

Synthese und biologische Evaluierung von fluorierten und carbaanalogen Glycopeptiden für die Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Im Promotionsfach Organische Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz

Sarah Wagner

geboren in Saarbrücken

Mainz, März 2012

Tag der Prüfung: 05.04.2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von Januar 2009 bis März 2012
am Institut für Organische Chemie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
durchgeführt.

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an
interessant zu werden, wo sie aufhört.“

Justus von Liebig

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs - Merkmale und Behandlung	1
1.2	Aktive und passive Immuntherapie	4
1.3	Mucine in der aktiven Immuntherapie	8
1.4	Antigenanaloge zur Entwicklung von tumorspezifischen Vakzinen	14
1.5	Biologisch aktive Fluor- und Carbazucker	16
2	Zielsetzung	19
3	Allgemeiner Teil	23
3.1	Strukturell modifizierte Kohlenhydratantigene	23
3.1.1	Synthese der fluorierten Glycosylaminosäuren	23
3.1.2	Synthese der carbaanalogen Glycosylaminosäuren	49
3.2	Synthese und biologische Evaluierung von Antitumorvakzinen mit fluorierten Kohlenhydratantigenen	72
3.2.1	Synthese der fluorierten Glycopeptide	73
3.2.2	Synthese und biologische Evaluierung der fluorierten MUC1-Glycopeptid-Konjugate	89
4	Zusammenfassung	119
5	Experimenteller Teil	129
5.1	Allgemeines und Messgeräte	129
5.2	Immunologische Evaluierung- Materialien	133
5.3	Synthese der modifizierten Glycosylaminosäuren.....	136
5.3.1	Synthesen zu Kapitel 3.1.1	136
5.3.2	Synthesen zu Kapitel 3.1.2	179
5.4	Synthese der Glycopeptidkonjugate und deren Immunologische Evaluierung	202
5.4.1	Synthesen zu Kapitel 3.2.1 und 3.2.2	202
5.4.2	Immunologische Evaluierung- Methoden	231
5.4.3	Immunologische Evaluierung-Ergebnisse	234
6	Literaturverzeichnis	239

Abkürzungsverzeichnis

[α]	spezifischer Drehwert	DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
Abb.	Abbildung	DMAP	4-Dimethylaminopyridin
absol.	absolut	DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
Ac	Acetyl-	DMSO	Dimethylsulfoxid
Ac ₂ O	Acetanhydrid	dt	Dublett von Triplett
Ala, A	Alanin	ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
AS	Aminosäure	Et	Ethyl
arom.	aromatisch	EtOAc	Ethylacetat
Asn, N	Asparagin	ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
Asp, D	Asparaginsäure	ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
Äquiv.	Äquivalente	FD-MS	Field-desorption-Massenspektrometrie
arom.	aromatisch	Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
b	breit	Gal	D-Galactose
ber.	Berechnet	gef.	gefunden
Bn	Benzyl	ges.	gesättigt
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl	Gln, Q	Glutamin
BSA	Bovine Serum Albumin	Glu, E	Glutaminsäure
Bzn	Benzylidnacetal	Gly	Glycin
c	Konzentration	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
COSY	Correlated Spectroscopy	HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Cys, C	Cystein	⁶ Hex	Cyclohexan
δ	chemische Verschiebung	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
d	Tag	HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
ddd	Dublett, Dublett von Dublett, Dublett von Dublett von Dublett	HOAc	Essigsäure
DAST	<i>N,N</i> -Diethylamino-schwefeltrifluorid	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
DC	Dünnschichtchromatographie	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Deoxofluor	[Bis(2-methoxyethyl)-amino]schwefeltrifluorid	Raumtemp.	Raumtemperatur
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>		
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure		
HPLC	High Performance Liquid Chromatography		

Abkürzungsverzeichnis

Hz	Herz	quant.	quantitativ
Kat.	katalytisch	R	Rest
Lit.	Literatur	R _f	Retentionsfaktor für
Lsg.	Lösung		Dünnschichtchromatogramme
M	Molarität	RP	Reversed phase
m	Multipllett	R _t	Retentionszeit
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight	s Ser, S t	Singulett Serin Tripllett
Me	Methyl	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
MeCN	Acetonitril	<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
MeOH	Methanol	TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyluroniumtetra- fluoroborat
MHz	Megahertz		
min	Minute		
MS	Molekularsieb	<i>tert</i>	tertiär
Mes	Methansulfonat	TFA	Trifluoressigsäure
N	Normale	Thr, T	Threonin
NaOMe	Natriummethanolat	TIS	Triisopropylsilan
NeuNAc	N-Acetylneuramin- säue	Tf Trp, W	Trifluormethansulfonat Tryptophan
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	Trt	Trytil
NMP	<i>N</i> -Methyl-2- pyrrolidon	TOCSY UV	<i>Total Correlation Spectroscopy</i> Ultraviolett
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>	Val, V Z	Valin Benzyloxycarbonyl
NOESY	<i>Nucler Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>		
Nosyl	<i>p</i> -Nitrosulfonat		
org.	organisch		
Phe, F	Phenylalanin		
pos	positiv		
ppm	parts per million		
Pro, P	Prolin		
q	Quartett		

1 Einleitung

1.1 Krebs - Merkmale und Behandlung

Schätzungen des Robert Koch-Institutes zufolge, ist noch immer jeder vierte Todesfall in Deutschland auf eine Krebserkrankung zurückzuführen.^[1] So gab es im Jahr 2010 allein in Deutschland etwa 450.000 Neuerkrankungen, davon 246.000 Männer und 204.000 Frauen. Im Jahre 2006 verstarben knapp 211.000 Menschen an den Folgen maligner Tumore, so dass Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen bereits die zweithäufigste Todesursache ist.^[1, 2] Während Frauen meist an Brustkrebs erkranken, treten bei Männern am häufigsten bösartige Geschwulste der Lunge, der Prostata und des Dick- und Mastdarms auf.

Prinzipiell unterscheidet man bei Krebs zwischen benignen und bösartigen Tumoren. Als benigne wird ein Tumor bezeichnet, wenn kein gesundes Gewebe durch das Geschwulst zerstört wird und keine Metastasen entstehen. Diese Art von Tumoren können meist durch einen operativen Eingriff leicht entfernt werden. Maligne Tumore vermehren sich hingegen unkontrolliert und halten sich nicht an Gewebsgrenzen, sie brechen dabei in gesunde Organe und Gefäße ein und zerstören diese (Infiltration). Krebs und die damit verbundene unkontrollierte Proliferation von Zellen kann auf eine Vielzahl von Ursachen zurückgeführt werden. Um dies zu erläutern, sollen zunächst die sechs wichtigsten Kennzeichen einer Krebserkrankung dargestellt werden.^[3]

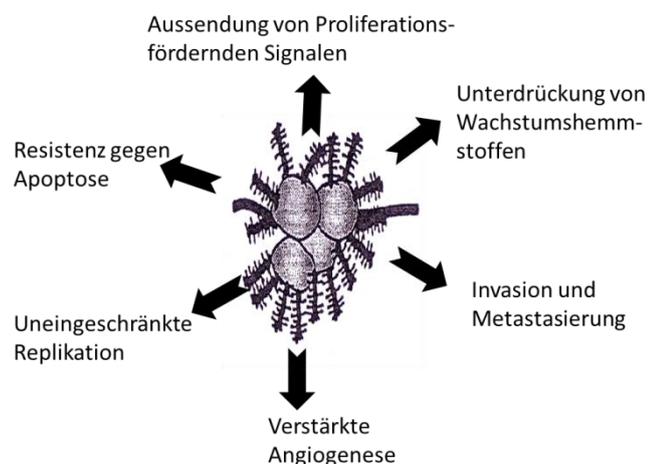


Abb. 1.1: Merkmale einer Krebszelle

In gesunden Zellen läuft die Zellteilung streng reguliert ab, so dass die Zellanzahl immer gleich bleibt. Wie in Abb. 1.1 zu erkennen ist, haben Krebszellen Wege gefunden, dieser kontrollierten Zellteilung zu entgehen, indem es ihnen z.B.: durch die selbständige Produktion von Wachstumshormonen möglich ist, sich der Kontrolle durch negative Rückkopplung zu entziehen. Zudem ist in gesunden Zellen die Anzahl der möglichen Zellzyklen limitiert. Dies ist auf Telomere zurückzuführen, welche an den Enden der Chromosomen sitzen. Bei jeder Zellteilung werden diese Telomere verkürzt. Erreichen sie schließlich eine bestimmte Länge, so kann sich die Zelle nicht mehr weiter teilen. Es kommt entweder zum Wachstumsstopp der Zelle oder zur direkten Einleitung der Apoptose. In Krebszellen hingegen liegt das Enzym Telomerase, das in der Lage ist, die Enden der Telomere wieder zu verlängern, stark überexprimiert vor, wodurch Krebszellen zu einer uneingeschränkten Replikation befähigt sind.^[3, 4] Neben den proliferationsfördernden Merkmalen liegen der Entwicklung von Krebs häufig auch antiapoptotische Mechanismen zugrunde. Antiapoptotische Signale können z.B. auf eine Mutation in sogenannten Tumorsuppressorgenen wie dem RB-(retinoblastima-associated) und dem TP 53-Protein zurückgeführt werden.^[5] Diese sind in Normalzellen dafür verantwortlich, den Zellzyklus z.B. nach oxidativem Stress oder Genschäden zu stoppen. Durch eine Fehlfunktion bzw. Mutation sind diese Proteine jedoch nicht in der Lage, die Apoptose einzuleiten. Neben der Fehlfunktion von Tumorsuppressorgenen führt in Krebszellen auch eine Überexpression von antiapoptotischen Proteinen wie dem Bcl2 zu einer Verhinderung des Zelltods.^[6] Um die ausreichende Versorgung der schnell wachsenden Tumorzellen sicherzustellen, können Tumorzellen zusätzlich Wachstumsfaktoren (VEGF-A) für die Ausbildung von Gefäßstrukturen (Angiogenese) vermehrt produzieren.^[7] Durch diese Mechanismen, die meist durch Schäden auf der Genebene ausgelöst werden, kommt es schließlich zu einem unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen und durch das Ablösen von Metastasen zur Bildung weiterer Tochtergeschwülste. Ausgelöst werden können all diese krankhaften Veränderungen des Erbgutes durch die Einwirkung von schädigenden Strahlungen z.B. UV- und radioaktive Strahlung, durch krebserregende Chemikalien sowie durch Bakterien bzw. Viren.

Da die verschiedensten Gewebe und Organe von Krebs befallen werden können und es neben lokal begrenzten Tumorarten auch Krebsarten gibt, die sich systemisch im Körper verteilen, so z.B. die Leukämie, variieren die möglichen Behandlungsformen und die damit verbundenen Überlebenschancen sehr stark. Bei einfach zugänglichen Geschwulsten wird meist über einen gezielten operativen Eingriff versucht, die Tumormasse komplett zu entfernen bzw. weitest möglich zu verkleinern. Im Anschluss daran kann über eine gezielte

Strahlen- bzw. Chemotherapie das übrige maligne Gewebe einschließlich eventuell vorhandener Metastasen bekämpft werden. Beide Therapieformen stützen sich dabei auf die hohe Teilungsaktivität der Tumorzellen. So sind diese dadurch wesentlich strahlungsempfindlicher als gesunde Zellen. Zum Einsatz kommt bei dieser Therapieform neben der Protonen- und Ionenstrahlung auch Mikrowellenstrahlung, die den Tumor durch Aufheizen des Gewebes zerstören soll. Auch die Chemotherapie greift vor allem Zellen in der Teilungsphase an. Die dabei verabreichten Medikamente, sogenannte Zytostatika, wirken vor allem auf die DNA bzw. auf die in den Zellteilungsprozess eingebundene Proteine und Enzyme. Prominente Beispiele dafür sind zum Einen Mitosehemmer, die das für die Zellteilung notwendige Protein Tubulin inhibieren, sowie Platinanaloga, die in der Lage sind, die DNA-Stränge zu vernetzen, wodurch keine Zellteilung mehr möglich ist.

Allerdings sind sowohl die Radiotherapie als auch die Chemotherapie nicht tumorspezifisch, so dass in den meisten Fällen auch gesundes Gewebe beeinträchtigt wird und die Patienten meist unter sehr starken Nebenwirkungen leiden. Dies gilt vor allem für den Einsatz von Zytostatika, da diese auf alle teilungsaktiven Zellen im Körper wirken, somit auch die gesunden Zellen der Haare, Haut und vor allem des Knochenmarks schädigen. Neben den eher unangenehmen Nebenwirkungen wie Haarausfall und Übelkeit kommt es dadurch auch oft zu ernsthaften Schädigungen der Organe, vor allem des Knochenmarks. Dies kann zu einer deutlichen Schwächung des Immunsystems führen, was sich in einer höheren Infektionsanfälligkeit der Patienten niederschlägt, die den weiteren Krankheitsverlauf negativ beeinflusst.

Daher ist es notwendig eine spezifische Krebstherapie zu entwickeln, die gezielt auf Tumorzellen wirkt und dabei das gesunde Gewebe verschont. So konnte durch das bessere Verständnis der Krebsentstehung ein erster Impfstoff gegen diese Krankheit auf den Markt gebracht werden. Für dessen Entwicklung wurde im Jahre 2008 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Der Impfstoff verhindert dabei den Ausbruch des durch humane Papilomviren (HPV) ausgelösten Gebärmutterhalskrebses, wodurch ein wichtiger Durchbruch im Kampf gegen diese Erkrankung erzielt werden konnte.^[8] Daneben wäre es erstrebenswert, eine Tumormimmuntherapie zu entwickeln, welche im Gegensatz zu antiviralen bzw. antibakteriellen Vakzinen^[8] nicht prophylaktisch wirkt, sondern in der akuten Therapie zum Einsatz käme. Dabei kann man zwischen der aktiven und der passiven Immuntherapie unterscheiden. Letztere beruht, neben dem Austausch von Zellen des Immunsystems, auf der Applikation von tumorspezifischen Antikörpern, durch welche eine Lyse der Tumorzellen bewirkt werden sollte. Dahingegen sollte in einer aktiven Immuntherapie durch die

Verabreichung von tumorselektiven Antigenen eine starke humorale und zelluläre Immunantwort des Körpers gegen den Tumor ausgelöst werden. In beiden Fällen würde das Immunsystem des Menschen selektiv gegen tumoröses Gewebe aktiviert werden, wobei das gesunde Gewebe nicht beeinträchtigt würde.

1.2 Aktive und passive Immuntherapie

Zur Entwicklung einer passiven Immuntherapie wurden bereits eine Reihe von monoklonalen Antikörpern über die Immunisierung von Mäusen mit Tumorzellen oder Membranlysaten erzeugt.^[9] Erste vorklinische Studien dieser Antikörper im Mausmodell lieferten auch sehr ermutigende Ergebnisse. So konnte durch Behandlung entsprechender Mäuse mit dem SM3-Antikörper ein deutlich verlangsamtes Tumorstadium bei Brustkrebs beobachtet werden.^[10, 11] Dennoch schafften es in den letzten fünf Jahren nur wenige dieser monoklonalen Antikörper in klinischen Studien, die zumeist mangels Wirksamkeit rasch wieder eingestellt wurden, (so z.B. im Falle eines gegen Bauchspeicheldrüsenkrebszellen gerichteten Antikörpers).^[9, 12] Um die Wirksamkeit dieser Behandlungsform zu erhöhen, wird die Immuntherapie häufig mit der konventionellen Strahlentherapie kombiniert, indem die monoklonalen Antikörper mit radioaktiven Kernen versehen werden, die gezielt das tumoröse Gewebe zerstören sollen. Dafür wurden sowohl β -Strahler wie Yttrium-90 bzw. Iod-131 als auch entsprechende α -Strahler wie Bismuth-213 und Astat-211 eingesetzt. Die α -Strahlung besitzt dabei den Vorteil einer wesentlich geringeren Reichweite, so dass sie eine höhere Selektivität als β -Strahlung aufweist und umgebendes Gewebe weniger geschädigt wird.^[13] So konnte in entsprechenden *in vitro* Studien eine hohe Cytotoxizität solcher ²¹³Bi-tragender Antikörper gegen tumoröse Bauchspeicheldrüsenzellen festgestellt werden,^[14] klinische Studien mit einem ⁹⁰Y-makierten Antikörper belegten hingegen keine therapeutische Wirksamkeit.^[15] Dennoch ist diese Therapieform so vielversprechend, dass gegenwärtig weitere klinische Studien mit radioaktiv markierten monoklonale Antikörper laufen.

Unter einer aktiven Immuntherapie hingegen wird die Verabreichung einer antigenen Struktur verstanden, die das menschliche Immunsystem in die Lage versetzen soll, selektiv den Tumor zu bekämpfen. Die aktive Tumorummuntherapie wird dabei in Kombination mit der klassischen chirurgischen Behandlung eingesetzt, um verbleibende Tumorzellen und Metastasen zu bekämpfen. Zusätzlich wäre die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses wünschenswert, da so das erneute Ausbrechen der Krankheit verhindert

werden könnte.^[2] Die dafür zur Verfügung stehenden potentiellen Vakzine kann man grob in vier Klassen aufteilen:^[16]

- Vakzine bestehend aus Tumorzellen
- Vakzine basierend auf dendritischen Zellen
- Antigen-spezifische Vakzine
- Vakzine basierend auf viralen Vektoren und cDNA

Neben der Stimulierung einer starken tumorspezifischen Immunantwort sollten diese Vakzine auch in der Lage sein, die durch den Tumor ausgelöste Immunsuppression zu überwinden. Diese kommt zum einen dadurch zustande, dass es sich bei tumorassoziierten Antigenen um körpereigene Strukturen handelt, die vom Immunsystem toleriert werden. Zusätzlich ist der Tumor in der Lage weitere immunsuppressive Mechanismen in Gang zu setzen, die eine erfolgreiche Aktivierung des Immunsystems verhindern. So werden von Tumorzellen vermehrt immunsuppressive Cytokine (bspw. TGF- β) sekretiert, die die Toleranzschwelle des Immunsystems gegenüber dem malignen Gewebe erhöhen. Hinzu kommen das Fehlen von kostimulierenden Molekülen auf der Tumorzelle und eine verminderte Antigenpräsentation aufgrund einer geringeren HLA-Expression. Auch das Wachstum der Tumore an Orten, die für das Immunsystem schlecht zugänglich sind, verhindert oft eine selbständige und aktive Bekämpfung durch das Immunsystem.^[17] Um diese Toleranzschwelle brechen zu können, ist die Aktivierung des humoralen und des zellulären Teils des Immunsystems unabdingbar. Hierzu müssen die Vakzine sowohl eine starke cytotoxische T-Zellantwort, als auch eine durch T-Helferzellen vermittelte Antikörperproduktion hervorrufen, wobei letztere schließlich auch zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führt.

Antikörper werden von differenzierten B-Zellen produziert, welche wiederum zu ihrer Aktivierung sowohl die Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor, als auch eine Wechselwirkung mit CD4-positiven T-Helferzellen benötigen. Nach Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor wird dieses über Endocytose in die Zelle aufgenommen. Nach Prozessierung können anschließend entsprechende Antigenfragmente über MHC-II-Komplexe (major histocompatibility complex) auf der Zelloberfläche präsentiert und von T-Helferzellen erkannt werden. Diese liefern dann über weitere Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen und durch Ausschüttung von Cytokinen die notwendigen kostimulierenden Signale. Als Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung ist z.B. die Interaktion des CD40-Rezeptors der B-Zelle mit dem entsprechenden CD40L-Liganden und die des B7-Rezeptors mit dem CD28 Liganden der T-Helferzelle zu nennen. Zu den wichtigsten Cytokinen zählen z.B. IL-2, IL-4, IL-6 sowie TNF- α und TNF- β , deren Sekretion schließlich

die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle zu antikörperbildenden Zellen und Gedächtniszellen einleitet (Abb. 1.2). Die so gebildeten Antikörper sind schließlich in der Lage, Antigene auf Tumorzellen bzw. Metastasen selektiv zu erkennen und zu binden, wodurch schließlich die Krebszellen von Phagozyten (Makrophagen) als körperfremd erkannt und lysiert werden können.^[18]

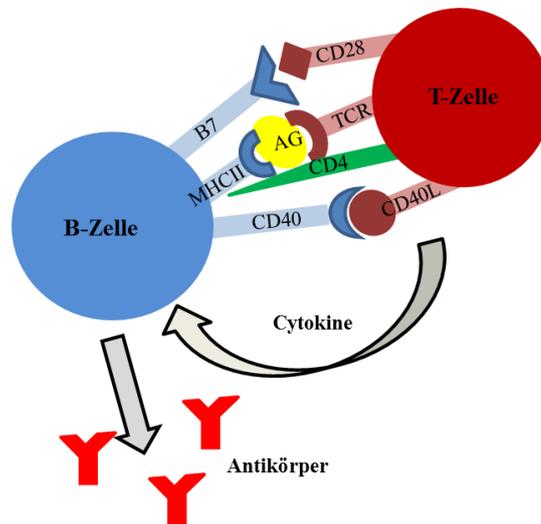


Abb. 1.2 Aktivierung der B-Zelle über die T-Zell vermittelte humorale Immunantwort

Die zweite Klasse von T-Zellen, die dem humoralen Teil des Immunsystems angehören, sind die sogenannten cytotoxische T-Zellen. Im Gegensatz zu den $CD4^+$ -T-Zellen tragen diese T-Zellen an ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TCR) zur spezifischen Erkennung von Antigenstrukturen, die über die MHC-I-Komplexe auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) dargeboten werden. Auch hier sind zur Aktivierung der cytotoxischen T-Zelle weitere Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, wie die Interaktion des B7-Liganden der APC-Zelle mit dem CD28-Rezeptor der T-Zelle und die Sekretion von kostimulierenden Cytokinen (IL-1, IL-2) notwendig.

Erste Versuche, ein Antitumorvakzin zu entwickeln, gehen auf den Einsatz von körpereigenen Tumorzellen zurück. Diese wurden zunächst aus dem tumorösen Gewebe des Patienten entnommen, durch Bestrahlung abgetötet und schließlich wieder injiziert. Ein großer Vorteil dieser Methode war, dass keine spezifischen Antigene identifiziert werden mussten, da die injizierte Tumorzelle praktisch alle möglichen Antigene tragen sollte. Von Nachteil hingegen war neben der Gefahr einer Autoimmunreaktion^[15] auch die geringe Immunogenität der abgetöteten Zellen. Daher wurden diese Zellen genetisch derart verändert, dass sie in der Lage waren, kostimulatorische Signale auszusenden.^[19, 20] Dennoch konnte sich diese Methode bis heute nicht durchsetzen, was vor allem auf die hohen Kosten solch einer personalisierten Behandlungsmethode und die schwierige und intensive Laborarbeit zurückzuführen ist.

Zudem gestaltet es sich häufig schwierig, geeignete Methoden zum Nachweis einer spezifischen Immunantwort zu entwickeln.^[19]

Eine weitere mögliche Immuntherapie beruht auf der Vakzinierung mit dendritischen Zellen. Diese sind als Teil des Immunsystems vor allem für die Antigenprozessierung und Präsentation zuständig. Zusätzlich können sie durch die Ausschüttung von Cytokinen die Aktivierung von T-Zellen in der zellulären Immunabwehr verstärken. In der Immuntherapie werden dendritische Zellen eingesetzt, die zuvor mit Tumorlysaten^[21] bzw. Tumorproteinextrakten^[22] versetzt oder mit RNA transfiziert worden sind.^[19] Eine große Hürde bei dieser Therapieform stellt neben der Entwicklung von geeigneten Methoden für die Darstellung auch die Suche nach geeigneten Verabreichungsformen der dendritischen Zellen dar.^[15]

In der auf spezifische Antigene gestützten Immuntherapie müssen die potentiellen Antigene zunächst mehrere Voraussetzungen erfüllen. So muss z.B. gewährleistet sein, dass die Antigene hochgradig tumorspezifisch sind. Ist dies nicht der Fall, könnte das Immunsystem nicht zwischen malignen und gesunden Zellen unterscheiden, und es käme durch den Angriff auf das gesunde Gewebe zu einer Autoimmunreaktion. Des Weiteren muss das Immunsystem in der Lage sein, die verabreichten Antigene als fremd zu erkennen und eine starke Immunantwort auszulösen. In den letzten 50 Jahren wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen tumorspezifischen Antigenen entdeckt.^[23] Dabei handelt es sich z.B. um auf Tumorzellen stark überexprimierte Strukturen oder um solche, die durch eine post-translationelle Modifikationen bzw. Genmutation entstanden sind.^[24] Aufgrund der Vielzahl an möglichen Antigenstrukturen wurde 2009 von einer Arbeitsgruppe des *National Cancer Institute (Translation Research Working Group)* eine Prioritätsliste dieser Antigene nach verschiedenen rationalen Kriterien aufgestellt. Berücksichtigt wurde dabei unter anderem:^[23, 25]

- Anzeichen einer Antitumoraktivität in klinischen Studien
- Anzeichen einer Immunantwort *in vivo*
- Spezifität des Antigens (Expression auf der Tumorzelle)
- Häufigkeit des Antigens

Nach Auswertung dieser Daten gelangt das epitheliale Mucin MUC1 auf Platz zwei der Prioritätenliste und stellt somit ein besonders vielversprechendes Antigen für die Entwicklung tumorspezifischer Vakzine dar.^[25] Bei MUC1 handelt es sich um ein Glycoprotein, welches

auf Tumorzellen in hohem Maße überexprimiert vorliegt und sich zudem durch eine charakteristisch veränderte Oberflächenstruktur auszeichnet.^[26, 27, 28, 29, 30]

1.3 Mucine in der aktiven Immuntherapie

Das Wort Mucine stammt aus dem Lateinischen und bedeutet so viel wie „der Schleim“. Bei den Mucinen handelt es sich um polymorphe, hochgradig *O*-glycosylierte Zelloberflächen-Glycoproteine, wobei ihr Kohlenhydratanteil 50 bis zu 90 Gewichtsprozent betragen kann.^[31] Mucine werden von den meisten Epithelzellen des Verdauungs- und Bronchialtraktes zum Schutz der Zelloberfläche gegen die Einwirkung von Pathogenen, Enzymen, hohen Ionenkonzentrationen und Säuren exprimiert.^[2] Die Klasse der 21 bis heute bekannten Mucine wird in zwei große Gruppen eingeteilt: Zum einen in die der sekretorischen (schleimbildenden) Mucine und zum anderen in die der membrangebundenen Proteine. Das membrangebundene Mucin MUC1 wurde als erstes Mucin durch Verwendung von monoklonalen Antikörpern aus humaner Milch isoliert^[32, 33] und konnte später in seiner tumorassoziierten Form auf vielen Krebszellen nachgewiesen werden. MUC1 wird nach seiner Transkription im endoplasmatischen Retikulum in zwei Untereinheiten gespalten (α und β), welche jedoch als Heterodimer über nichtkovalente Wechselwirkungen an der Zelloberfläche miteinander verbunden sind.^[9] Die bürstenförmige extrazelluläre Domäne erstreckt sich dabei 200 bis 800 nm in das Lumen hinein^[34] und besitzt neben ihrer protektiven Wirkung auch zusätzlich Funktionen in der durch β -Catenin vermittelten Interaktion mit dem Cytoskelet (Zell-Zell-Adhäsion).^[35, 36] Die cytoplasmatische Domäne hingegen, welche über eine hydrophobe Transmembrandomäne fest in der Zellmembran verankert ist, spielt durch die Vielzahl der möglichen Phosphorylierungsstellen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion.^[37] Da die dem Lumen zugewandte extrazelluläre Domäne lediglich über nichtkovalente Bindungen mit dem intrazellulären Teil verbunden ist, kann diese in das Serum abgegeben werden. Das lösliche MUC1 (CA15-3) kann im Serum nachgewiesen werden und dient damit als Tumormarker in der Krebsdiagnostik.^[9, 34, 38] Diese Domäne ihrerseits besteht aus 20-125 Wiederholungen der für die Mucine typischen *tandem-repeat*-Sequenz (*variable number of tandem repeat* „VNTR“),^[27] die für jedes der Mucine unterschiedlich bezüglich der Länge, der Sequenz und der Anzahl von Aminosäuren ist. Allerdings beinhalten alle diese VNTR eine große Zahl an potentiellen *O*-Glycosylierungsstellen in Form der Aminosäuren Serin und Threonin. Im speziellen Falle des MUC1 besteht die TR-Wiederholungseinheit aus 20 Aminosäuren, die mit ihren drei Threonin- und zwei

Serinbausteinen fünf solcher potentielle Glycosylierungsstellen aufweist (H-G-V-T-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P-P-A). Ihre lang gestreckte Konformation ist auf die hohe Zahl an helixbrechenden Aminosäurebausteinen Prolin und die komplexe Glycosylierung zurückzuführen. Der Grad der Glycosylierung ist dabei gewebsspezifisch und hängt zudem vom Entwicklungsstadium der Zelle ab. Die dabei auftretenden verschiedenen Glycosylierungsmuster lassen sich grob in acht Kernstrukturen unterteilen.^[27]

Core 1: β Gal-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Core 2: β Gal-(1,3)-[β GlcNAc-(1,6)-] α GalNAc-O-Protein

Core 3: β GlcNAc-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Core 4: β GlcNAc-(1,3)-[β GlcNAc-(1,6)-] α GalNAc-O-Protein

Core 5: α GalNAc-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Core 6: β GlcNAc-(1,6)- α GalNAc-O-Protein

Core 7: α GalNAc-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Core 8: α Gal-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Abb. 1.3 Core-Strukturen der O-Glycane bei Mucinen

Diese entstehen durch posttranslationale Modifikation der Proteine im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum, wobei in letzterem nur *N*-glycosidische Bindungen geknüpft werden. Die für das epitheliale MUC1 wichtigen Kernstrukturen Core1 und Core 2 werden in den Kompartimenten des *cis*-Golgi Apparates aufgebaut.^[27, 39] Dafür werden zunächst die Hydroxylfunktion des Serins und Threonins enzymatisch mit einem *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) Baustein verknüpft. Beim weiteren Durchlaufen des Golgi-Apparates erfolgt darauf aufbauend eine weitere Verlängerung der Kohlenhydratseitenketten um weitere Galactose bzw. Glucosebausteine. Im zweiten Teil des Golgi-Apparates, dem *trans*-Golgi, findet anschließend eine Terminierung des Kettenwachstums durch Anbindung von Fucose oder Sialinsäure bzw. durch Sulfatierung statt. Die somit entstehenden komplexen Kohlenhydratseitenketten sorgen für eine lange gestreckte Konformation der Mucine auf der apicalen Zelloberfläche. Zudem sind sie in der Lage, das Peptidrückgrat effektiv gegenüber dem Immunsystem abzuschirmen.

In Tumorzellen hingegen besitzt das Mucin MUC1 nicht nur ein wesentlich verändertes Glycosylierungsmuster, es wird zudem stark überexprimiert und liegt nicht mehr ausschließlich auf der apicalen, sondern der gesamten Zelloberfläche vor. (Abb. 1.4) Die veränderte Oberflächenstruktur begünstigt zudem die für Tumorzellen charakteristische Bildung von Metastasen. Dies ist unter anderem auf die Inhibierung von der durch

Integrine^[40] vermittelte Zell-Adhäsion mit der extrazellulären Matrix und die Inhibierung der Zell-Zell Kontakte, vermittelt durch E-Cadherin,^[41] zurückzuführen.

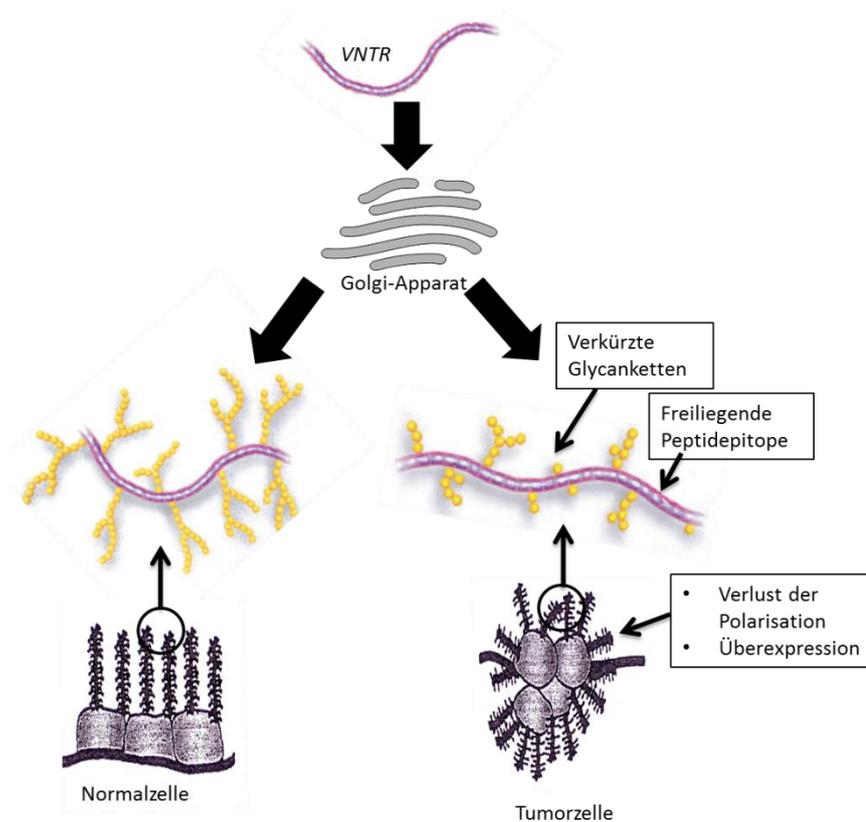


Abb. 1.4 Lokalisation und Struktur des Glycoproteins MUC1 auf normalen und Tumorepithelzellen

Das veränderte Glycosylierungsmuster vieler Krebszellen ist auf eine abweichende Expression von Glycosyl- und Sialyltransferasen zurückzuführen. So liegen in vielen Krebszellen, wie beispielsweise der Brustkrebszelllinie T47D, stark verkürzte Kohlehydratseitenketten vor (Abb. 1.5). Dabei nehmen das T_N-Antigen (B) 8% und das T-Antigen (D) 59% des gesamten Kohlenhydratanteils ein. Dem sialylierten 2,3-ST-Antigen (E) kommt immerhin noch ein Anteil von 33% zu.^[42, 43] Diese verkürzten Glycanstrukturen sind vor allem auf eine verminderte Aktivität der Glucosaminytransferase (β -1,6-GlcNAc-Transferase) und der β -1,3-Galactosyltransferase (β -1,3-Gal/ T-Synthetase) zurückzuführen. Ursache für letzteres kann zum einen eine direkte Genmutation der T-Synthetase oder die fehlende Expression des Hitzeschockproteins Cosmc sein, die mit einer Fehlfaltung des Enzymes einhergeht.^[44, 45, 46] Eine zusätzlich Überexpression der beiden Sialyltransferasen (α -2,6-Sia und α -2,3-Sia-Transferase)^[2, 47] führt dann zu einem frühzeitigen Abbruch der Kettenverlängerung, der meist schon auf der Stufe der Core1 Struktur erfolgt. Diese stark verkürzten tumorassoziierten Antigene (TAA) sind in Abb. 1.5 (A-E) dargestellt. Erwähnenswert ist zudem, dass das Sialyl-T_N-Antigen (A) vor allem auf Darm-, Magen-,

Ovarial- und Mammakarzinomen vermehrt exprimiert wird,^[48] wohingegen die regioisomeren (2,3)-Sialyl-T- und (2,6)-Sialyl-T-Antigene (E und C) auf der Oberfläche von Leukozyten im Falle einer akuten myeloiden Leukämie auftreten.^[48] Wie in Abb. 1.4 zu erkennen ist, umhüllen diese verkürzten Glycanketten das Peptidrückgrad weniger effektiv, und es kommt zu einer Freilegung von bisher verborgenen Peptidepitopen. Zwei solcher bekannten immundominanten Peptidepitope stellen z.B. die GSTA und die PDTRP-Sequenz^[49] dar, wobei letztere in einer durch Glycosylierung induzierten *turn*-Struktur vorliegt.^[50]

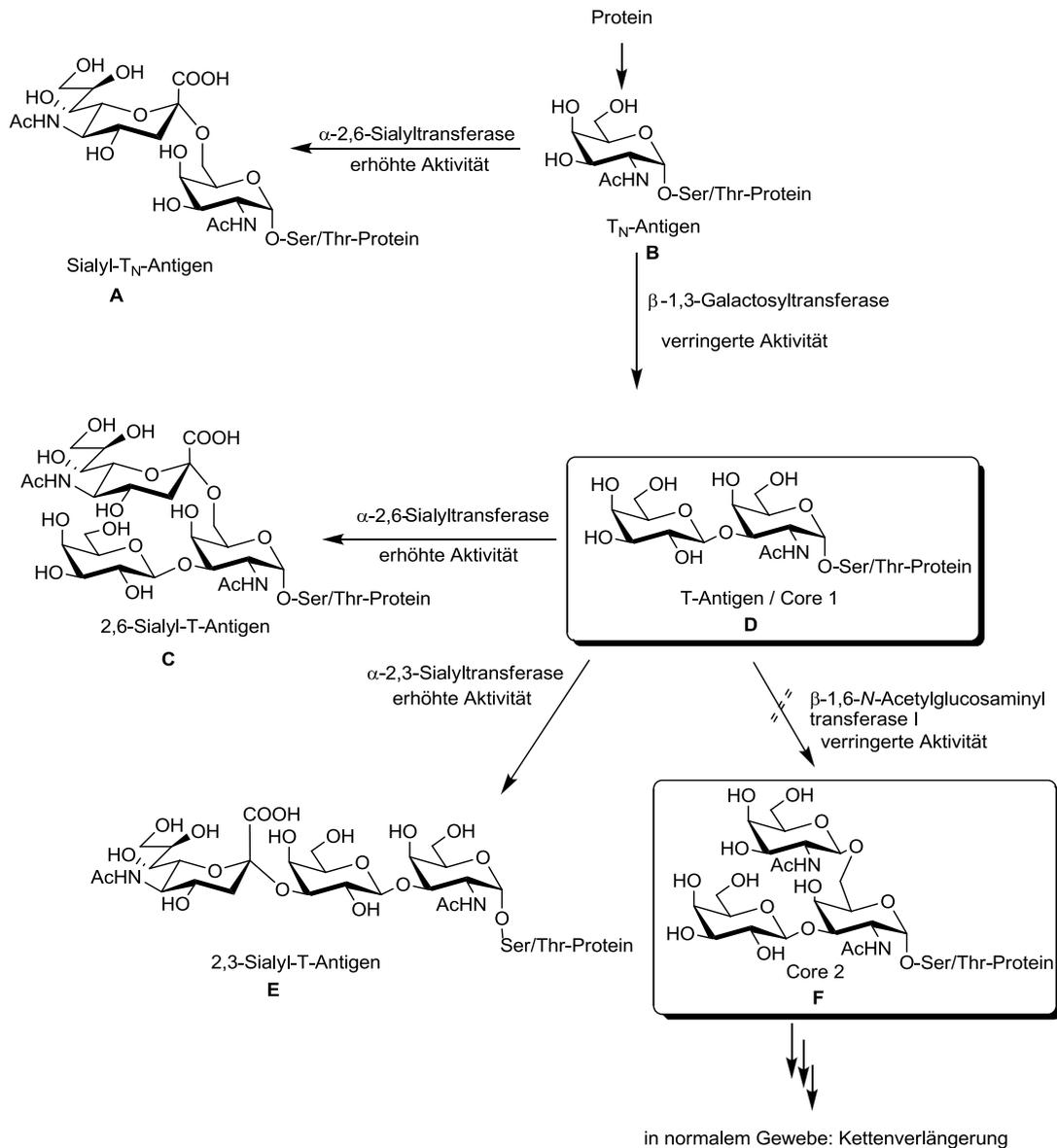


Abb. 1.5 O-Glycosylierung in gesunden Zellen und Krebszellen^[39]

Zur Entwicklung von tumorspezifischen Vakzinen ist es wichtig, dass Antigene identifiziert werden, die die Tumorzellen eindeutig von gesunden Zellen unterscheiden. Da MUC1 auf Tumorzellen stark überexprimiert vorliegt und sich zudem durch veränderte Kohlenhydratstrukturen und die damit verbundene Freilegung von Peptidepitopen

auszeichnet, stellt es einen interessanten Angriffspunkt für die Immuntherapie dar. Allerdings ist es nicht möglich, exakt definierte MUC1 Strukturen aus biologischen Quellen zu isolieren.^[51, 52] Daher ist es notwendig, diese Glycopeptidantigene mittels organischer Synthese herzustellen.

Bei dem auf MUC1 basierenden Glycopeptiden handelt es sich um körpereigene Strukturen, die vom menschlichen Immunsystem allein meist nur eingeschränkt bzw. gar nicht angegriffen werden können. In den letzten Jahren wurden dennoch erste Vertreter synthetischer Glycopeptid-Vakzine von den Arbeitsgruppen um *Kunz*^[53, 54, 55, 56], *Kihlberg*^[57] und *Boons*^[58] vorgestellt, die alle auf dem Einsatz von B-Zell-Epitopen mit mucinanaloge Kohlenhydrat-Antigenen wie z.B. T_N, T-, ST_N oder ST-Antigen (Abb. 1.5) beruhen. Zudem kamen neben den erwähnten mucinanaloge Antigenen auch komplexere Oligosaccharidstrukturen, wie z.B. das Lewis^y-Antigen,^[52] als Vakzinbaustein zum Einsatz. Um die in Kapitel 1.2 erwähnte robuste, von T-Helferzellen vermittelte, Antikörperproduktion und eine starke cytotoxische T-Zellantwort zu gewährleisten, wurden die nur schwach immunogenen, tumorassoziierten Glycopeptid-Antigene an spezielle das Immunsystem stimulierenden Strukturen gebunden. Neben starkimmunogenen Carrierproteinen (TTox, KLH) oder T-Zellen stimulierenden Proteinen (T-Zell-Epitope) kamen hierfür Toll-like-Rezeptor-Agonisten zum Einsatz.^[19, 52, 59, 60]

Ein Beispiel für ein solches synthetisches Vakzin, das bereits Eingang in klinische Studien der Phase I gefunden hat, ist in Abb. 1.6 a gezeigt. Dabei handelt es sich um ein Trimer des T_N-Antigens, welches über einen Abstandhalter an das immunogene Trägerprotein, dem Hämocyanin der Schlüssellock-Napfschnecke (keyhole limpet hemocyanin, KLH), konjugiert wurde. In Kombination mit dem Adjuvans QS21 konnten hohe Titer an IgM und IgG-Antikörpern erhalten werden.^[61, 62]

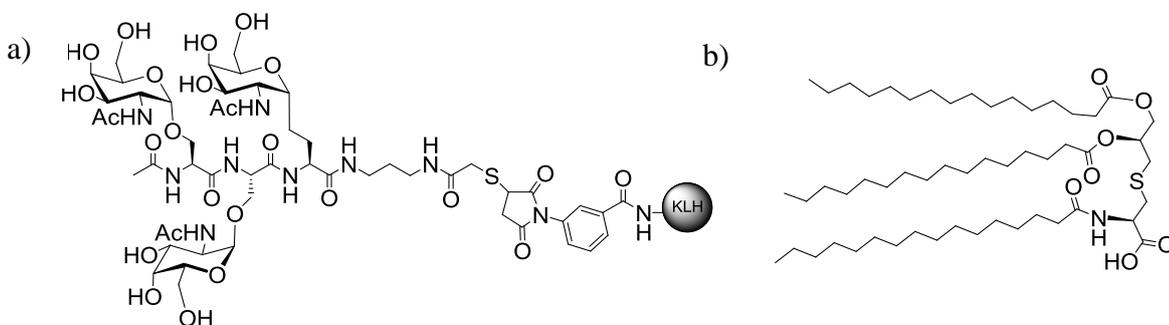


Abb. 1.6 a) schematisches Beispiel eines synthetischen Glycopeptid-Vakzins,^[61] b) Pam₃Cys-Lipopeptid

Die schon angesprochenen Toll-like-(TL)-Rezeptor-Liganden, deren Bindung an den entsprechenden TL-Rezeptor eingehen und zu einer Ausschüttung von Cytokinen führen, sind

in der Lage dendritische Zellen, Makrophagen und auch B-Zellen zu aktivieren.^[63, 64, 65] Bei solch einem Ligand handelt es sich um das Lipopeptid Pam₃Cys (Abb. 1.6b), das sowohl von der Gruppe um *Kunz*^[59, 60], *Boons*^[66] als auch *Payne*^[67] für die Entwicklung von Krebsvakzinen eingesetzt wurde. Dieses wurde mit einem T_H-Zell-Epitop sowie einem entsprechenden B-Zell-Epitop aus dem Mucin MUC1 kombiniert. *Boons* verwendete dabei eine einfach glycosylierte Teilsequenz während *Payne* die vollständige und mehrfach glycosylierte *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 einsetzte. Beide Vakzine waren in der Lage eine starke Immunantwort in Mäusen zu induzieren. Zudem konnte die Bindung der induzierten Antikörper an Brustkrebszellen der Linie MCF-7 nachgewiesen werden.^[66, 67] Ein weiteres mögliches Carrierprotein neben KLH stellt das Tetanus-Toxoid (TTox) dar. Dessen Verwendung bringt nicht nur eine stark erhöhte Immunogenität mit sich; auch der Einsatz dieser Vakzine im Menschen wird ermöglicht. In der Arbeitsgruppe *Kunz* wurde dieses Trägerprotein über einen nicht immunogenen Spacer mit einem glycosylierten B-Zell-Epitop aus der *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 kombiniert^[68, 69] (Abb. 1.7). Impfstudien in Mäusen zeigten eine starke toleranzbrechende Immunantwort. Hervorzuheben ist, dass die induzierten Antikörper nicht nur in der Lage waren Brustkrebszellen der MCF7 und T-47D Zelllinie zu erkennen, sondern dass mit Hilfe der Antikörper auch eine erfolgreiche Anfärbung von Gewebeschnitten aus Brustkrebstumoren durchgeführt werden konnte.^[70]

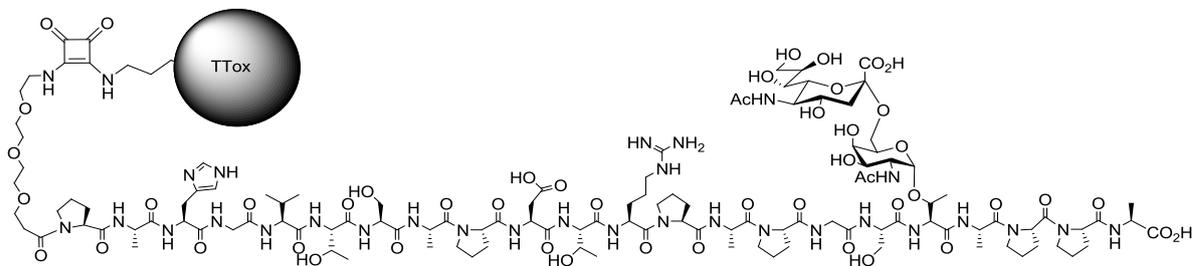


Abb. 1.7 Beispiel eines MUC1-Glycopeptid-Vakzins^[70]

1.4 Antigenanaloga zur Entwicklung von tumorspezifischen Vakzinen

Neben der relativ schwachen Immunogenität stellt auch die geringe (metabolische) Stabilität des Glycopeptid-Epitops ein Hindernis für dessen Einsatz in Krebsvakzinen dar. Die geringe metabolische und auch chemische Stabilität der natürlichen Glycopeptide kann auf die labile Kohlenhydrat-Acetalbindung zurückgeführt werden. So können diese Strukturen im sauren Milieu leicht gespalten werden bzw. unterliegen im Körper einem enzymatischen Abbau durch Glycosidasen. Beides geht mit einem Verlust der für die Tumorspezifität notwendigen Kohlenhydratseitenkette einher. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, beruht auf der Verwendung von nicht natürlichen Kohlenhydrat-Antigenen wie z. B. C- oder S-glycosidisch verknüpften Analoga.^[71, 72, 73, 74] (Abb. 1.8a) So wurde beispielsweise bereits C-Glycopyranosyl-Analoga des T_N-Antigens dargestellt, welche sich als (metabolisch) deutlich stabiler erwiesen.^[75, 76] Allerdings geht die Substitution des Sauerstoffes durch eine CH₂-Einheit oft mit einer erhöhten konformativen Flexibilität einher, die ihrerseits die biologische Erkennung/Aktivität negativ beeinflussen kann.^[77, 78]

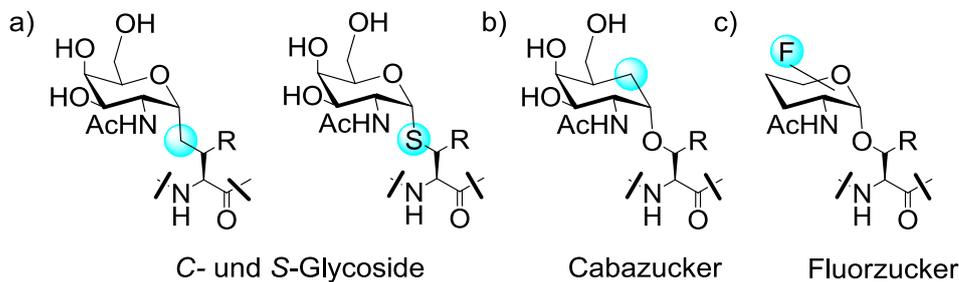


Abb. 1.8: Übersicht über metabolisch stabilere Kohlenhydratmimetika

Daneben lässt sich die (metabolische) Stabilität des Kohlenhydratepitops auch durch den gezielten Einbau von Fluorsubstituenten anstelle von Hydroxylgruppen im Kohlenhydratepitop erhöhen. (Abb. 1.8 c) Fluoratome können aufgrund ihres ähnlichen Durchmessers (1.47 Å) zur Hydroxylgruppe (1.40 Å), ebenso wie zu CO und OMe als „bioisoster“ angesehen werden. Durch eine Substitution mit Fluor sollte es also zu keiner sterischen Beeinflussung der Struktur kommen. Allerdings führt die besonders hohe Elektronegativität des Fluoratoms bei kleinem Atomradius zu einer Verschiebung der Elektronendichteverteilung im Molekül, was in einer veränderten chemischen Reaktivität von benachbarten Gruppen resultiert. So können beispielsweise festere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substrat und Rezeptor beobachtet werden.^[79, 80] Des Weiteren kann durch einen selektiven Fluoreinbau eine Erhöhung der chemischen und metabolischen

Stabilität erreicht werden, was wiederum die Bioverfügbarkeit der Verbindungen erhöhen sollte.^[81] Da es sich bei Fluoratomen um körperfremde Stoffe handelt sollte ebenfalls die Immunogenität beeinflusst werden. Eine Erhöhung der Immunogenität durch die Verwendung von Fluorzuckern konnte vor kurzem von der Gruppe um *Ye* beobachtet werden. So wurde durch den Einsatz von, in der Acetatamideinheit unterschiedlich fluorierten ST_N-Antigenen, in Impfstudien eine signifikante Erhöhung der IgG-Titer und ein besseres Verhältnis von IgM zu IgG-Antikörpern gegenüber dem natürlichen Vakzin beobachtet.^[82] Die Gefahr, dass fluoridierte Glycopeptid-Vakzine wenig tumorspezifisch sind, konnte in jüngster Zeit am Beispiel von in 3' 4' und 2' Position fluoridierten T-Antigenen (Abb. 1.9) in ELISA-Studien widerlegt werden.^[83, 84]

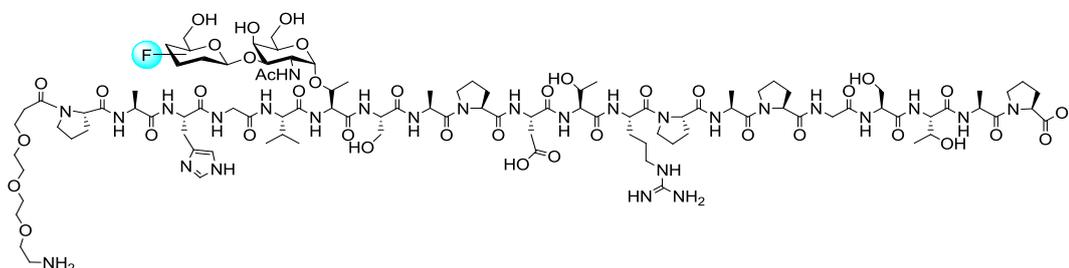


Abb. 1.9: Beispiele für erste fluoridierte Glycopeptide

Eine weitere Möglichkeit, die (metabolische) Stabilität von Glycopeptidmimetika zu erhöhen, stellt der Einsatz von Carbazuckern (Abb. 1.8b) anstelle der normalen Pyranosen dar. So geht bei der Substitution des Ringsauerstoffs durch eine Methylengruppe die labile Acetalbindung des Zuckerbausteins in eine hydrolytisch wesentlich stabilere Etherbindung über. Zudem besitzen Carbazucker kein anomeres Kohlenstoffatom mehr, wodurch normale Glycosylspaltungen verhindert werden sollten. Trotz des fehlenden anomeren Effektes liegen Carbazucker oft wie normale Pyranosen in Sesselkonformationen vor. Sie sollten somit bei deutlich erhöhter chemischer und biochemischer Stabilität ähnliche konformative Eigenschaften wie ihre natürlichen Vertreter haben und daher ideal für den Einsatz in Glycopeptidvakzinen geeignet sein. Trotz einer Vielzahl von Synthesen von Glucose- und Galactose-analogen Carbazuckern^[85] sind in der Literatur bisher weder (1→3) verknüpfte Pseudodisaccharide noch entsprechende Carboglycosylaminosäuren beschrieben. Auch der Einbau von Carbazuckern in Glycopeptide und deren Einsatz als tumorassoziierte Antigenanaloga in der Krebsimmuntherapie sind bislang noch nicht untersucht worden.

1.5 Biologisch aktive Fluor- und Carbazucker

Aufgrund der in Kapitel 1.4 erwähnten Eigenschaften von fluorierten Verbindungen, insbesondere der erhöhten Bioverfügbarkeit, ist es nicht verwunderlich, dass diese Strukturen für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse sind. So kamen bereits im Jahre 1997 die ersten fluorierten Wirkstoffe auf den Markt. Dabei handelte es sich unter anderem um das Antidepressivum Paxil[®] und das antibakteriell wirkende Cipro[®], welche sich bald unter den meistverkauften Medikamenten wiederfanden.^[86, 87]

Komplexe Kohlenhydrate, wie z.B. auch die Blutgruppenderminaten, spielen bei molekularen Erkennungsprozessen an der Zelloberfläche eine große Rolle. Dabei sind sie nicht nur wichtige Mediatoren für die Zelladhäsion oder die Aktivierung des Immunsystems, sondern sie sind auch an der Entstehung von bakteriellen und viralen Infektionen beteiligt. Auf Grund der Vielzahl von Funktionen ist es nicht verwunderlich, dass Kohlenhydrate und die in ihrem Metabolismus involvierten Enzyme in den letzten Jahren zunehmendes Interesse auf sich gezogen haben. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich daher unter anderem mit der Aufklärung von Rezeptor-Substrat-Wechselwirkungen, der Ermittlung von Enzymspezifitäten und der Klärung von Transportphänomenen.^[80, 88] Hierzu haben sich unter anderem fluorierte Kohlenhydrate als nützlich erwiesen, da sie durch die veränderte chemische Reaktivität und Elektronendichteverteilung Auswirkungen auf molekulare Erkennungsmechanismen haben. So sind sie beispielsweise sehr potente Inhibitoren für eine Vielzahl von verschiedenen Glycosyltransferasen und Glycosidasen^[89, 90] und stellen damit besonders geeignete Substrate für mechanistische Studien dar.^[91] Zudem kann Fluor (¹⁸F und ¹⁹F) als spektroskopische Sonde dienen, die es möglich macht, Stoffwechselwege und Enzymaktivitäten zu verfolgen und aufzuklären.^[92, 93]

Neben der direkten Inhibierung von Enzymen ist auch eine sogenannte metabolische Inhibierung möglich. So konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe eines peracetylierten 4-Fluor-GalNac-Bausteins zu dem Nährmedium von HL-60 Zellen die *O*-Glycosylierungsmuster des P-Selektin-bindenden Glycoproteinliganden 1 (PSGL-1) deutlich verändert wurden.^[94] Die veränderten Glycanstrukturen können dabei auf zwei möglichen Wegen entstehen: Zum einen kann der fluorierte Baustein in das Glycopeptid eingebaut werden und somit den Aufbau komplexerer Oligosaccharidstrukturen wie das Lewis^x-Antigen verhindern. Daneben kann aber auch eine modifizierte Form des 4-F-GalNac-Bausteins selbst einen Inhibitor für eines oder mehrere der beteiligten Enzyme darstellen.^[94] Beides führt zu einem um 20-25% gesenkten Glycangehalt des PSGL-1 und zu einer um 82% verringerten Expression des Lewis^x-Antigens auf der Zelloberfläche. Dies resultierte schließlich in einer

deutlich verminderten Bindungsfähigkeit von ca. 30% der P-, L- und E-Selektine, was diese Methode besonders für die Entwicklung einer Therapie gegen chronische Entzündungsprozesse interessant macht.

Diese Beispiele machen damit deutlich, welche große Rolle fluorierte Kohlenhydrate bei der Entwicklung von Wirkstoffen spielen.

Bereits im Jahre 1973 wurde von *Miller et al.* aus *Streptomyces* sp MA-4145, eine antibiotisch wirksame Substanz isoliert, deren Struktur einer Pseudo- α -galactopyranose entspricht.^[95] Neben dieser strukturell recht einfachen Substanz gibt es eine Reihe weiterer Beispiele von komplexeren antibiotisch wirkenden Verbindungen auf Basis von Carbazuckern. Dazu gehört zum Beispiel die Klasse der Pyralomycine und das hier gezeigte Antibiotikum Validamycin A, welches als Strukturelement den Carbazucker Validamin beinhaltet (Abb. 1.10).^[85, 96, 97]

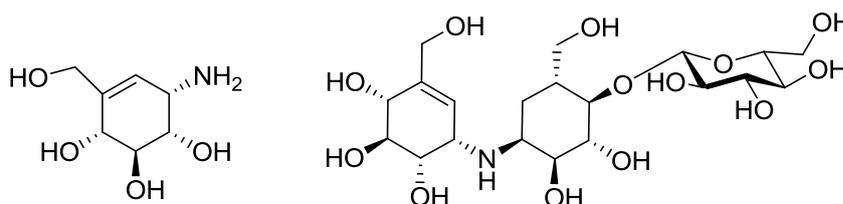


Abb. 1.10 Der Carbazucker Validamin und das Antibiotikum Validamycin^[97]

Aufgrund der Tatsache, dass die metabolisch deutlich stabileren Carbazucker trotz des fehlenden anomeren Effektes ebenfalls in 4C_1 -Sesselkonformationen vorliegen, stellen diese ideale Saccharidmimetika mit ähnlichen konformativen Eigenschaften dar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Struktur motive, wie das oben gezeigte Validamin, nicht nur Bestandteil von antibiotisch wirkenden Substanzen sind, sondern auch oft in Glycosidasehemmern gefunden werden, wie z.B. in der Acarbose.^[98, 99] Auch weniger komplexe Moleküle, welche nur aus einer Carbazuckereinheit bestehen, stellen wichtige Glycosidase-Inhibitoren dar. Ein Beispiel ist das Cyclophellitol, das in der Lage ist, die Aktivität von β -Glucosidasen herabzusetzen und möglicherweise in der Tumorthherapie eingesetzt werden könnte.^[85] Da Carbazucker in besonderem Maße in der Lage sind, normale Glycosylspaltungen zu verhindern bzw. deren Enzyme zu blockieren, sind diese potenten Inhibitoren zudem auch für die Behandlung von Diabetes äußerst interessant.^[85, 99]

Erste Beispiele für immunstimulierende Carba-Glycolipide wurden von der Gruppe um *Mori* synthetisiert.^[100, 101] In dem Glycolipid KRN7000 wurde der Galactosebaustein durch den entsprechenden Carbazucker ersetzt, wodurch man einen deutlichen Anstieg der IFN- γ -

Produktion und damit der Antitumorwirkung in *in vivo*-Tests nachweisen konnte (Abb. 1.11). Durch die Bindung dieses Pseudo-Glycolipides an CD1d, ein glycolipidpräsentierendes Protein des Immunsystems, können cytotoxische T-Zellen über eine Rezeptorwechselwirkung aktiviert werden, welche dann durch die Ausschüttung von Cytokinen, wie INF- γ , die Antitumorwirkung auslösen.^[100, 101]

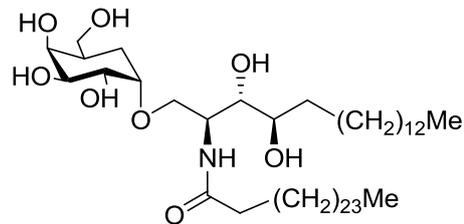


Abb. 1.11 Carbaanalogue des Glycolipides KRN7000

2 Zielsetzung

Da Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankungen noch immer die zweithäufigste Todesursache darstellt, ist die Entwicklung neuer, effizienter und schonender Behandlungsmethoden von großem Interesse. Ein wichtiger Ansatz ist dabei die Krebsimmuntherapie, die auf eine gezielte Aktivierung des Immunsystems durch tumorassoziierte Vakzine abzielt. Eine Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von tumorspezifischen Oberflächenstrukturen, die gesunde Zellen eindeutig von malignen Zellen unterscheiden. Solch eine Zielstruktur stellt das epitheliale Glycoprotein MUC1 dar, welches auf Tumorzellen stark überexprimiert und mit einem, von dem der gesunden Zellen deutlich abweichenden Glycosylierungsmuster vorliegt. Da es aufgrund der biologischen Mikroheterogenität jedoch nicht möglich ist, diese tumorassoziierten Antigene aus natürlichen Quellen zu isolieren, müssen entsprechende Glycopeptide mittels organischer Synthese hergestellt werden. Von Nachteil ist jedoch die geringe chemische und metabolische Stabilität der glycosidischen Bindung. Diese sollte allerdings durch den gezielten Einbau von Fluorsubstituenten in das Kohlenhydratepitop bzw. durch den Ersatz der natürlichen Pyranosen durch analoge Carbazuckerbausteine verbessert werden können. Zusätzlich könnten die modifizierten Kohlenhydratepitope zu einer erhöhten Immunogenität des Vakzins bei gleichbleibender Antikörperspezifität führen. Des Weiteren könnten durch den gezielten Einbau von Fluoratomen in das Kohlenhydratgerüst die minimal notwendigen Bindungsepitope für eine ausreichend gute Antikörpererkennung ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten sowohl neuartige carbaanaloge als auch in Position 6 fluorierte tumorassoziierte Kohlenhydratantigene hergestellt werden. Die Synthesen der fluorierten Glycosylaminosäuren basieren dabei auf einem biomimetischen Ansatz und gehen von einem gemeinsamen Vorläufermolekül **I** aus, bei dem das Fluor bereits zu einem recht frühen Zeitpunkt der Synthese eingebaut wurde. Dabei konnte auf erste Vorarbeiten im Rahmen der Diplomarbeit zurückgegriffen werden.^[102] Ausgehend von dem Bromid **I** sollten in Folgereaktionen komplexere Kohlenhydratstrukturen wie die verschiedenen fluorierten T-Antigenanaloga und die zwei regioisomeren ST-Antigenanaloga aufgebaut werden können (Abb. 2.1).

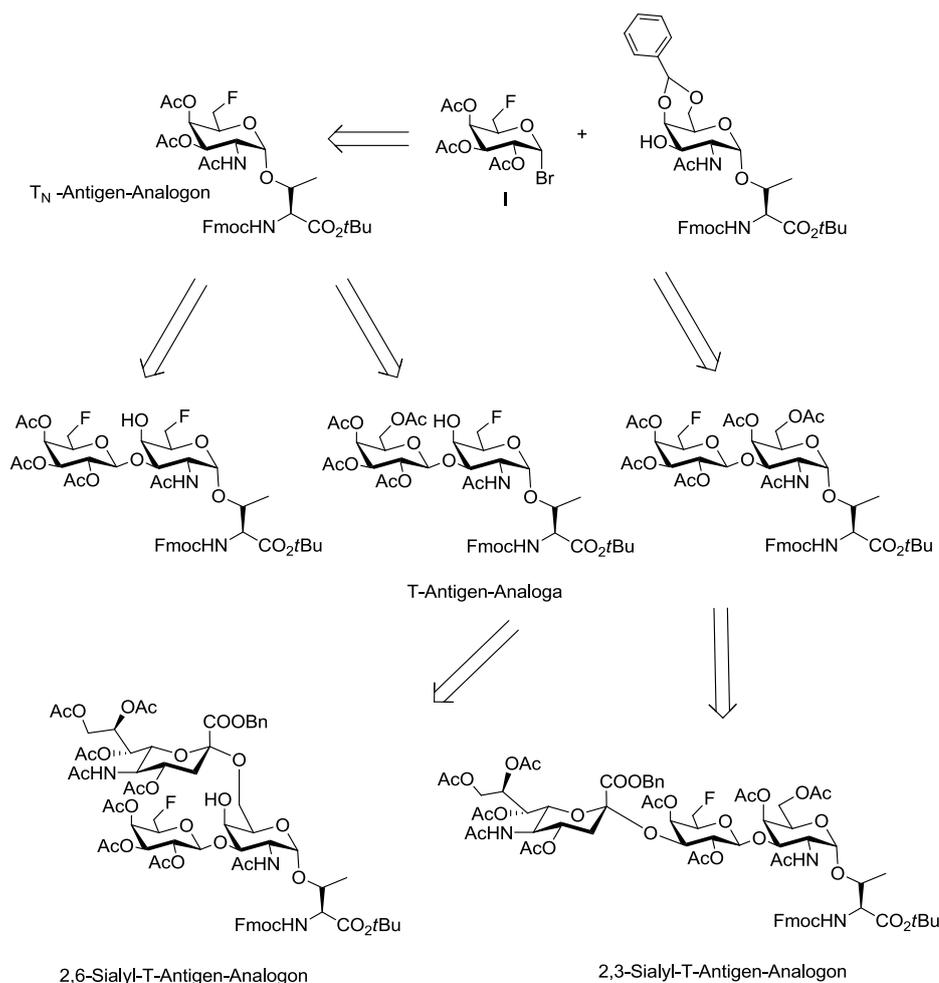


Abb. 2.1 Retrosynthese der fluorierten Glycosylaminosäuren

Die Schwierigkeit bei der Synthese bestand sowohl in der selektiven Fluorierung, die eine geschickte Wahl der Schutzgruppen voraussetzte, als auch in der stereoselektiven Glycosylierung. Des Weiteren musste während der Synthese die orthogonale Stabilität der Schutzgruppen für den späteren Einsatz der Glycosylaminosäure in der Festphasenpeptidsynthese gewährleistet werden.

Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollte ein Zugang zu verschiedenen mucinanalogen Carba-Glycosylaminosäuren erarbeitet werden, die aufgrund ihrer höheren metabolischen Stabilität wertvolle Kandidaten für die Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen darstellen. Trotz einer Vielzahl von Synthesen und interessanten Anwendungen^[85] sind bisher 1→3 verknüpfte Pseudosaccharide noch nicht beschrieben. In dieser Arbeit sollte ausgehend von Galactose über eine Umlagerungssequenz der Carbazucker **II** erhalten werden, welcher dann über eine geeignete nucleophile Substitution an einen entsprechenden Akzeptor angebunden werden sollte.

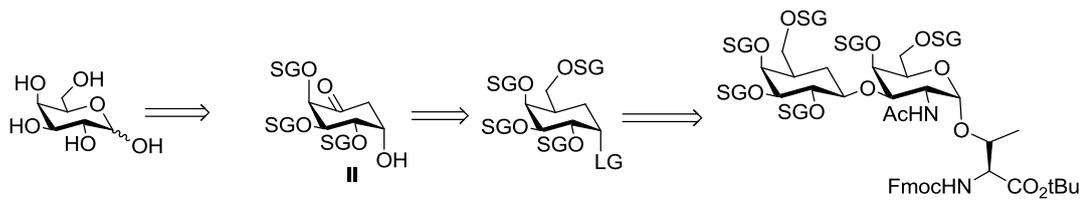


Abb. 2.2 Retrosynthese der carbaanalogen Glycosylaminosäure

Neben der hohen Anzahl an Reaktionsschritten war die Wahl eines orthogonalen Schutzgruppenmusters und die Etablierung einer geeigneten stereoselektiven nucleophilen Substitution für den Aufbau der 1→3 verknüpften Disaccharide eine wesentliche Herausforderung des Projekts.

Nach Abspalten des *tert*-Butylesters sollten die erhaltenen Glycosylaminosäuren mittels Festphasenpeptidsynthese in die *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1, bestehend aus 20 Aminosäuren, eingebaut werden. Da Glycopeptide in der Regel allein nicht immunogen genug für Vakzinierungen sind, müssen sie zusätzlich noch an ein entsprechendes Carrierprotein, wie z.B. an das Tetanus Toxoid, angebunden werden. Nur so ist gewährleistet, dass sowohl eine von T-Helferzellen vermittelte Antikörperproduktion als auch eine starke cytotoxische T-Zellantwort initiiert werden kann. Neben der Anbindung an das Tetanus Toxoid sollte auch eine Konjugation mit dem Rinderserumalbumin (BSA) durchgeführt werden, da diese Konjugate später zur Durchführung von ELISA-Studien im Zuge der immunologischen Evaluierung eingesetzt werden konnten.

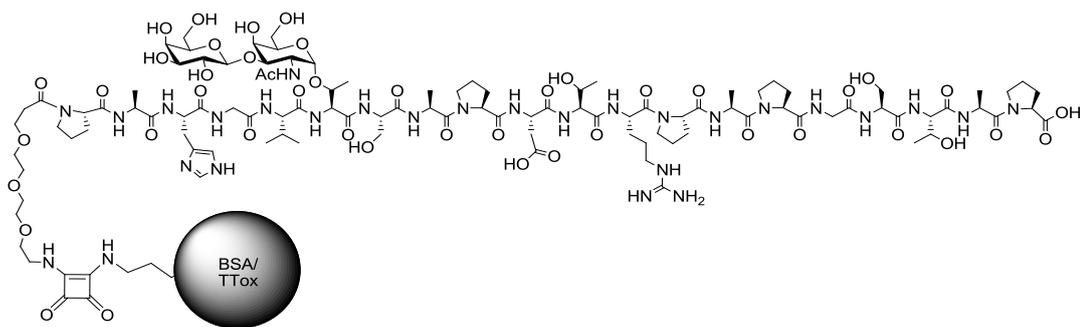


Abb. 2.3: Einbau der Glycosylaminosäuren in die *tandem-repeat*-Sequenz und Konjugation an Trägerproteine

Mit den TTox-Konjugaten sollten anschließend in Kooperation mit Prof. Dr. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz) Impfstudien an Mäusen durchgeführt werden. Mit Hilfe von ELISA-Experimenten sollten die aus dem Serum gewonnenen Antikörpern zunächst bezüglich ihrer Spezifität und ihres Isotyps charakterisiert werden. Zudem sollten die gewonnenen Antikörper hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an Tumorzellen untersucht werden.

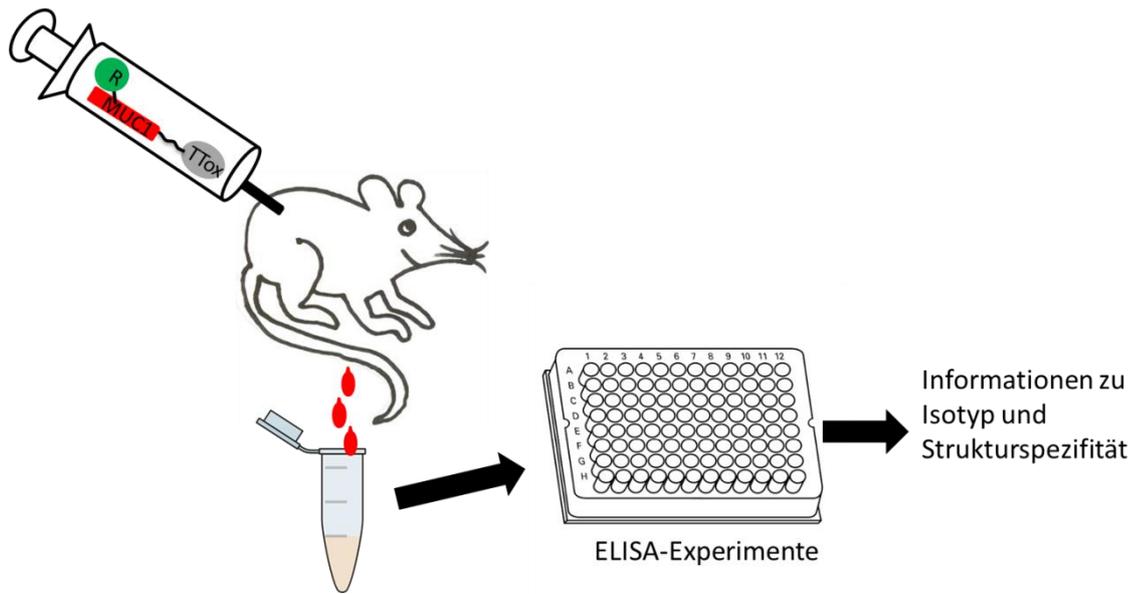


Abb. 2.4: Schematische Übersicht über die immunologische Evaluierung von TTox-Vakzinen

3 Allgemeiner Teil

3.1 Strukturell modifizierte Kohlenhydratantigene

Strukturell modifizierte Kohlenhydratantigen-Analoga stellen aus den oben genannten Gründen sehr interessante Vertreter für die Entwicklung von neuartigen tumorselektiven Vakzinen dar. Dabei sollten die Carbazuckereinheiten bzw. die selektiv fluorierten Saccharidbausteine sowohl die metabolische Stabilität als auch die Immunogenität der Antigene verbessern.

3.1.1 Synthese der fluorierten Glycosylaminosäuren

Synthese des 6-F-T_N-Antigens

Präparativ gut zugänglich sollte die monosaccharidische Glycosylaminosäure, das 6F-T_N-Derivat **14** sein. Um bei dessen Herstellung einer biomimetrischen Strategie folgen zu können, sollte das Fluoratom zu einem frühen Zeitpunkt der T_N-Synthese in das Molekül eingebaut werden. Dadurch können auch die Synthesen der komplexeren Antigene, wie die des 6F- bzw. 6',6-F-Thomsen-Friedenreich-Antigens (**21** und **18**) und die der beiden strukturisomeren 6'F-ST-Antigene **44** und **48**, auf ein gemeinsames Vorläufermolekül **31** zurückgeführt werden. Zu dessen Herstellung sollte ausgehend von der 1,2:3,4-Di-*O*-isopropylidengalactopyranose (**2**) zunächst das Fluoratom nucleophil in Position 6 eingeführt werden. Anschließende Schutzgruppenmanipulation und Bromierung würde das gewünschte Bromid **6** liefern, das über drei Stufen in den Glycosyldonor **9** überführt und mit einem geeigneten Akzeptor zu Glycosylaminosäure **14** umgesetzt werden könnte. Dabei ist auf eine geeignete Wahl der Schutzgruppen für die später anstehende Festphasenpeptidsynthese, zu achten.

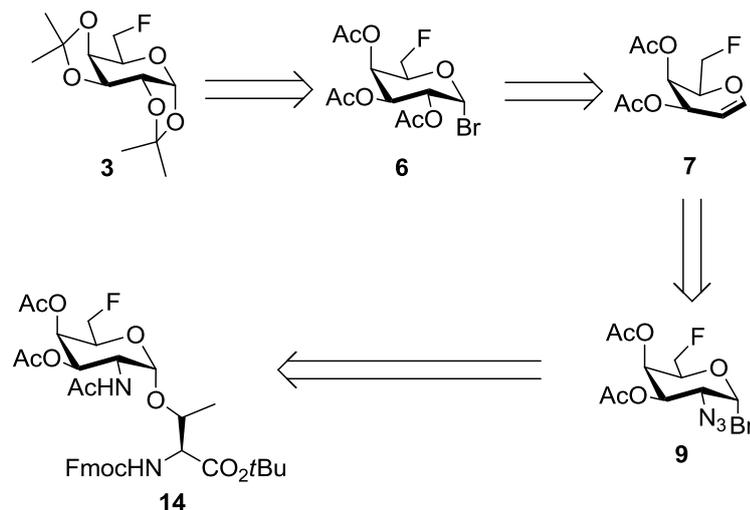


Abb. 3.1 Retrosynthese des T_N -Analogons

Um ein geeignetes Substrat für die Fluorierung zu erhalten, wurde D-Galactose in einer säurekatalysierten Reaktion mit einem Überschuss an Kupfersulfat in Aceton zu der 1,2:3,4-Di-*O*-isopropylidengalactopyranose (**2**) umgesetzt. Diese Reaktion verläuft selektiv ohne Blockierung der 6-OH-Funktion, da mit Aceton bevorzugt Acetale von 1,2-*cis*-Diolen gebildet werden. Somit konnte die Ausgangsverbindung für die Fluorierung in 81% Ausbeute erhalten werden.

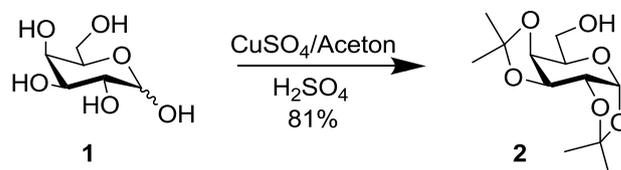


Abb. 3.2 Synthese der 1,2:3,4-Di-*O*-isopropylidengalactopyranose **2**

Um Fluoratome mithilfe einer nucleophilen Substitution einzubauen, wird oft auf Fluorierungsreagenzien wie Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST[®]) und dessen Analogon Bis(2-methoxyethyl)aminoschwefeltrifluorid (DeoxofluorTM) zurückgegriffen.^[103] (Abb. 3.3).

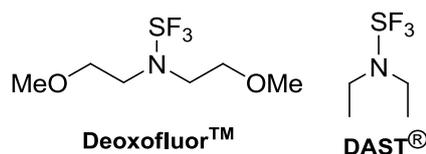


Abb. 3.3: DeoxofluorTM / DAST[®]

In beiden Fällen verläuft die Fluorierungsreaktion über einen S_N2 -Mechanismus, indem zunächst die zu substituierende Hydroxyl- bzw. Carboxylgruppe unter Freisetzung von

Fluoridionen aktiviert wird. Letztere können dann unter Inversion der Konfiguration die gebildete Abgangsgruppe ($\text{OSF}_2\text{NET}_2^-$) substituieren, wobei die jeweilige Fluorverbindung entsteht. (Abb. 3.4).

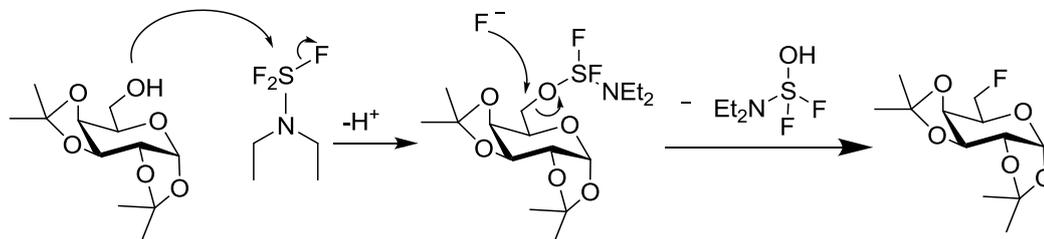


Abb. 3.4: Mechanismus der Fluorierung mit DAST®

Die gewünschte 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-desoxy-6-fluorgalactopyranose (**3**) konnte so in einer Reaktion mit DAST® in einer Ausbeute von 84% erhalten werden. Zum Abfangen der während der Reaktion intermediär entstehenden Fluorwasserstoffsäure wurde dem Reaktionsgemisch zusätzlich noch 2,4,6-Collidin als Base zugesetzt.

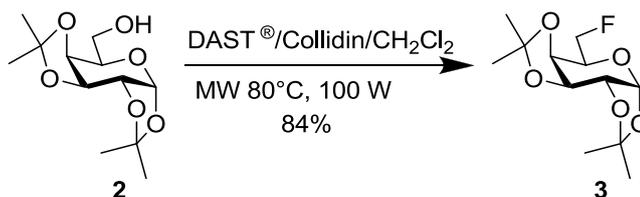


Abb. 3.5: Fluorierung der 1,2:3,4 Di-*O*-isopropyliden-galactopyranose

Ausgehend von diesem Produkt wurde das zentrale Vorläufermolekül **6** in drei Stufen synthetisiert. Dazu wurden zunächst die Isopropylidenschutzgruppen durch saure Hydrolyse mit 80%iger Essigsäure in der Siedehitze entfernt. Die verbleibenden freien Hydroxylgruppen wurden anschließend durch Behandlung mit Acetanhydrid/Pyridin (1:2) in die entsprechenden Acetate überführt.

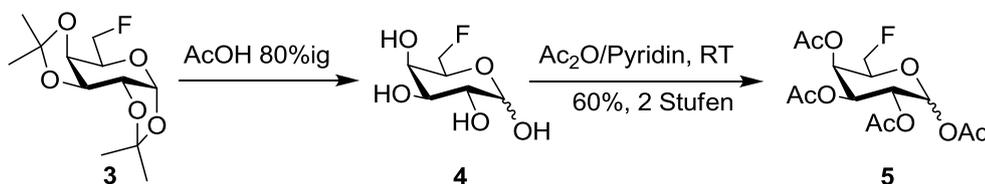


Abb. 3.6: Synthese der 6-Desoxy-6-fluor-1,2,3,4-tetra-*O*-acetylgalactopyranose

Die so in 60%iger Ausbeute erhaltene 6-Desoxy-6-fluor-1,2,3,4-tetra-*O*-acetylgalactopyranose (**5**) wurde anschließend mittels Bromwasserstoffsäure in Eisessig (33%ig), aufgrund des anomeren Effektes selektiv in das gewünschte α -Bromid **6** überführt.

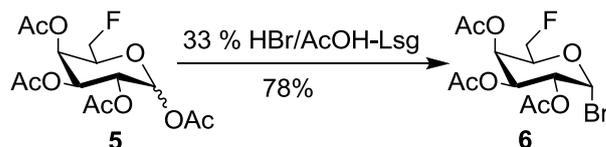


Abb. 3.7: Synthese des α Bromids **6**

Ausgenommen von elektronegativen Substituenten in anomerer Stellung sind in Pyranosen mit Sesselkonfiguration Substituenten in äquatorialer Position aus sterischen Gründen gegenüber den Substituenten in axialer Position bevorzugt. Dieser Ausnahme liegt der anomere Effekt zugrunde, der sowohl auf elektrostatische als auch auf stereoelektronische Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Die elektrostatischen Effekte lassen sich anhand von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der benachbarten Gruppen erklären. So liegt einer der beiden Dipole entlang der Bindung vom anomeren Kohlenstoffatom zum elektronegativen Substituenten, während der zweite Dipol durch die freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffs erzeugt wird. Liegt eine äquatoriale Anordnung vor, so zeigen beide Dipole in die gleiche Richtung, und summieren sich. In α -konfigurierten Pyranosen dagegen zeigen beide Dipole in unterschiedliche Richtungen.



Abb. 3.8: Darstellung der an dem anomeren Effekt beteiligten Dipol-Dipol-Wechselwirkungen

Zusätzlich dazu führen stereoelektronische Effekte zu einer bevorzugten axialen Konfiguration des Substituenten. Dabei überlappt das freie Elektronenpaar des p-Molekülorbitals des Ringsauerstoffatoms mit dem antibindenden σ^* -Orbital der C-Br-Bindung. Die axiale Koordination des Substituenten wird nun dadurch erzwungen, dass diese Hyperkonjugation, d. h. die π -O \rightarrow σ^* -Delokalisierung der nichtbindenden Elektronen, nur bei einer antiperiplanaren Anordnung der beteiligten Orbitale optimal erfolgen kann.^[104]

Durch den anomere Effekt konnte selektiv das 6-Desoxy-6-fluor-2,3,4-tri-O-acetyl- α -galactosylbromid (**6**) in 78%iger Ausbeute gebildet werden. Um aus diesem Vorläufermolekül einen geeigneten Glycosyldonor für die bevorstehende Glycosylierungsreaktion zu dem T_N-Antigenanalogon erhalten zu können, musste eine maskierte Aminfunktion in das Molekül eingebaut werden. Dies ist notwendig, da das N-Acetylamid selbst eine β -dirigierende

Wirkung in der Glycosylierungsreaktion ausüben würde. Als geeigneter Acetamid-Vorläufer hat sich eine Azidogruppe, die selbst keine dirigierende Wirkung besitzt und sich durch Reduktion leicht in das Acetamid überführen lässt, herausgestellt.^[105, 106] Hierzu wurde **6** zunächst durch reduktive Eliminierung mit aktiviertem Zinkstaub in Gegenwart von *N*-Methylimidazol in 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorgalactal (**7**) umgewandelt.^[104, 107] Anschließend wurde **7** einer Azidonitratisierung nach *Lemieux*^[107] mit Cer(IV)ammoniumnitrat und Natriumazid in absolutem Acetonitril unterzogen, wobei ein Anomerengemisch der beiden möglichen 3,4-Di-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-6-fluor- α/β -galactopyranosylnitrate **8** in einer Ausbeute von 47% erhalten wurde.

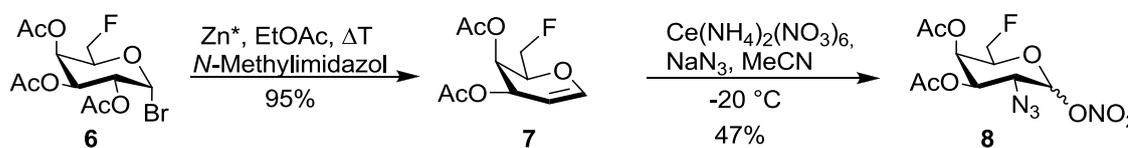


Abb. 3.9: Synthese des 3,4-Di-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-6-fluor- α/β -galactopyranosylnitrates **8**

Der Mechanismus der Azidonitratisierung nach *Lemieux*^[108] verläuft vermutlich über radikalische Zwischenstufen. Zunächst wird ein Azidradikal oxidativ aus einem Azidion mit einem Äquivalent Cer(IV)ammoniumnitrat erhalten, das wiederum zu einem Cer(III)-Ion reduziert wird. Das Azidradikal kann anschließend die Doppelbindung des Galactals **7** elektrophil angreifen, wobei der Übergangszustand **I** mit der Azidofunktion in der sterisch günstigeren äquatorialen Position 2 bevorzugt entsteht. Dieses Radikal kann dann durch ein weiteres Äquivalent Cer(IV)ammoniumnitrat oxidiert werden, wobei das entstehende Oxocarbeniumion **II** durch die freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffes stabilisiert wird. Durch den nucleophilen Angriff eines Nitrations am anomeren Zentrum entsteht das gewünschte Azidonitrat **8** als Anomerengemisch.

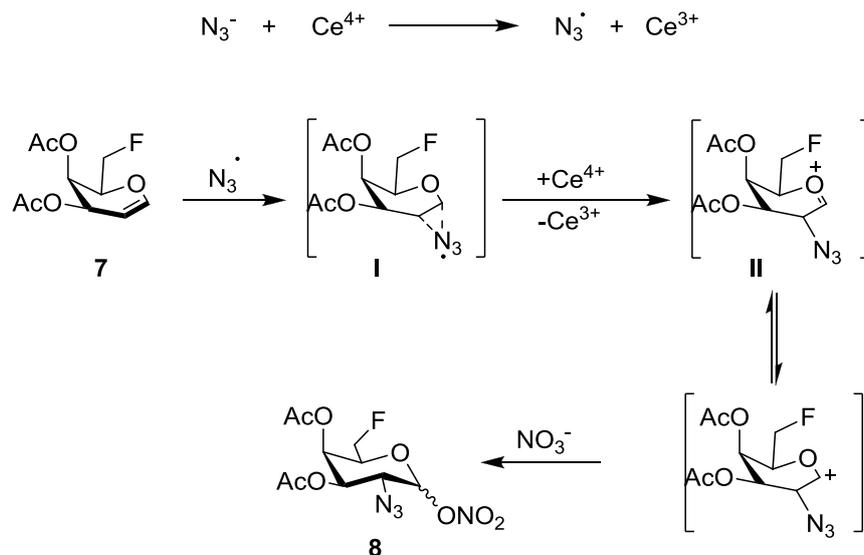


Abb. 3.10: Mechanismus der Azidonitratisierung nach Lemieux

In einem letzten Schritt wurde das hydrolyseempfindliche Azidonitrat **8** mit wasserfreiem Lithiumbromid in absolutem Acetonitril selektiv in das 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**9**) überführt.^[109] Auch bei dieser Reaktion beruht die zu beobachtende Stereoselektivität auf dem anomeren Effekt, wobei der gewünschte Galactosyldonor in einer Ausbeute von 67 % erhalten wurde.

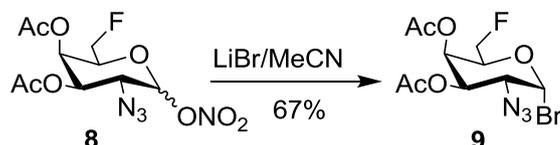


Abb. 3.11: Synthese des Galactosyldonors **9**

Nun musste noch ein geeigneter orthogonal geschützter Galactosylakzeptor synthetisiert werden. Da die spätere Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie erfolgen sollte, wurde zunächst die Aminofunktion des L-Threonins **10** durch Umsetzung mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu), als Urethan blockiert.^[110, 111] Für die Säurefunktion musste anschließend eine zur Fmoc-Gruppe orthogonale Schutzgruppe gewählt werden. Dafür hat sich besonders die säurelabile *tert*-Butylester-Schutzgruppe bewährt, die mit *tert*-Butanol in einer Cu(I)-katalysierten Reaktion unter Aktivierung der Carboxylatfunktion mit *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) eingeführt werden konnte. Hierbei war wegen des Überschusses an *tert*-Butanol eine genaue Reaktionskontrolle und rechtzeitiger Abbruch der Reaktion notwendig, da als Nebenreaktion

eine zusätzliche Veretherung der β -Hydroxylfunktion in der Seitenkette in nicht unerheblichen Maße auftreten kann.^[112, 113]

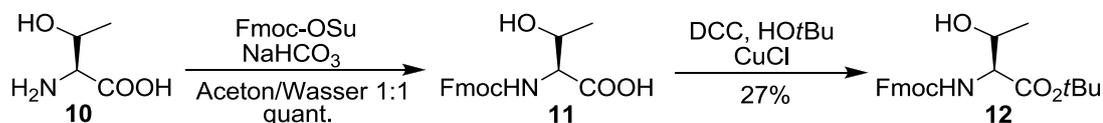


Abb. 3.12: Synthese des orthogonal geschützten Galactosylakzeptors **12**

Die anschließende *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung erfolgte nach einer von *Paulsen* und *Hölck*^[114, 115] eingeführten Variante. Auf Grund der durch den Elektronenzug des Fluoratoms ausgelösten Desaktivierung des Galactosyldonors erfolgte die Umsetzung des orthogonal geschützten Threonins **12** mit dem Azidobromid **9** bei leicht höheren Temperaturen,^[116, 117] als die in der Synthese der nicht fluorierten Verbindung. Als Promotoren fungierten dabei analog zum natürlichen T_N-Baustein ein Gemisch aus Silber(I)perchlorat und Silber(I)-carbonat. Aufgrund des anomeren Effektes und der nicht nachbargruppenaktiven Azidfunktion wurde wie gewünscht das α -Galactosid **13** in einer Ausbeute von 70 % erhalten. Eine Bildung des unerwünschten β -Anomers konnte nur in geringem Maße beobachtet werden. Als Nebenreaktion trat hauptsächlich die Hydrolyse des im Überschuss eingesetzten Galactosyldonors auf.

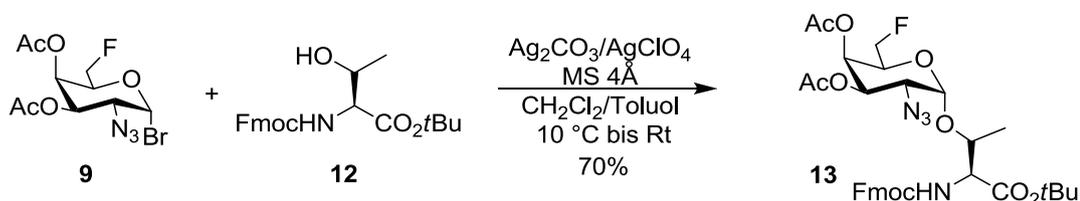


Abb. 3.13: Glycosylierung nach Koenigs-Knorr zu **13**

Anschließende reduktive Acetylierung der Azidfunktion mit aktiviertem Zinkstaub in einem THF/Acetanhydrid/Essigsäure-Gemisch (3:2:1) lieferte das 6F-T_N-Antigenanalogon **14** in 75%.^[118]

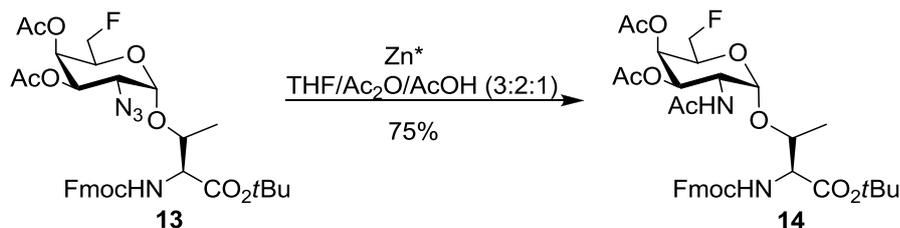


Abb. 3.14 Reduktive Acetylierung zu dem fertigen T_N-Antigenanalogon

Damit wurde ein erster Vertreter eines fluorierten und orthogonal geschützten Vorläufers des T_N-Antigens erhalten, der wiederum für die Synthese weiterer fluorierter tumorassoziierter Antigenanaloge zur Verfügung steht. Zudem wurde nach saurer Hydrolyse des *tert*-Butylesters ein erster Baustein für den Einbau in die *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 erhalten.

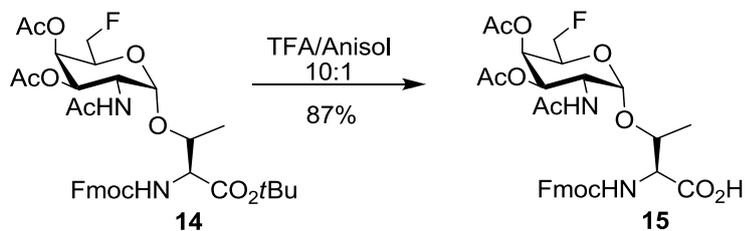


Abb. 3.15: Saure Hydrolyse des *tert*-Butylesters

Synthese der fluorierten T-Antigen-Analoga

Die Darstellung der in Position 6 fluorierten T-Antigen-Analoga sollte zum einem von dem neuen 6F-T_N-Antigen **14** und zum anderen von dem literaturbekannten natürlichen T_N-Baustein **28** ausgehen. Dafür sollten diese unter geeigneten Reaktionsbedingungen mit den Glycosyldonoren **6** und **20** in entsprechenden Glycosylierungsreaktionen umgesetzt werden.

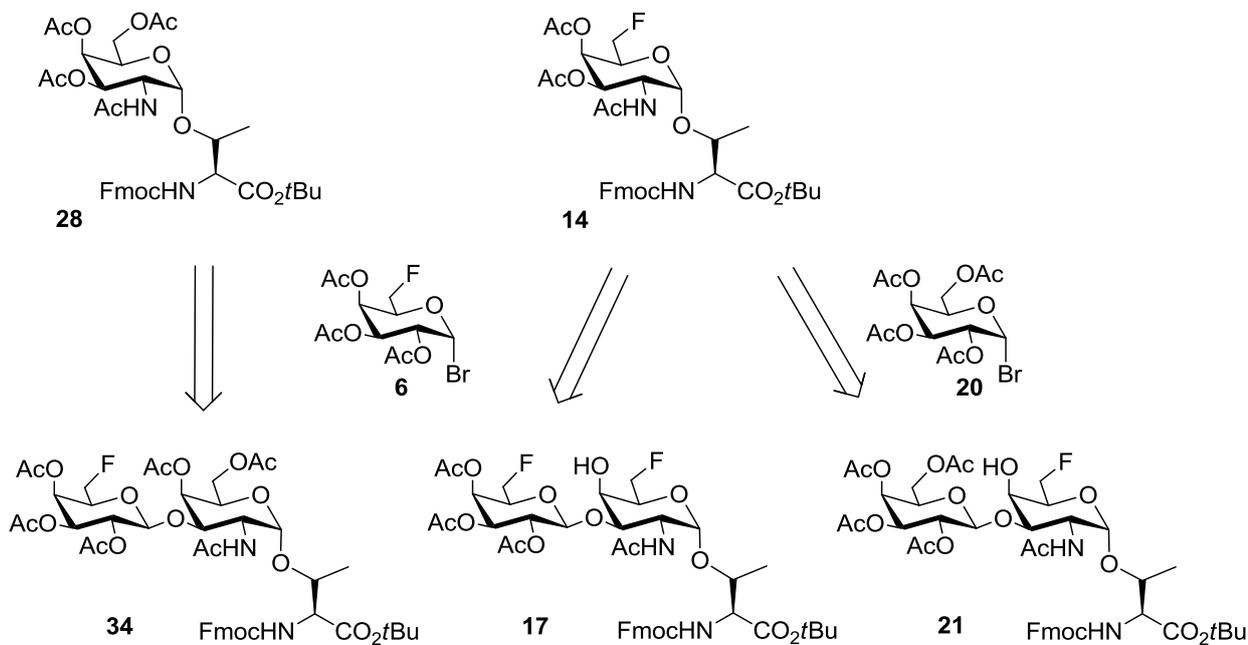


Abb. 3.16: Übersicht über die geplanten Synthesen der T-Antigen-Analoga

Zum Aufbau der beiden T-Antigen-Analoga **17** und **21** musste zunächst ein geeigneter Galactosylakzeptor bereitgestellt werden. Dafür wurden die Hydroxylfunktionen des 6F-T_N Bausteins **14** über eine Esterspaltung nach *Zemplén*^[119] bei pH 8.5 deblockiert^[55, 120]. Diese Umesterung erfolgte mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 8.5. Dabei war ein genaues Einstellen und ständiges Nachregulieren des pH-Wertes wichtig, da die Reaktion einerseits bei einem zu niedrigen pH-Wert nicht abläuft und andererseits bei einem zu hohen pH-Wert die Fmoc-Schutzgruppe mit abgespalten werden kann.^[120]

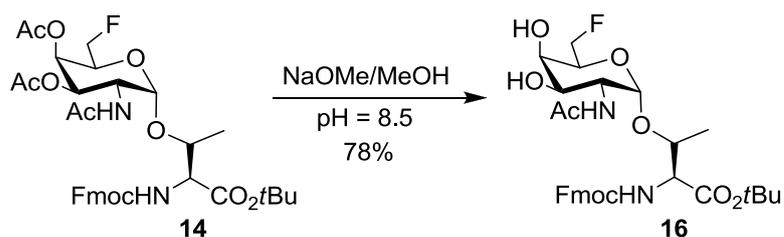


Abb. 3.17: *Zemplén*-Deblockierung des T_N-Bausteins **16**

Der erhaltene Glycosylakzeptor **16** sollte anschließend sowohl mit einem fluorierten als auch mit einem nichtfluorierten Galactosyldonor zu den oben gezeigten T-Antigen-Bausteinen (Abb. 3.16) umgesetzt werden. Zur Synthese des bisfluorierten Analogons konnte das bereits in der Darstellung des 6F-T_N-Bausteins **14** verwendete α -Bromid **6** eingesetzt werden.

Da sich die Glycosylierungsreaktion nach *Helferich*^[121] bereits bei der Synthese des natürlichen T-Antigens als besonders geeignet herausgestellt hatte^[114] wurde auch hier auf diese Reaktion zurückgegriffen. Zur Aktivierung des Donors können hierbei Quecksilbersalze wie Quecksilber(II)cyanid verwendet werden. Wegen der geringeren Reaktivität der fluorierten Galactosyldonoren im Gegensatz zu den Natürlichen wurde die Reaktion, die in einem Lösungsmittelgemisch aus Nitromethan/Dichlormethan (3:2) abläuft, zudem nicht bei Raumtemperatur sondern in der Mikrowelle bei 80 °C durchgeführt.

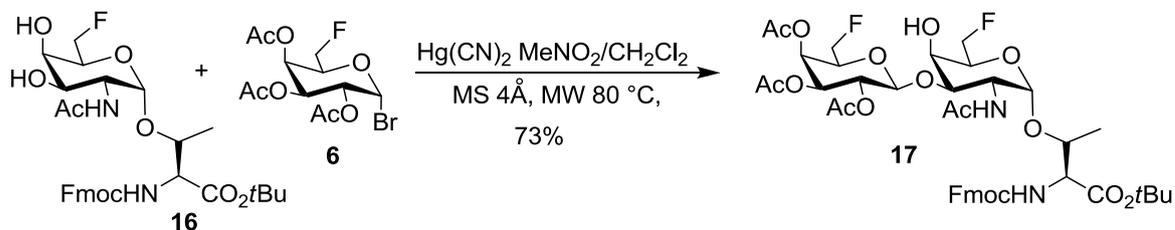


Abb. 3.18: Mikrowellenunterstützte Glycosylierung nach *Helferich* zu **17**.

Eine Blockierung der 4-Hydroxylfunktion ist dabei aus sterischen und elektronischen Gründen nicht nötig, da nur die reaktivere 3-Hydroxylgruppe unter diesen Glycosylierungsbedingungen reagiert.^[108] Zudem entstand aufgrund der

nachbargruppenaktiven Acetylschutzgruppe im α -Bromid **6** ausschließlich das gewünschte β -Anomer **17** mit einer Ausbeute von 73%. Ein weiterer Vorteil der Glycosylierung nach *Helferich* besteht darin, dass die Bildung des unerwünschten Orthoesters **II**, dessen Auftreten häufig bei der entsprechenden Glycosylierung nach *Schmidt* beobachtet wird^[122, 123], durch den Promotor $\text{Hg}(\text{CN})_2$ unterdrückt werden kann. Dies beruht vermutlich auf der vorübergehenden Koordination des Cyanidions an den Dioxolenium-Kohlenstoff **I**, wodurch das Nucleophil nur noch einen *trans*-Angriff auf das anomere Zentrums eingehen kann (Abb. 3.19).

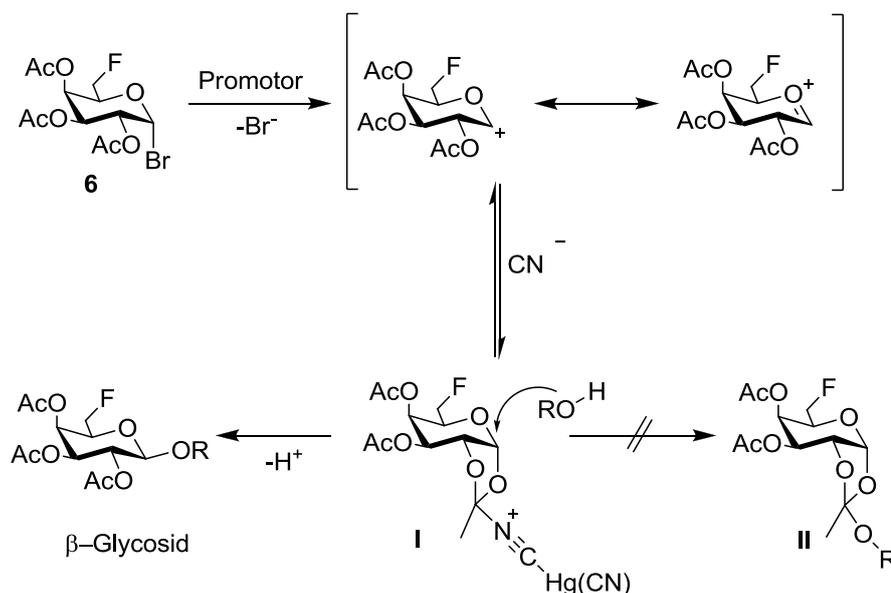


Abb. 3.19: Nachbargruppeneffekt und Steuerung der Regioselektivität bei der Glycosylierung nach *Helferich*

Eine anschließende Deblockierung des C-Terminus der Glycosylaminosäure liefert den für die Festphasenpeptidsynthese geeigneten Baustein **18** mit einer sehr guten Ausbeute von 87%.

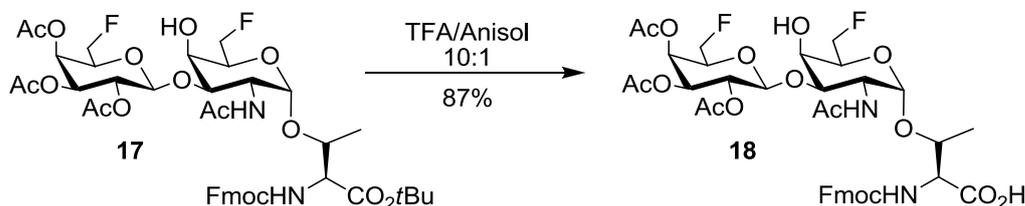


Abb. 3.20: Saure Hydrolyse des *tert*-Butylesters

Zusätzlich dazu sollte das einfach fluorierte T-Antigen-Analogon **21** synthetisiert werden, wobei als Galactosyldonor das natürliche nichtfluorierte 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -galactosylbromid (**20**) herangezogen wurde. Dieses konnte analog der oben gezeigten

Synthesesequenz ausgehend von D-Galactose durch Peracetylierung und anschließende Bromierung mit Bromwasserstoff in Eisessig dargestellt werden.

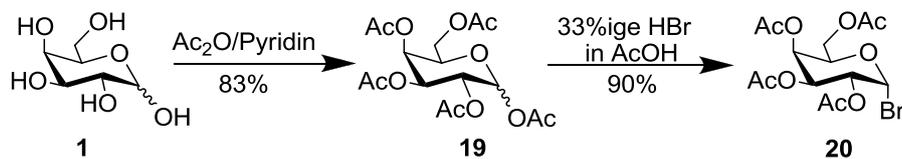


Abb. 3.21: Darstellung des 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -galactosylbromids **20**

Dieser Donor konnte schon in früheren Arbeiten^[124] zum Aufbau der natürlichen T-Antigene erfolgreich eingesetzt werden. Da in diesen Vorschriften der Akzeptor bei Raumtemperatur mit dem Galactosyldonor **20** umgesetzt wurde, sollten diese Bedingungen auch hier unter Verwendung des fluorierten Akzeptors und Quecksilber(II)cyanid als Promotor getestet werden. Bei dieser Temperatur konnte jedoch zunächst kein Umsatz beobachtet werden, weshalb die Reaktionslösung mit weiterem Quecksilber(II)cyanid versetzt und wie bereits in der Synthese des bisfluorierten T-Antigens beschrieben, unter Mikrowelleneinstrahlung (100 W, 5 min Aufheizzeit) bei 80 °C mehrere Stunden reagieren gelassen wurde. Dabei konnte jedoch neben dem gewünschten Produkt auch die Bildung eines Nebenproduktes **22** beobachtet werden. So erfolgt unter diesen Reaktionsbedingungen sowohl eine Glycosylierung an der 3- also auch an der 4-Hydroxylgruppe des Akzeptors, was sich vermutlich auf die höhere Reaktivität des Donors **20** gegenüber dessen fluorierten Analogon **6** zurückführen lässt. Die säulenchromatographische Abtrennung dieses Nebenproduktes war jedoch zunächst nicht möglich, so dass das Produktgemisch in der nächsten Reaktion eingesetzt wurde.

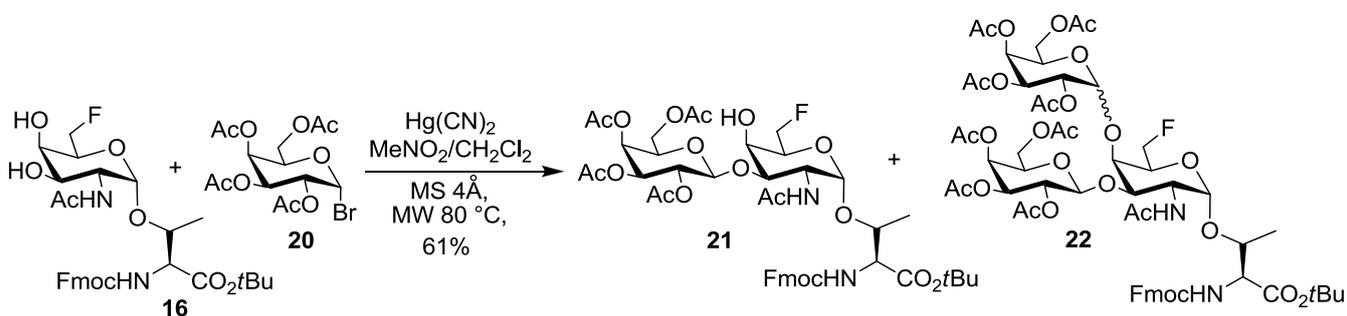


Abb. 3.22: Mikroellenunterstützte Glycosylierung mit Bildung des Nebenproduktes **22**

Erfreulicherweise gelang die Abtrennung des entstandenen Trisaccharids **22** problemlos nach der sauren Verseifung des *tert*-Butylesters durch semipräparative HPLC, wobei das gewünschte 6F-T-Antigen-Analogon **23** mit in einer Ausbeute von 44% erhalten wurde.

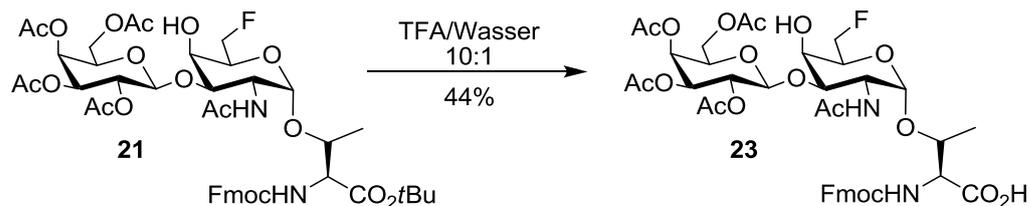


Abb. 3.23: Saure Hydrolyse des *tert*-Butylesters.

Zur Darstellung des dritten T-Antigen-Analogons, des 6'FT **34**, musste zunächst das natürliche T_N-Antigenderivat **30** als Galactosylakzeptor hergestellt werden. Dies erfolgte nach einem literaturbekannten Verfahren.^[55] ausgehend von dem bereits zuvor eingesetzten α -Bromids **20**, das zunächst in einer reduktiven Eliminierung zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**24**) umgesetzt und anschließend einer Azidonitratisierung nach *Lemieux*^[108] unterworfen wurde.

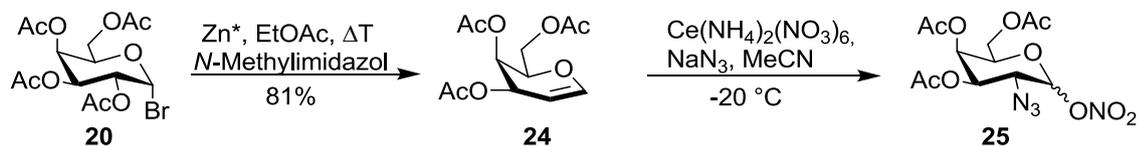


Abb. 3.24: Synthese des 3,4,6 Tri-*O*-acetylgalactal **25**

Das erhaltene anomere Gemisch des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrates (**25**) wurde auf Grund seiner Hydrolyseempfindlichkeit ohne vorherige säulenchromatographische Reinigung direkt mit wasserfreiem Lithiumbromid in Acetonitril zu dem Glycosyldonor **26** umgesetzt.

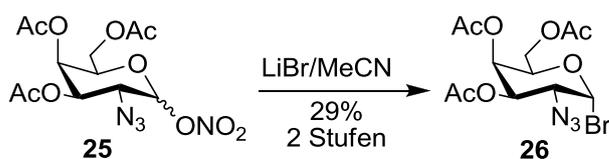


Abb. 3.25: Synthese des Glycosyldonors **26**

Die nachfolgende Glycosylierung zum T_N-Derivat **27** erfolgte wie zuvor beschrieben nach der *Paulsen-Hölck*-Variante^[115] der *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung,^[116] wobei erneut eine hohen α -Selektivität erreicht werden konnte. Die Abtrennung des in geringem Maße entstandenen β -Anomeres war jedoch auf dieser Stufe flashchromatographisch nur schwer möglich, so dass neben dem reinen α Anomer auch immer anteilig Mischfraktionen erhalten wurden.

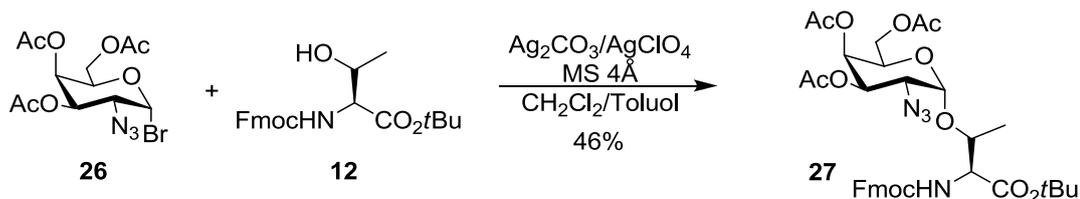


Abb. 3.26: Glycosylierung nach *Koenigs-Knorr*

Daher wurde zunächst die Azidfunktion der erhaltenen Glycosylaminosäure **27** durch reduktive Acetylierung mit aktiviertem Zinkstaub in einem THF/Acetanhydrid/Essigsäure-Gemisch (3:2:1) in eine Acetamidogruppe **28** umgewandelt (87%).^[118] Aufgrund der veränderten Polarität des Moleküls gelang es auf dieser Stufe problemlos, den bei der Glycosylierung gebildeten Anteil an β -Anomer säulenchromatographisch abzutrennen.

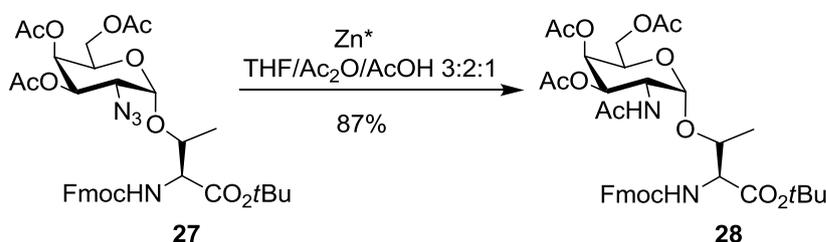


Abb. 3.27: Reduktive Acetylierung von **27**

Um den fluorierten Galactosyldonor selektiv mit der 3-Hydroxyfunktion dieses Akzeptors verknüpfen zu können, sollten durch Schutzgruppenmanipulationen die 4,6-Hydroxyfunktionen selektiv blockiert werden. Dafür wurden zunächst die Acetatschutzgruppen mittels Natriummethanolat in einer methanolischen Lösung bei $\text{pH} = 8.5$ entfernt und anschließend die 4- und die 6-Hydroxyfunktion selektiv durch ein Benzylidenacetal blockiert. Bei der Durchführung der *Zemplén*-Umesterung ist wiederum auf eine strikte Einhaltung des pH -Wertes zu achten, um eine Deblockierung der Aminfunktion zu vermeiden. Da sich die Bildung des freien Amines trotz ständiger Kontrolle des pH -Wertes nicht vollständig vermeiden ließ, wurde dieses nach flashchromatographischer Reinigung durch Umsetzung mit FmocOSu und DIPEA bei $\text{pH} 9.5$ wieder in das Fmoc-geschützte Produkt überführt. Die anschließende Einführung des Benzylidenacetals, das bevorzugt aus 1,3-Diolen entsteht und so die Position 4 und 6 gleichzeitig blockiert, erfolgte mit Benzaldehyddimethylacetat und katalytischen Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure in Acetonitril.^[120, 125]

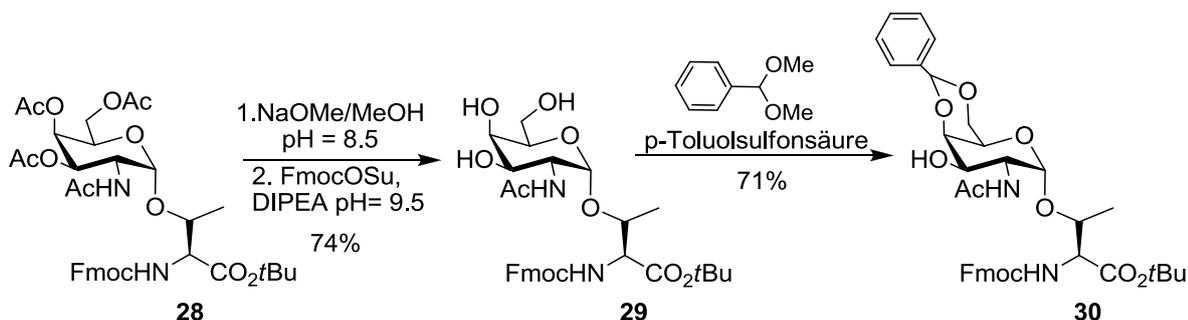


Abb. 3.28: Synthese des benzylidenacetal-geschützten Galactosylakzeptors **30**

Als Galactosyldonor für die nachfolgende *Helferich*-Glycosylierung wurde wieder auf das 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluoro- α -galactosyl-bromid (**6**) zurückgegriffen. Das T-Antigen-Analogon **31** konnte unter Zusatz von Quecksilber(II)cyanid als Promotor in einer Lösung aus absolutem Dichlormethan und Nitromethan (3:2) bei 80 °C in der Mikrowelle mit sehr guten Ausbeuten von 98% erhalten werden, wobei aufgrund des Nachbargruppeneffektes der Acetate in Position 2 wieder selektiv das gewünschte β -Glycosid resultierte.

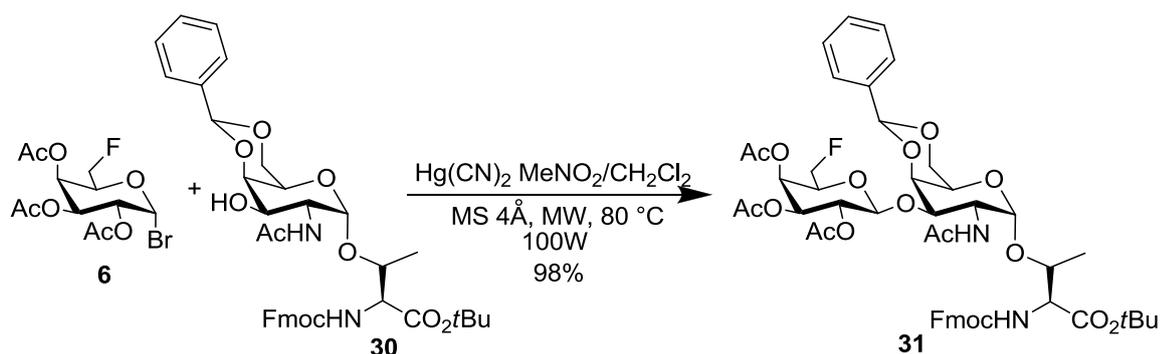


Abb. 3.29: Glycosylierung nach *Helferich*

Um die saure Hydrolyse des *tert*-Butylester durchführen zu können, und somit einen geeigneten Baustein für die Peptidfestphasensynthese zu erhalten, waren nun noch einige Schutzgruppenmanipulationen nötig. Zunächst sollte die säurelabile Acetalgruppe durch die stabileren Acetatgruppen ausgetauscht werden. Dafür wurde in einer säurekatalysierten Reaktion mit aktiviertem Kieselgel die Benzylidenacetalgruppe unter Freisetzung der beiden Hydroxylfunktionen gespalten.^[126] Alternativ lässt sich diese Schutzgruppe auch durch die Behandlung mit katalytischen Mengen an Iod in Methanol bei einer Temperatur von 80 °C entfernen.^[127]

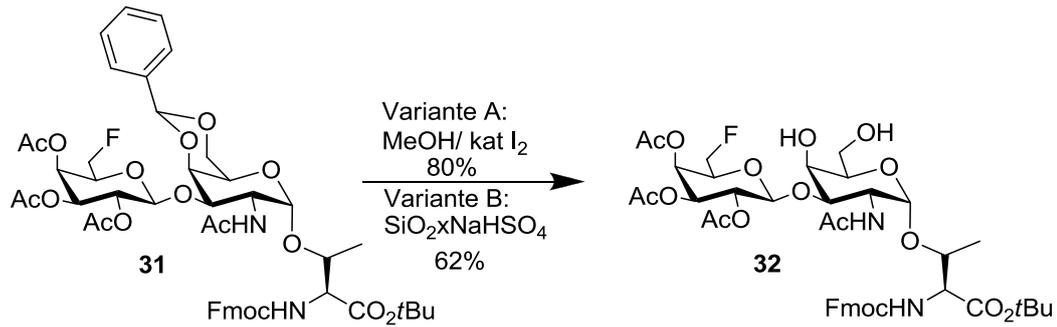


Abb. 3.30: Säurekatalysierte Abspaltung des Benzylidenacetals

Anschließende Acetylierung der beiden freien Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid/Pyridin (1:2) und saure Verseifung des *tert*-Butylesters lieferten einen weiteren neuartigen TAA-Baustein für den Einbau in die *tandem repeat*-Sequenz des epithelialen MUC1.

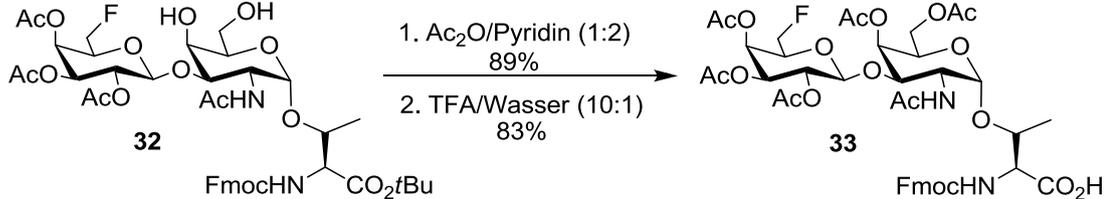


Abb. 3.31: Synthese des 6^oF-T-Antigen-Festphasenbausteins **33**

Um nachzuweisen, dass durch den Einbau des Fluoratoms tatsächlich eine metabolische Stabilisierung des Moleküls erzielt wird, sollten im Folgenden die von Manuel Johannes Rahmen seiner Dissertation durchgeführten Studien zur Stabilität der synthetisierten Antigene gegenüber β -Galactosidasen vorgestellt werden.^[83] Die im Körper vorhandenen β -Galactosidasen katalysieren die Hydrolyse von z.B. T-Antigen analogen Disacchariden zur Galactose und dem Galactosaminbaustein. Eine Hemmung dieser Enzyme und eine damit verlängerte Überlebensdauer der Antigene im Körper sollte zu einer verstärkten Immunantwort gegen die synthetischen Vakzine führen.

Um die in dieser Arbeit synthetisierten in Position 6 fluorierten T-Antigenanaloga bezüglich ihrer Stabilität testen lassen zu können, mussten zunächst sämtliche Alkoholfunktionen der Antigene durch Umesterung mit einer methanolischen Natriummethanolatlösung deblockiert^[55] werden.

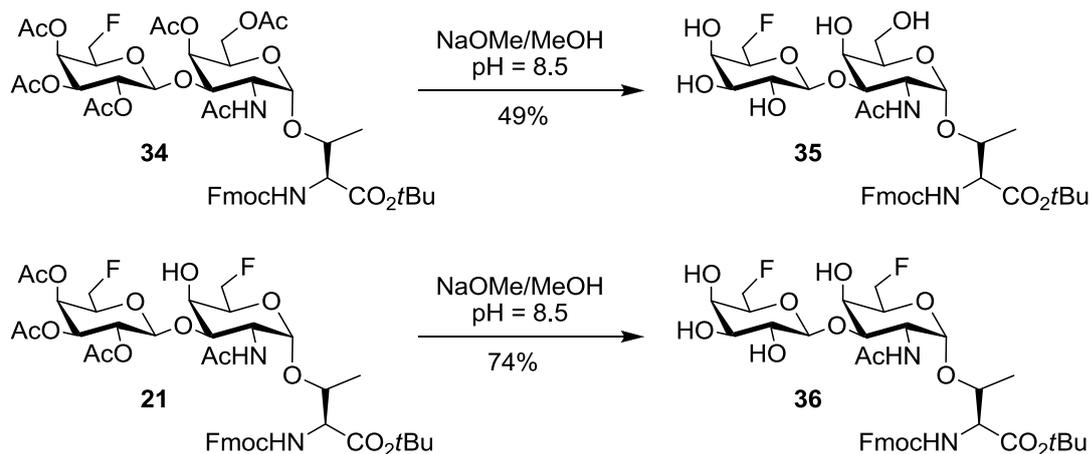


Abb. 3.32: Synthese der Substrate für die Stabilisationsexperimente

Die erhaltenen Substrate konnten dann von M. Johannes im Vergleich zu dem natürlichen T-Antigen, in Abbaustudien mit der kommerziell erhältlichen β -Galactosidase untersucht werden.^[128, 129] Dafür wurden die entsprechenden Antigene in einer MES-Pufferlösung, die Cyclodextrin als Lösungsvermittler und BSA enthielt, mit dem Enzym versetzt und stark geschüttelt.^[83]

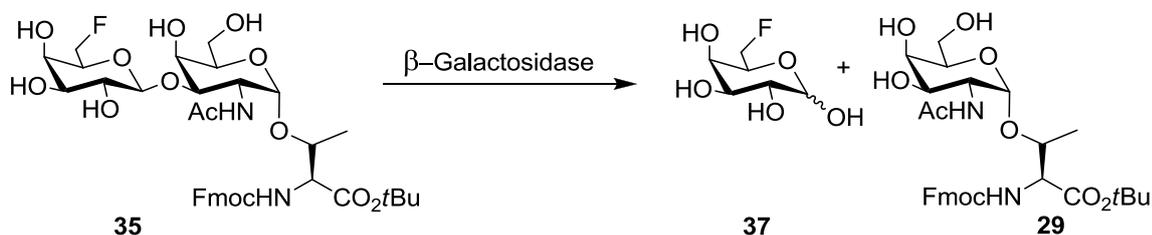


Abb. 3.33: Hydrolyse des T-Antigens **35** durch β -Galactosidase

Innerhalb fester Zeitabstände wurde durch analytische HPLC der Fortschritt der Hydrolyse verfolgt. Dabei diente die Fmoc-Schutzgruppe als Chromophor zum Nachweis des T- bzw. T_N-Antigens, welche sich deutlich in ihrer Retentionszeit unterscheiden.

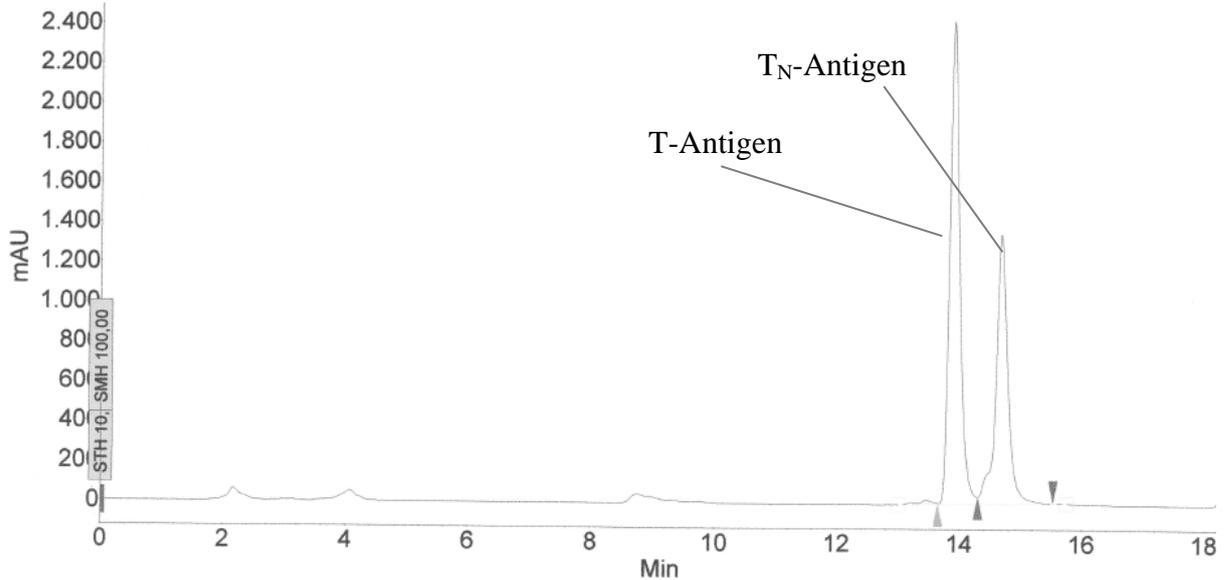


Abb. 3.34: HPLC Profil des 6'F-T-Antigens 35 33.5 Stunden nach Zugabe des Enzyms ($\lambda = 264 \text{ nm}$)

Wie im Falle des natürlichen T-Antigens konnte auch hier eine Hydrolyse des Disaccharides beobachtet werden. Dies zeigte sich in der kontinuierlichen Abnahme der zum 6'F-T-Antigen gehörenden Signalstärke und der Zunahme des T_N -Signals.

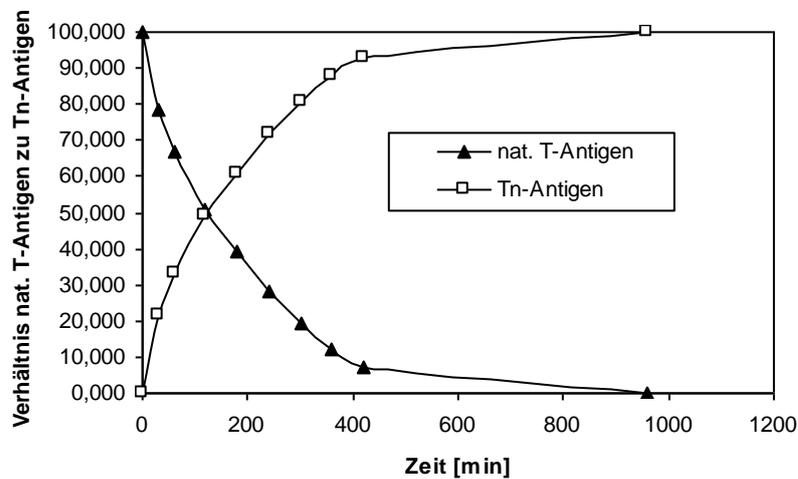


Abb. 3.35: Enzymatischer Abbau des natürlichen T-Antigens

Allerdings verlief dieser Abbau deutlich langsamer als der des natürlichen Antigens (Abb. 3.35), so dass nach einer Messzeit von zwei Tagen noch immer 60% des Substrates vorhanden waren (Abb. 3.36).^[83]

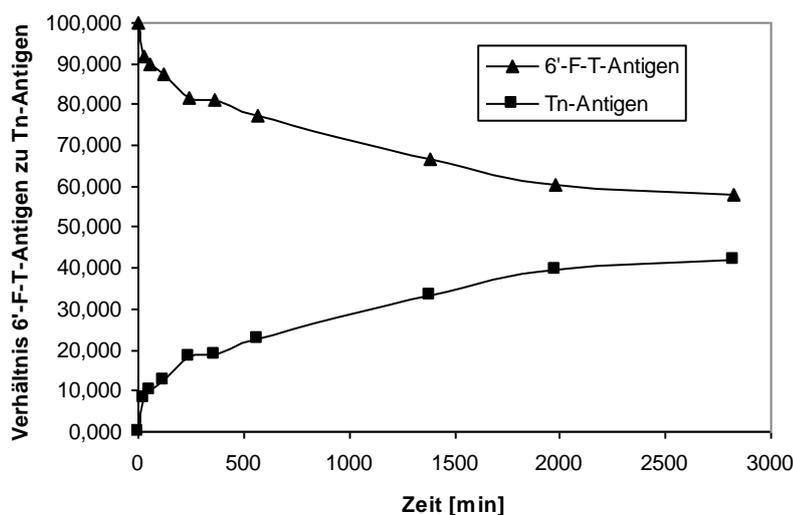


Abb. 3.36: Enzymatischer Abbau des 6'-F-T-Antigens **35**

Als eine mögliche Ursache für diesen Befund käme vor allem eine schlechtere Enzyme-Substrat-Erkennung in Frage, wodurch sowohl die Bindung des Substrates in der Enzymtasche als auch die Hydrolyse deutlich verlangsamt wären.

Analog zu diesen Untersuchungen sollte auch die enzymatische Stabilität des 6'-F-6F-T-Antigens **36** überprüft werden. Da diese Verbindung jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen keine ausreichende Löslichkeit besaß, sollte zunächst der *tert*-Butylester sauer gespalten werden, was jedoch misslang und zur Zersetzung des Produktes führte. Eine mögliche Erklärung dafür ist die fehlende stabilisierende Wirkung der Acetatgruppen, wodurch das Molekül eine deutlich höhere Säurelabilität besitzt.^[130]

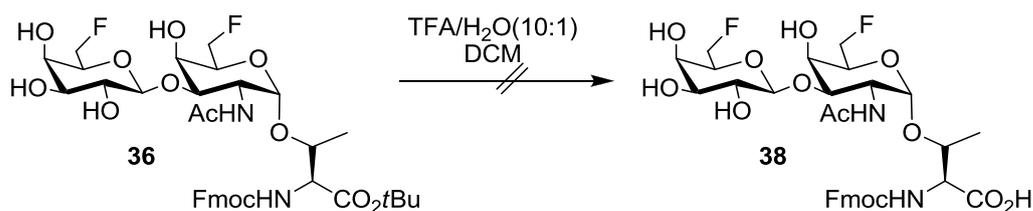


Abb. 3.37: Versuch der sauren Hydrolyse des *tert*-Butylesters

Synthese der strukturisomeren Sialyl-T-Antigen-Analoga

Zur Synthese der beiden 6'F-ST-Antigen-Analoga war zunächst die Darstellung der entsprechend geschützten T-Antigen-Analoga notwendig, die dann in einem nächsten Schritt sialyliert werden sollten. Hierzu wurde von dem oben beschriebenen 6'F-T-Baustein **31** ausgegangen, welcher nach Schutzgruppenmanipulation und Reaktion mit einem geeigneten Sialinsäuredonor in die gewünschten ST-Antigen-Analoga **44** und **47** überführt werden sollte.

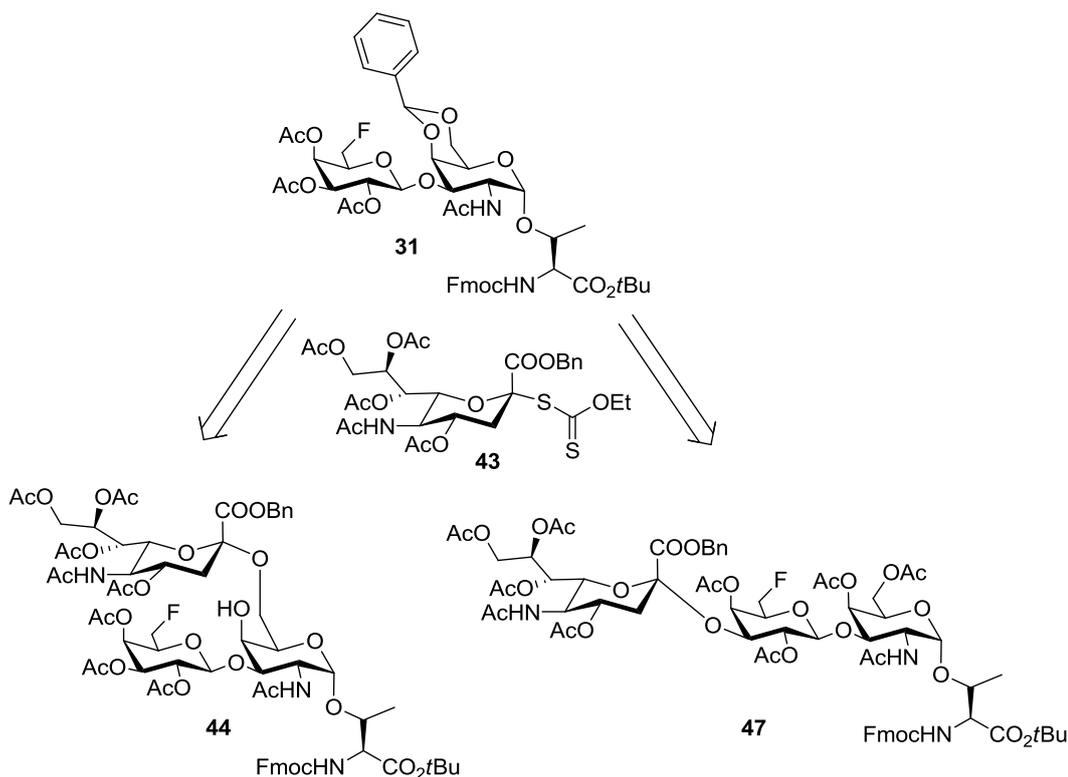


Abb. 3.38: Syntheseroute zur Darstellung der beiden 6'F-ST-Antigen-Analoga

Zunächst musste ein entsprechender Sialinsäuredonor für die anstehenden Sialylierungsreaktionen synthetisiert werden. Wie bereits in früheren Arbeiten^[114] und auch von *Dziadek*^[131, 132] beschrieben, dienen bei der Sialylierung selten Halogenide oder Trichloracetimide, welche sonst gern als Galactosyldonoren eingesetzt werden, als Abgangsgruppe, sondern vielmehr die entsprechenden Xanthogenate. Als Schutzgruppe für die Carboxylgruppe der Neuraminsäure wurde hier analog zu den Arbeiten von *S. Keil*^[56] ein Benzylester verwendet, der sich unter recht milden Bedingungen abspalten lässt. Ausgehend von der *N*-Acetylneuraminsäure (**39**) ließ sich der Donor **43** in vier Stufen synthetisieren. Dabei wurden zunächst wurden die freien Hydroxylgruppen von **39** mit einer Mischung aus

Acetanhydrid und Pyridin (1:2) acetyliert, bevor das *in situ* erzeugte Cäsiumsalz^[133] der freien Säure zu dem Benzylester umgesetzt wurde.^[134]

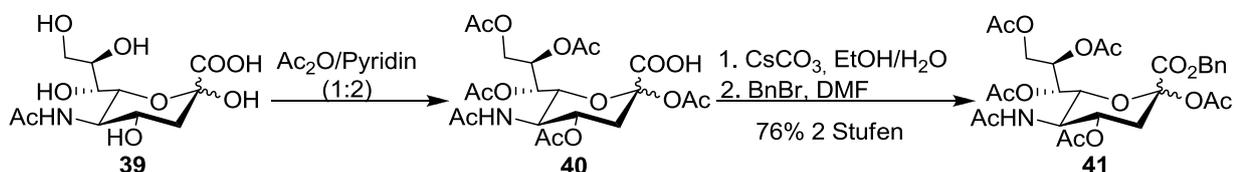


Abb. 3.39: Einführung der Schutzgruppen der Sialinsäure

Die vollständig geschützte Sialinsäure **41** wurde dann durch Behandlung mit *in situ* erzeugtem Chlorwasserstoff in das anomere Chlorid überführt, das aufgrund seiner Hydrolyseempfindlichkeit sofort unter Verwendung von Kaliummethylxanthogenat zu dem gewünschten Donor umgesetzt wurde.

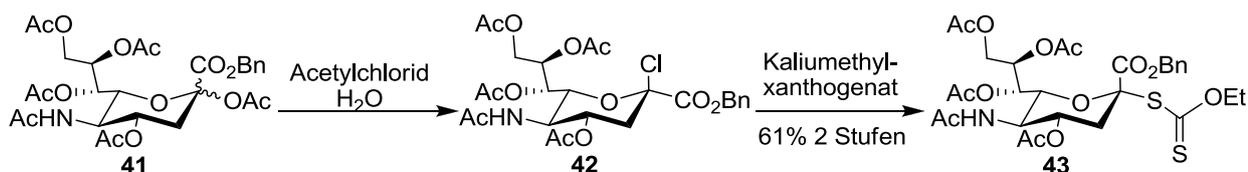


Abb. 3.40: Synthese des Neuraminsäuredonors **43**

Die Aktivierung dieser Xanthogenatdonoren kann durch die Zugabe äquimolaren Mengen von thiophilen Promotoren, wie z. B. Methylsulfonyltriflat (MeOTf),^[135] Phenylsulfonyltriflat (PhOTf),^[136] Dimethyl(methylthio)-sulfoniumtriflat (DMTST)^[137] oder *N*-Iodsuccinimid (NIS)^[138, 139] erfolgen. Das in dieser Arbeit verwendete Methylsulfonyltriflat wurde *in situ* aus Silbertriflat und frisch hergestellter Methylsulfonylbromidlösung, welche aus Dimethyldisulfid und Brom in Dichlorethan gewonnen wurde, erzeugt. Bei der Aktivierung des Sialinsäuredonors **43** koordiniert zunächst der Promotor an den doppelt gebundenen Schwefel des Thiocarbonates. Dabei kommt es zur Bildung des Disulfides **I**, das als Austrittsgruppe fungiert und ein intermediäres Kation **II** hinterlässt. Dieses kann anschließend mit dem Sialylakzeptor zu dem gewünschten Produkt **III** reagieren.

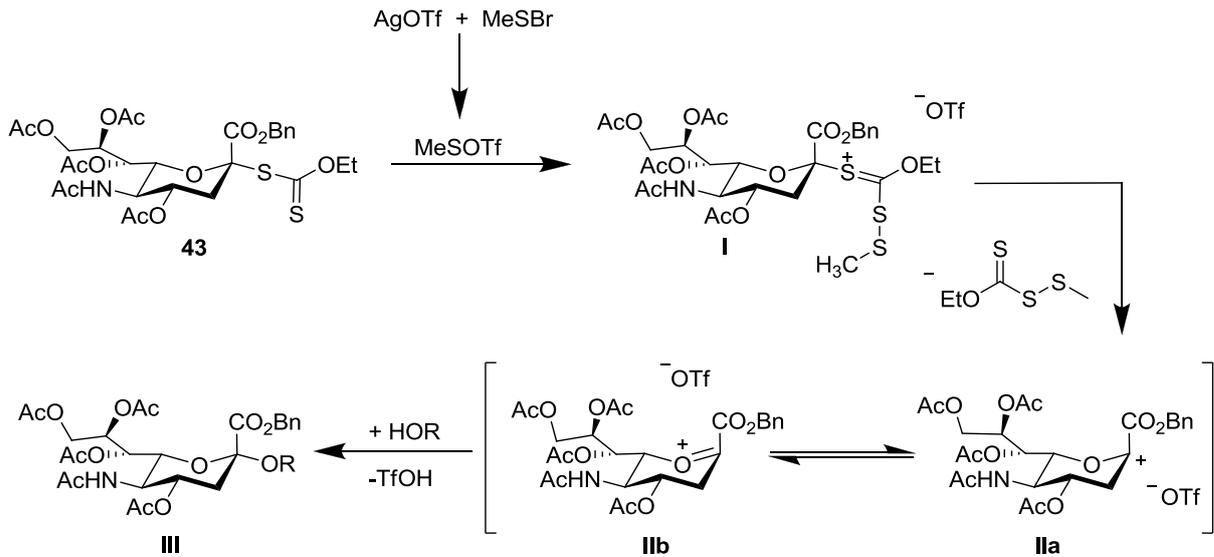


Abb. 3.41: Aktivierung des Sialinsäurexanthogenat **43**

Prinzipiell stellen stereoselektive Sialylierungen häufig schwierige Glycosylierungsreaktionen dar. Im Gegensatz zur Galactose besitzt die Neuraminsäure ein tertiäres Kohlenstoffatom am anomeren Zentrum, wodurch die Reaktivität sterisch stark eingeschränkt wird. Außerdem stehen keine dirigierenden Substituenten in der direkten Nachbarschaft des anomeren Zentrums zur Verfügung, so dass der stereochemische Verlauf der Reaktion nicht durch nachbargruppenaktive Substituenten beeinflusst werden kann und häufig anomere Gemische des Produktes resultieren, die aufwendig säulenchromatographische Trennungen erfordern. Zusätzlich dazu führt der elektronenziehende Carboxylatsubstituent am anomeren Zentrum zu einer merklichen Destabilisierung des Oxocarbeniumions, wodurch als Nebenreaktion häufig die 2,3-Eliminierung unter Ausbildung von Glycalen beobachtet wird. Um dennoch gute Ausbeuten in der Sialylierungsreaktion zu erhalten, werden die teuren, jedoch meist unreaktiven Donoren in Überschüssen von ca. 2.5 Äquivalenten eingesetzt.

Trotz der fehlenden dirigierenden Nachbargruppen ist es jedoch möglich, den stereochemischen Verlauf der Sialylierungsreaktion zu beeinflussen. So kann durch die geschickte Wahl der Reaktionstemperatur und des Lösungsmittels der Anteil des gewünschten α -Glycosids merklich gesteigert werden, indem der sogenannte Nitril-Effekt ausgenutzt wird.^[140, 141]

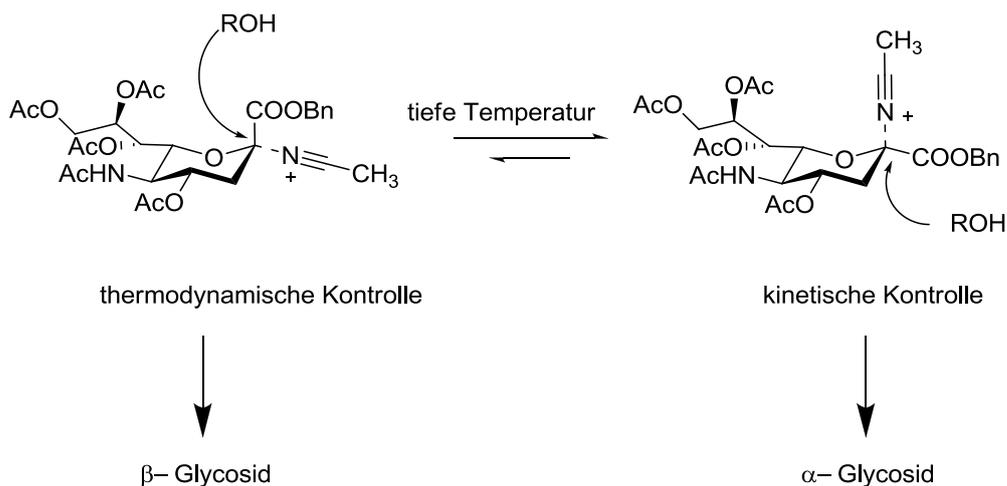


Abb. 3.42: Der Nitrileffekt

Dieser beruht auf der Koordination von Acetonitril als Lösungsmittel an das intermediär entstehende Sialylkation, wobei abhängig von der Temperatur sowohl eine äquatoriale als auch eine axiale Koordination auftreten kann. Dabei führen tiefe Temperaturen zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes hin zu der kinetisch kontrollierten axialen Koordination. Liegt das Molekül in dieser Koordination vor, so kann der Angriff des Akzeptors jedoch nur noch von der äquatorialen Seite aus erfolgen, und es kommt zu einer stereoselektiven Bildung des α -Glycosids. Bei höheren Temperaturen hingegen überwiegt die thermodynamisch stabilere äquatoriale Koordination. Aus dieser kann der nucleophile Angriff lediglich von der axialen Seite aus erfolgen und das β -Glycosid entsteht als Hauptprodukt.

Als Akzeptor für die Darstellung des 6'F-2,6-ST-Antigen Analogons **32** konnte auf das bereits synthetisierte partiell entschützte 6'F-T-Antigen zurückgegriffen werden (Abb. 3.43). Ein Blockieren der freien 4-Hydroxylfunktion war dabei nicht notwendig, da vorzugsweise die reaktivere und zudem sterisch weniger gehinderte 6-Hydroxylfunktion unter den Reaktionsbedingungen reagierte.^[120]

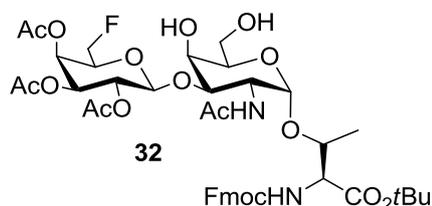


Abb. 3.43: Sialinsäureakzeptor zur Darstellung des 6'F-2,6-ST-Antigens **44**

Die stereoselektive Sialylierung des T-Antigen-Analogons **32** erfolgte schließlich unter Ausnutzung des Nitrileffektes bei einer Temperatur von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Mischung aus

Acetonitril und Dichlormethan. Die Zugabe des Dichlormethans war dabei notwendig, um das Einfrieren der Reaktionslösung zu verhindern. Der Donor **43** wurde mit einem 2,5-fachen Überschuss eingesetzt, um trotz der drohenden 2,3-Eliminierung des Sialinsäuredonors **43** eine gute Ausbeute an sialyliertem Produkt zu erhalten. Die Aktivierung des Xanthogenatdonors **43** erfolgte durch *in situ* dargestelltes Methylsulfonyltriflat. Dafür wurde zunächst das Silbertriflat in der Reaktionslösung vorgelegt. Und tropfenweise mit einer vorgekühlten Lösung aus Methylsulfonylbromid in Dichlorethan versetzt. Nach säulenchromatographischer Abtrennung der Nebenprodukte konnte das gewünschte α -Glycosid **44** in sehr guten Ausbeuten von 88% erhalten werden.

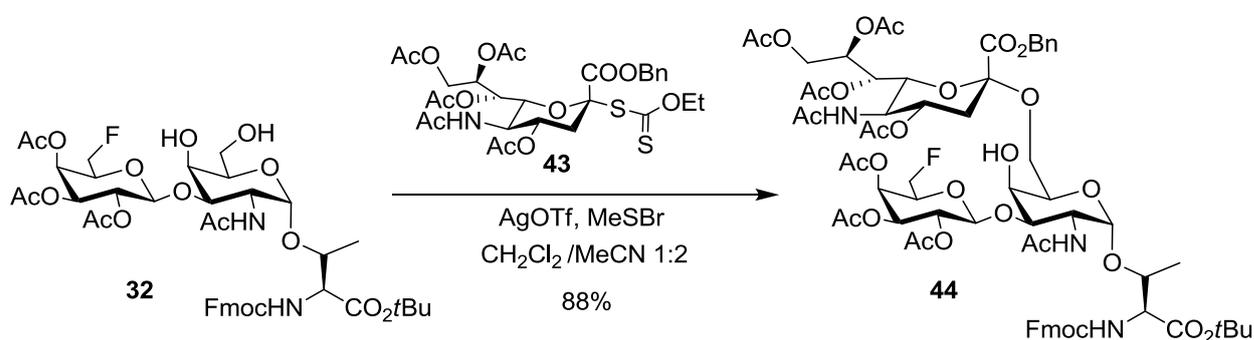


Abb. 3.44: Sialylierung des T-Bausteins **32**

Weil es sich bei dem anomeren Zentrum der Sialinsäure um ein quartäres Kohlenstoffatom handelt wird die Bestimmung der anomeren Konfiguration deutlich erschwert. So ist die übliche Messung der Kopplungskonstanten $^3J_{H1,H2}$ nicht mehr möglich. Dennoch beruht auch hier die Bestimmung der Konfiguration auf dem Vergleich der chemischen Verschiebung und verschiedener Kopplungskonstanten im NMR-Experiment. Dafür wurden durch den Vergleich von verschiedenen α - und β -verknüpfter Sialinsäurederivaten folgende empirische Regeln aufgestellt.^[142, 143, 144]

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

Diese Regeln beruhen hauptsächlich auf der Differenz der chemischen Verschiebung und dem empirischen Vergleich zwischen den Kopplungskonstanten des α - und β -Glycosides. Sie dienen damit eher als Anhaltspunkt und sind vor allem für komplexere Strukturen nicht allgemeingültig. Durch Auswertung der spektroskopischen Daten von Verbindung **44** konnte

für das äquatoriale Proton in Position 3 eine chemische Verschiebung von $\delta = 2.61$ ppm bestimmt werden. Da die chemische Verschiebung dieses Protons im β -Anomeren jedoch bei einem deutlich höheren Feld von 2.40 - 2.57 ppm zu erwarten ist, lieferte dieser Befund einen ersten Hinweis auf das Vorliegen des α -anomeren Produktes. Des Weiteren konnte eine Differenz der chemischen Verschiebung der beiden geminalen Protonen an C-9 von 0.22 ppm gemessen werden. Nach Regel 3 sollte diese Differenz bei dem β -Anomer mit ca. 1.0 ppm deutlich höher als im Falle des α -konfigurierten Produktes liegen. Auch die chemische Verschiebung des 4''-Protons bei 4.85 ppm liegt deutlich hochfeld verschoben. Zudem weist ein Vergleich der erhaltenen spektroskopischen Daten mit denen des natürlichen Vertreters eindeutig auf das Vorliegen des α -anomeren Sialosids hin.

Auf die Blockierung der 4-Hydroxylgruppe durch einen Acetatrest wurde für den nachfolgenden Einsatz in der Festphasenglycopeptidsynthese aus sterischen Gründen verzichtet,^[145] so dass für die Peptidsynthese lediglich der C-Terminus freigesetzt werden musste. Dies erfolgte durch Behandlung mit Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur unter Zusatz von Anisol als Kationenfänger.

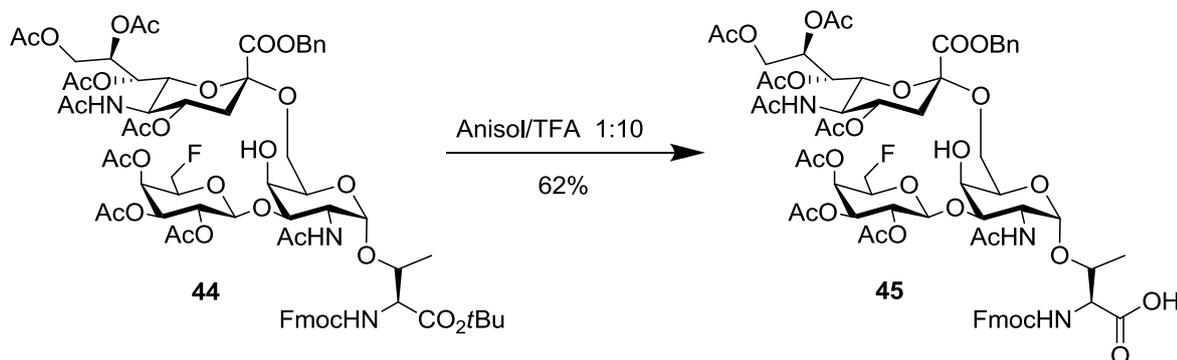


Abb. 3.45: Acidolyse des *tert*-Butylesters **44**

Zur Synthese des regioisomeren 6'F-2,3-ST-Antigens musste zunächst ein geeigneter Akzeptorbaustein dargestellt werden, bei dem die reaktivere 6-Hydroxylgruppe blockiert vorlag. Da die 6'-Position des benzylidengeschützten Bausteins **31** bereits durch ein Fluoratom blockiert war und die Benzylidenschutzgruppe mit den nachfolgenden Reaktionen kompatibel ist, konnte daraus der gewünschte Sialylakzeptor durch Umesterung von **31** erhalten werden. Auch bei dieser Reaktion ließ sich die Bildung des freien Amins nicht vollständig verhindern, so dass ein zusätzlicher Behandlungsschritt mit FmocOSu in Dioxan für eine gute Ausbeute an **46** notwendig war.

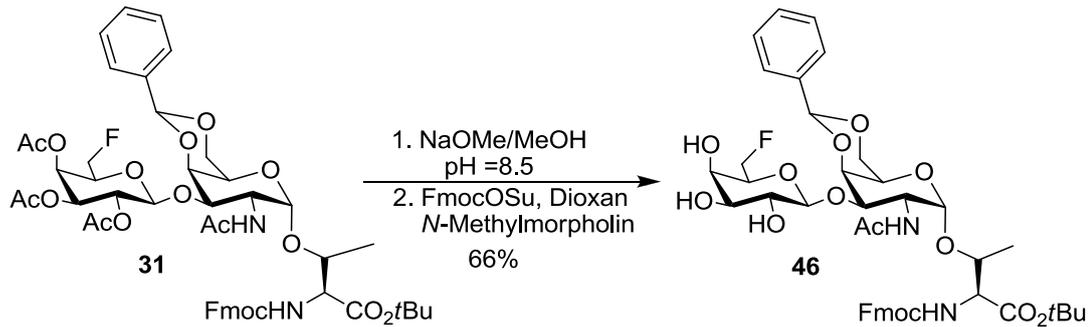


Abb. 3.46: Synthese des Sialinsäurerezeptors

Die anschließende stereoselektive Sialylierung erfolgte analog zur oben beschriebenen Durchführung.^[114, 146] Jedoch musste aufgrund der etwas geringeren Reaktivität der 3'-Hydroxylfunktion im Vergleich zu der 6 OH-Gruppe, die Temperatur von -40°C auf -20°C erhöht und die Reaktionsdauer auf fünf Tage ausgedehnt werden. Dennoch konnte hier nur eine mäßige Ausbeute von 25% erzielt werden, die zum Teil sicherlich auch aus der geringeren Reaktivität des Akzeptors, bedingt durch den starken Elektronenzug des Fluoratoms, resultiert.

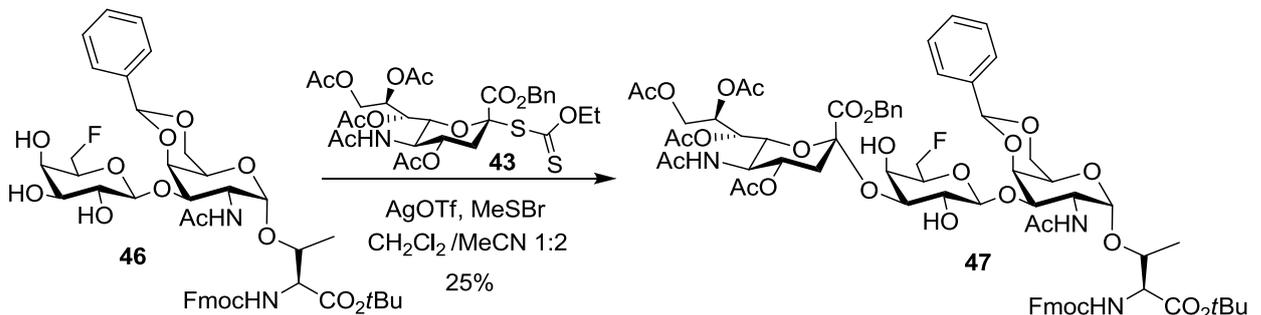


Abb. 3.47: stereoselektive Sialylierung zu dem 6'F-2,3-ST-Antigen-Analogon **47**

Im Gegensatz zur Synthese des strukturisomeren 6'F-2,6-ST Antigens **44** musste Verbindung **47** vor der Festphasenpeptidsynthese noch abschließenden Schutzgruppenmanipulation unterworfen werden. So wurde zunächst das Benzylidenacetal durch Erhitzen in 80%iger Essigsäure sauer gespalten und die resultierenden freien Hydroxylgruppen wurden dann mit einem Gemisch aus Acetanhydrid und Pyridin (1:2) acetyliert.

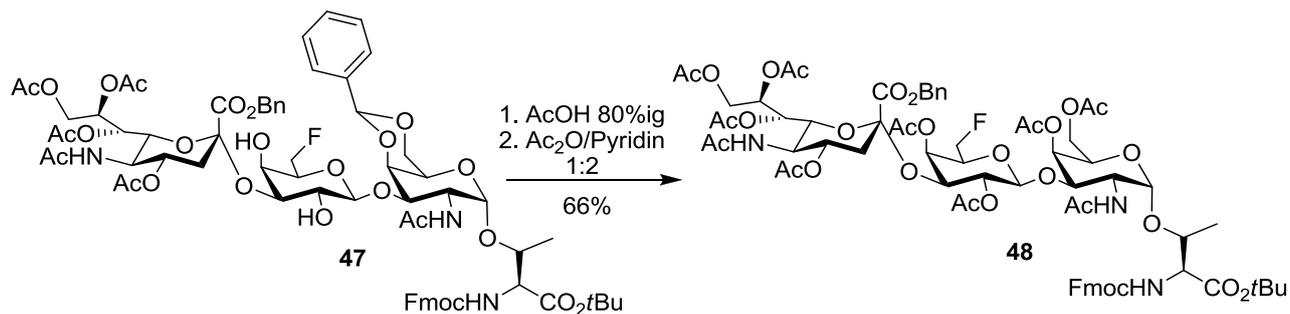


Abb. 3.48: Schutzgruppenmanipulation zur Synthese des Festphasenbausteins **48**

In einem letzten Schritt wurde schließlich die Säurefunktion des Bausteins **48** durch Behandlung mit einem Gemisch aus TFA und Wasser (10:1) freigesetzt.

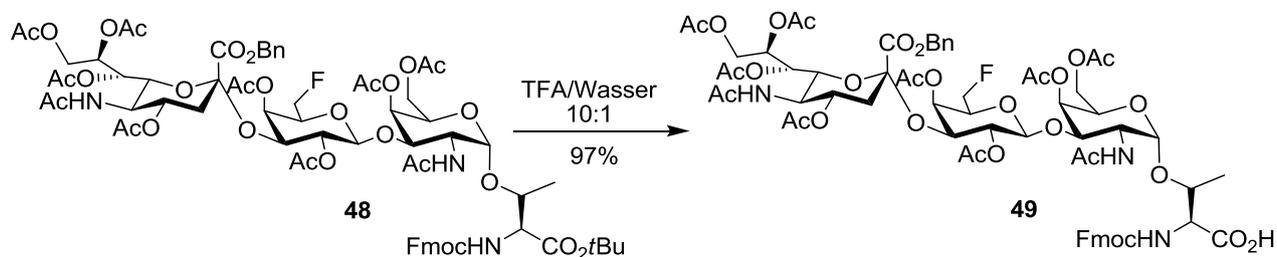


Abb. 3.49: Acidolyse des *tert*-Butylesters

So konnten ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufermolekül, dem 6'F-T-Antigen **31** durch geschickte Schutzgruppenmanipulation und stereoselektiver Sialylierung zwei neuartige fluorierte Sialyl-T-Antigene für die Festphasenpeptidsynthese dargestellt werden.

3.1.2 Synthese der carbaanalogen Glycosylaminosäuren

Mit Blick auf die erforderliche Stereochemie sollte die Synthese des Carbazuckerbausteins von einem geeignet geschützten Galactosevorläufer **60** ausgehen, der im Schlüsselschritt über eine *Ferrier-II*-Umlagerung in den gewünschten Carbocyclus **63** überführt würde. Nachfolgende Transformationen einschließlich Petasis-Olefinierung und Hydroborierung sollten schließlich einen geeigneten Carbagalactosyldonor liefern, der in einer nucleophilen Substitution mit einem geeigneten Akzeptorbaustein schließlich zu dem gewünschten T-Antigenanalogon führen sollte.

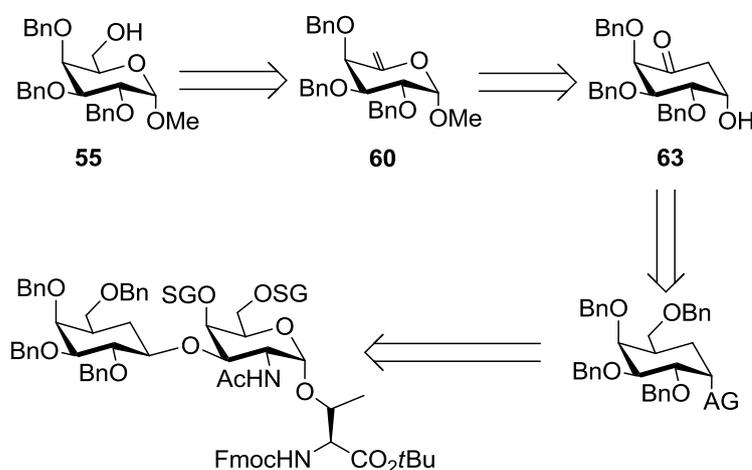


Abb. 3.50: Retrosynthese zur Darstellung der Pseudo-Glycosylaminosäure

Um die geplante Umlagerung durchführen zu können, wurde ein Galactosebaustein mit dem folgenden Schutzgruppenmuster benötigt: So sollte die 6-Hydroxylfunktion frei vorliegen, während die 2, 3- und 4-Hydroxylgruppen in Form von Benzylethern blockiert werden. Diese Schutzgruppen hatten sich bereits zuvor in solchen Umlagerungssequenzen bewährt^[147] und sollten durch einen anomeren Methylether ergänzt werden

Eine Möglichkeit, das oben genannte Schutzgruppenmuster aufzubauen, sollte von der schon bekannten Isopropyliden geschützten Galactose **2** ausgehen. Diese wurde durch Behandlung mit *p*-Methoxybenzylchlorid und Natriumhydrid in DMF in den entsprechend geschützten Baustein **50** überführt. In Gegenwart der PMB-Schutzgruppe sollte eine anschließende Schutzgruppenmanipulation das gewünschte Produkt **51** liefern.

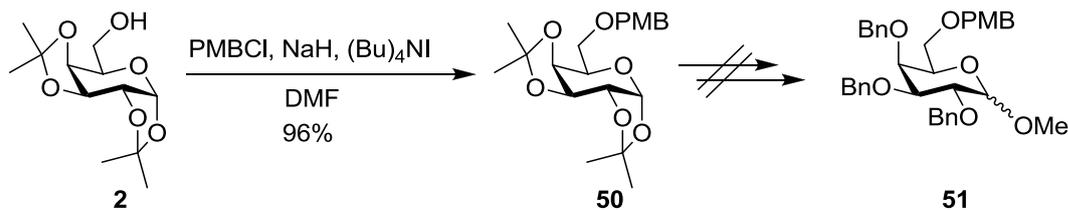


Abb. 3.51: Einführung der *para*-Methoxybenzylschutzgruppe und anschließende selektive Schutzgruppenmanipulation

Allerdings konnte die in Abb. 3.51 gezeigte Schutzgruppenmanipulation, die selektives Abspalten der Acetalschutzgruppen und anschließende selektive Blockierung der freien Hydroxylgruppen beinhaltet, auch unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen nicht durchgeführt werden.¹ Daher wurde auf eine alternative Synthese Strategie zurückgegriffen, bei der die Einführung des benötigten anomeren Methylethers durch Erhitzen von D-Galactose unter Rückfluss in Methanol unter Verwendung eines sauren Ionenauschers erfolgte.^[148] Alternativ ließ sich die Methylgruppe auch unter saurer Katalyse durch die Zugabe von Acetylchlorid einführen.^[149]

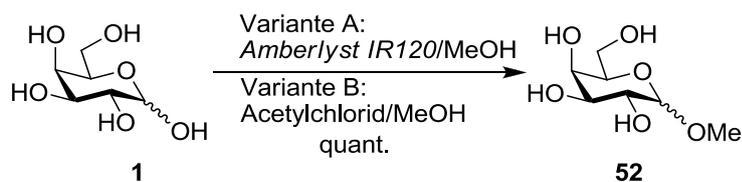


Abb. 3.52: Saure Methylierung des anomeren Zentrums

Die anschließende selektive Einführung eines Benzylidenacetals, das die Positionen 4 und 6 gleichzeitig blockiert, erfolgte unter Einsatz von Benzaldehyddimethylacetal und katalytischen Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure in Acetonitril.^[150] Im Anschluss daran wurden die verbleibenden 2- und 3-Hydroxylgruppen durch Deprotonierung mit Natriumhydrid und nucleophiler Substitution in die entsprechenden Benzylether überführt.^[151]

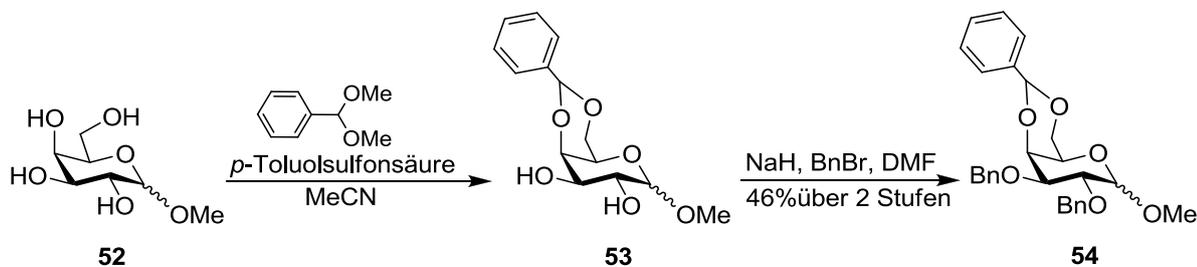


Abb. 3.53: Synthese der vollständig geschützten Galactose **54**

¹ Dowex 50WX8 in MeOH, Amberlyst 15 MeOH/THF, Amberlite IRC 80 MeOH, BiCl₃ in MeCN/Wasser

Ausgehend von diesem vollständig geschützten Baustein **54** sollte nun die regioselektive Öffnung des Benzylidenacetals nach einem literaturbekanntem Verfahren^{[152],[153]} in Gegenwart von Aluminiumchlorid als Lewis-Säure und Lithiumaluminiumhydrid als Hydrid-Donor erfolgen.^{[152] [153]}

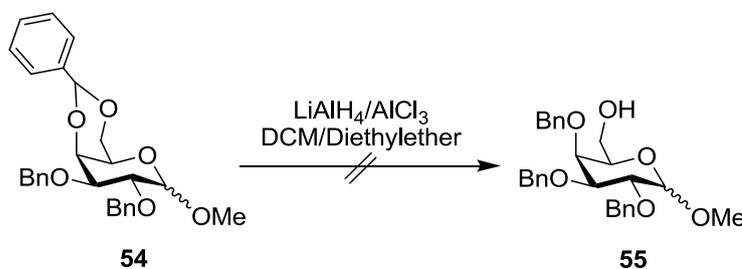


Abb. 3.54: Selektive Benzylidenacetalspaltung

Unter diesen Reaktionsbedingungen war jedoch leider keine Produktbildung zu beobachten, weshalb auf eine kürzlich beschriebene Variante dieser Reaktion zurückgegriffen wurde, mit deren Hilfe verschiedene Glucosederivate selektiv in Gegenwart von Kupfertriflat und Boran-THF-Komplex in Position 6 deblockiert werden konnten.^[154] Erfreulicherweise verlief die Reaktion auch mit dem vorliegenden Galactosebaustein **54** glatt, und das gewünschte Produkt **55** konnte in einer sehr guten Ausbeute von 92% erhalten werden.

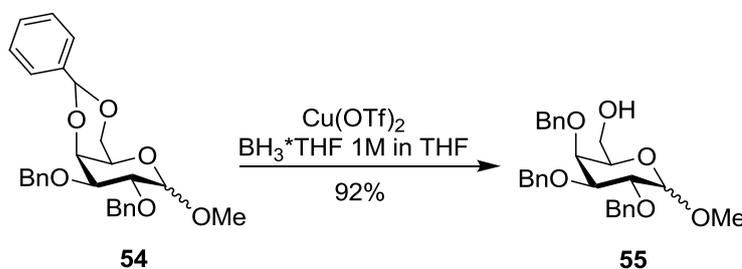


Abb. 3.55: Regioselektive Acetalöffnung

Ein Nachteil dieser Reaktion ist jedoch der Einsatz relativ teurer Chemikalien zu einem recht frühen Zeitpunkt der Synthese. Zudem wurde in den folgenden Reaktionen ein Einbruch der Ausbeute beobachtet, der vermutlich auf nicht abgetrennte Boranspuren zurückzuführen ist. Daher wurde nach einem alternativen Verfahren zur Darstellung von **55** gesucht, wobei die Wahl auf die Triphenylmethylgruppe (Tritylgruppe)^[104, 155] als temporäre Hydroxylschutzgruppe fiel. Diese konnte bei 0 °C unter DMAP-Katalyse selektiv in die Position 6 der Methylgalactosids **52** eingeführt werden.^[156]

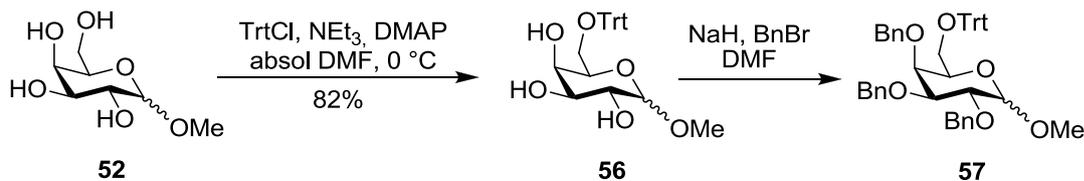


Abb. 3.56: Selektive Blockierung der 6-Hydroxylgruppe und nachfolgende Benzylierung

Eine anschließende Benzylierung lieferte das vollständig geschützten Galactosederivat **57**, das im Folgenden unter sauren Bedingungen selektiv in Position 6 deblockiert werden sollte. Erstaunlicherweise gelang die Deblockierung der 6-Hydroxylfunktion weder in Gegenwart von Trifluoressigsäure/Anisol noch unter Verwendung von TMSOTf und Et_3SiH ,^[157] d.h. unter reduktiven Bedingungen.

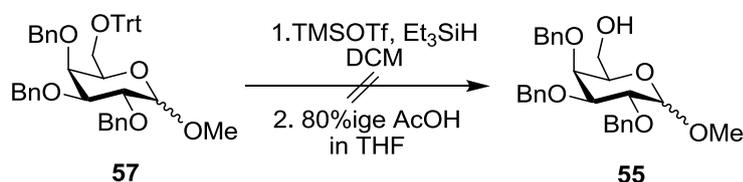


Abb. 3.57: Versuch zur Tritylentfernung

Vermutlich wurden im letzten Fall während des Hydrolyseschrittes mit 80%iger Essigsäure nicht nur der intermediär gebildeten Silylether^[157] sondern auch die Benzylschutzgruppen abgespalten. Daher sollte getestet werden, ob durch Behandlung mit TBAF selektiv der Silylether in Gegenwart der Benzylgruppen gespalten werden konnte.

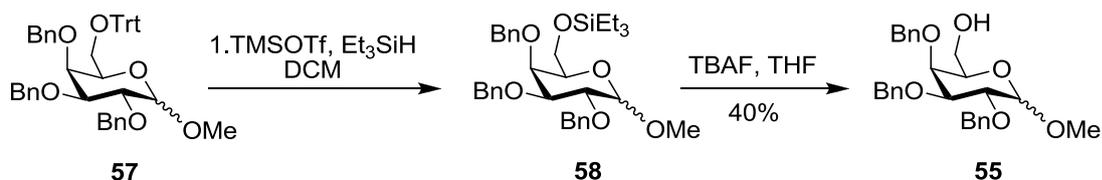


Abb. 3.58: Spaltung des Silylethers durch Behandlung mit TBAF

Letzteres gelang in der Tat, und das gewünschte Produkt konnte in 40%iger Ausbeute erhalten werden. Alternativ ließ sich die Tritylgruppe nach einer Methode von Dax^[158, 159] unter Verwendung von Bortrifluorid abspalten, wobei diese Umsetzung schnell und in sehr guten Ausbeuten verläuft.

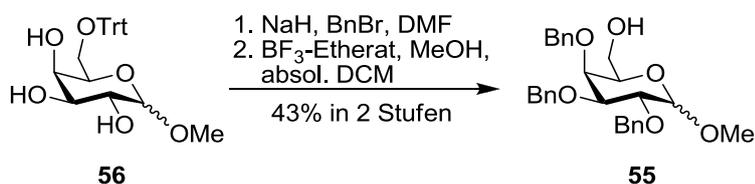


Abb. 3.59: Deblockierung der 6-Hydroxylgruppe

Aus dem freigesetzten Alkohol wurde anschließend nach Garegg^[160] die entsprechende Iodverbindung **59** hergestellt, wozu **55** in einer Lösung aus Triphenylphosphin, Imidazol und Iod in Tetrahydrofuran unter Rückfluss erhitzt wurde.^[161]

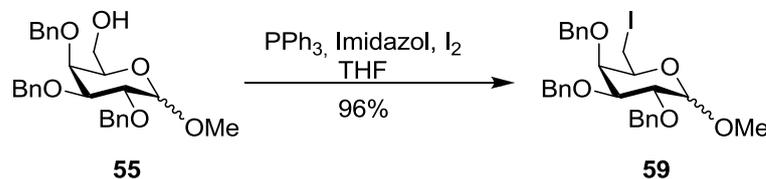


Abb. 3.60: Substitution der OH-Gruppe nach Garegg

Triebkraft der Reaktion ist die Bildung des stabilen Triphenylphosphinoxids. Mechanistisch kommt es dabei zunächst zu einer Salzbildung **II** unter Freisetzung von Iodidanionen. Das erhaltene Iminophosphoran **II** kann dann mit dem Alkohol unter Ausbildung eines Alkoxyphosphoniumions **III** reagieren, das von Iodid nucleophil angegriffen wird. Nach Abspaltung von Triphenylphosphinoxid resultiert dann das gewünschte halogenierte Produkt.

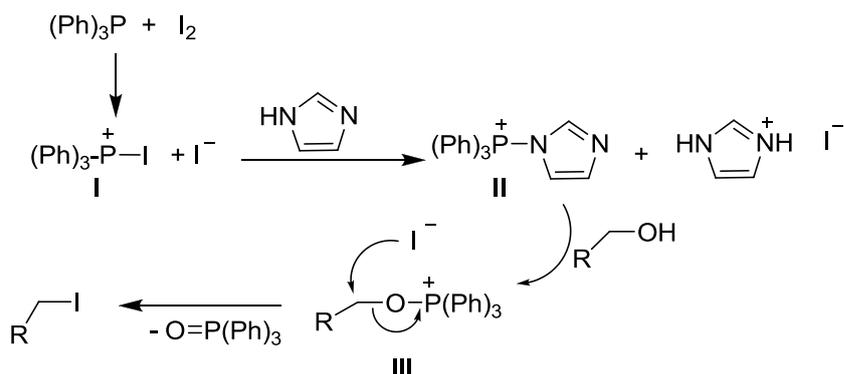


Abb. 3.61: Mechanismus der Garegg Reaktion

Um als Substrat für die nachfolgende Palladium-katalysierte Ferrier-Umlagerungsreaktion dienen zu können, musste zunächst noch die exo-Methylengruppe durch 1,2-Eliminierung erzeugt werden. Dazu sollte ebenfalls auf ein literaturbekanntes Verfahren zurückgegriffen werden, bei dem die iodierte Verbindung in Gegenwart von DBU in DMF refluxiert wurde.^[162]

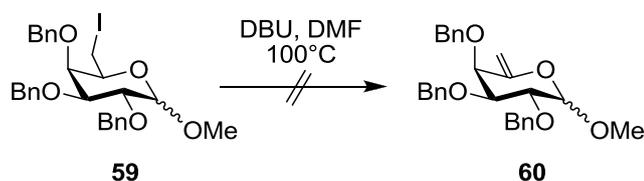


Abb. 3.62: Versuch zur Eliminierung

Allerdings lieferten weder konventionelles Erhitzen im Ölbad noch eine Reaktion unter Mikrowelleneinstrahlung^[162] das gewünschte Produkt. Auch durch den Wechsel des Lösungsmittels von DMF zu THF^[163] konnte keine Eliminierung beobachtet werden. Erst der Einsatz von Silberfluorid in Pyridin^[164] führte zur Bildung des gewünschten Produkts **60**.

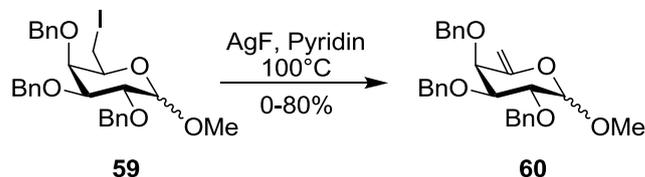


Abb. 3.63: Eliminierung mit Silberfluorid

Leider war die Reaktion jedoch nicht reproduzierbar, und es wurden stark schwankende Ausbeuten von 0-80% beobachtet. Dies ist vermutlich auf die geringe Stabilität des Silberfluorids bei Lichteinstrahlung und in Gegenwart von Feuchtigkeitsspuren zurückzuführen. Aufgrund des hohen Preises und der schlechten Reproduzierbarkeit wurde daher nach einer alternativen Eliminierungsreaktion gesucht. Dafür wurde zunächst als Abgangsgruppe das sehr reaktive Trifluormethansulfonat verwendet, welches nach Einführung in das Molekül direkt ohne weitere Reinigung zur Eliminierung eingesetzt wurde.

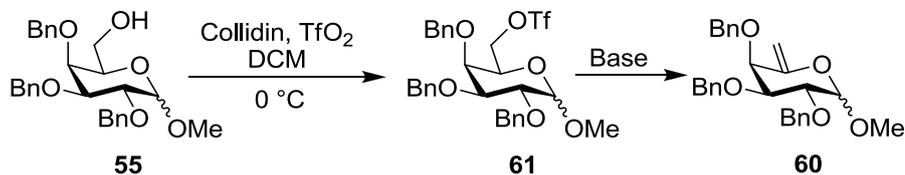


Abb. 3.64: Versuche zur Eliminierung über das Triflat **61**

Die ersten Tests zur Eliminierung des Triflates **61**, unter Verwendung von Collidin, DBU oder auch NaH als Base, verliefen jedoch wenig erfolgsversprechend, weshalb im Folgenden auf das entsprechende Mesylat zurückgegriffen wurde, das ebenfalls ohne vorherige säulenchromatographische Reinigung direkt als Rohprodukt den unten gezeigten Eliminierungsreaktion unterworfen wurde.

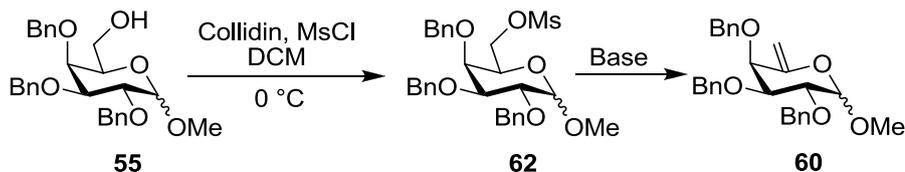


Abb. 3.65: Versuche zur Eliminierung über das Mesylat **62**

Reagenzien	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
DBU, DMF	MW, 80°C, 100 W	Substitutionsprodukt
Piperidin, DMF	100 °C	keine Reaktion
NaH, DMF ^[165]	100 °C	30%
NaOMe, DMF	100 °C	24% + Substitutionsprodukt
K ₂ CO ₃ , DMF	100 °C	3%
Kalium- <i>t</i> Butanolat, DMF	100 °C	25% + nicht charakterisiertes Nebenprodukt
CsF, DMF, kat. (<i>t</i> Bu) ₄ NI	100 °C	40%

Tab. 3.1: Versuche zur Eliminierung über das Mesylat **62**

Neben geringen Ausbeuten an Produkt wurde in diesen Versuchen häufig Nebenprodukte erhalten, die aus der Substitution der Mesylgruppe durch Chloridionen resultierten. Daher wurde wieder auf Iod, das einen wesentlich kleineren elektronenziehenden Effekt als die Methansulfonatgruppe hat und damit die Eliminierungsreaktion begünstigen sollte, als Abgangsgruppe zurückgegriffen und den beiden erfolgversprechendsten Basen Natriumhydrid und Cäsiumfluorid in DMF bei 100°C ausgesetzt.

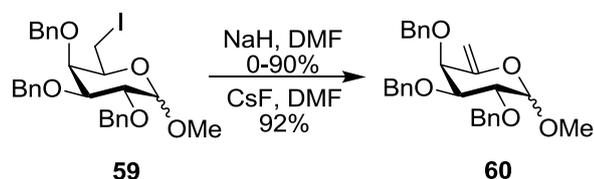


Abb. 3.66: Eliminierung

Mit beiden Basen konnten sehr gute Ausbeuten erzielt werden. Zwar war die Reaktionszeit in Gegenwart von Natriumhydrid als Base wesentlich kürzer als bei der Verwendung Cäsiumfluorid, allerdings führte auch diese Reaktion zu stark schwankenden Ausbeuten, weshalb im Folgenden Cäsiumfluorid als Base eingesetzt wurde. Bei der nachfolgenden Schlüsselreaktion, der Umwandlung der Pyranose in das carbacyclische Analogon **63**, handelte es sich um eine durch Palladium(II)chlorid katalysierte *Ferrier-II*-Umlagerung, die mit dem Verlust der Methylgruppe am anomeren Zentrum und der Bildung der axialen Hydroxylgruppe einhergeht.

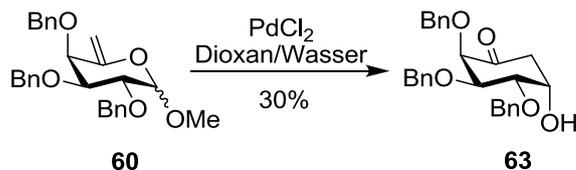


Abb. 3.67: Umlagerung zu der Pseudogalactose

Der Mechanismus dieser Reaktion ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, verläuft jedoch vermutlich ähnlich zu dem der ursprünglichen, durch Quecksilbersalze katalysierten, Carbocyclisierung, d.h. über den sechsgliedrigen Übergangszustand **IV**.^[147, 166] In einem ersten Schritt entsteht dabei zunächst unter Addition von Wasser und Palladium(II)chlorid an die exständige Doppelbindung (Oxypalladierung)^[167] ein labiles Hemiacetal **I**, das unter Verlust von Methanol in den Ketoaldehyd **II** übergeht. Dieser steht im Gleichgewicht mit dem Enolat **III**, welches in einer aldolähnlichen intramolekularen Cyclisierung das gewünschte Cyclohexanonderivat **63** bildet.^[168, 169]

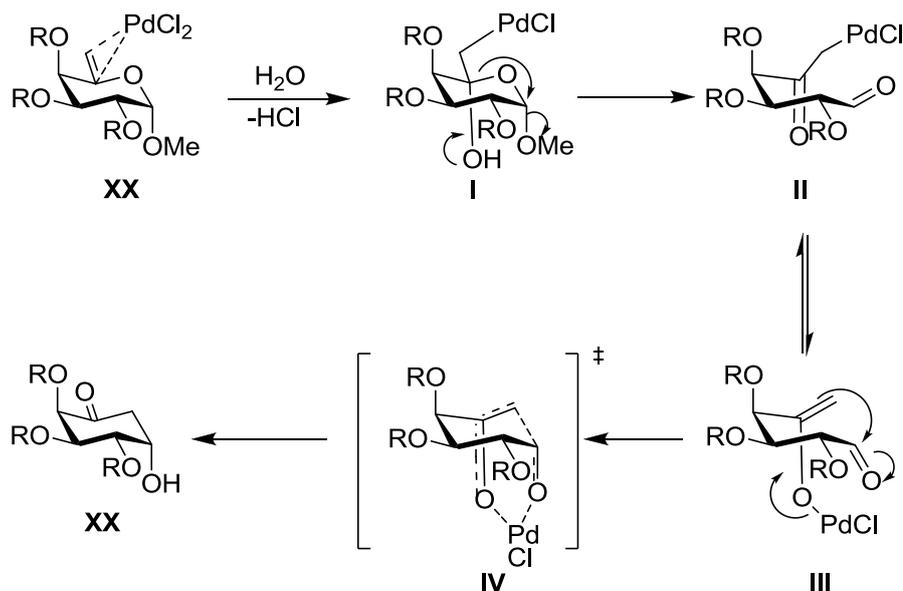


Abb. 3.68: vermuteter Mechanismus der *Ferrier-II*-Reaktion

Negativ auf die Ausbeute der Reaktion wirkt sich die Bildung eines offenkettigen Nebenproduktes **64** aus, dessen Anteil bis zu 40% betragen kann.

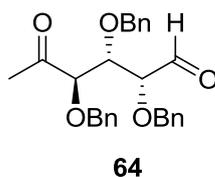


Abb. 3.69: Nebenprodukt der Umlagerungsreaktion

Dieses entsteht vermutlich aus **III** (Abb. 3.68) durch Protonierung der Doppelbindung mit den *in situ* erzeugten Mengen an Salzsäure.

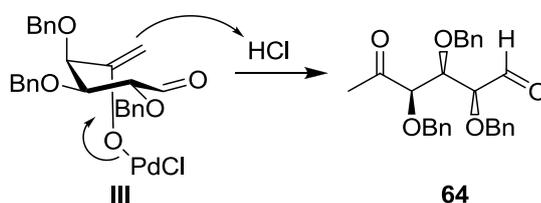


Abb. 3.70: Bildung des offenkettigen Nebenproduktes

Erste Überlegungen, die Bildung des offenkettigen Produktes durch Herabsetzen der Salzsäurekonzentration zu unterdrücken, erwiesen sich jedoch nicht als fruchtbar.

Reaktionsbedingungen	Wasser/Dioxan	Ausbeute 63
Mikrowelle 60°C 100 W	1:2	30%
Ölbad 60°C	1:2	14-57%
Ölbad 60°C	1:1	26%
Ölbad 60°C	1:5	50%
Ölbad 60°C	1:10	14%
Ölbad 60°C	1:20	17%

Tab. 3.2: Versuche zur Optimierung der Umlagerungsreaktion

In der Literatur^[170] fand sich jedoch bei ähnlichen Titan(IV)-katalysierten Umlagerungen der Hinweis, dass niedrige Ausbeuten vor allem bei Einsatz anomerer Gemische auftraten und folglich als Ausgangsverbindung für die Bildung des offenkettigen Produktes die β -konfigurierte Galactose vermutet wurde.

Um die Bildung des offenkettigen Produktes zu unterdrücken, wurde die Umlagerung mit dem anomenreinen Vorläufer α -**60** wiederholt. Hierzu wurde das α -Methylgalactosid **65** durch Umkristallisation in Isopropanol vom β -Anomer abgetrennt und wie zuvor beschrieben in den Vorläufer α -**60** überführt.

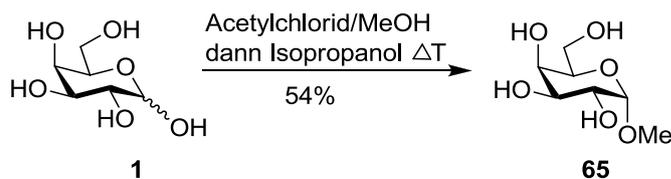


Abb. 3.71: Synthese der α -Methylgalactose

Erfreulicherweise konnte so die Ausbeute der Umlagerungssequenz auf 73% an **63** gesteigert und die Bildung des offenkettigen Produktes nahezu vermieden werden. Anschließend musste die freie 1-Hydroxylgruppe mit einer zu den Benzylethern orthogonalen Schutzgruppe versehen werden, wobei es zu beachten galt, dass diese Schutzgruppe auch mit den nachfolgenden Reaktionsbedingungen wie der Olefinierung und Hydroborierung kompatibel sein sollte. Daher wurde die *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe ausgewählt, die sich in der Regel leicht unter Verwendung von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBSCl) und Imidazol in absolutem DMF installieren lässt. Aufgrund der geringen Reaktivität der axial stehenden sekundären Hydroxylgruppe musste diese Reaktion jedoch bei 50 °C durchgeführt werden.

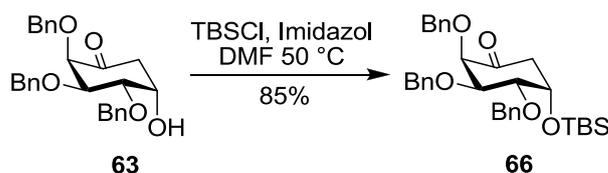


Abb. 3.72: Einführung der TBS-Schutzgruppe

Zur nachfolgenden Olefinierung der Ketogruppe wurde die in der Literatur mit sehr guten Ausbeuten beschriebene Tebbe-Olefinierung eingesetzt.^[100, 162] Hierzu wurde das Olefinierungsreagenz bei -40 °C zu einer Lösung des Ketons in absolutem Tetrahydrofuran/Pyridin (4:1) getropft.^[171] Jedoch konnte selbst bei Erwärmen des Reaktionsgemisches auf 50 °C keine Produktbildung beobachtet werden.

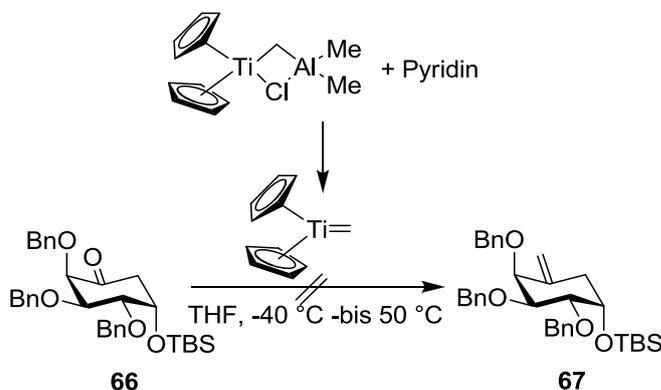


Abb. 3.73.: Tebbe-Olefinierung

Erst bei Verwendung von Dimethyltitanocen (Petasis-Reagenz) als alternatives Olefinierungsreagenz,^[172] dessen Einsatz bereits in der Synthese von C-Glycosiden beschrieben wurde,^[173] konnte das gewünschte Produkt **67** in einer Ausbeute von 89% erhalten werden.

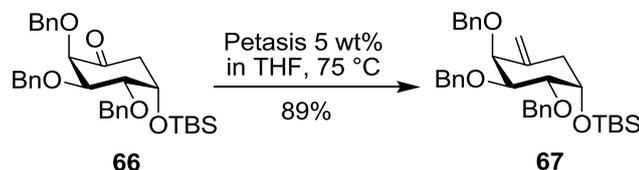


Abb. 3.74: Petasis Olefinierung

Mechanistisch verläuft die Reaktion wie folgt: Zunächst wird Dimethyltitanocen **I** bei 75°C unter Eliminierung von Methan aktiviert. Das resultierende sehr reaktive Methylentitanocen **II** reagiert sofort mit dem Keton **68** unter Ausbildung eines Oxatitanacyclobutans **III**, das schließlich zu dem gewünschten Olefin und Titanocenoxid **IV** zerfällt.

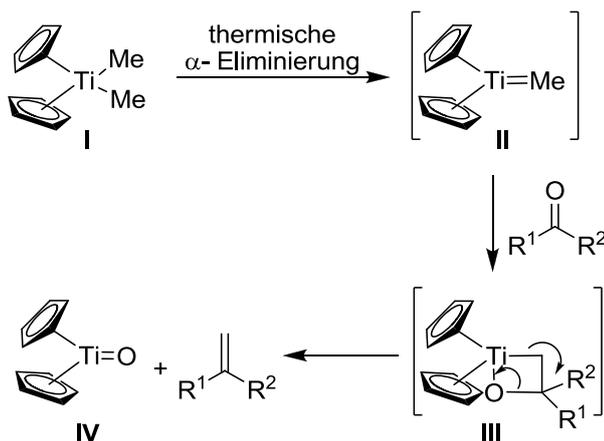


Abb. 3.75: Mechanismus der Petasis-Olefinierung^[172]

Die Überführung der so gebildeten Doppelbindung in einen Alkohol gelang durch Hydroborierung bei 0 °C unter Verwendung des Boran*THF-Komplexes. Nach oxidativer Aufarbeitung konnte so das Carba-Galactosederivat in 45%iger Ausbeute erhalten werden, wobei als Nebenprodukt geringe Mengen des diastereomeren Cyclohexylmethanols **69** erhalten wurden.

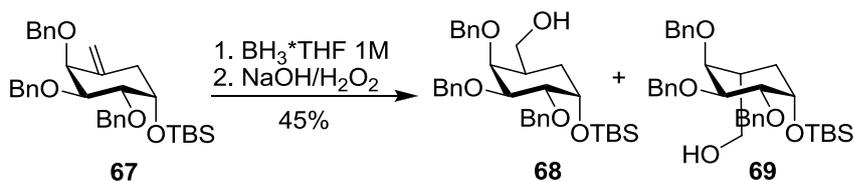


Abb. 3.76: Hydroborierung der Doppelbindung

Zur Steigerung der Ausbeute wurden die Reaktionsbedingungen der oxidativen Aufarbeitung und das Hydroborierungsmittels variiert. Allerdings lieferten weder der Einsatz von 9-BBN, noch des Boran* SMe_2 -Komplexes das gewünschte Produkt in einer guten Ausbeute. Auch die Variation der Temperatur in einem Bereich von $-10\text{ }^\circ\text{C}$ bis $50\text{ }^\circ\text{C}$ bzw. die Verlängerung der Reaktionszeit auf insgesamt zwei Tage brachte keinen positiven Effekt mit sich. Ebenso führte auch der Einsatz 3M Natriumacetatlösung anstelle der 3M Natriumhydroxidlösung lediglich zu einer geringen Ausbeutensteigerung von etwa 5%.

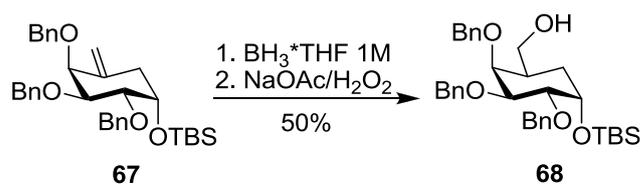


Abb. 3.77: Oxidative Aufarbeitung mit Natriumacetatlösung

Durch abschließende Schutzgruppenmanipulation konnte schließlich der gewünschte Vorläufer **71** für die anstehende Substitutionsreaktion nach insgesamt 12 aufeinanderfolgenden Stufen erhalten werden. Dafür wurde die freie Hydroxylgruppe durch Umsetzen mit Natriumhydrid, Benzylbromid und katalytischen Mengen an *tetra*-Butylammoniumiodid in den Benzylether **70** überführt, bevor die TBS-Gruppe mit *tetra*-Butylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran entfernt wurde.^[100]

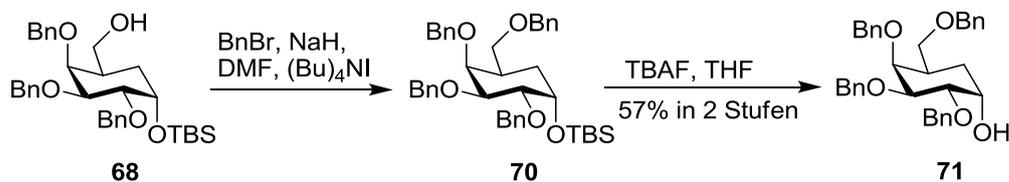


Abb. 3.78: Schutzgruppenmanipulation zur Darstellung von **71**

Ausgehend von dem gewünschten Carbazuckerbaustein **68** ließ sich zudem in zwei Stufen ein analoges fluoriertes Derivat herstellen. Ein derartiges F-Galactosemimetikum war bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt, liess sich jedoch glatt durch eine DAST-vermittelte Deoxyfluorierung in Gegenwart der TBS-Schutzgruppe, gefolgt von deren TBAF-induzierten Spaltung, herstellen (s. Abb. 3.4)

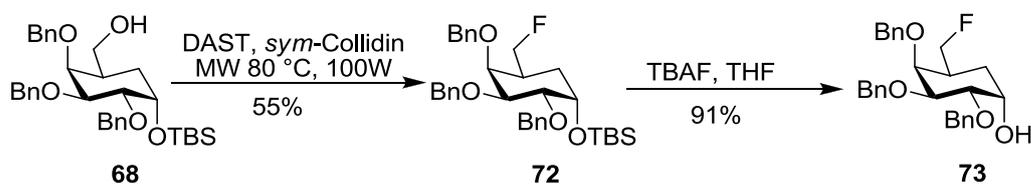


Abb. 3.79: Synthese der fluorieren Carbagalactose

In ersten Studien zur Anbindung des Carbazuckerbausteines an einen Galactosaminakzeptor wurde der gerade gezeigte Baustein jedoch nicht verwendet. Vielmehr sollte zunächst die Herstellung eines Disaccharidmimetikum unter Verwendung der Pseudogalactose **71** untersucht werden. Da sich das benzylidengeschützte T_N-Derivat **30** auf Grund der geringen Basenstabilität nur schlecht als Akzeptor für eine nucleophile Substitutionsreaktion eignen würde, musste zunächst ein entsprechender basenstabiler Vorläufer für diese Verbindung synthetisiert werden, der zu einem späteren Zeitpunkt dann in wenigen Schritten zur Ziel-Glycosylaminosäure umgesetzt werden würde. Dafür wurde ein in Position 4 und 6 geschützter Thiodonor **75** gewählt, der nach Anbindung an die Pseudogalactose auch eine Glycosylierung zu dem orthogonal geschützten Threoninbaustein **85** erlauben sollte.

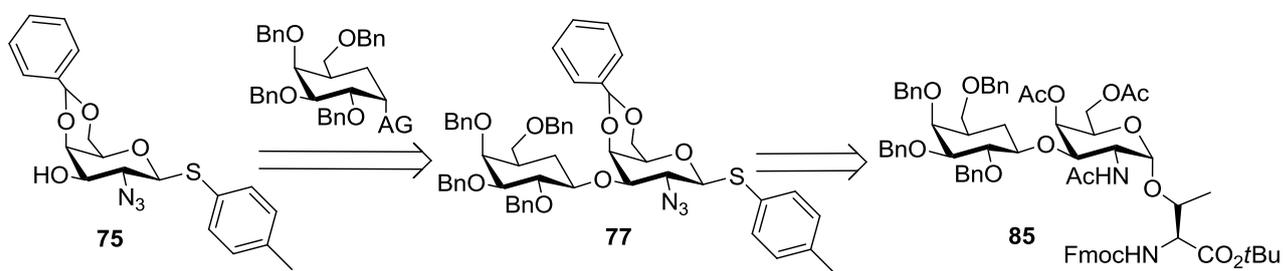


Abb. 3.80: Retrosynthese des T-Antigenanalogons

Für die Herstellung dieses Thiodonors **75** konnte von dem bereits in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Azidobromid **26** ausgegangen werden. Dieses wurde zunächst in einem Schritt deacetyliert und in den gezeigten Thioether überführt.^[174] Eine anschließende selektive Einführung der Benzylidenschutzgruppe in Position 4 und 6 lieferte den fertigen Pseudogalactosylakzeptor **75** in 54% Ausbeute über beide Stufen.^[175]

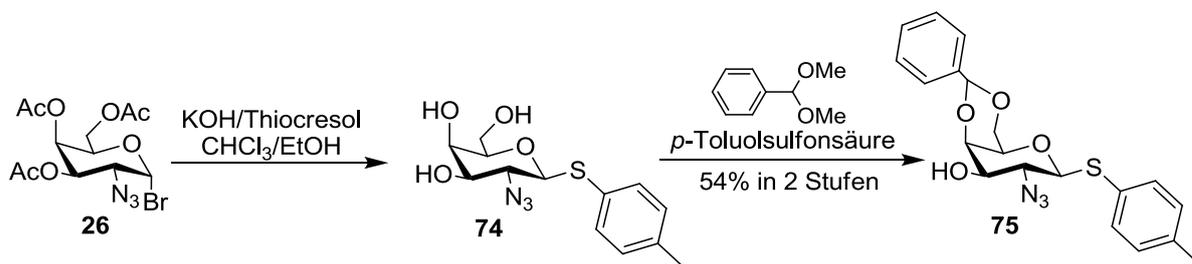
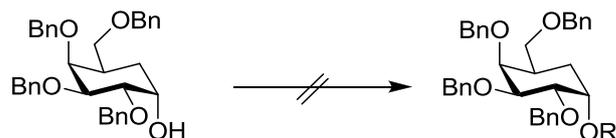


Abb. 3.81: Synthese des Carbagalactosylakzeptors **75**

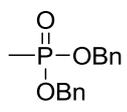
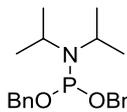
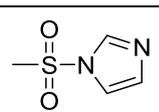
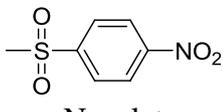
Nun musste noch eine geeignete Abgangsgruppe in α -Position des Carbazuckers installiert werden, um eine stereoselektive Verknüpfung zum Pseudodisaccharid **77** unter S_N2-Bedingungen zu ermöglichen. Zunächst sollten die zwei am häufigsten verwendeten Abgangsgruppen Mesylat und das Tosylat in die Reaktion eingesetzt werden.



Abgangsgruppe	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
Mesylat	MsCl, Pyridin, DCM, DMAP	Keine Reaktion
Mesylat	MsCl, NEt ₃ , DCM, DMAP	Keine Reaktion
Tosylat	TsCl, Pyridin, DMAP	Keine Reaktion

Abb. 3.82: Versuche zur Einführung des Mesylats bzw. Tosylats als Abgangsgruppe

Allerdings konnte unter diesen Reaktionsbedingungen und auch durch Erhöhen der Reaktionstemperatur kein Umsatz zu dem gewünschten Donorbaustein beobachtet werden. Daher wurde im Folgenden versucht, alternative Abgangsgruppen in das Molekül einzuführen.

Abgangsgruppe R=	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
 Phosphat	 <i>N</i> -Phenylimidazoltriflat dann 3-Chlorperbenzoesäure	Keine Reaktion
 <i>N</i> -Imidazol-1-sulfonat	NaH, DMF dann <i>N,N</i> -Sulfonyldiimidazol	Keine Reaktion
 Nosylat	NosCl, NEt ₃ , Dichlormethan, DMAP	48%

Tab. 3.3: Versuche zur Einführung einer alternativen Abgangsgruppe

Leider schlug jedoch sowohl der Versuch zur Bildung eines Phosphates, welche schon bei der Synthese von entsprechenden Pseudoglucosen erfolgreich eingesetzt wurde,^[162] als auch die Einführung eines *N*-Imidazol-1-sulfonat als Abgangsgruppe fehl.^[176] Glücklicherweise konnte jedoch in einem weiteren Versuch durch die Verwendung von Triethylamin und katalytischen

Mengen DMAP, das von dem Tosylat abstammende *para*-Nitrobenzoesulfonat mit einer Ausbeute von 48% erfolgreich in den Carbazuckerbaustein **71** eingeführt werden.

Mit diesem Donor in Händen konnten geeignete Substitutionsbedingungen für die Anbindung an den Akzeptorbaustein **75** ermittelt werden: Als erstes wurde 2,6-Di-*tert*-butylpyridin als Base zur Aktivierung des Akzeptors untersucht, da dessen Verwendung schon in mehreren ähnlichen Substitutionsreaktionen beschrieben wurde.^[177, 178] Dafür wurde der Akzeptor **75** zusammen mit der Base in absolutem Dichlormethan gelöst und nach einer Stunde tropfenweise mit dem Carbagalactosyldonor **76** versetzt.

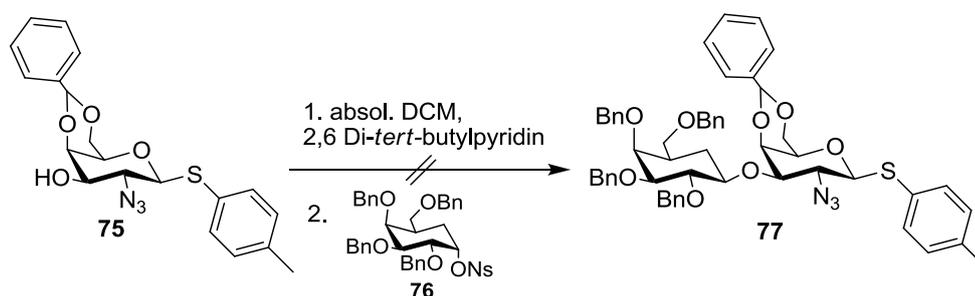


Abb. 3.83: Versuch zur Glycosylierung mit 2,6-Di-*tert*-butylpyridin

Allerdings konnte auch nach erneuter Zugabe der Base keine Reaktion festgestellt werden, so dass auf eine vorgeschaltete irreversible Deprotonierung des Alkohols durch Natriumhydrid zurückgegriffen wurde, bevor der Donorbaustein **76** langsam zu getropft wurde.

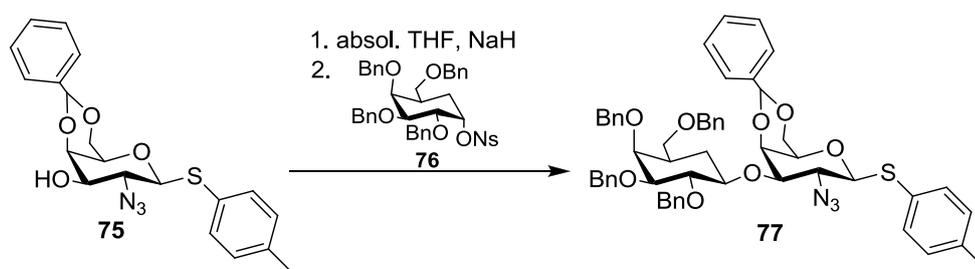


Abb. 3.84: Versuch zur Glycosylierung mit Natriumhydrid als Base

Während der Reaktion konnte zwar dünnschichtchromatographisch die Entstehung eines neuen Produktes beobachtet werden, doch reichten die Mengen nicht für eine Isolierung aus. Um die Reaktion weiter voranzutreiben wurden daher einige Tropfen HMPA zugesetzt.^[179] Dadurch konnte auch in der Tat ein Substitutionsprodukt erhalten werden, doch stellte sich bei genauerer Analyse heraus, dass es sich hierbei nicht um die gewünschte Verbindung **77** sondern einen Phenolether **78** handelte, der aus der Substitution der Nitrogruppe des Nosylrestes resultierte.

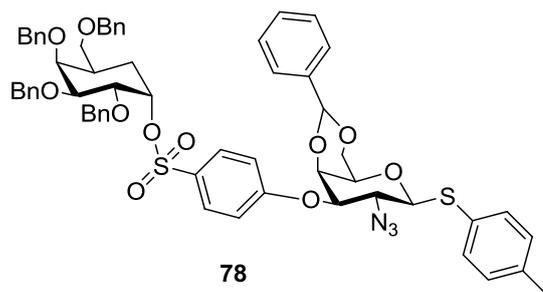


Abb. 3.85: Substitutionsprodukt der durch HMPA katalysierten Reaktion

Diese Struktur konnte durch die Messung von 2D-NMR-Spektren wie TOCSY, HMBC HMQC sowie durch die Messung einer hochauflösten Masse bestätigt werden. Unter anderem wurde ein charakteristisches Signal bei 160 ppm gefunden, dessen Verschiebung einem Phenol-C entspricht, und das im HMBC-Spektrum eine Kopplung zu dem Proton an C3 der Pseudogalactose aufwies.

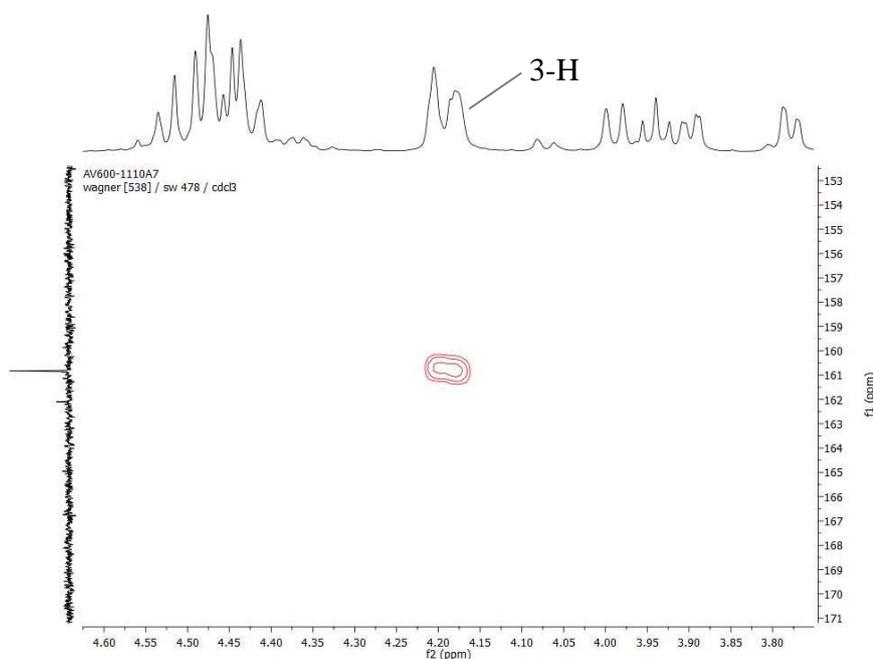


Abb. 3.86: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des Substitutionsproduktes **78**

Zudem konnte die noch immer vorhandene α -Konfiguration des Carbazuckers an Hand der NOESY Kopplung des 1'-Protons mit den beiden Protonen der Ringmethylengruppe eindeutig belegt werden. Würde eine β -Konfiguration vorliegen, wäre nur die Kopplung zu dem äquatorial ständigen Proton zu sehen.

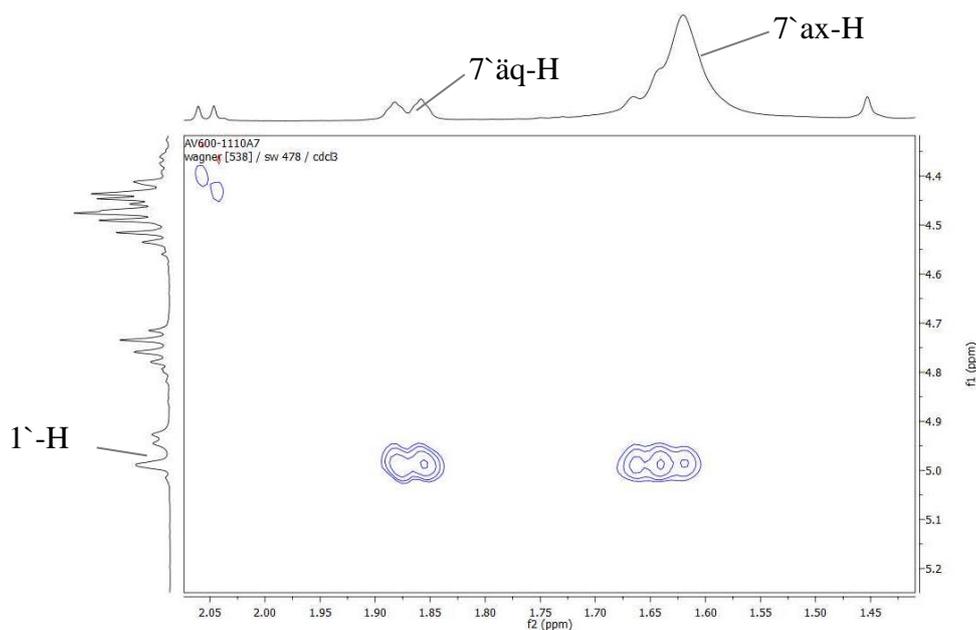


Abb. 3.87: Ausschnitt aus dem NOESY Spektrum des Substitutionsproduktes **78**

In der Literatur wurden ähnliche Substitutionen mit *C*, *S* und *O*-Nucleophilen bereits 1976 von *Kornblum* beschrieben, wobei ebenfalls HMPA als Lösungsmittel eingesetzt wurde.^[180] So scheint die gewünschte Substitution am C1 des Carbazuckers aus sterischen Gründen stark gehindert zu sein, weshalb in Gegenwart von HMPA bevorzugt die Substitution der Nitrogruppe des elektronenarmen Aromaten erfolgt.

Da diese Art der Substitutionsreaktion also nicht zu dem gewünschten Produkt führte, wurde nun auf die im Arbeitskreis *Kunz*^[181, 182] für die Synthese der Lewis^x-Mimetika verwendete Stannylene methode^[182] zurückgegriffen. Dafür war es zunächst notwendig, die Benzylidenschutzgruppe des Akzeptors selektiv zur Position 6 hin zu öffnen. Dies wurde im Jahre 2011 an ähnlichen Substraten von der Gruppe um *Li*^[183] unter Verwendung von Natriumcyanoborhydrid und 4N Salzsäure beschrieben. Leider führte diese Methode nicht zu dem gewünschten Produkt. Eine weitere Möglichkeit Benzylidenacetale selektiv zur Position 6 hin zu öffnen liegt in der Verwendung von Triethylsilan und Trifluormethansulfonsäure bei -78°C. Nach dieser Methode konnte das gewünschte Produkt **79** in 32% Ausbeute erhalten werden. Die beiden freien *cis*-ständigen Hydroxylgruppen konnten anschließend mit Di-*n*-butylzinnoxid zu dem entsprechenden Stannyleneacetal **80** umgesetzt werden. Die Aktivierung des gebildeten Acetals sollte dann durch Verwendung von Cäsiumfluorid in absolultem DME erfolgen.

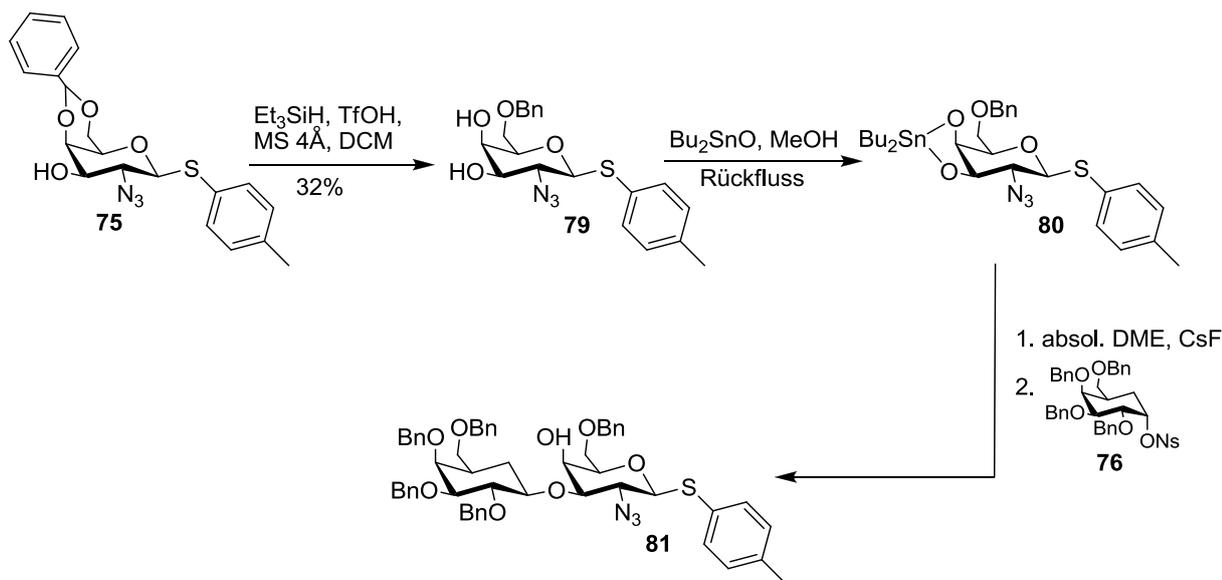


Abb. 3.88: Selektive Benzylidenöffnung und Versuch der Glycosylierung über ein Stannyleneacetal **80**

Im Gegensatz zu dem Aufbau der Lewis^x-Strukturen konnte jedoch in diesem Fall auch durch Erhöhen der Temperatur auf 50 °C keine Reaktion beobachtet werden.

Daher sollte versucht werden, ein Iod in Position 1 des Carbazuckers als Abgangsgruppe einzuführen. Man könnte dann durch die Zugabe von löslichen Silber Salzen zu dem Reaktionsgemisch Silberiodid ausfällen, um somit ein sekundäres Carbokation zu erzeugen, das dann von dem Akzeptor nucleophil angegriffen werden könnte. Zwar würde man bei dieser Reaktion ein Diastereomergemisch erwarten, welches aber aufgrund der sterisch besser geeigneten äquatorialen Position auf der Seite des gewünschten Produktes liegen sollte. Im Jahre 1999 wurde von *Jin* eine Methode beschrieben, bei der man die Nosylgruppe in α -Stellung von Ketonen selektiv und in sehr guten Ausbeuten in das entsprechende Iodid überführen konnte.^[184] Dafür wurde das Nosylat in Acetonitril gelöst und mit Kaliumiodid und Kronenether, zum chelatisieren des Kaliumions, versetzt.

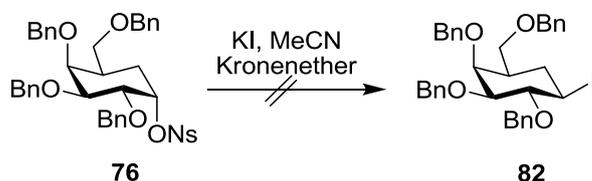


Abb. 3.89: Substitution des Nosylates durch Iod

Da es nicht gelang das Nosyl direkt zu substituieren, sollte die entsprechende Iodverbindung **71** aus dem freien Alkohol hergestellt werden.

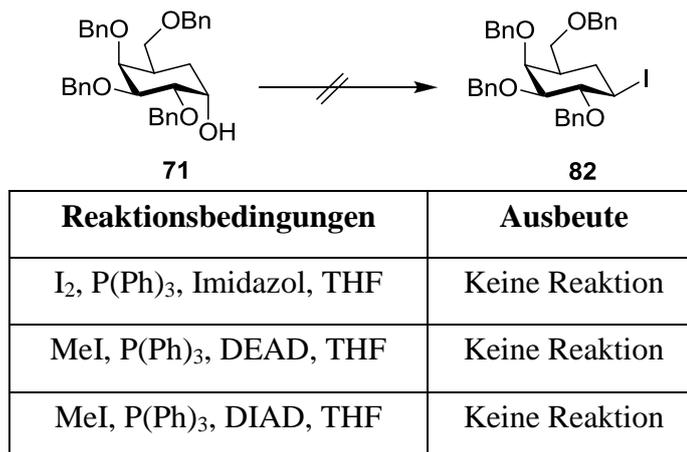


Abb. 3.90: Versuch der Iodierung unter *Garegg*- und *Mitsunobu*-Bedingungen

Leider konnte sowohl unter *Garegg*- als auch unter *Mitsunobu*-Bedingungen unabhängig von der verwendeten Azoverbindung, lediglich das Edukt wieder gewonnen werden.

Auf Grund der geringen Reaktivität dieses sekundären Alkohols **71** wurde anschließend versucht das sehr reaktive Triflat zu bilden. Dies gelang schließlich auch durch die Verwendung von Triflattanhydrid und Pyridin bzw. 2,6-Lutidin als Base.

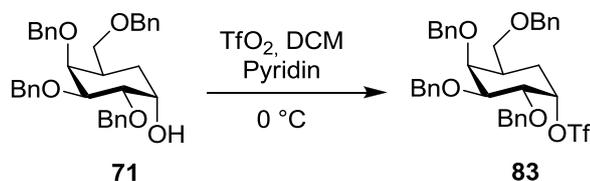


Abb. 3.91: Synthese des Carbagalactosyldonors **83**

Der so erhaltene Donor **83** wurde wegen der Hydrolyseempfindlichkeit des Trifluormethansulfonates anschließend direkt und ohne säulenchromatographische Reinigung in der Substitutionsreaktion eingesetzt. Dafür wurde auf den schon bekannten Akzeptor **75** zurückgegriffen, welcher zunächst, um das Natriumalkoholat zu bilden, in Tetrahydrofuran gelöst und mit Natriumhydrid versetzt wurde.

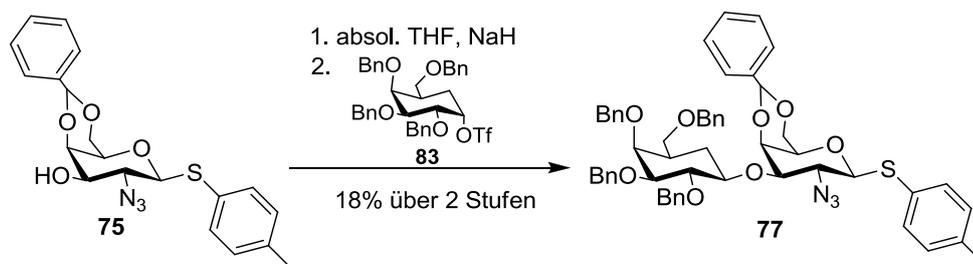


Abb. 3.92: Glycosylierungsreaktion

Nach Zugabe des Akzeptors und einer Reaktionszeit von 18 Stunden konnte das gewünschte Produkt **77** in einer Ausbeute von 18% über beide Stufen erhalten werden. Bemerkenswert dabei ist, dass die Bildung eines α -verknüpften Carbazuckers nicht beobachtet werden konnte so dass die Reaktion anscheinend völlig stereoselektiv verlaufen ist. Damit konnte zum ersten Mal ein 1 \rightarrow 3 verknüpftes Carbadisaccharid über 21, davon 14 lineare Stufen, dargestellt werden.

Ein erster Versuch, dieses Disaccharid mit dem orthogonal geschützten Threonin **12** zu der Glycosylaminosäure **84** umzusetzen, führte jedoch unter den gewählten Reaktionsbedingungen^[185] hauptsächlich zur Hydrolyse des eingesetzten Thiodonors.

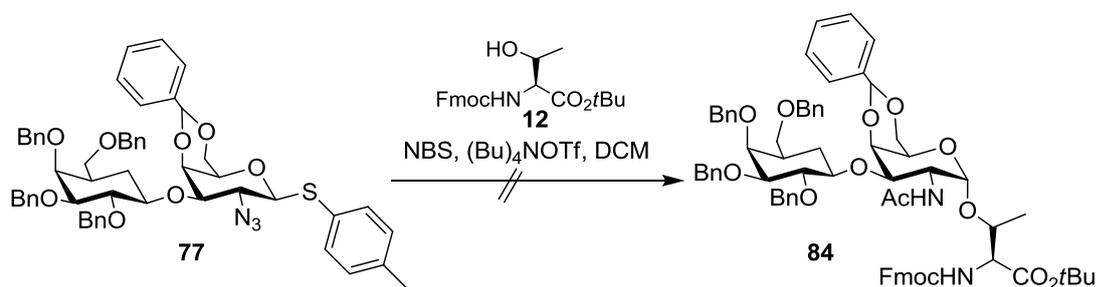


Abb. 3.93: Versuch zur Darstellung der Glycosylaminosäure

Aus zeitlichen Gründen konnten die Arbeiten zur Entwicklung geeigneter Reaktionsbedingungen für diese Glycosylierung nicht weiter fortgesetzt werden.

Versuche zur Darstellung des CarbaT_N-Bausteins

In einem weiteren kleinen Projekt sollten erste Versuche zur Darstellung eines CarbaT_N-Analogons durchgeführt werden. Dafür musste zunächst ein in Position 6 eliminiertes T_N-Derivat synthetisiert werden, das dann in einer von Aluminium- bzw. Titan-Lewis-Säuren katalysierten Carbacyclisierung umgesetzt werden sollte.^[170, 186, 187] Zur Synthese dieses Vorläufers wurde von der vollständig deacetylierten Glycosylaminosäure **29** ausgegangen, die zunächst durch die Einführung einer Isopropylidenschutzgruppe selektiv in 3- und 4- Position blockiert wurde. Dabei wurde auch immer die Bildung von geringen Mengen des falschen Isomer **87** beobachtet, das aber durch Erhitzen in einem Methanol-Wasser Gemisch in das gewünschte Produkt **86** überführt werden konnte.^[188]

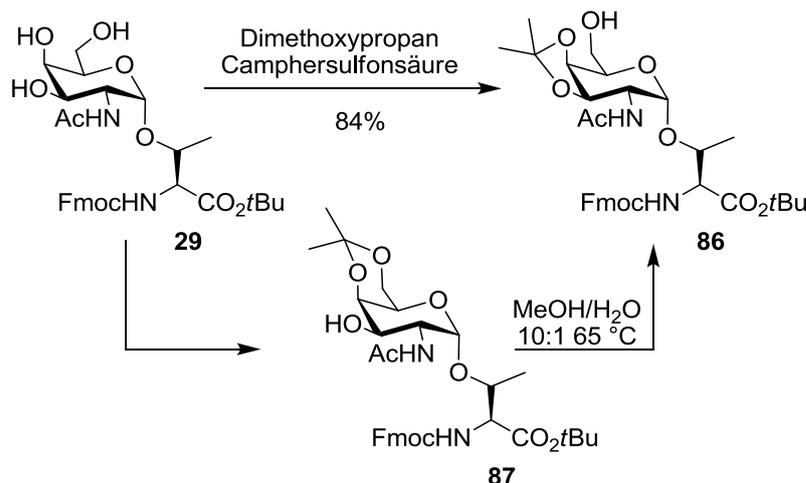


Abb. 3.94: Synthese des Isopropyliden geschützten T_N-Bausteins

Die verbleibende freie Hydroxylgruppe wurde nach dem bereits beschriebenen Verfahren nach *Garegg* in sehr guten Ausbeuten von 92% in Iod überführt.^[161] Für die folgende Eliminierung wurde hier trotz des hohen Preises Silberfluorid eingesetzt, um die Reaktion durch Ausfällen von schlecht löslichem Silberiodid noch zu begünstigen. Leider führte jedoch Erhitzen der Reaktionslösung zu einer Zersetzung des T_N-Derivates.

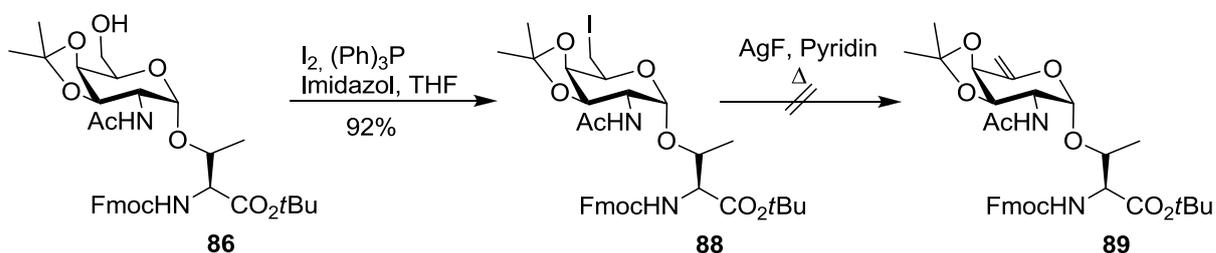


Abb. 3.95: Iodierung des Isopropyliden geschützten T_N-Bausteins

Eine alternative Synthesestrategie beruht auf der späten Einführung der Aminosäure, so dass nach der beschriebenen Synthese zunächst die Carbagalactose **71** dargestellt werden kann, die anschließend über ein cyclisches Sulfamidat des *allo*-L-Threonins zur Glycosylaminosäure umgesetzt werden sollte.

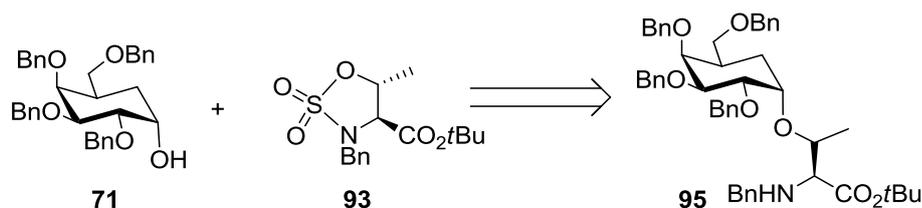


Abb. 3.96: Retrosynthese zur Darstellung des CarbaT_N-Bausteins

Die nucleophile Ringöffnung eines Sulfamidates wurde bereits für eine Reihe von Verbindungen beschrieben.^[189] So konnten über diese Reaktion beispielsweise Thioanaloge des Lewis^x-Antigens^[190] aber auch S-glycosidisch verknüpfte Glycosylaminosäuren des Serins und Threonins^[191] erhalten werden. Ebenso sind auch Ringöffnungen durch Sauerstoffnucleophile bekannt,^[189, 192] jedoch gibt es nur sehr wenig Beispiele der selektiven Ringöffnung durch Sauerstoffnucleophile bei solch sterisch anspruchsvollen Moleküle.^[100] Zu Testzwecken wurde hier zunächst nicht von *allo*-L-Threonins sondern von dem noch vorhandenen *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin-*tert*-butylester **12** ausgegangen. Dieser wurde durch Behandlung mit Piperidin in Dichlormethan *N*-terminal deblockiert, das erhaltene freie Amin wurde im Anschluss daran mittels Benzaldehyd und anschließender Reduktion des Amids mit Natriumborhydrid in das Benzylamin überführt.

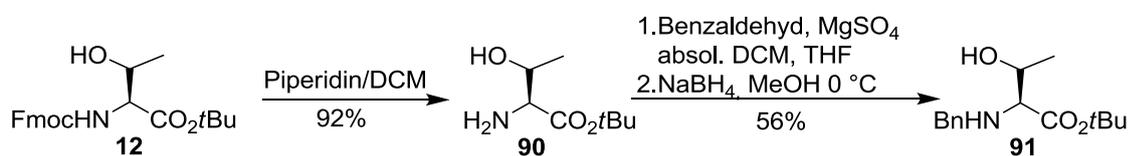


Abb. 3.97: Synthese des *N*-Benzyl-L-threonin-*tert*-butylester

Die Synthese des cyclischen Sulfamidates verlief über das cyclische Sulfamidit **92** als Zwischenstufe. Dafür wurde der *N*-Benzyl-L-threonin-*tert*-butylester **91** mit Thionylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan versetzt und bei -40 °C eine Stunde gerührt. Nach einer kurzen Aufarbeitung erfolgte dann Oxidation zu dem gewünschten Sulfamidat **93** durch Reaktion mit Natriumperiodat und katalytischen Mengen Rutheniumtrichlorid, wodurch das Produkt in einer Ausbeute von 34% erhalten werden konnte.

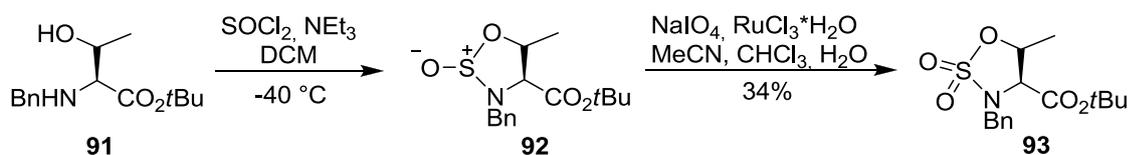


Abb. 3.98: Synthese des Sulfamidats **93**

Dieses sollte dann analog einem Verfahren von *Tashiro*^[100] mit der Carbogalactopyranose **71** zu der Glycosylaminosäure **94** umgesetzt werden. Demnach wurde der Carbazuckerbaustein **71** in einer Mischung aus DMF und Tetrahydrofuran gelöst und zur Bildung des Alkoholates mit Natriumhydrid versetzt. Anschließend wurde das Sulfamidat bei 0 °C zugetropft. Da auch bei Raumtemperatur keine Reaktion zu beobachten war, wurde die Reaktionslösung schließlich auf 70 °C erhitzt.

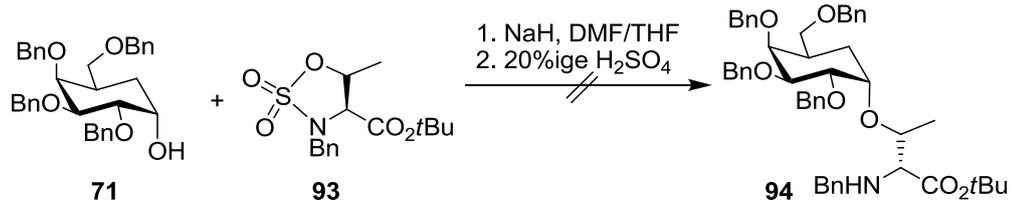


Abb. 3.99: Versuch zur nucleophilen Ringöffnung des Sulfamidates

Jedoch konnte auch nach weiterer Zugabe von Sulfamidat **93** keine Produktbildung beobachtet werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die geringe Reaktivität des sterisch gehinderten axialen Nucleophiles und Elektrophiles sein. So wurde auch bei der Synthese der thioglycosidisch verknüpften Glycosylaminosäuren von *Cohen* ein Einbruch der Ausbeute beim Wechsel von Serin zu Threonin bzw. von β - zu α -konfigurierten Zuckern verzeichnet.^[191] Aus zeitlichen Gründen konnten jedoch keine weiteren Versuche zur Glycosylierung durchgeführt werden.

3.2 Synthese und biologische Evaluierung von Antitumorvakzinen mit fluorierten Kohlenhydratantigenen

Wie in Kapitel 1.3 ausgeführt wurde, stellt das Mucin MUC1 eine interessante Zielstruktur für die Krebsimmuntherapie dar. So können Partialstrukturen des MUC1-Glycoproteins nach Konjugation an ein geeignetes Trägerprotein als B-Zell-Epitope zur gezielten Aktivierung des Immunsystems im Kampf gegen Krebs eingesetzt werden. Die hierfür notwendigen Glycopeptide lassen sich mithilfe der Festphasenpeptidsynthese herstellen, wobei in dieser Arbeit anstelle der natürlichen Kohlenhydratseitenketten, die eigens synthetisierten fluorierten Glycosylaminosäuren (s. Kap. 3.1.1) eingebaut werden sollten. Um die resultierenden fluorierten Glycopeptide hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften mit denen der natürlichen Vertreter vergleichen zu können, wurde die von *Kaiser*^[60, 68] und *Westerlind*^[53] bereits beschriebenden *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 verwendet (Abb. 3.100), wobei als Glycosylierungsposition die Seitenkette des Threonins der *N*-terminal liegenden HGVT Domäne dient.

P-A-H-G-V-T-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

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

Abb. 3.100: Gewählte Peptidsequenz für die Glycopeptidsynthese.

Um eine ausreichende Immunantwort in Vakzinierungsstudien zu erhalten, sollten die synthetisierten Glycopeptide anschließend noch über einen nicht immunogenen Spacer an geeignete Trägerproteine angebunden werden.

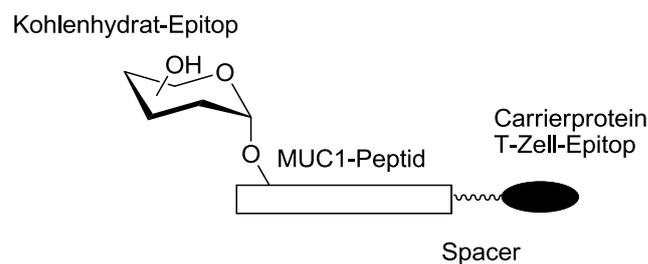


Abb. 3.101: Vollsynthetisches Glycopeptid-Vakzin.

3.2.1 Synthese der fluorierten Glycopeptide

Prinzipiell kann die Synthese von Peptiden und Glycopeptide entweder in Lösung oder an der festen Phase erfolgen, wobei die von Merrifield^[193, 194] eingeführte Festphasenpeptidsynthese als die effektivste Methode gilt, da nach einer erfolgten Kupplung die im Überschuss eingesetzten Reagenzien und Aminosäuren von dem unlöslichen Harz nur abfiltriert und gewaschen werden müssen. Im Gegensatz zur Biosynthese von Peptiden erfolgt in der Festphasenpeptidsynthese deren Aufbau nicht ausgehend vom *N*-terminalen Ende, sondern die Startaminosäure wird hier *C*-terminal über ein geeignetes Ankersystem an das polymere Trägermaterial angebunden. Durch Deblockierung des Amines der Startaminosäure kann anschließend die nächste *N*-terminal geschützte Aminosäure gekuppelt werden. Der dabei neu entstandene *N*-Terminus wird erneut deblockiert und einem weiteren Synthesezyklus unterworfen. Durch sukzessive Wiederholung dieses Schrittes ist es möglich, größere Oligopeptide in guter Ausbeute und kurzer Zeit aufzubauen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Verfahren die selektive Blockierung und Deblockierung des *N*-Terminus der Aminosäuren (Abb. 3.102), da die Aminschutzgruppe unter den gewählten Kupplungsbedingungen stabil und unter milden Bedingungen abspaltbar sein muss, ohne dass dabei die wachsende Peptidkette in Mitleidenschaft gezogen wird. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, bedient man sich in der Festphasenpeptidsynthese hauptsächlich zweier Schutzgruppensysteme. Zum einem wird die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc) Schutzgruppe^[195, 196] und zum anderen die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Gruppe^[197, 198] zur Blockierung der Aminfunktion verwendet. Ein wesentlicher Nachteil der Boc-Strategie liegt jedoch darin begründet, dass diese Schutzgruppe durch Behandlung mit 20-50%-iger Trifluoressigsäure abgespalten werden muss, was im Hinblick auf die Synthese von Glycopeptiden zu einer Vielzahl von unerwünschten Seitenschutzgruppenabspaltungen und dem Verlust der Kohlenhydratseitenketten führen kann.^[199] Dahingegen lässt sich die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe unter sehr milden Bedingungen, wie z.B. durch die Verwendung von Piperidin oder Morpholin^[200] als Base entfernen und ist somit kompatibel (orthogonal) zu den übrigen Seiten- bzw. Glycanschutzgruppen. Zudem kann die baseninduzierte β -Eliminierung der Glycane durch die Verwendung solcher milder Reagenzien vermieden werden, weshalb die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe als Methode der Wahl für den Aufbau komplexer Glycopeptiden gilt.

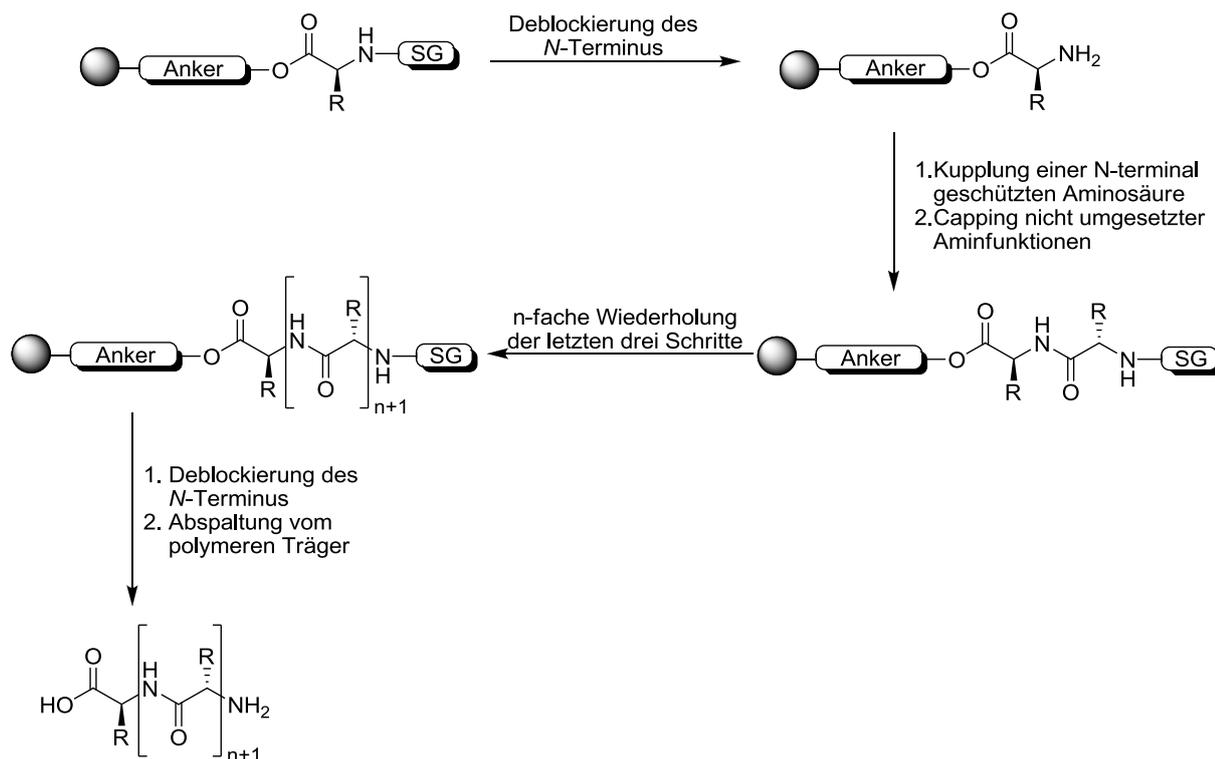


Abb. 3.102: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese.

Wie bereits erwähnt wurde, ist der erste Schritt zum Aufbau der Glycopeptiden die Deblockierung des *N*-Terminus der Startaminosäure, welcher anschließend mit geeigneten Kupplungsreagenzien die Anbindung der nachfolgenden Aminosäure folgt. Um die Entstehung von fehlerhaften Peptidsequenzen zu vermeiden, wird der Kupplung ein Cappingsschritt angeschlossen, bei dem alle noch freien, nicht gekuppelten Aminfunktionen in die entsprechenden Acetamide überführt werden und so einer weiteren Kettenverlängerung entzogen werden. Die Wiederholung dieser drei Schritte liefert schließlich die polymergebundene Peptidkette, die unter möglichst milden Bedingungen und ohne Racemisierung von dem eingesetzten Trägerharz abgespalten werden muss. (Abb. 3.102) Um die Abspaltung des Glycopeptids sowohl in geschützter als auch in partiell deblockierter Form zu erlauben, wurde eine Vielzahl unterschiedlich spaltbarer Ankersysteme entwickelt, deren Einsatz auf die jeweiligen Synthesepäne abgestimmt werden können. So gehören der HMBA-Linker^[201] und der Kaiser-Oxim-Linker^[202] beispielsweise zu der Gruppe der basenlabilen Ankersysteme, (Abb. 3.103) die recht drastische Abspaltungsbedingungen erfordern und daher häufig zu Nebenreaktionen wie Racemisierung und Aspartatimidbildung führen.

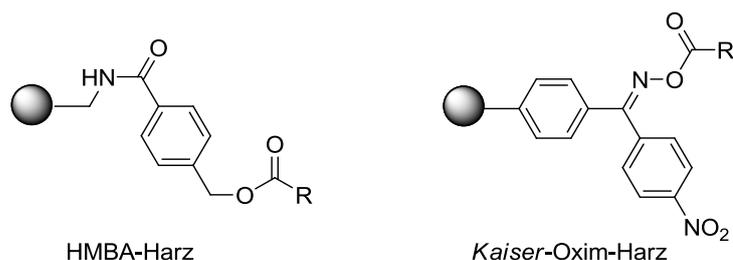


Abb. 3.103: Basenlabile Ankersysteme.

Um diese Nebenreaktionen umgehen zu können, wurden besonders säurelabile Ankersysteme entwickelt, zu denen als bekannteste Vertreter das Wang-^[203] und das SASRIN-Harz (super acis sensitive resin)^[204] zählen. Daneben gehören zu dieser Klasse auch das Merrifield-Harz^[205], das Rink-Säure-Harz^[206] und das Trityl-Harz.^[207] (Abb. 3.104) Ein weiterer Vorteil dieser Ankersysteme ist, dass gleichzeitig zur Abspaltung des Peptides von dem polymeren Träger auch alle säurelabilen Seitenschutzgruppen in einem Schritt mit entfernt werden.

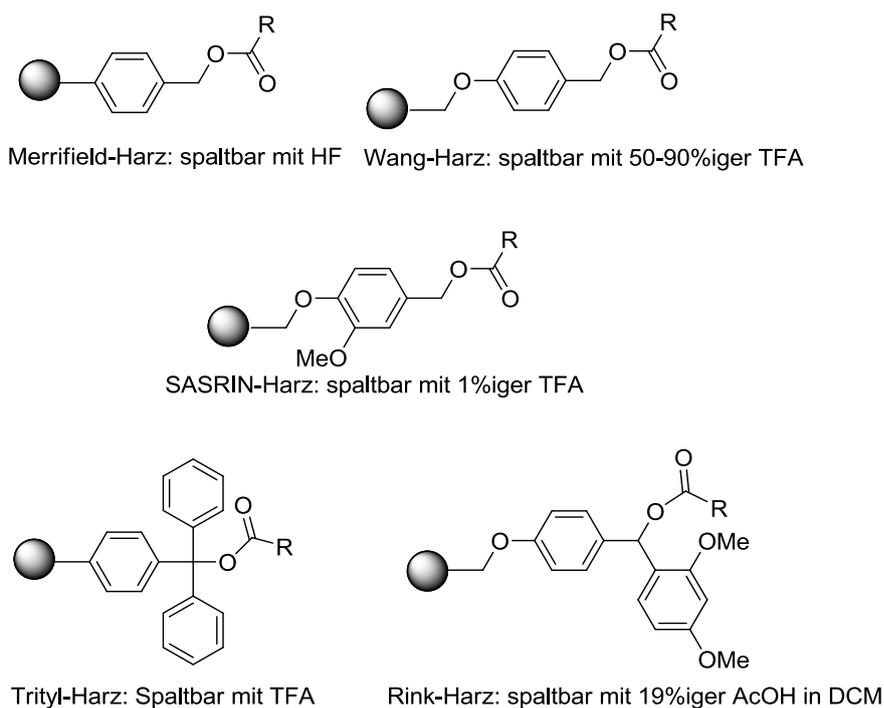


Abb. 3.104: Säurelabile Ankersysteme

Wird für die weitere Synthese jedoch ein vollständig geschütztes (Glyco)-Peptid benötigt, kann man z.B. auf die Gruppe der durch Fluoridionen spaltbaren^[208, 209] bzw. photolabilen^[210, 211] Ankersysteme zurückgreifen. So lassen sich Silyllinkersysteme, wie z.B. das Chao-Silyl-Harz mit Fluoridionen in DMF bzw. THF spalten. Allerdings können dabei ebenfalls Nebenreaktionen, wie die Racemisierung nicht ausgeschlossen werden. Wesentlich milder

dagegen lässt sich der von *Wagner* und *Kunz*^[209] entwickelte PTMSEL-Linker in Dichlormethan durch Tetrabutylammoniumfluorid spalten, so dass baseninduzierte Nebenreaktionen in diesen nahezu neutralen Reaktionsbedingungen verhindert werden können.

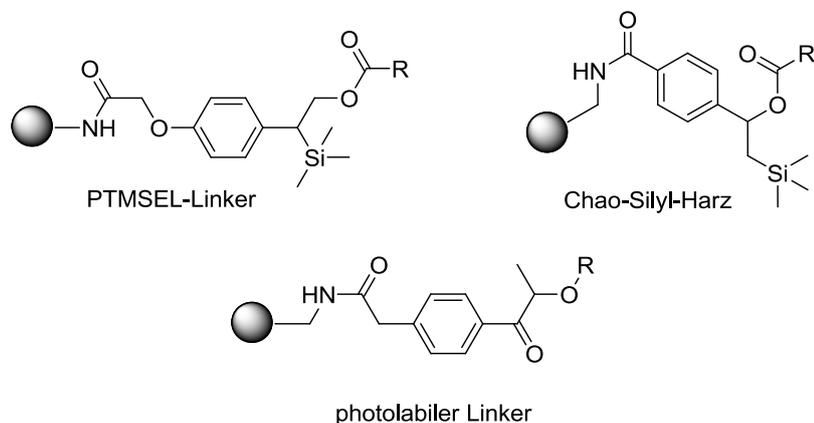


Abb. 3.105: Photolabile- und Silylankersysteme.

Für die Anbindung der Aminosäuren steht dem Peptidchemiker ebenfalls eine Reihe von verschiedenen Kupplungsreagenzien für die *in situ*-Aktivierung der Carbonsäurefunktion zur Verfügung. Dabei ist sowohl die Reaktivität, als auch die Racemisierungsneigung der jeweiligen aktivierten Aminosäure zu beachten. Neben dem Einsatz von Carbodiimiden wie z.B. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[212], *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) und *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)^[213] werden heute vor allem Uroniumsalze zur Ausbildung von Aktivestern eingesetzt. Diese haben den Vorteil, dass sie eine, gegenüber den Carbodiimiden eine erhöhte Reaktivität aufweisen und dass sich durch Zusatz eines Additives wie z.B. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)^[214] oder 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)^[215] die Racemisierung des gebildeten Aktivesters gut unterdrücken lässt. Bei den gängigsten Uroniumsalze handelt es sich um das *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)^[216, 217], *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)^[218] und 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU).^[219, 220]

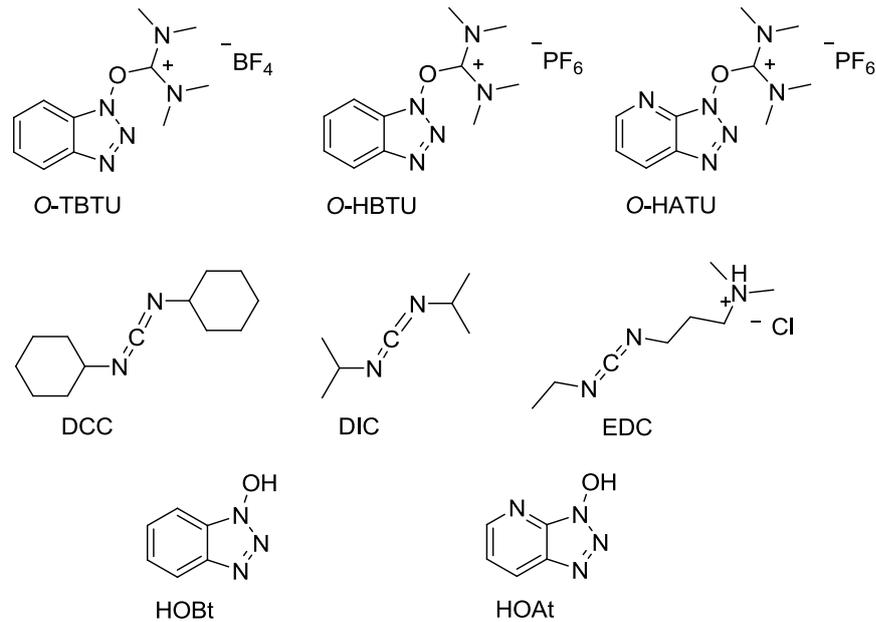


Abb. 3.106: Kupplungsreagenzien und Additive zur Knüpfung von Amidbindungen

Mechanistisch betrachtet läuft die durch HBTU und HOBT katalysierte Amidknüpfung folgendermaßen ab: Die von *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) deprotonierte Carbonsäure greift zunächst unter Ausbildung eines *O*-Acyl-Uroniumsalzes **I** das Kupplungsreagenz HBTU an. Dieses reaktive Zwischenprodukt **I** wird dann wiederum von deprotonierten HOBt unter Bildung eines Aktivesters **II** angegriffen, welcher schließlich mit der freien Aminfunktion zu dem gewünschten Amid reagieren kann.

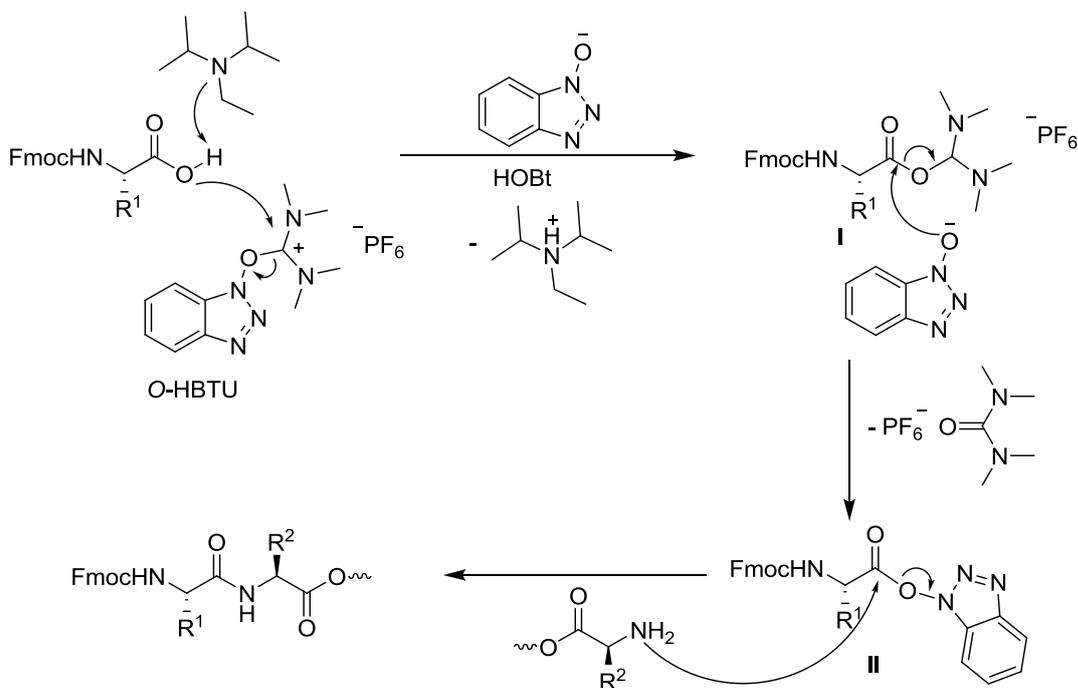


Abb. 3.107: Mechanismus der Peptidkupplung unter Verwendung von HBTU und HOBt

Die Racemisierung und weitere unerwünschte Nebenreaktionen lassen sich durch die Verwendung der Additive HOAt und HOBt weitestgehend unterdrücken. Dies liegt hauptsächlich an der besonders hohen Reaktivität des durch das Additiv gebildeten Aktivesters. Für besonders anspruchsvolle Kupplungsreaktionen, wie z.B. die Kupplung einer sterisch stark gehinderten Glycosylaminosäure, hat sich vor allem das System bestehend aus HATU, HOAt und *N*-Methylmorpholin als Base bewährt. Dies ist auf eine gegenüber HBTU/HOBt erhöhte Reaktivität der Reagenzien durch den zusätzlich elektronenziehenden Stickstoff zurückzuführen. So stellt HOAt eine bessere Abgangsgruppe als das ihm verwandte HOBt dar. Darüber hinaus kann das zusätzliche Stickstoffatom des Kupplungsreagenzes eine Wasserstoffbrücke zu dem freien Amin der harzgebundenen Aminosäure ausbilden, was zu einer Vororientierung der Reaktanden und damit einer Reaktionsbeschleunigung sowie geringerer Racemisierungstendenz führt.

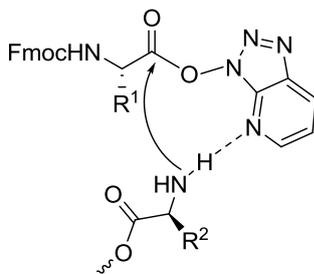


Abb. 3.108: Vorkoordination desamins bei der Verwendung von HOAt/HATU

Neben den bereits diskutierten Problemen können während der Festphasenpeptidsynthese noch zusätzliche Nebenreaktionen der Aminosäureseitenketten auftreten. Daher ist es notwendig, eine orthogonale Schutzgruppenstrategie beim Aufbau von polyfunktionalen Glycopeptiden einzusetzen. So kann z.B. als Nebenreaktion unter den basischen Bedingungen der Fmoc-Abspaltung die bereits erwähnte Aspartatimidbildung zu einer verringerten Ausbeute des gewünschten Peptids führen. Diese Nebenreaktion ist sequenzabhängig und tritt besonders oft auf, wenn Asparaginsäure auf Glycin, Glutamin, Serin oder auch Alanin folgt.^[221] Durch Deprotonierung des Amidstickstoffs kommt es in diesem Fall zunächst unter Ausbildung eines Succinimids zum Ringschluss und durch nachfolgende Reaktion mit Wasser entweder zu dem gewünschten α -Aspartyl-Peptid oder aber zu dem als Nebenprodukt auftretenden β -Aspartyl-Peptid. Durch die Verwendung von sterisch besonders anspruchsvollen Schutzgruppen wie der *tert*-Butylester und der *tert*-Butylether lässt sich diese Nebenreaktion oft unterdrücken. Allerdings muss bei der anschließenden sauren Hydrolyse der Seitenschutzgruppen ebenfalls auf eine Aspartatimidbildung geachtet werden.

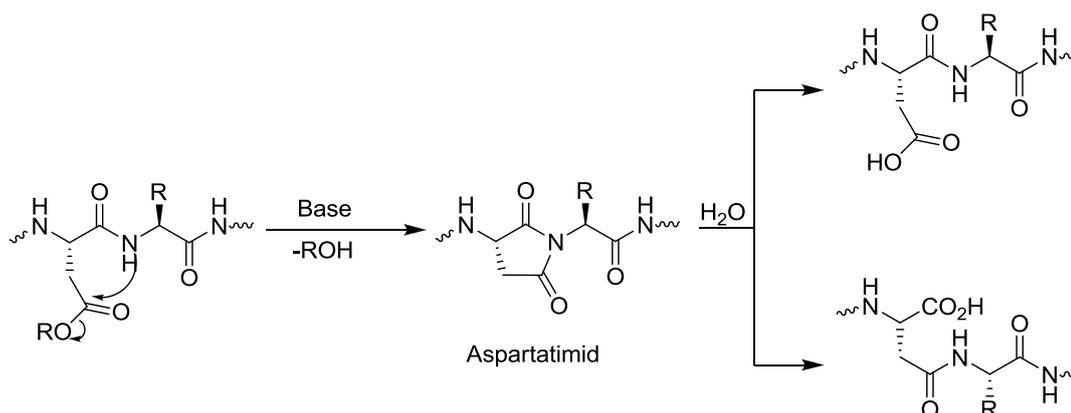


Abb. 3.109: Aspartimidbildung

Auch bei der Verwendung von ungeschützten Arginin-Seitenketten ist Vorsicht geboten. So kann die nucleophile Guanidinium-Gruppe durch die freie Säure, der als nächstes zu kuppelnden Aminosäure, acyliert werden. Dieses Acylierungsprodukt kann dann unter basischen Bedingungen zu einem entsprechenden Ornithin-Derivat und einem 2-Iminoimidazolin weiterreagieren. Zudem kann die Aktivierung der Carboxylfunktion des Arginins zu einer intramolekularen Lactambildung führen. Beide Nebenreaktionen führen schließlich zu einem Abbruch des Kettenwachstums.

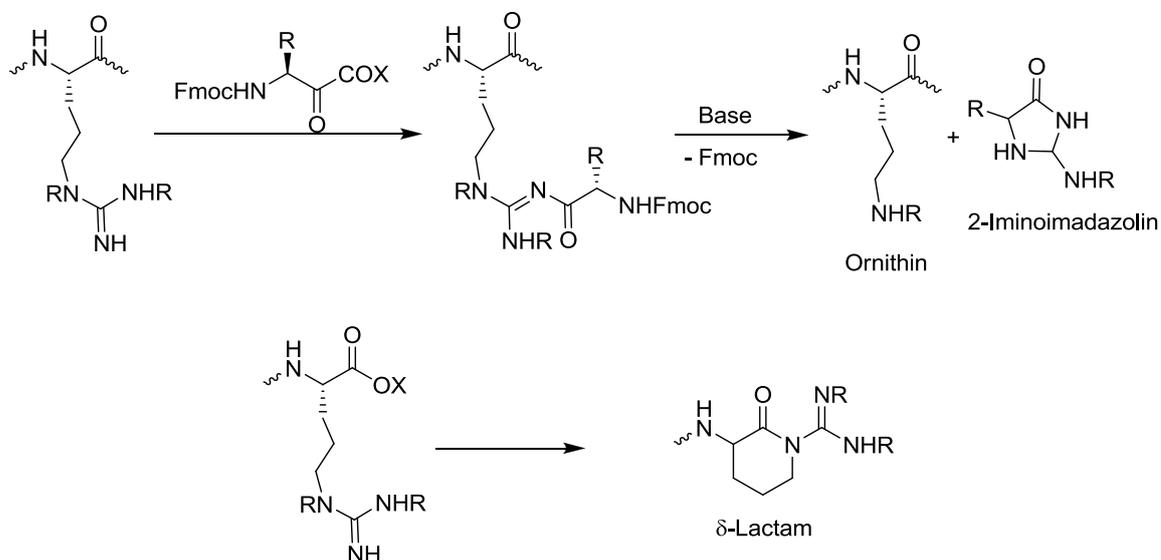


Abb. 3.110: Ornithin Bildung und δ -Lactambildung in carboxyaktiviertem Argininen

Durch Einführung der säurelabilen 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc),^[222, 223] die die Nucleophilie des Guanidins erheblich herabsetzt, können diese Nebenreaktionen jedoch unterdrückt werden. Dabei entspricht die Säurelabilität der Pmc-Gruppe ungefähr der des *tert*-Butylesters, so dass beide Schutzgruppen in einem Schritt entfernt werden können. Um alle Seitenkettenschutzgruppen gemeinsam abspalten zu können,

wird daher auch die Seitenkette des Histidins in dieser Arbeit mit einer säurelabilen Trityl-Schutzgruppe versehen.

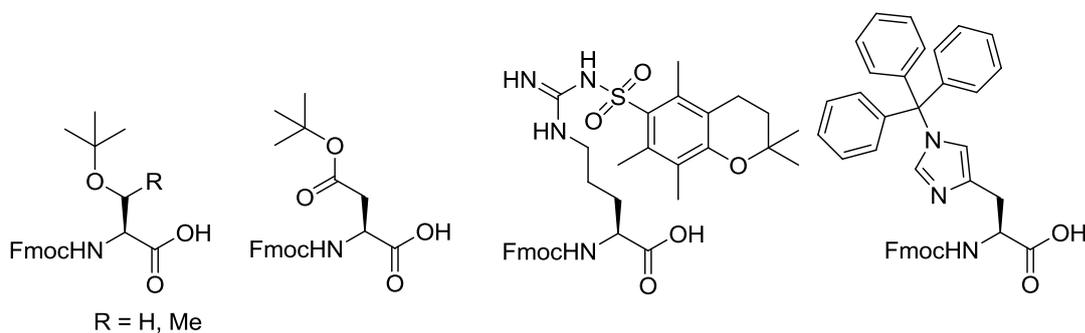


Abb. 3.111: sekundäre Schutzgruppen in der Festphasenpeptidsynthese

Protokoll zur automatisierten Festphasen-Glycopeptidsynthese

In der vorliegenden Arbeit wurden die MUC1-Glycopeptide entsprechend der Fmoc-Strategie und mit Hilfe eines *ABI 433A*-Peptidsynthesizers der Firma *Perkin-Elmer Applied Biosystems* synthetisiert. Als polymeres Trägermaterial wurden wegen der besonders guten Quell-eigenschaften TentaGel-Harze, die bereits mit Fmoc-Prolin als Startaminosäure vorbeladen waren, verwendet. Dabei wurde auf eine relativ geringe Beladung der Harze von 0.2 bis 0.25 mmol/g geachtet, um Probleme durch die gegenseitige Beeinflussung der wachsenden Peptidketten zu vermeiden. Wie bereits erwähnt wurde, spielt die Wahl des Schutzgruppenmusters eine entscheidende Rolle beim Aufbau von komplexen Glycopeptiden. Daher wurden die Seitenketten der Aminosäuren mit den bereits vorgestellten säurelabilen Schutzgruppen versehen: So wurden für die Hydroxylgruppen des Serins und Threonins sowie für die Carboxylgruppe der Asparagin- und Glutaminsäure *tert*-Butylester-Gruppen verwendet. Die Guanidinfunktion des Arginins wurde mit der 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc) und das Amin des Histidins mit der Trityl-Gruppe blockiert. (Abb. 3.111) Die Hydroxylgruppen der Zuckerbausteine wurden hingegen mit dazu orthogonalen Acetylschutzgruppen versehen, welche in einem letzten Schritt der Synthese unter basischen Bedingungen abgespalten werden können. Da in den hier vorgestellten Synthesen die Abspaltung des Peptids vom Harz unter gleichzeitigem Verlust der Aminosäureschutzgruppen gewünscht war, wurden als Ankersysteme säurelabile Trityl-TentaGel-Harze verwendet. Diese Harze haben sich zudem aufgrund des sterischen Anspruchs des Tritylankers bei der Unterdrückung der als Nebenreaktion auftretenden 2,5-Diketopiperazinbildung bewährt. Diese wird zu Beginn einer Peptidsynthese besonders häufig beobachtet, wenn Prolin, Glycin

oder Alanin als Startamino­säure zum Einsatz kommen. Dabei kann nach *N*-terminaler Fmoc-Abspaltung an einem Dipeptid durch intramolekulare Aminolyse der Esterbindung die Ausbildung eines 2,5-Diketopiperazins auftreten, wodurch neben der Bildung von Fehlsequenzen auch eine Ablösung des Dipeptides von dem polymeren Träger und somit der Verlust der wachsenden Peptidkette resultiert.

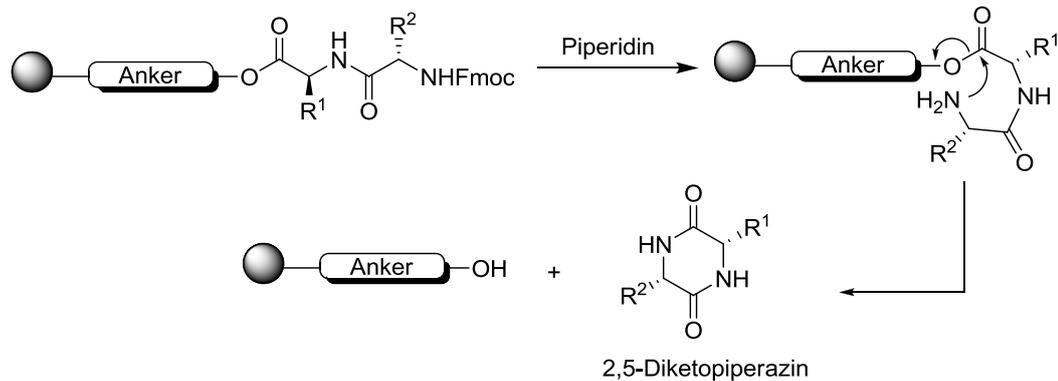


Abb. 3.112: Diketopiperazinbildung

Diese Reaktion kann jedoch durch sterisch anspruchsvolle Ankersysteme wie das Trityl-Harz verhindert werden. Alternativ kann auch die Kupplung eines Dipeptides an die Startamino­säure vorgenommen werden.

Die automatisierte Peptidsynthese erfolgte nach dem Standardprotokoll (*Fastmoc*) in sich wiederholenden Syntheseyklen, wobei diese sich aus den drei bereits geschilderten Teilschritten zusammensetzen. Zunächst wurde die die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit einer 20%igen Piperidin-Lösung in NMP abgespalten. Dieser Schritt wird in der Regel dreimal wiederholt und die Freisetzung des Amins über das entstandene Abspaltungsprodukt der Fmoc-Gruppe, das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt, photometrisch kontrolliert.

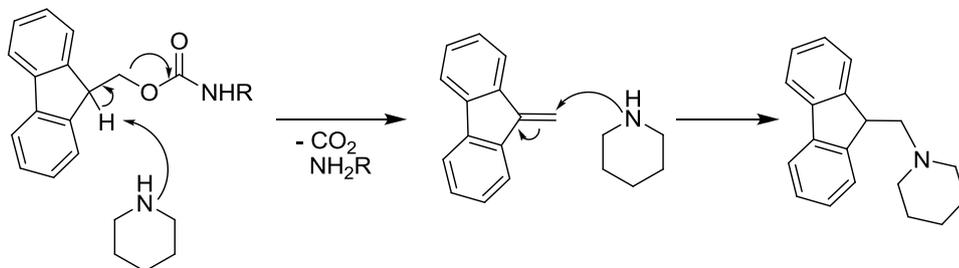


Abb. 3.113: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung und Bildung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes

Dabei können über die Extinktionswerte der UV-spektroskopischen Messung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes Rückschlüsse auf die Effizienz der vorangegangenen Kupplungsreaktionen gezogen werden.

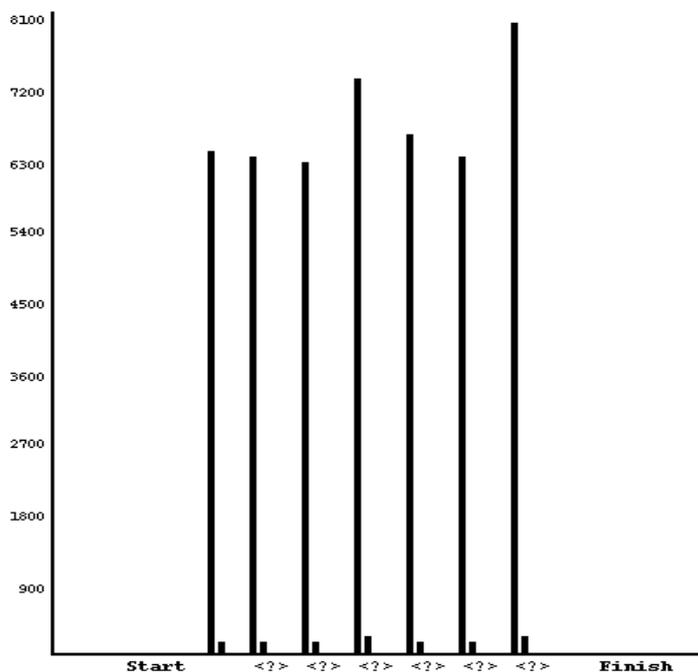


Abb. 3.114: Abspaltungsprotokoll einer Peptidsynthese

Nach erfolgter Deblockierung des *N*-Terminus kann die nächste Aminosäure, die in der Regel mit einem Überschuss von 10 Äquivalenten eingesetzt wurde, gekuppelt werden. Die Knüpfung der Peptidbindungen erfolgt dabei innerhalb von 20-30 min unter Verwendung von HBTU/HOBt (ebenfalls in einem Überschuss von 10 Äquivalenten) und DIPEA (20 Äquiv.). Im anschließenden *Capping*-Schritt werden alle nicht umgesetzten Aminfunktionen durch Behandlung mit Acetanhydrid, DIPEA und katalytischen Mengen an HOBt acetyliert. Die Kupplung der wertvollen und sterisch anspruchsvollen Glycosylaminosäurebausteine erfolgte im Gegensatz zu den normalen Aminosäuren halbautomatisch und mit einem maximalen Überschuss von 2.5 Äquivalenten. Um dennoch gute Ausbeuten zu erzielen wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt zur Aktivierung verwendet. Nach Zugabe von *N*-Methylmorpholin (NMM) als Base wurde das Reaktionsgemisch in den Festphasenreaktor eingebracht und acht Stunden reagieren gelassen. Anschließend wurde erneut mit dem *Capping*-Reagenz acetyliert, und die folgenden Aminosäuren wurden anhand des üblichen Standardprotokolls gekuppelt. Die vollständige harzgebundene Peptidsequenz wurde anschließend in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und das Glycopeptid mit einer Mischung aus TFA, Triisopropylsilan und Wasser unter gleichzeitiger Freisetzung der

Aminosäureseitenketten vom Harz abgespalten, bevor in einem letzten Schritt die Acetyl- und Benzylesterschutzgruppen der Kohlenhydrateinheit basisch entfernt wurden.

Synthese des Fmoc-geschützten Triethylenglycolspacers

Für den Aufbau vollsynthetischer tumorassoziierter Vakzine auf der Basis von MUC1-Glycopeptiden ist deren Konjugation an Trägerproteine und immunstimulierende Substanzen wie Rinderserumalbumin (BSA) bzw. Tetanus Toxoid (TTox) unerlässlich. Damit jedoch beide Haptene, sowohl das Glycopeptid als auch das Carrierprotein sich nicht gegenseitig in ihrer Konformation bzw. ihren immunogenen Eigenschaften beeinflussen, muss ein nichtimmunogener Abstandhalter zwischen beide Teilstrukturen eingebaut werden.^[56] Als gut geeignet haben sich hierfür Oligoethylenglycolspacer erwiesen, da sie weder immunogen sind noch die konformativen Eigenschaften der Vakzinbausteine beeinflussen.^[224] Durch Einführung eines Fmoc-Carbamates an einem Ende des Ethylenglycolspacers und einer Carboxyfunktion am anderen Ende kann eine solche Spaceraminosäure zudem automatisch im Peptidsynthesizer gekuppelt werden. Zusätzlich lässt sich durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe der Erfolg dieser Peptidknüpfung photometrisch bestimmen und das freie Amin kann zur Anknüpfung an Carrierproteine oder zu einer weiteren Peptidsynthese eingesetzt werden.

Die Synthese der eingesetzten Spaceraminosäure erfolgte nach einem literaturbekannten Verfahren^[56, 225, 226] ausgehend von Triethylenglycol. Dieses wurde zunächst in einer Hetero-Michael-Addition mit Acrylsäure-*tert*-butylester unter Verwendung von katalytischen Mengen an Natrium in THF zu dem 12-Hydroxy-4,7,9-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **97** umgesetzt. Durch Überführung der Hydroxylgruppe von **97** in das entsprechende Mesylat konnte letzteres anschließend durch Natriumazid substituiert werden.

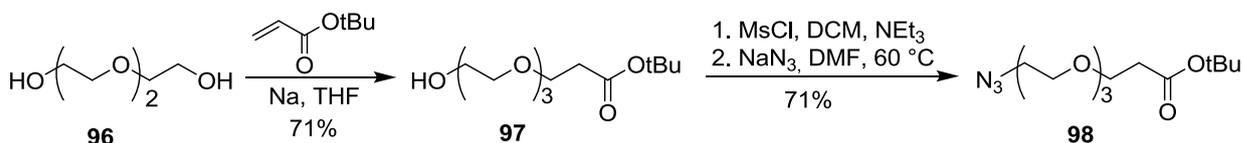


Abb. 3.115: 12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **98**

Das resultierende Azid **98** wurde mit Wasserstoff und Raney-Nickel als Katalysator in Isopropanol zu dem freien Amin **99** reduziert, das mit Fmoc-OSu in einem Aceton/Wasser-Gemisch (1:1) in das entsprechende Fmoc-Carbamat **100** überführt wurde. In einem letzten Schritt wurde schließlich der *tert*-Butylester durch Behandlung mit TFA/Wasser (10:1)

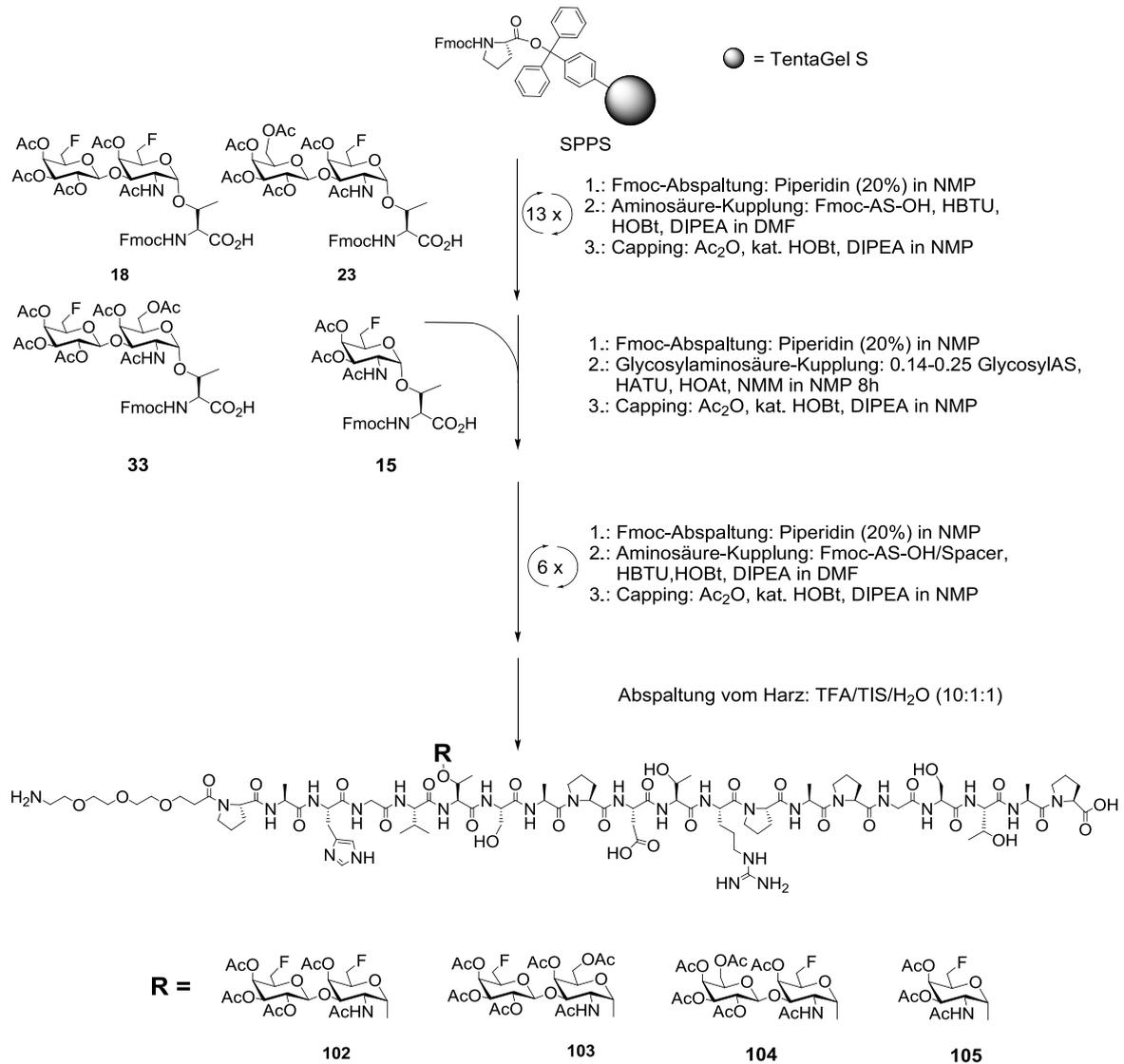


Abb. 3.117: Festphasenglycopeptidsynthese der MUC1-Glycopeptide **102**, **103**, **104**, **105**

Ohne weitere Reinigungsschritte wurden anschließend die Kohlenhydratschutzgruppen entfernt, wofür entweder die bereits oben vorgestellten Reaktionsbedingungen der kontrollierten Methanolyse oder wässrige Natriumhydroxidlösung zum Einsatz kommen kann. In beiden Fällen ist jedoch auf ein genaues Einstellen des pH-Wertes zu achten, um den Verlust der Kohlenhydratseitenketten durch β -Eliminierung zu unterdrücken. In diesem Fall wurden die Acetylschutzgruppen mittels wässriger Natriumhydroxidlösung bei einem pH-Wert von 10 entfernt, da diese Methode ein einfaches Einstellen und Regulieren des pH-Wertes erlaubt.^[68] Nach erfolgter Deacetylierung, deren Verlauf über HPLC kontrolliert wurde, wurde mit 1 N Essigsäure neutralisiert und lyophilisiert. Semipräparative RP-HPLC lieferte die gereinigten fluorierten MUC1-Glycopeptide in Ausbeuten von 44-74% bezogen auf die Beladung des eingesetzten Harzes.

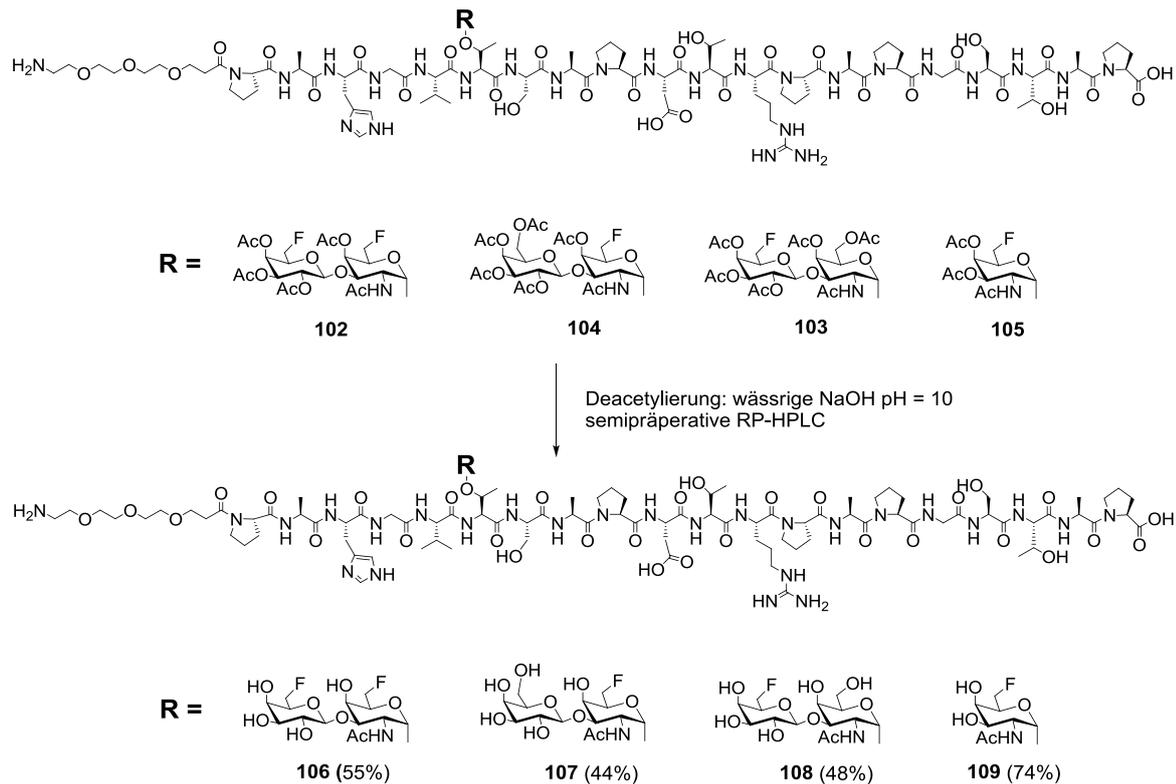


Abb. 3.118: Deacetylierung der Glycopeptide **106-109**

Der Einbau der beiden fluorierten isomeren ST-Antigene **45**, **49** in die *tandem repeat* Sequenz des MUC1 verlief analog zu dem oben beschriebenen Verfahren. Allerdings wurde hier aufgrund der sterischen Hinderung der Glycosylaminosäure die Reaktionszeit auf 16 Stunden ausgedehnt. Zusätzlich wurde die nächste Aminosäure Valin einer Doppelkupplung unterzogen, da deren Anbindung ebenfalls als kritisch angesehen werden kann.

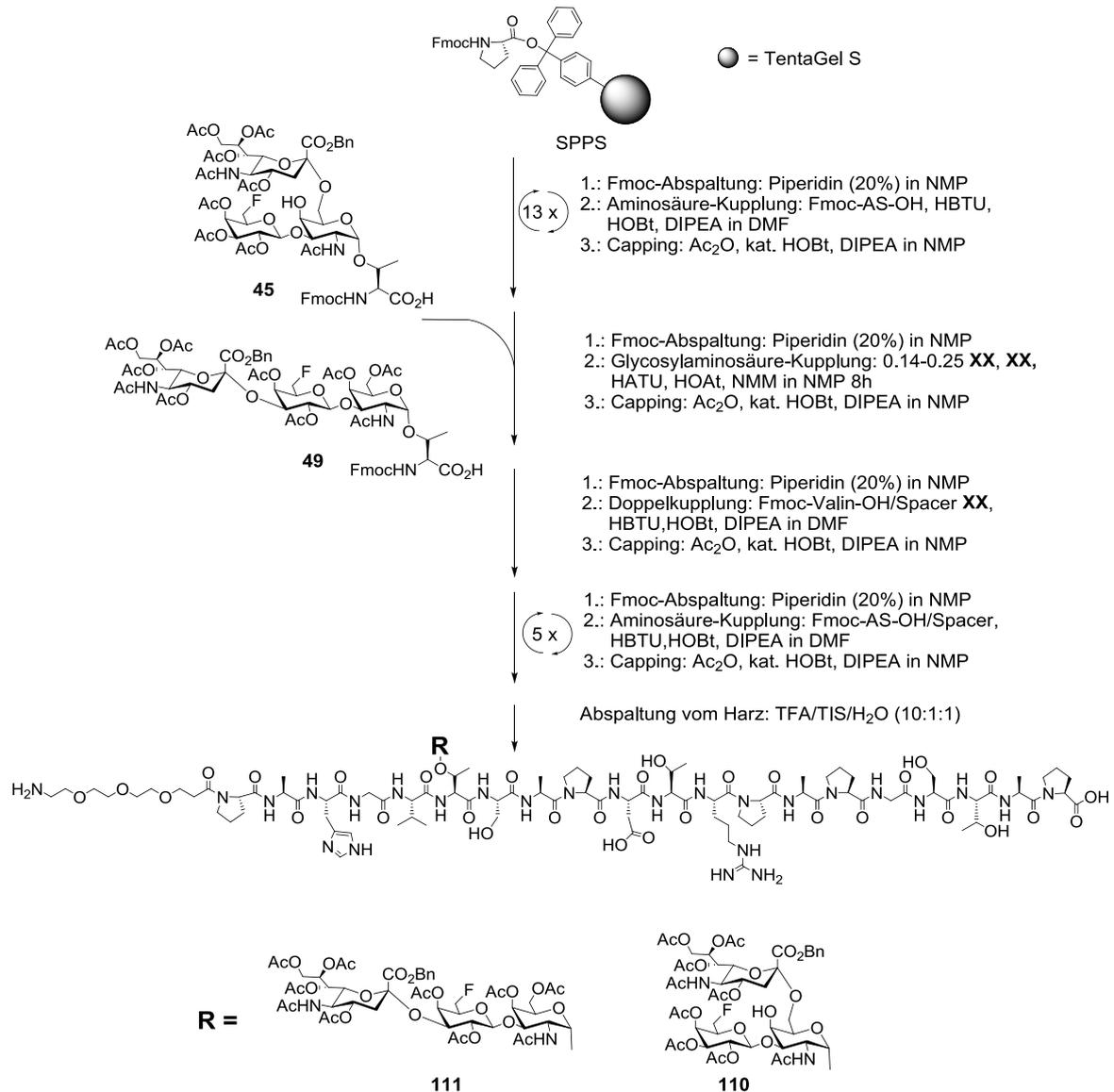


Abb. 3.119: Festphasenglycopeptidsynthese der MUC1-Glycopeptide **110** und **111**

Aufgrund der geringen Ausbeute an 2,3-6'-F-ST-Glycosylaminosäure **49**, von der lediglich 1.05 Äquivalente für die Synthese zur Verfügung standen, wurde neben dem gewünschten Produkt ein nicht unerheblicher Anteil an Abbruchsequenz erhalten, die nach der Deblockierung der Zucker-Hydroxylgruppen und der Spaltung des Benzylesters abgetrennt werden sollte. Durch Behandlung mit wässriger Natriumhydroxidlösung bei pH 11 gelang dabei in einem Schritt die vollständige Deblockierung des Glycopeptids **110**, das in einer Ausbeute von 33% erhalten wurde. In der analogen Reaktionssequenz zur Deblockierung des regioisomeren 2,3-ST-antigen tragenden Glycopeptids **111** führte diese Methode hingegen nicht zum Erfolg, da hier nach semipräparativer RP-HPLC nur die Abbruchsequenz isoliert werden konnte.

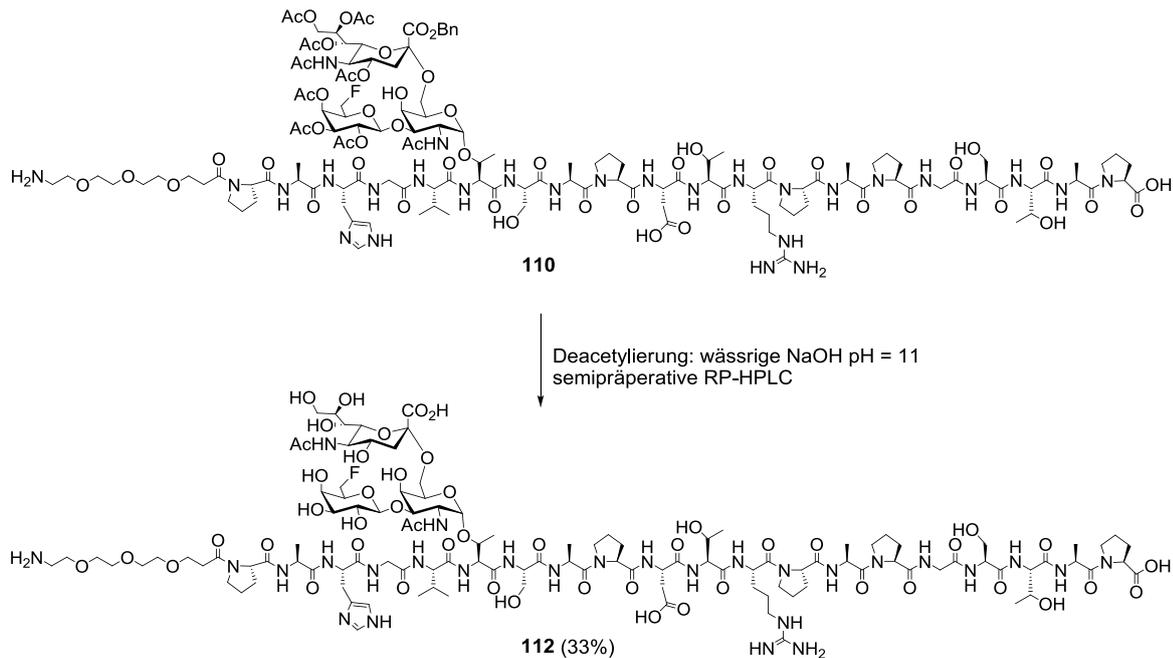


Abb. 3.120: Deblockierung des Glycopeptides **112**

Dennoch konnten fünf neuartige fluorierte Glycopeptide, die drei verschiedene fluorierte T-Antigene, ein 2,6-ST-Antigen und ein 6F-T_N-Antigen enthalten, erfolgreich hergestellt werden. Die Strukturen konnten dabei mittels ESI-MS und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie eindeutig gesichert werden, so dass die Verbindungen nun für die Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen sowie für vergleichende Neutralisationsexperimente zur Verfügung stehen.

3.2.2 Synthese und biologische Evaluierung der fluorierten MUC1-Glycopeptid-Konjugate

Da es sich bei den Strukturen auf Tumorzellenden um körpereigene Stoffe handelt, ist das menschliche Immunsystem in der Regel nicht oder nur eingeschränkt in der Lage, Krebszellen selbständig anzugreifen. Daher ist man bestrebt, mittels synthetisch hergestellter Vakzine diese Selbsttoleranz zu brechen und das Immunsystem gegenüber den Tumorzellen zu aktivieren. Dabei ist es wichtig, dass sowohl der humorale als auch der zelluläre Teil des Immunsystems aktiviert wird. So kann es durch die Präsentation der Antigene über MHC II-Komplex zu einer T_H -1-Zell-vermittelten Immunantwort unter Aktivierung von Makrophagen kommen, während die von T_H -2-Zellen und Cytokinen ausgelöste Aktivierung von B-Zellen zu einer Antikörperproduktion führt. (siehe Kapitel 1.2 Abb. 1.2) Diese Antikörper sind in der Lage, die entsprechenden Fremdkörper zu markieren, wodurch diese Fremdkörper von Makrophagen erkannt und lysiert werden können.

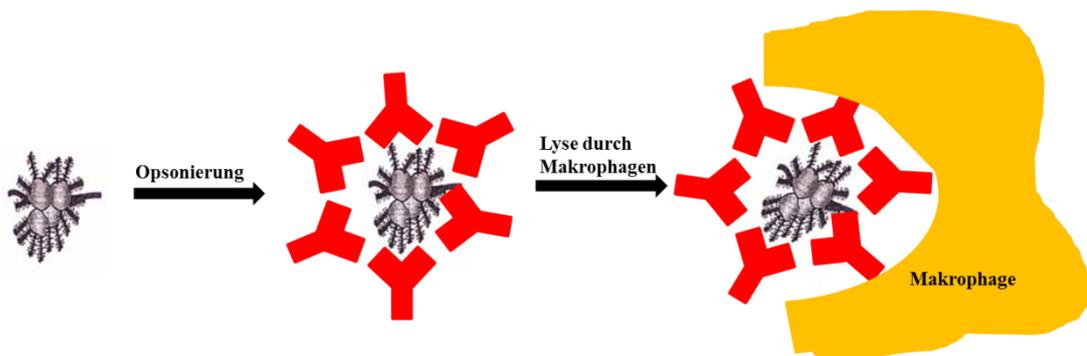


Abb. 3.121: Lyse der Krebszellen durch Makrophagen nach Opsonierung durch Antikörper

Die MHC-I-restringierte Immunantwort hingegen führt zu einer Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen und somit zur Lyse von infizierten Zellen. Diese $CD8^+$ -T-Zellen tragen an ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TCR), welche spezifische, durch MHC I-Moleküle präsentierte Antigenstrukturen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) erkennen und binden können. Durch eine weitere Wechselwirkung des B7-Liganden der APC-Zelle und dem CD28-Rezeptor der T-Zelle sowie durch die Sekretion von kostimulierenden Cytokinen (IL-1, IL-2) wird die cytotoxische T-Zelle aktiviert. Dabei werden cytotoxische Granula ausgeschüttet, die Perforin und weitere Proteasen enthalten und die in die infizierte Zelle eindringen und deren Zelltod auslösen können.

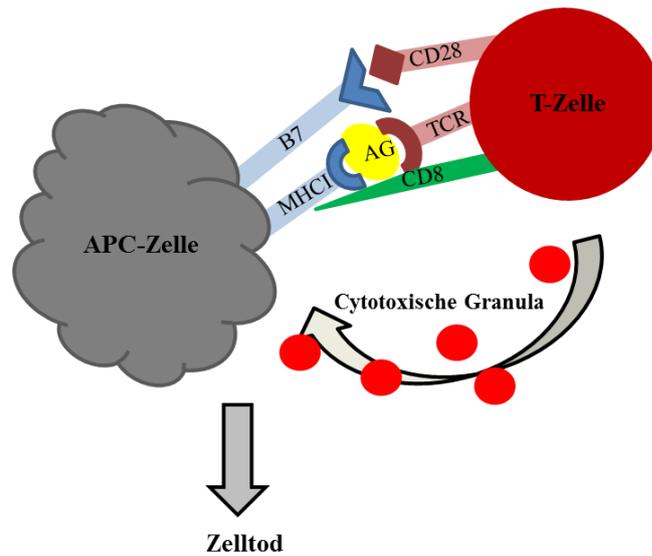


Abb. 3.122: Lyse von infizierten Zellen durch cytotoxische T-Zellen

Synthese der MUC1-Glycopeptid-Konjugate

Um eine effektive Immunantwort auslösen zu können, ist eine Konjugation der selbst nicht ausreichend immunogen wirkenden MUC1-Glycopeptide-Haptene an geeignete Carrierproteine notwendig. Zur Überwindung der Selbsttoleranz des Immunsystems ist es dabei wichtig, dass diese Carrierproteine T_H2 -Zell-Epitope besitzen, welche nach Aufnahme und Prozessierung in einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) über entsprechende MHC II-Komplexe auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert und von $CD4^+$ -T-Helferzellen erkannt werden können. Nur so ist gewährleistet, dass es über eine gekoppelte Erkennung zu einer effektiven Aktivierung der B-Zellen und damit zu einer starken Aktivierung des Immunsystems kommt. Als Trägerproteine kommen dafür neben Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA)^[227] auch Ovalbumin (OVA)^[224, 228] und vor allem das Tetanus Toxoid (TTox)^[228, 229, 230, 231] in Frage.

Einen Schlüsselschritt in der Synthese der Glycopeptid-Carrier-Konjugate stellt die Anbindung des B-Zell-Epitops (MUC1-Glycopeptid) an das Trägerprotein dar. Um eine Beeinflussung bzw. Beeinträchtigung der B- und T_H -Zell-Epitope zu verhindern, sollte die Reaktion möglichst unter milden Bedingungen und vor allem chemoselektiv verlaufen. Zusätzlich dazu dürfen die eingesetzten mono- oder bifunktionellen Linker, mit deren Hilfe die Haptene die kovalent angebunden werden, selbst nicht immunogen sein. In der Literatur sind bereits eine Reihe von Konjugationsverfahren beschrieben, die jedoch alle ihre Vor und Nachteile aufweisen.^[232] Das häufigste Problem stellt meist eine zu hohe Immunogenität des

Linkers dar, wie sie z.B. bei Konjugaten mit Maleinimidspacern beobachtet wurde.^[233, 234] In dieser Arbeit kam ein von *Tietze*^[235, 236] entwickeltes Verfahren zur Anwendung, das sich schon in früheren Arbeiten zur Konjugation von MUC1-Glycopeptiden bewährt hatte.^[53, 60, 237] Dieses beruht auf der chemoselektiven Reaktion eines Amins mit einem Quadratsäure-diethylester unter Bildung des entsprechenden Quadratsäureestermonoamids.

Um die Glycopeptide an die Lysinseitenketten des Carriermoleküls anzubinden, wurde zunächst das freie Amin des Spacers chemoselektiv mit dem Quadratsäurediethylester umgesetzt. Die vorhandenen funktionellen Gruppen der vollständig entschützten Glycopeptide störten dabei die Reaktion nicht, so dass in einem Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1) und einem pH-Wert von 8 die gewünschten Monosquarate **113**, **114**, **115**, **116** und **117** in Ausbeuten von 22% bis 73% nach semipräparativer RP-HPLC erhalten wurden.

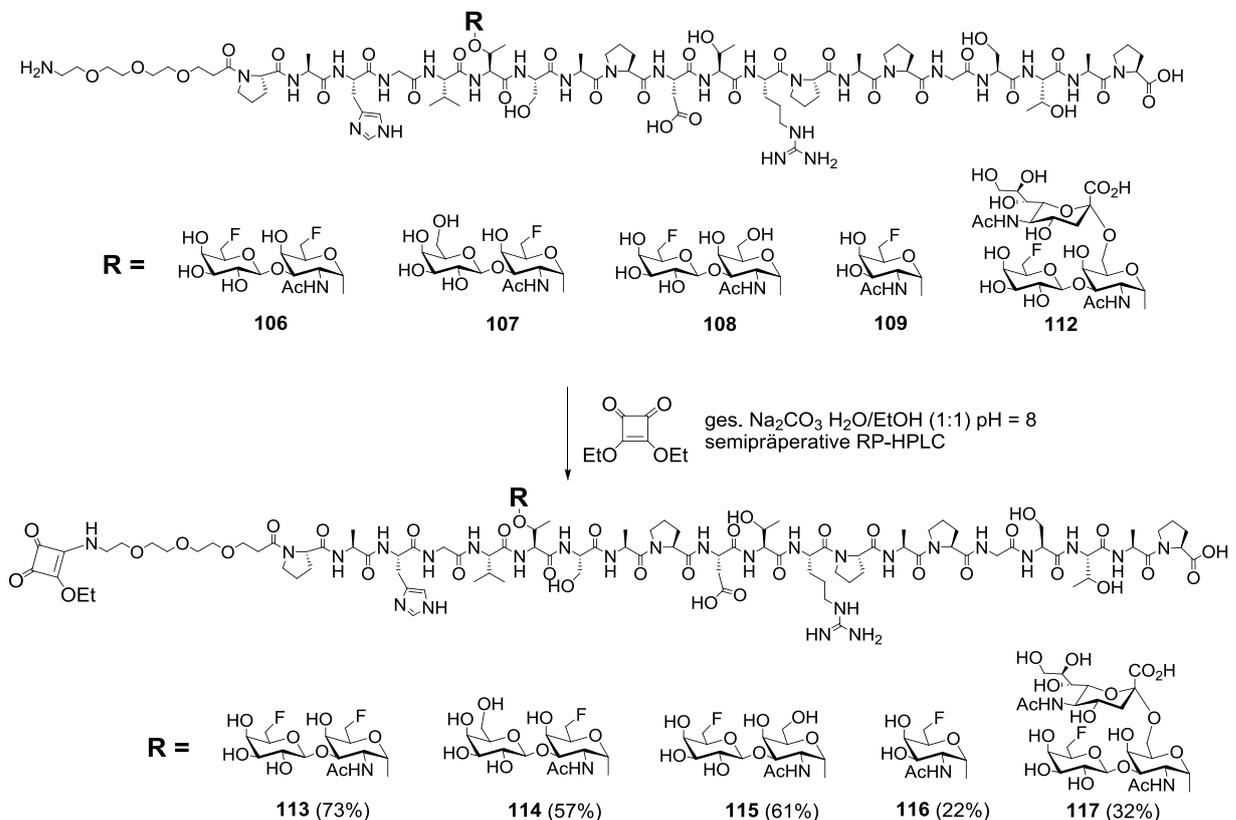


Abb. 3.123: Synthese der Quadratsäurefunktionalisierten Glycopeptide

Die Anknüpfung der Quadratsäure-Glycopeptide an die Lysinseitenketten des Trägerproteins wurde in ähnlicher Weise bei einem leicht erhöhten pH-Wert von 9.5 durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden als Trägerproteine Rinderserumalbumin (BSA) und Tetanus Toxoid (TTox) verwendet. Da es sich bei Rinderserumalbumin um ein recht kleines Protein mit einem Molekulargewicht von nur ca. 66.500 g/mol handelt, ist es zwar in der Lage, eine

Immunantwort auszulösen, jedoch fällt diese im Vergleich zu den durch TTox-Konjugate ausgelösten Immunantworten relativ schwach aus. Daher wurden diese Konstrukte auch nicht zur Immunisierung selbst, sondern zur Beschichtung von ELISA-Platten (enzym linked immunosorbent assay, Abb. 3.128) genutzt. Dadurch wurde es möglich, die Bildung von Antikörpern während einer Immunisierung, d.h. nach den ersten Vakzinierungen zu verfolgen. Zusätzlich ist durch die geringen Molekulargewichte der Glycopeptid-BSA-Konstrukte eine massenspektrometrische Analyse mithilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie möglich, so dass Aussagen über den Beladungsgrad der einzelnen BSA-Konjugate gemacht werden konnten.

Die Anbindung der Quadratsäuremonoethylester an die Lysinseitenketten des BSA-Moleküls erfolgte in einer wässrigen Natriumhydrogenphosphatpufferlösung bei einem pH-Wert von 9.5 über einen Zeitraum von ca. fünf Tagen.^[237]

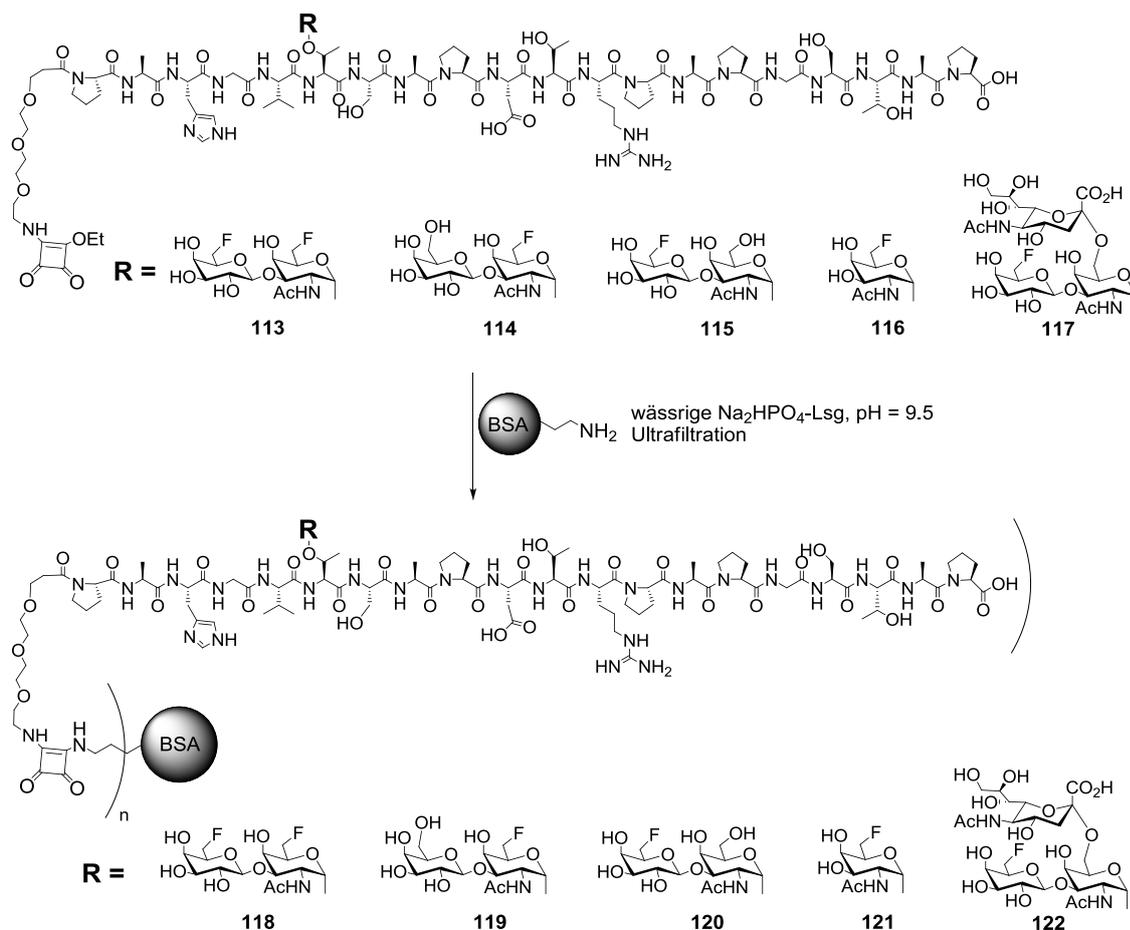


Abb. 3.124: Konjugation der fluorinierten MUC1-Glycopeptide an BSA

Zur Abtrennung der Salze und nichtgekuppelten Glycopeptide wurde die Lösung schließlich in eine Ultrafiltrationsanlage gegeben, die eine Membran enthält, die nur für Moleküle mit

einem Molekulargewicht von < 30.000 g/mol durchlässig ist. Nach mehrmaligem Waschen mit entionisiertem Wasser und anschließender Lyophilisierung konnten so fünf neuartige fluoridierte Glycopeptid-BSA-Konstrukte erhalten werden. Durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie ließ sich dabei für das fluoridierte Glycokonjugat **118** eine Beladung von durchschnittlich vier Molekülen Peptid pro BSA-Molekül ermitteln.

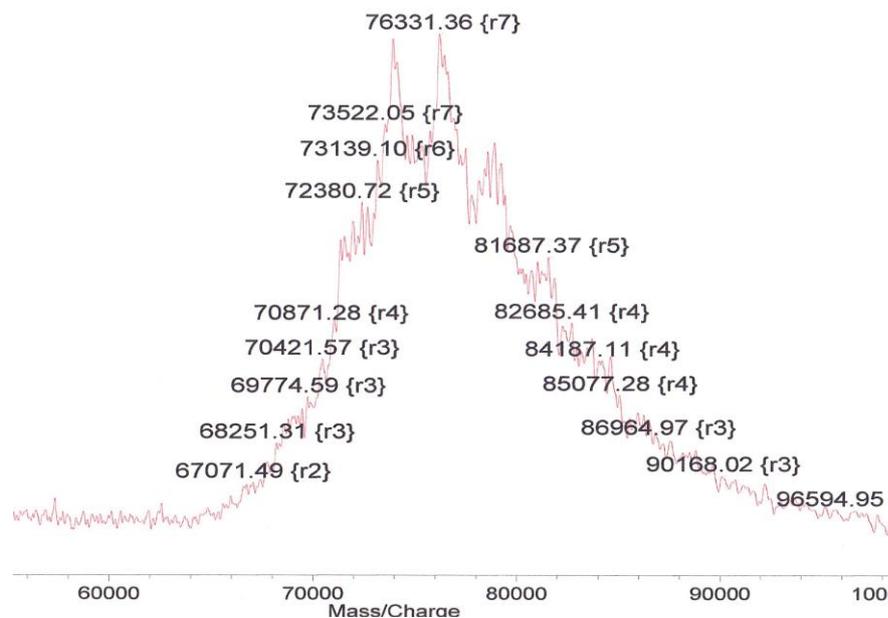


Abb. 3.125: MALDI-TOF Spektrum des 6F,6'F-T-Glycopeptid-BSA-Konjugates

Neben den für ELISA-Studien benötigten BSA-Konjugaten sollten auch zur Vakzinierung geeignete Konjugate hergestellt werden. Wie bereits einleitend erwähnt wurde, sollten diese in der Lage sein, sowohl eine starke Immunantwort auszulösen, als auch die durch den Tumor verursachte Immunsuppression aufzuheben. Dazu sollte das hochgradig immunogene Tetanus Toxoid mit einem Molekulargewicht von ca. 150.000 g/mol als Carrierprotein mithilfe des oben beschriebenen Quadratsäure-Amid-Verfahren angebunden werden. Die mit der Quadratsäure funktionalisierten Glycopeptide **113**, **115** und **117** wurden zusammen mit dem Tetanus Toxoid in einem wässrigen Natriumhydrogenphosphatpuffer bei pH 9.5 über mehrere Tage gerührt. Nach der Abtrennung der nicht umgesetzten Glycopeptidanteile durch Ultrafiltration konnten die jeweiligen TTox-Konjugate **123**, **124** und **125** als farblose Lyophilisate gewonnen werden.

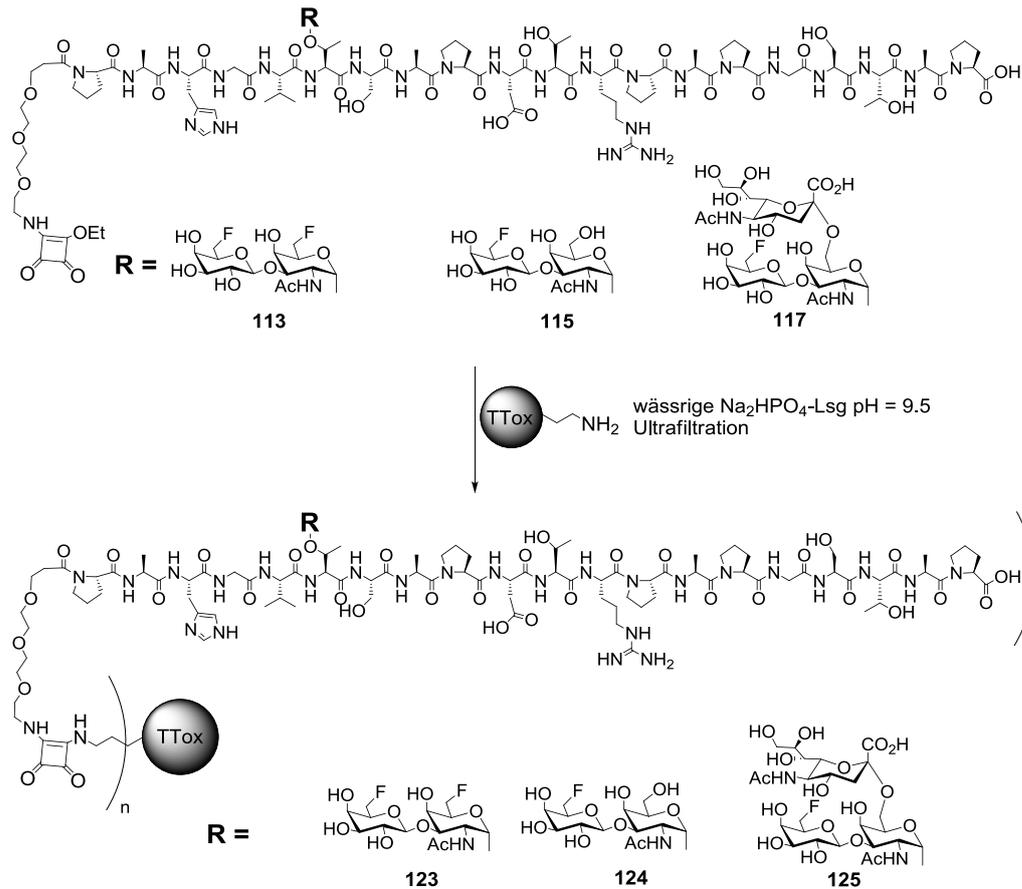


Abb. 3.126: Synthese der fluorinierten TTTox-Glycopeptidkonjugate

Ein wesentlicher Vorteil der TTTox-Vakzine ist, dass sie T_H2 -Zellepitope besitzen, die sowohl vom Immunsystem des Menschen als auch von dem der Maus erkannt werden können. Somit wird eine Übertragung der Ergebnisse, die im Mausmodell gewonnen werden, auf den Menschen ermöglicht. Zudem wird das Tetanus Toxoid-Protein als Impfstoff gegen Wundstarrkrampf eingesetzt, wodurch bei den meisten Menschen starke Immunantworten auf solche MUC1-Glycopeptid-TTTox-Konjugate resultieren sollten. Auch die Literatur weist bereits Beispiele für solche auf TTTox basierenden Impfstoffe auf. ^[228, 231, 238] Im Arbeitskreis von *Kunz* konnten beispielsweise starke, toleranzbrechende Immunantworten gegen MUC1-Glycopeptide im Mausmodell erfolgreich induziert werden. ^[53, 68]

Immunologische Evaluierung der fluorierten Glycopeptide und deren Tumorstoffe

Bevor die neuartigen fluorierten Glycopeptid-Vakzine für Immunisierungsstudien in Mäusen herangezogen werden konnten, sollte zunächst durch ELISA- und Neutralisationsstudien eine Bindung der fluorierten Glycopeptide durch spezifische MUC1-Antikörper sichergestellt werden. Dafür wurde ein in den Arbeitsgruppen *Kunz* und *Schmitt* hergestellter MUC1-Antikörper verwendet, der durch Immunisierung von balb/c Mäusen mit einem am Threonin 6 glycosylierten MUC1-TTTox-Konjugat (Abb. 3.127) gewonnen werden konnte.

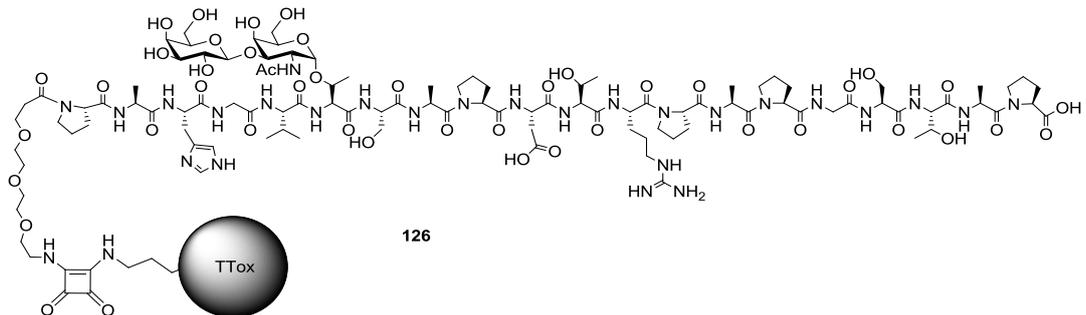


Abb. 3.127: Tumorselektives Vakzin nach *Kaiser*^[239]

Mit Hilfe von ELISA-Experimenten lässt sich zum einen der Titer und zum anderen auch die Selektivität der eingesetzten Antikörper bestimmen. Daher sollte nach dieser Methode die Erkennung von fluorierten Antigenen durch den gegen das oben gezeigte natürliche Konstrukt gerichtete Antikörper nachgewiesen werden. Eine starke Bindung durch den Antikörper könnte dabei als Beweis dafür dienen, dass zusätzlich eingeführte Fluoratome im Saccharid keinen merklichen Einfluss auf die Antikörpererkennung ausüben und damit auch das modifizierte Hapten zur Induktion einer tumorselektiven Immunantwort herangezogen werden kann.

Zur Durchführung der ELISA-Studien wurden zunächst die BSA-Konjugate in wässriger Lösung auf die Mikrotiterplatten aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde blieben diese auf der Mikrotiterplatte haften und konnten mit dem durch die Immunisierung gewonnenen Primärantikörper versetzt werden. Zur Visualisierung der Bindung dieses Antikörpers an das MUC1-Glycopeptid wurde ein biotinylierter spezifischer anti-Maus-Sekundärantikörper zugegeben. Dieser wurde anschließend wiederum von einer mit Streptavidin funktionalisierten Merrettichperoxidase (SA-HPO) an der Biotin-Einheit erkannt und gebunden.

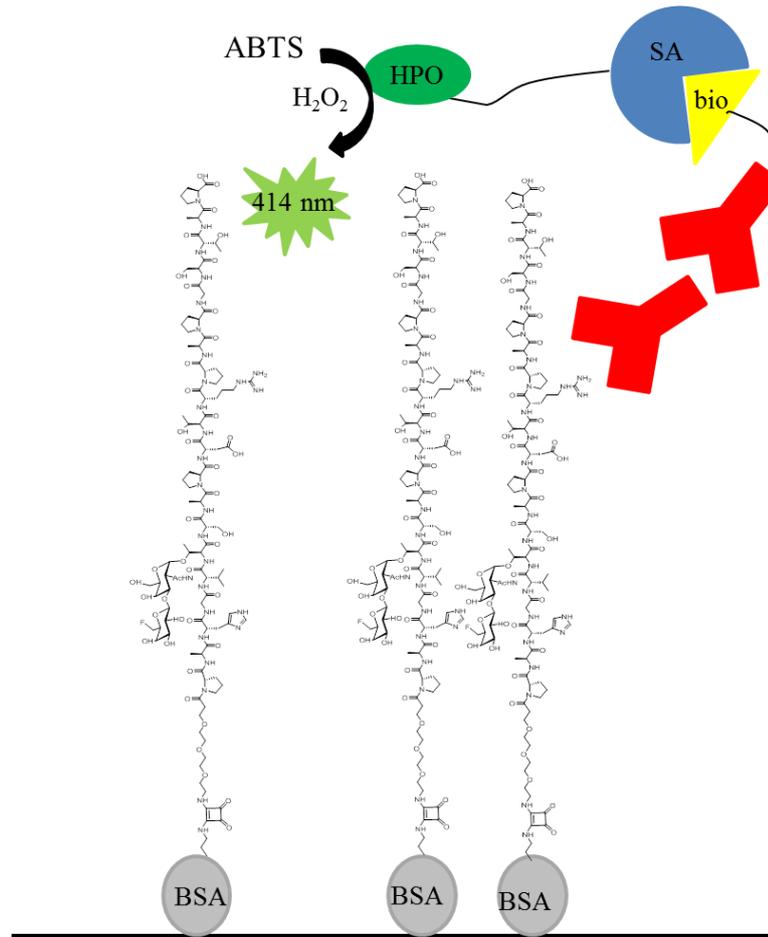


Abb. 3.128: schematische Darstellung eines ELISA-Tests

Nach Zugabe des farblosen Farbstoffs 2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) katalysierte die Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation des ABTS zu einem grünfarbigen Radikal, das mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 414 \text{ nm}$ eine Visualisierung und photometrische Quantifizierung der Antikörper-Antigen-Bindung erlaubt.

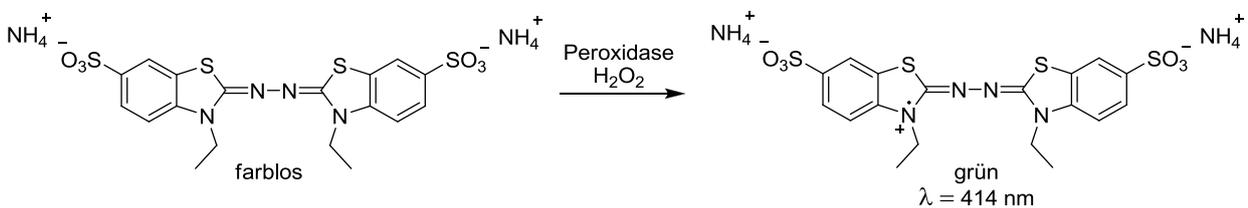


Abb. 3.129: HPO katalysierte Oxidation des ABTS-Farbstoffes

Werden die Absorptionmesswerte (optische Dichte) gegen die Verdünnung des Serums aufgetragen, so lassen sich Rückschlüsse über die Konzentration der über die immobilisierten Antigen-BSA-Konjugate gebundenen Antikörper ziehen.

Im Gegensatz zu normalen ELISA-Experimenten können in Neutralisationsstudien nicht nur Aussagen über die generelle Bindung des Antikörpers an das Antigen, sondern auch Aussagen über die Affinität des Antikörpers gegenüber zwei verschiedenen Antigenen getroffen werden, wobei eines davon frei löslich und eines an die Mikrotiterplatte fixiert vorliegen muss. Folglich wurde zunächst eine Mikrotiterplatte mit einem MUC1-T-BSA-Konjugat beschichtet, das der Struktur des bei der Impfung eingesetzten Vakzins **126** (s. Abb. 3.127) entsprach.

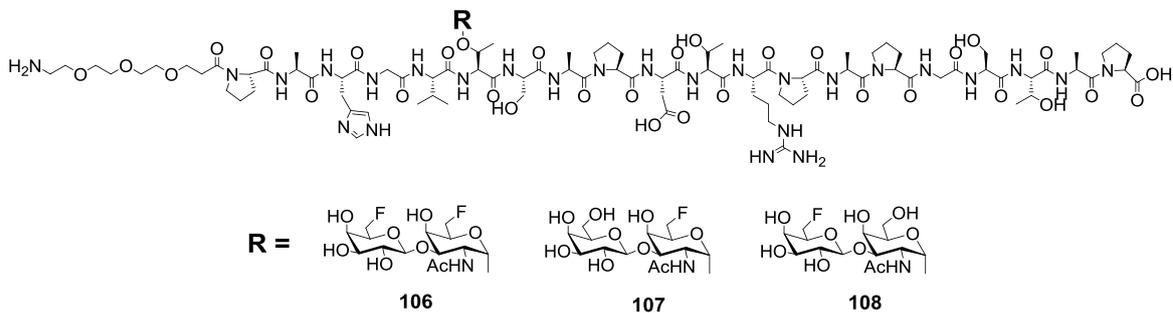


Abb. 3.130: Strukturen der in den Neutralisationstests eingesetzten Antigene

Daneben wurden die zu testenden Glycopeptide auf einer weiteren Mikrotiterplatte mit dem, bis in die Nähe des Titerpunktes, verdünnten Antikörperserums eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden diese Lösungen eins zu eins auf die mit dem BSA-Konjugat beschichtete Mikrotiterplatte übertragen. Nach einer Inkubationszeit von einer weiteren Stunde wurde entsprechend dem normalen ELISA-Protokoll verfahren. Da nun zwei verschiedene Antigene um die Bindung des Antikörpers konkurrieren, kann man Rückschlüsse auf die Antikörperselektivitäten bzw. -affinitäten ziehen. Bindet der Antikörper das lösliche (fluorierte) Glycopeptid, werden diese nach der einstündigen Inkubationszeit im nächsten Schritt durch Waschen entfernt, wodurch für die Bindung an die immobilisierten BSA-Konjugate insgesamt weniger Antikörper zur Verfügung stehen und eine geringere Absorption resultiert. Zum Nachweis eines korrekt durchgeführten ELISA-Experimentes wurden stets auch eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle durchgeführt. Zu dem Serum der Positiv-Kontrolle wurden dabei keine löslichen Antigene zugesetzt, so dass die vorhandenen Antikörper nur an die BSA-Konjugate binden konnten, und so die größte optische Dichte auftrat. Dagegen wurde bei der Negativ-Kontrolle auf die Zugabe des Antikörpers verzichtet, so dass keinerlei Farbreaktion auftreten konnte. In Abb. 3.131 sind die Absorptionmesswerte der jeweiligen Neutralisationslösungen gegen die Verdünnung des Antikörperserums aufgetragen.

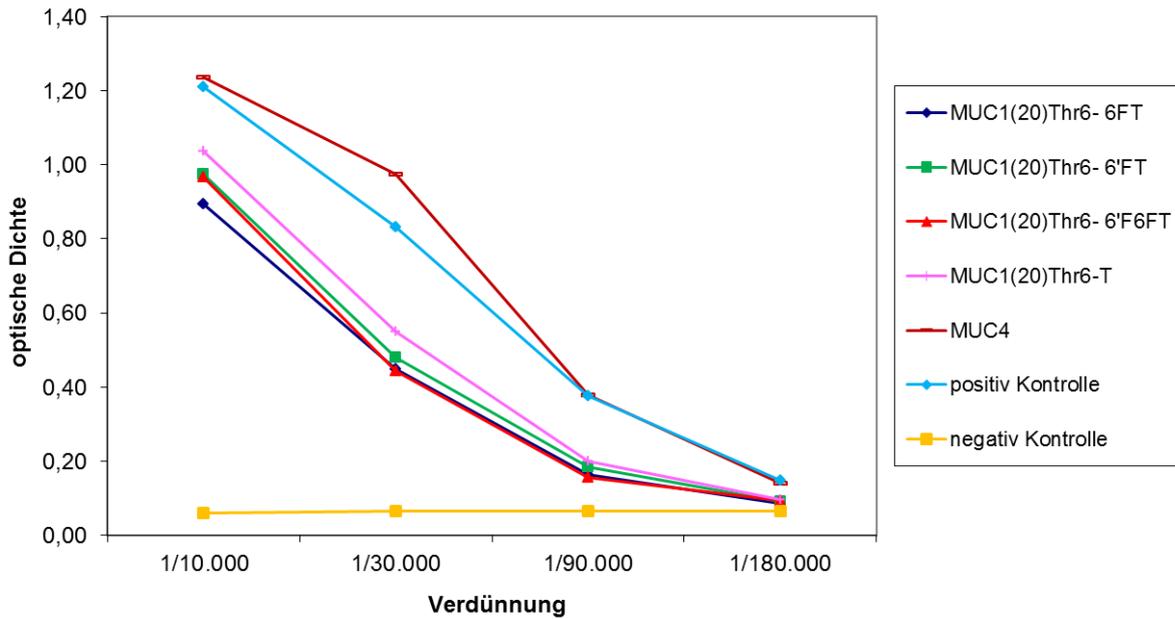


Abb. 3.131: Neutralisations-ELISA des Serums einer mit dem natürlichen T-Antigen tragenden TTox-Vakzine immunisierten Maus

Neben dem natürlichen MUC1-Glycopeptid und dem F-modifizierten Glycopeptidanaloga wurde als Kontrolle auch eines der verwandten MUC4-*tandem-repeat*-Sequenz^{[114]2} zur Neutralisation der Antikörper eingesetzt. Wie man in Abb. 3.131 erkennen kann, wurde dies jedoch nicht von dem zugesetzten Antikörper erkannt. Die fluoridierten Antigene **106**, **107**, **108** hingegen zeigten alle eine ähnliche, wenn nicht sogar eine etwas stärkere Affinität zu dem Antikörper als das natürliche Hapten. Es zeigt sich also, dass die Substitution einer Hydroxylgruppe in Position 6 bzw. 6' der Kohlenhydrateinheit durch ein Fluor keine wichtigen Bindungskontakte zwischen Antikörper und Glycopeptid beeinträchtigt und folglich die fluoridierten Haptene interessante Substrukturen für die Vakzinentwicklung darstellen.

² Zur Verfügung gestellt von C. Brocke

Evaluierung der Immunantwort gegen das 6,6'-Di-F-T-Thr⁶-MUC1-TTox-Konjugat

Zum Vergleich der Eigenschaften der mit einer natürlichen und einer fluorierten Glycopeptid-Vakzine induzierten Immunantworten wurde in ersten Vakzinierungsstudien zunächst nur das zweifach fluoridierte Analogon **123** (Abb. 3.132) eingesetzt. Ziel war es zu klären, ob die Substitution der Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom einen Verlust der Immunogenität des Konstruktes nach sich zieht und ob die Antigenspezifität der erhaltenen Antikörper beeinträchtigt würde.

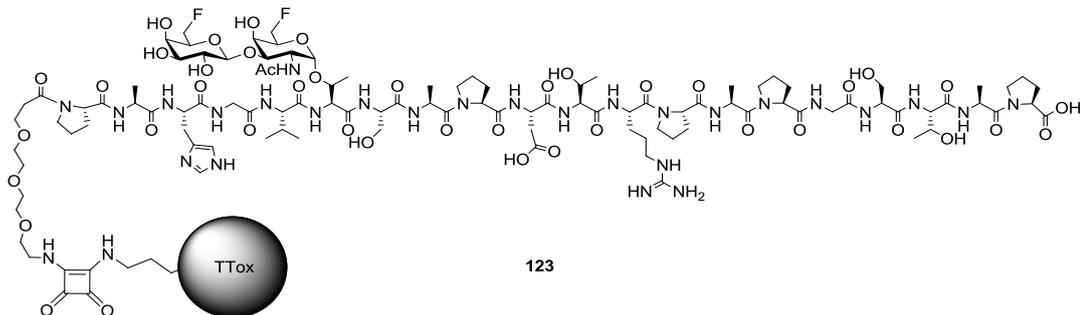


Abb. 3.132: fluoriertes MUC1 Glycopeptid-Konjugat **123** für die Immunisierung

Dafür wurden drei weibliche Balb/c-Mäuse mit dem TTox-Konjugat **123** und dem kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA) immunisiert. Anschließend erfolgte alle 21 Tage eine intraperitoneale Auffrischungsimpfung, die unter Verwendung des sog. inkompletten Freund'schen Adjuvans (IFA) durchgeführt wurde. Fünf Tage nach der 4. Immunisierung wurde den Mäusen zur Gewinnung des Serums Blut aus der Schwanzvene entnommen. Dieses konnte dann mittels ELISA auf spezifische Antikörper gegen das MUC1-Glycopeptid **106** und das Carrierprotein (TTox) hin untersucht werden. Hierzu wurden die ELISA-Platten zum einen mit dem entsprechenden BSA-Konjugat **118** und zum anderen mit Tetanus Toxoid beschichtet (je 5 µg/mL). Dabei sollte durch die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit dem entsprechenden BSA- statt dem TTox-Konjugat ein falsches, zu hohes Titer durch die TTox-spezifische Antikörper unterbinden. Wie in Abb. 3.133 zu sehen ist, konnte bei allen drei behandelten Mäusen eine sehr starke Immunantwort festgestellt werden, die für das Durchbrechen der natürlichen Toleranz mehr als ausreichend sein sollte. Dabei lag der Antikörpertiter bei Maus 13 und 15 bei etwas über 1/40.000, während Maus 14 mit einem Titer von etwa 1/32.000 eine etwas schwächere, aber insgesamt immer noch sehr starke Immunantwort zeigte. Somit konnte nachgewiesen werden, dass fluoridierte Glycopeptidkonjugate reproduzierbar dazu in der Lage sind, eine sehr starke toleranzdurchbrechende Immunantwort hervorzurufen.

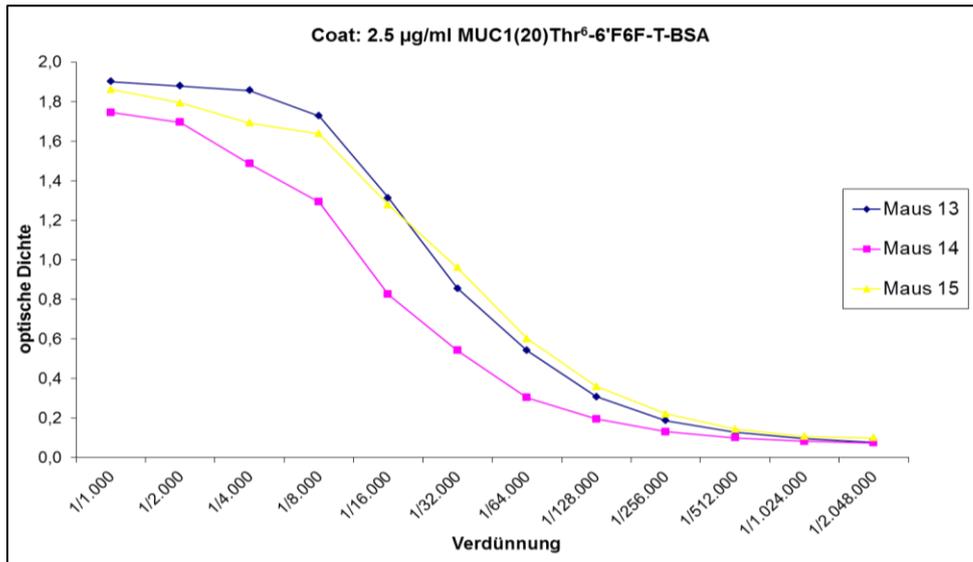


Abb. 3.133: ELISA zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen das fluorierte MUC1 Glycopeptid

Wie zu erwarten war, konnte neben der MUC1-spezifischen Immunantwort auch eine starke gegen das Carrierprotein TTox gerichtete, Antikörperantwort beobachtet werden. Auch hier liegen die Titer für Maus 14 etwas niedriger als die der beiden anderen Mäuse. Insgesamt liegen die Antikörpertiter gegen Tetanus Toxoid mit ca. 1/100.000 allerdings eine Verdünnungsstufe höher als die Titer der Glycopeptid-spezifischen Antikörper.

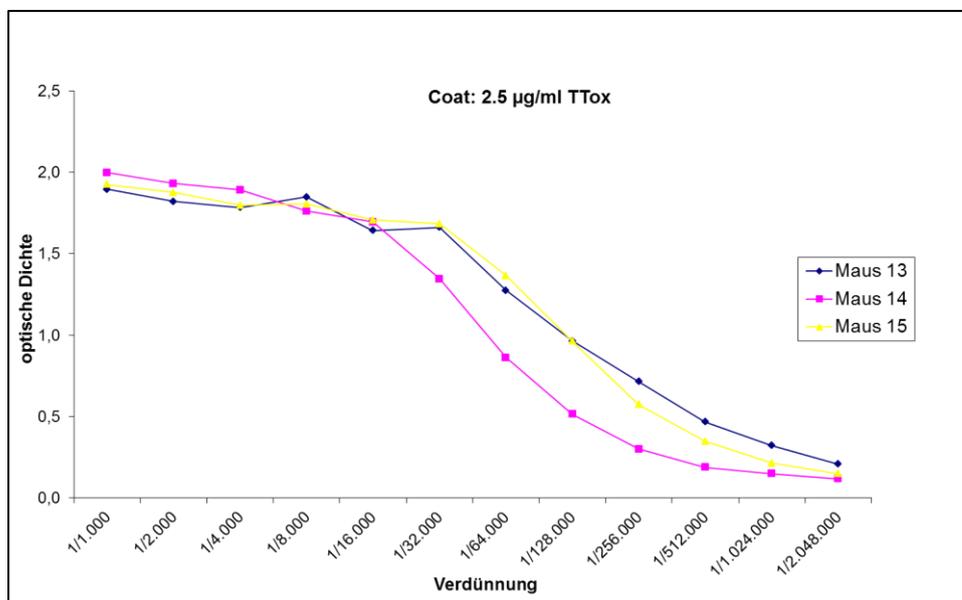


Abb. 3.134: ELISA zum Nachweis von TTox spezifischen Antikörpern

Nachdem spezifische, gegen das zur Immunisierung verwendete Vakzin gerichtete Antikörper nachgewiesen werden konnten, sollte die Spezifität der gebildeten Serum-Antikörper in weiteren ELISA-Experimenten näher untersucht werden. Dafür wurde beispielhaft das Serum der Maus 15 mit verschiedenen glycosylierten BSA-Coats inkubiert und im ELISA analysiert.

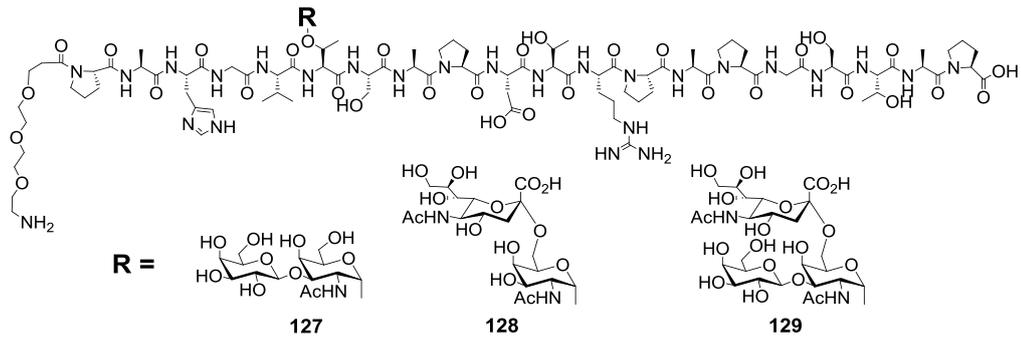


Abb. 3.135: Substanzen für Selektivitätsstudien³

Neben den in Abb. 3.135 gezeigten glycosylierten MUC1-Glycopeptiden wurde auch die unglycosylierte *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 eingesetzt

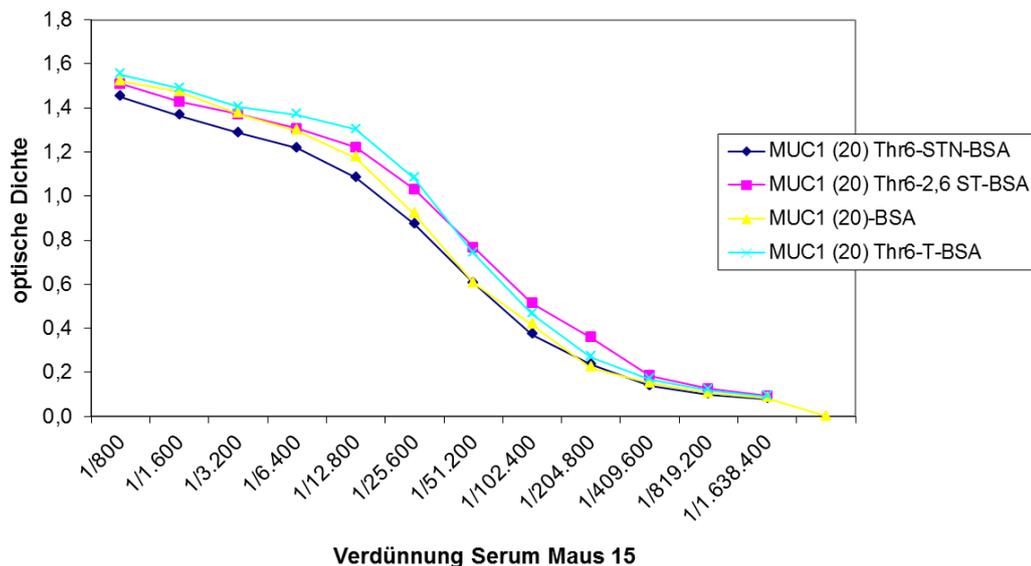


Abb. 3.136: ELISA zur Bindungsselektivität der induzierten Antikörper

Wie in Abb. 3.136 zu sehen ist, besitzen die Antikörper ein recht breites Erkennungsspektrum und binden sowohl verschiedene Glycosylierungsmuster, als auch die unglycosylierte *tandem repeat*-Sequenz des MUC1. Dabei werden alle natürlichen (nicht fluorierten) Antigene ungefähr gleich gut von den Antikörpern erkannt, was im Hinblick auf einen potentiellen Einsatz dieser Vakzine und der Mikroheterogenität der Tumoroberfläche, durchaus als positiv anzusehen ist.

Da für einen möglichst großen Therapieerfolg vor allem eine spezifische und T_H-Zell-vermittelte Immunreaktion erforderlich ist, sollten auch die Isotypen der gebildeten Antikörper bestimmt werden. Dies erfolgte über ein ELISA-Experiment bei welchem Isotyp-selektive Sekundärantikörper eingesetzt wurden.

³ Zur Verfügung gestellt von A. Kaiser und U. Westerlind

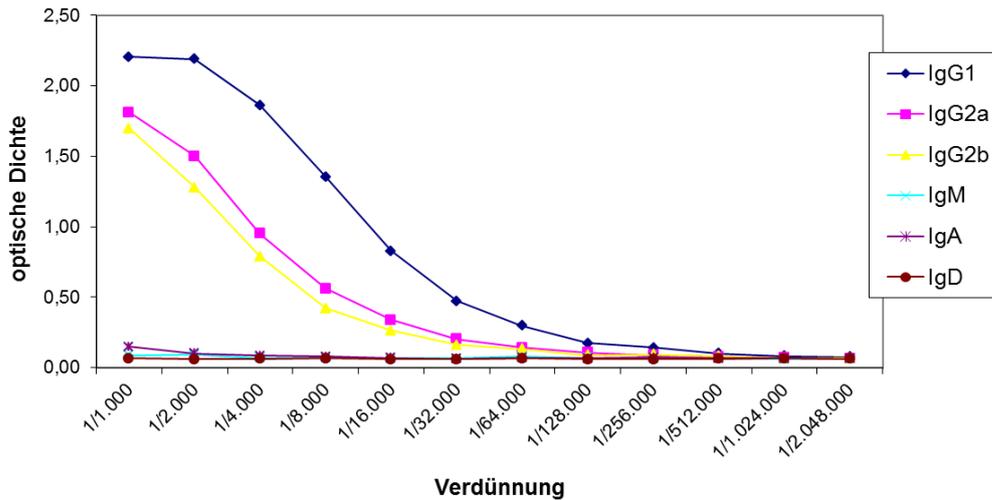


Abb. 3.137: Isotypbestimmung der im Serum von Maus 15 enthaltenen MUC1 spezifischen Antikörper, Coat: 5µg/mL des BSA-Konjugates **118**

Das Ergebnis zeigt, dass überwiegend Antikörper des Isotypes IgG₁, jedoch nahezu keine IgM-Antikörper induziert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Immunantwort selektiv und im gewünschten MHC II-restringierten Sinne abgelaufen ist. Zudem zeigt dieser Isotyp die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses an. Neben den IgG₁-Antikörpern wurde zudem ein merkliches Ausmaß an IgG_{2a,b}-Antikörpern induziert. Da die Isotypverteilung bei den Antiseren der drei Mäuse gleich ausfiel, ist hier nur ein solches Experiment exemplarisch dargestellt. (Abb. 3.137)

Nachdem im Mausmodell nachgewiesen werden konnte, dass fluorierte Glycopeptid-Vakzine in der Lage sind, eine starke MHC II-restringierte Immunantwort auszulösen, und dass die so induzierten Antikörper neben der fluorierten Struktur auch eine Reihe von natürlichen tumorassoziierten Antigenen erkennen, blieb nun noch der Nachweis zu erbringen, dass die induzierten Antikörper auch an die natürlichen, auf Brustkrebszelllinien vorkommenden Glycoprotein-Strukturen binden können. Dies konnte mit Hilfe einer weiteren immunologischen Analysemethode, der FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorter)⁴ bewerkstelligt werden. Mit Hilfe dieser Methode können einzelne Zellen gezählt und nach bestimmten (Fluoreszenz-) Eigenschaften sortiert werden. Die Analyse beruht dabei auf einem Strom einzelner Zellen, der durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet wird. Die dabei passierenden Einzelzellen erzeugen für sich ein charakteristisches Streu- und Fluoreszenzlicht, das jeweils getrennt detektiert werden kann. So kann man z.B. durch die Art des Streulichtes Rückschlüsse auf die Größe, Granulierung und Dichte der Zellen schließen.

⁴ alle FACS-Analysen wurden von B. Gerlitzki am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg Universität durchgeführt

Sind die Zellen mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen markiert, können diese durch den Laser angeregt werden und das dabei emittierte Licht erlaubt eine Unterscheidung bzw. Identifizierung der Zellen.

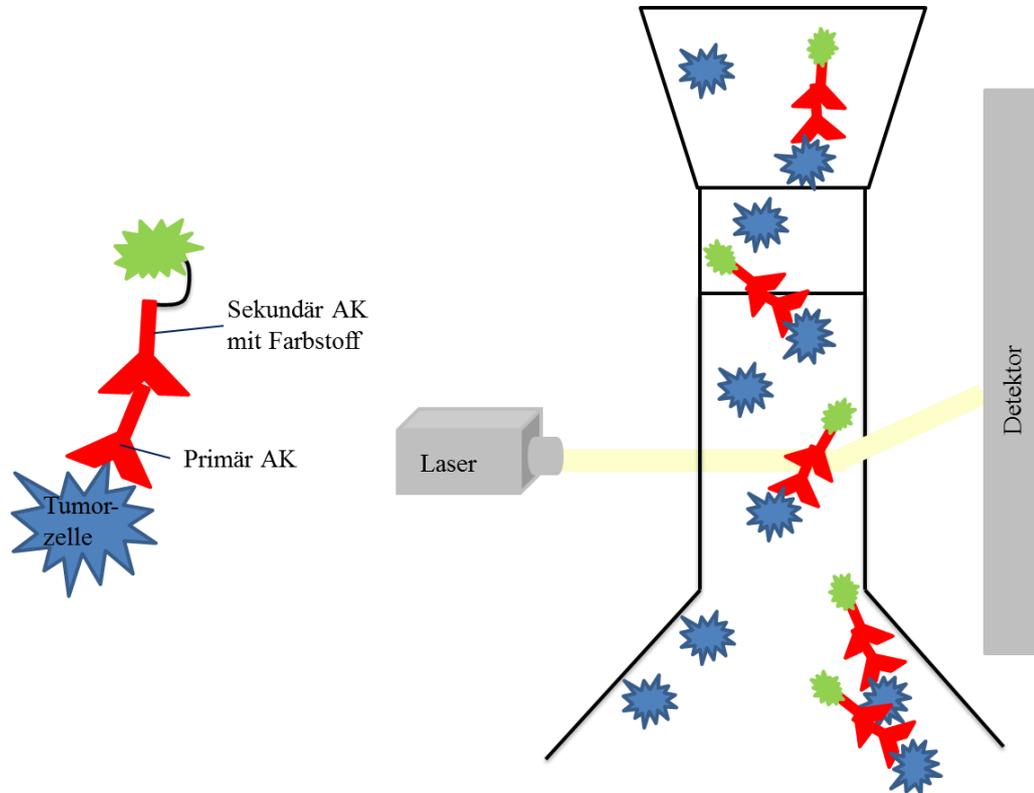


Abb. 3.138: schematische Darstellung der FACS-Analyse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung der induzierten Antikörper an die Zellen der epithelialen Tumorzelllinie MCF-7 untersucht werden. Dafür wurden zunächst die Tumorzelllinien mit den durch Immunisierung erhaltenen Antiseren (Primärantikörper) inkubiert. Nach Waschen wurden die gebundenen Antikörper durch Zugabe eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers aus der Ziege (Ziege-anti Maus-IgG-Antikörper markiert mit AlexaFluor 488) markiert und konnten so im FACS-Gerät ausgezählt werden.

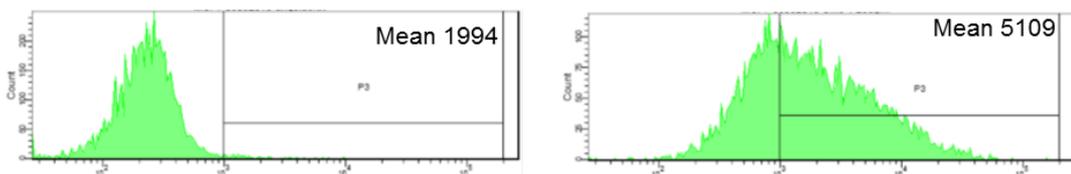


Abb. 3.139: FACS Analyse der Bindung an MCF-7-Zellen Links: ungefärbt, rechts: SM3 als Primärantikörper

In Abb. 3.139 ist exemplarisch die Zählweise des FACS-Gerätes gezeigt. Man kann gut erkennen, dass im Falle der unbehandelten Zellen (links) keine Fluoreszenzmarkierung registriert werden kann, weshalb die Zellen im linken Bereich des Diagrammes, d.h. bei

geringer Fluoreszenzintensität detektiert werden. Die mit dem kommerziell erhältlichen SM3-Antikörper^[32, 49, 240] behandelten Zellen zeigen dagegen eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz und erscheinen im rechten Bereich des Diagrammes (Positivkontrolle). Im Folgenden werden alle Zellen die sich in dem rechten Abschnitt des Diagrammes befinden als positiv betrachtet. Zusätzlich wurden in der Arbeitsgruppe *Kunz* zwei weitere Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen MCF-7-Zellen mit Seren von Mäusen inkubiert wurden die mit dem Tetanus Toxoid bzw. mit einer PBS-Lösung immunisiert wurden. In beiden Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass lediglich ein minimaler Unterschied im Vergleich zu nicht markierten MCF-7-Zellen zu erkennen war. Hierdurch lässt sich eine Bindung von TTox-spezifischen bzw. der natürlichen im Mausserum vorkommenden Antikörpern an die Tumorzellen ausschließen.^[241]

In Abb. 3.140 sind die FACS-Ergebnisse der aus den drei immunisierten Mäusen erhaltenen Seren abgebildet. Diese wurden in drei verschiedenen Verdünnungen (1/1000, 1/2000, 1/4000) mit den Tumorzelllinien inkubiert, gefärbt und anschließend ausgezählt. Obwohl alle drei Mäuse im ELISA-Experiment einen in etwa gleich großen Antikörpertiter und darüber hinaus dieselben Isotypen aufwiesen, wurden hier unterschiedliche Ergebnisse erhalten. So konnte für das Serum der Maus 13 keine Bindung an Tumorzellen festgestellt werden. Die Seren der Mäuse 14 und 15 hingegen wiesen beide eine sehr hohe Tumorspezifität auf.

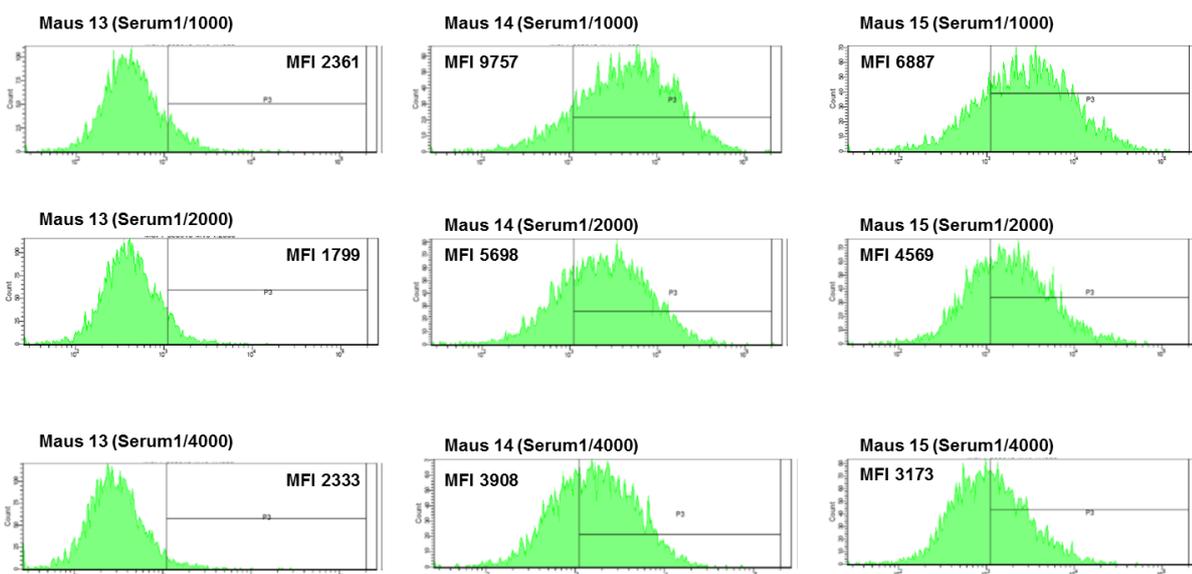


Abb. 3.140: FACS Analyse der Bindung an MCF-7 Zellen der Seren von Maus 13-15 in verschiedenen Verdünnungen

Um die Tumorspezifität der Seren beider positiv reagierender Mäuse besser miteinander vergleichen zu können, wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Seren angesetzt und per

FACS auf die Bindungsfähigkeit an Tumorzellen untersucht. In Abb. 3.141 ist der prozentuale Anteil der Antikörper-gebundenen Zellen bei der entsprechenden Verdünnungsstufe abgebildet. Daraus geht eindeutig hervor, dass in Maus 14 die stärkere tumorspezifische Immunreaktion hervorgerufen wurde: So zeigen bei einer Verdünnung von 1/16.000 noch mehr als 60% der MCF-7-Zellen eine erhöhte Fluoreszenz, also die Erkennung durch die Antikörper. Die Antikörper im Serum der Maus 15 binden dagegen bei derselben Verdünnungsstufe nur noch zu ca. 35 % an die Tumorzellen.

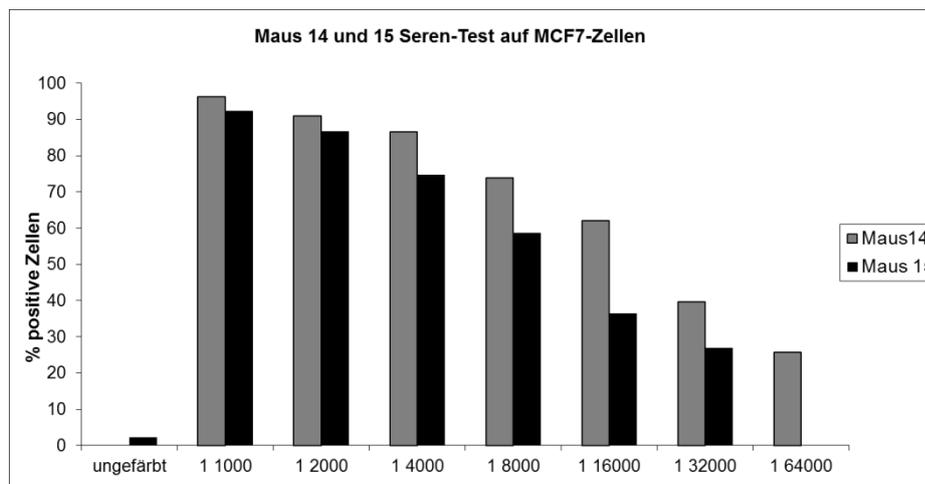


Abb. 3.141: FACS-Analyse der Bindung des Antiserums von Maus 14 und 15 an MCF-7-Zellen bei verschiedenen Verdünnungen

Verglichen mit den ELISA-Studien ist diese Tatsache etwas verwunderlich, da Maus 14 im ELISA-Test einen etwas geringeren Titer als die andern beiden Mäuse aufwies.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den an die Tumorzellen bindenden Antikörpern auch wirklich um MUC1-spezifische Antikörper handelt, wurde ein Neutralisationsexperiment durchgeführt, hier exemplarisch für Maus 14 gezeigt. Dabei wurden die MCF-7-Zellen zum einen allein mit dem Serum von Maus 14 inkubiert (Abb. 3.142 a) und zum anderen mit einem Serum welches mit dem der Vakzine entsprechenden MUC(20)Thr⁶-6,6'Bis-FT-Glycopeptid **106** (b und c) und dem natürlichen MUC(20)Thr⁶ T-Glycopeptid **127** (d und e) neutralisiert wurde. Im Falle des nicht behandelten Serums sieht man wie zu erwarten eine starke Bindung der Antikörper an die Zellen der Brustkrebszelllinie (a). Wurde jedoch das Serum zunächst mit einem der beiden Glycopeptide versetzt, so wurden die vorhandenen Antikörper von dem Glycopeptid gebunden, und es war keine Bindung an die MCF-7-Zellen mehr möglich.

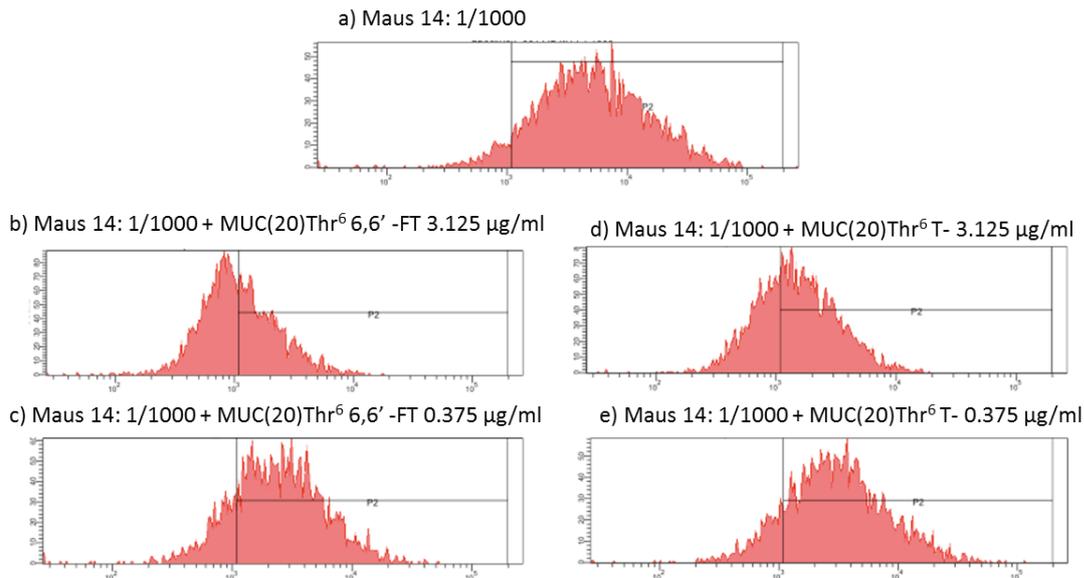


Abb. 3.142: FACS-Analyse der Bindung des Antiserums von Maus 14 an MCF-7-Zellen und Neutralisation des Serums mit dem fluoridierten und dem natürlichen T-Antigen. Verdünnung jeweils 1/1000

Wie in Abb. 3.142 b) und d) zu erkennen ist, reichen bereits einige Mikrogramm des Glycopeptides, um die Bindung an die Tumorzellen weitestgehend zu unterbinden. Dabei ist die Neutralisationswirkung der fluoridierten Verbindung **106** dem des natürlichen T-Antigen-Glycopeptides **127** vergleichbar. Verringert man die Konzentration des Glycopeptides weiter, können jedoch nicht mehr alle Antikörper neutralisiert werden, und man beobachtet wieder einen Anstieg der Fluoreszenz und damit eine stärkere Erkennung der MCF-7-Zellen. (Abb. 3.142 c und e). Diese Experimente beweisen, dass durch ein fluoridiertes Vakzin eine Bildung von MUC1-spezifischen Antikörpern induziert werden kann, die in der Lage sind tumorspezifische Oberflächenglycopeptide auf MCF-7-Zellen zu erkennen und zu binden.

Neben den hier aufgeführten Neutralisationsexperimenten sollten nun anhand weiterer Experimente die Selektivität bzw. die Erkennungsbreite der MUC1-Antikörper untersucht werden. Dafür wurden die Seren mit einer Auswahl an verschiedenen glycosylierten und unglycosylierten MUC1-Glycopeptiden sowie mit (Glyco)Peptiden aus der MUC4-*tandem-repeat*-Sequenz⁵ inkubiert.

⁵ Die Neutralisationssubstanzen wurden von N. Gaidzik und C. Brocke zur Verfügung gestellt.

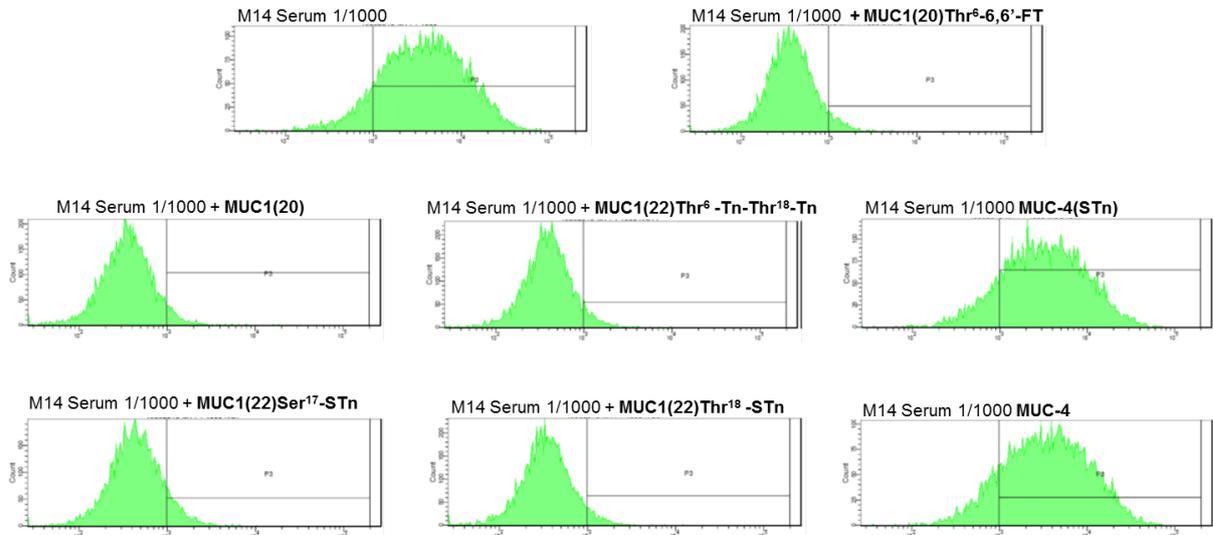


Abb. 3.143: Neutralisationsanalyse zur Bindungsspezifität der induzierten Antikörper via FACS-Experimente

Wie in Abb. 3.143 deutlich zu erkennen ist, ließ sich die Bindung der durch die synthetische Vakzine **123** induzierten Antikörper an die MCF-7-Tumorzellen durch alle MUC1-Glycopeptide wieder aufheben; selbst die unglycosylierte *tandem repeat*-Sequenz führte zu einer vollständigen Neutralisation. Auch scheint eine Verlängerung der Peptidsequenz um zwei weitere Aminosäuren keinen Einfluss auf die Antigenerkennung auszuüben. Zusätzliche Glycosylierungsstellen bzw. eine Verschiebung der Glycosylierungsposition vom Threonin zum Serin wurden ebenfalls toleriert. Dagegen konnten jedoch sowohl das unglycosylierte als auch das mit einer ST_N-Einheit glycosylierte Peptid aus der MUC4-Sequenz keine Neutralisation der Antikörper bewirken. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Bindungsepitope der Antikörper weniger mit den Kohlenhydratseitenketten korrelieren, sondern vermutlich hauptsächlich auf dem Peptidrückgrat zu finden sind. In wieweit das Kohlenhydratgerüst jedoch eine wichtige Rolle für die Induktion der Antikörper spielt, muss noch untersucht werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit einem zweifach fluoridierten T-Thr⁶-MUC1-TTox-Konjugat **123** eine sehr starke toleranzbrechende Immunantwort induziert werden konnte, die zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses geführt hat (Bildung von IgG₁ IgG_{2a,b} Antikörpern). Zusätzlich konnte in ersten Zelltests die Bindung der MUC1-spezifischen Antikörper an Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 belegt werden. Besonders interessant wird diese aus einem synthetischen fluoridierten MUC1-Glycopeptid und Tetanus-Toxoid bestehende Vakzine dadurch, dass auch der Einsatz beim Menschen möglich ist.

Evaluierung der Immunantwort gegen einfach fluoridierte Analoga des T-Thr⁶-MUC1-TT_{ox}-Konjugat

Da in der oben erläuterten Impfstudie belegt werden konnte, dass die Substitution einer Kohlenhydrat-Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom ohne Verlust der immunologischen Wirkung einhergeht wurden weitere Impfstudien mit ähnlichen fluoridierten MUC1-Vakzinen durchgeführt. Dafür wurden Glycopeptide ausgewählt, die einfach fluoridierte T-Antigen-Strukturen enthielten, da sich diese in Stabilitätsstudien gegen den enzymatischen Abbau durch eine β -Galactosidase als besonders stabil erwiesen haben.^[83]

Neben dem in dieser Arbeit synthetisierten 6'F-T-MUC1-TT_{ox}-Vakzin **124** (A) wurden auch ein von M. Johannes synthetisiertes 4'F-T-Vakzin^[83] (B) und ein von C. Mersch dargestelltes 2'F-T-Vakzin^[242] (C) auf ihre immunologischen Eigenschaften hin untersucht. (Abb. 3.144)

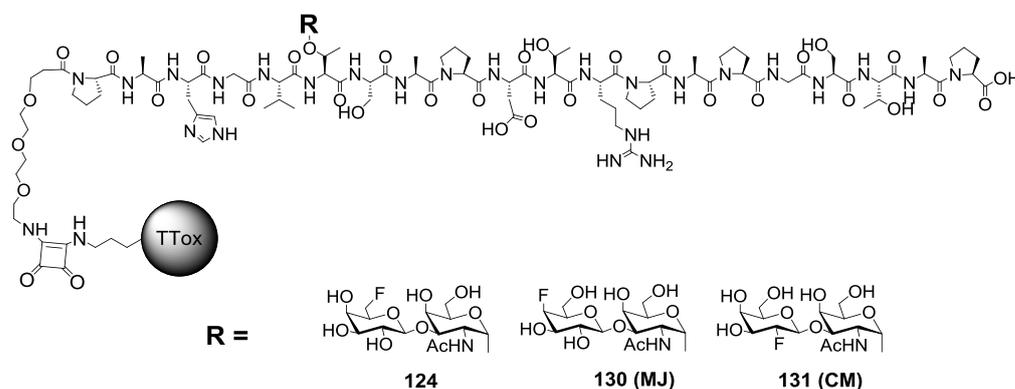


Abb. 3.144: fluoridierte Glycopeptid-Vakzine für die immunologische Evaluierung

Wie in dem vorherigen Versuch beschrieben, wurden jeweils drei Balb/c Mäuse mit dem jeweiligen Vakzin und komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) subcutan geimpft. Anschließend erfolgte alle 21 Tage eine intraperitoneale Auffrischungsimpfung in Gegenwart des inkompletten Freund'schen Adjuvans (IFA). Nach der 3. Immunisierung wurde allen Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen und die erhaltenen Seren wurden hinsichtlich der Induktion von MUC1- bzw. TT_{ox}-spezifischen Antikörper untersucht. Dafür wurden Mikrotiter-Platten mit dem zum jeweiligen Vakzin entsprechenden BSA-Konjugat beschichtet und ELISA-Experimente mit den Seren durchgeführt. Erfreulicherweise wiesen alle drei Mäuse der Gruppe A, mit dem Vakzin **124** immunisiert wurde, eine starke toleranzbrechende Immunantwort auf. Dabei konnten Titer von ca. 1/32.000 für Maus A2 sowie 1/64.000 für Maus A3 festgestellt werden.

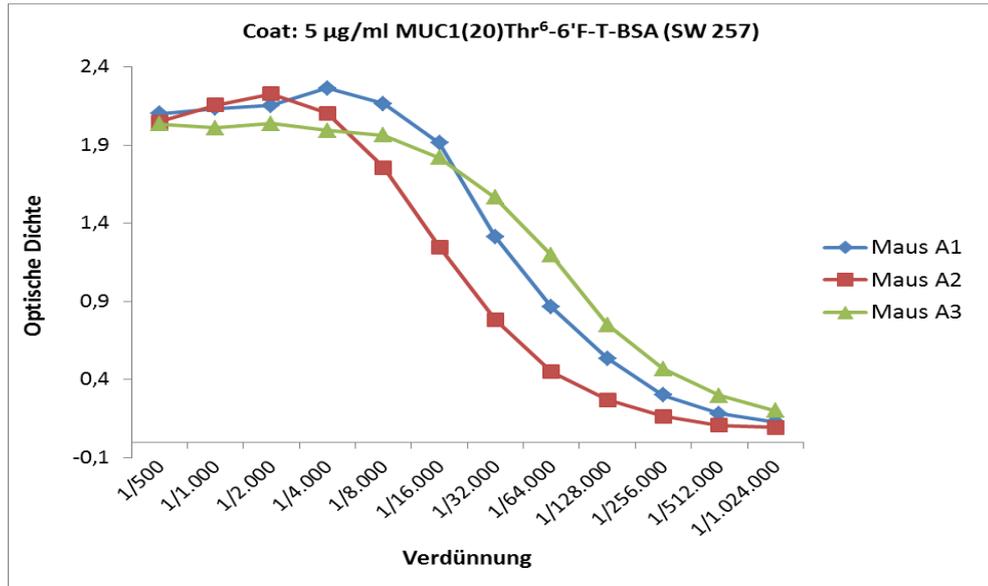


Abb. 3.145: ELISA zum Nachweis der MUC1 spezifischen Antikörper im Serum der Gruppe A immunisiert mit **124**

Ein ähnliches Bild bot sich für Gruppe B, in welcher die Mäuse mit einem in 4²-Position fluoridierten T-Antigen-Vakzin **130** immunisiert wurden. Auch hier wurde in allen drei Mäusen eine starke humorale Immunantwort induziert. Die Titer liegen dabei mit etwa 1/30.000 bis 1/50.000 in einem ähnlichen Bereich wie bei Gruppe A.

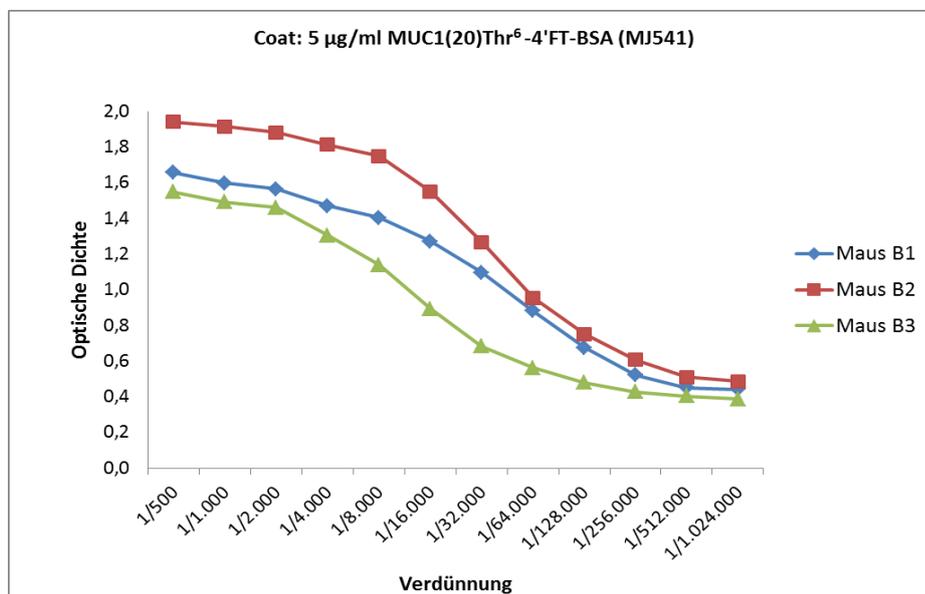


Abb. 3.146: ELISA zum Nachweis der MUC1 spezifischen Antikörper im Serum der Gruppe B immunisiert mit **130**

Die Seren, der mit dem in 2¹-Position fluoridierten Vakzin **131** immunisierten Mäuse, boten jedoch ein etwas anders Bild. Hier konnte zwar in allen drei Mäusen eine Bildung von Antikörpern beobachtet werden, allerdings wies das Serum von Maus C1 einen sehr geringen Titer von lediglich 1/3.000 auf. In Maus C2 und 3 hingegen konnte eine starke Immunantwort

mit der Bildung von MUC1 spezifischen Antikörpern und einem Titer von ca. 1/32.000 erhalten werden.

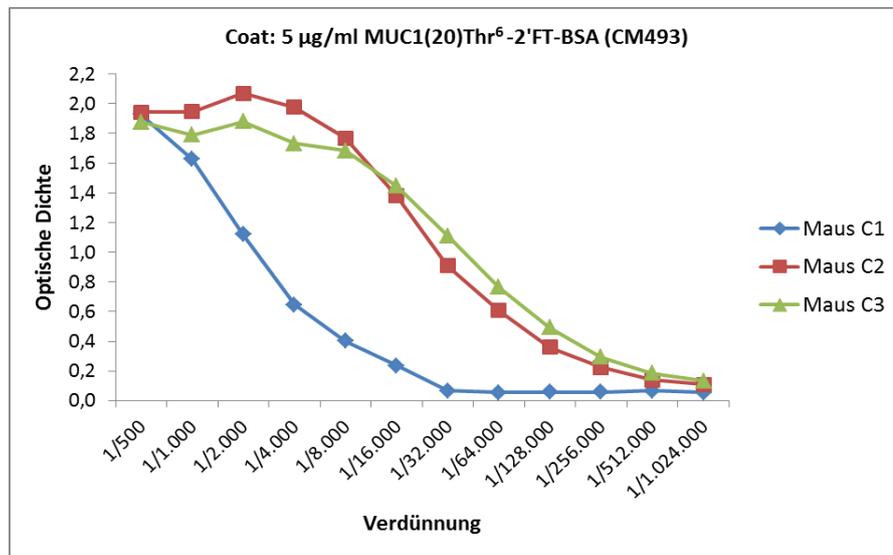


Abb. 3.147: ELISA zum Nachweis der MUC1 spezifischen Antikörper im Serum der Gruppe C, immunisiert mit
131

Wie zu erwarten war, konnten in allen Seren der drei Gruppen (hier exemplarisch für Gruppe B gezeigt) wieder eine starke Immunreaktion gegen das Carrierprotein Tetanus Toxoid beobachtet werden (Abb. 3.148). Die dabei ermittelten Titer lagen höher als die der MUC1-spezifischen Antikörper, nämlich bei ca. 1/80.000.

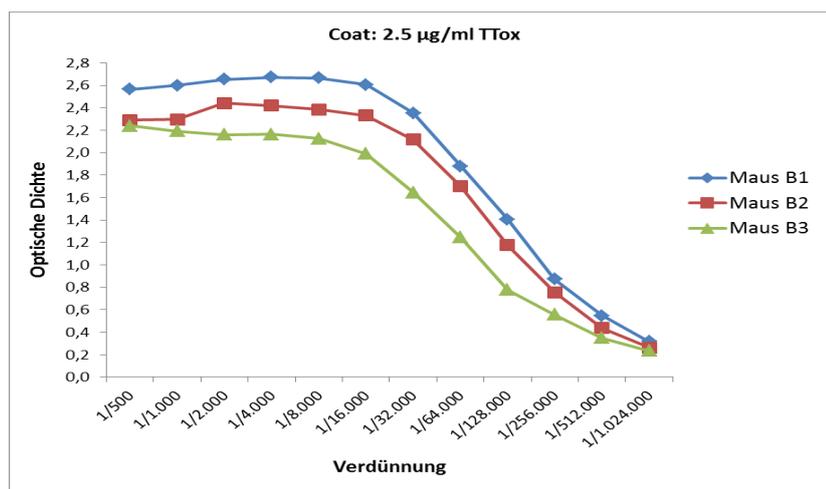


Abb. 3.148: ELISA zum Nachweis der TTTox spezifischen Antikörper im Serum der Gruppe B, immunisiert mit
130

Die Bestimmung der Antikörper-Isotypen erfolgte, wie bereits zuvor, über ein ELISA-Experiment. Und wird hier exemplarisch für jeweils eine Maus der drei Gruppen vorgestellt.

Der Serentest der Maus A2 (6[']F-T) zeigt, dass die Immunreaktion auch in diesem Fall hauptsächlich über eine T_H-Zell vermittelte IgG₁-Antikörperproduktion erfolgt war.

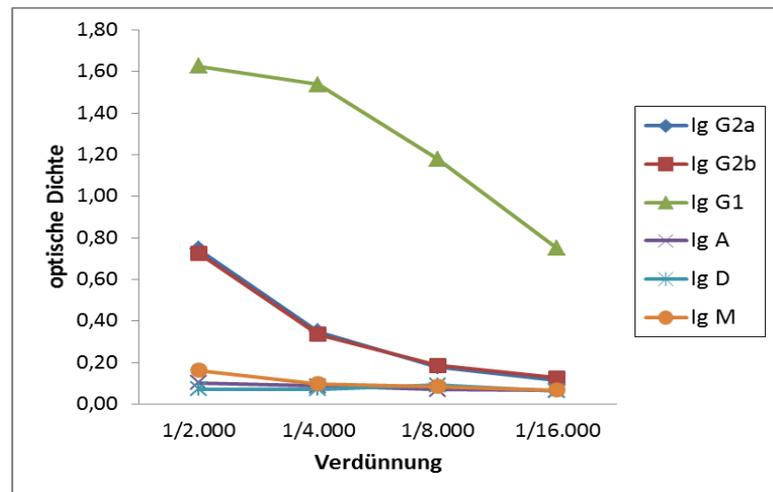


Abb. 3.149: Isotypbestimmung des Serums von Maus A2

Die Immunantwort ist somit selektiv und zeigt die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses an. Neben den überwiegenden IgG₁-Isotyp konnte auch ein geringer Anteil an IgG_{2a,b}-Antikörpern nachgewiesen werden, deren Anteil allerdings in den übrigen Seren der Mäuse dieser Gruppe erheblich schwankte.

Auch in der Gruppe B wurden hauptsächlich Antikörper des Isotyps IgG₁ gebildet. Das Auftreten der Isotypen IgG_{2a,b} konnte für die Mäuse B1 und B3 nicht bestätigt werden.

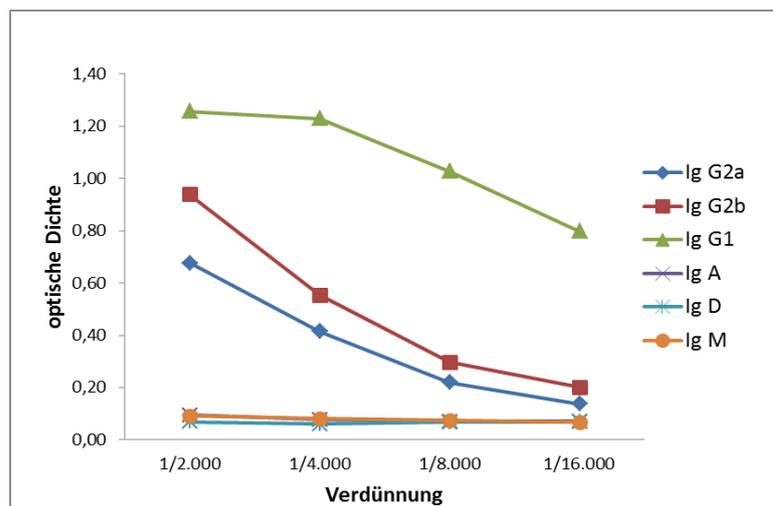


Abb. 3.150: Isotypbestimmung des Serums von Maus B2

Ebenfalls konnte in der Gruppe C IgG₁ als der überwiegende Isotyp-Antikörper gefunden werden. Erstaunlicherweise wurden die Isotypen IgG_{2a,b} lediglich in geringem Maße bei Maus C1 nachgewiesen, die im ELISA den geringsten Antikörpertiter von ca. 1/3.000 aufwies.

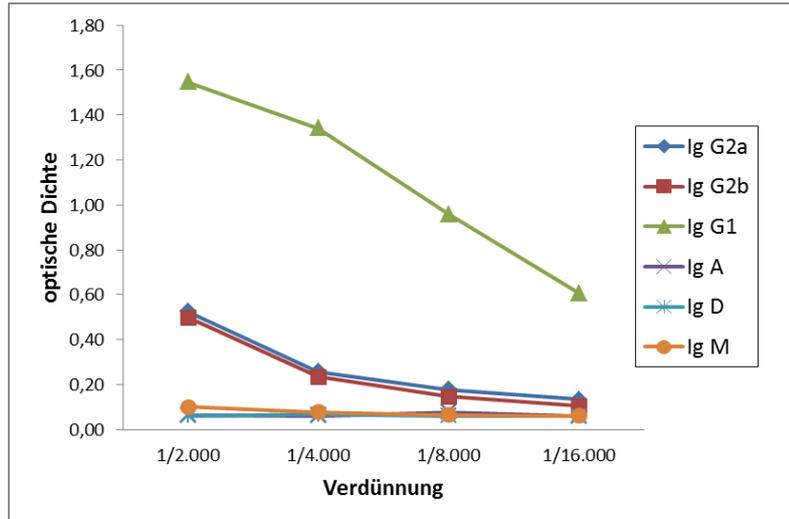


Abb. 3.151: Isotypbestimmung des Serums von Maus C1

Wie zuvor sollten auch diese Antiseren FACS-Analysen unterworfen werden, um die Bindungsfähigkeit der Antikörper an MCF-7-Brustkrebszellen zu bestimmen.

Wie in Abb. 3.152 zu sehen ist, banden in allen drei Fällen die Antikörper spezifisch an die Tumorzellen.

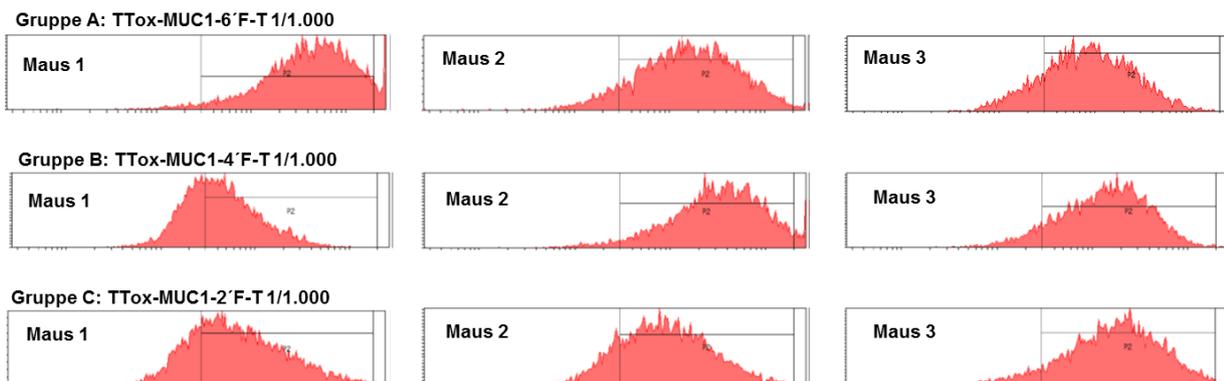


Abb. 3.152: FACS-Analyse der Bindung der induzierten Antikörper an MCF-7-Zellen

Bei Gruppe A konnte bei einer Verdünnung von 1/100 bei jeder der drei Mäuse, eine starke Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Insbesondere bei Maus A1 scheinen alle Tumorzellen von dem MUC1-spezifischen Antikörpern erkannt und gebunden zu werden. Auch in Gruppe B konnten für Maus 2 und 3, unabhängig vom gebildeten Isotyp, hohe Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden. Lediglich Maus B1 weist eine vergleichsweise schwache Bindung an die MCF-7-Zellen auf. Überraschenderweise konnte sogar für Maus C1, die einen sehr geringen Titer von 1/6.000 im ELISA erbrachte, eine Bindung an die Tumorzellen festgestellt werden. Diese fiel zwar schwächer aus als die für Maus C3, war aber dennoch deutlich zu erkennen.

Da Maus A1 neben einem hohen Titer auch die stärkste Bindung an MCF-7 Zellen aufwies, sollte das Serum dieser Maus in Neutralisationsstudien genauer untersucht werden. Zum Nachweis der Antikörperspezifität wurden die Tumorzellen zum einen mit dem Serum von Maus A1 (Kontrolle) und zum andern mit dem Serum, das zuvor mit verschiedenen Glycopeptiden neutralisiert wurde, inkubiert. Wie zu erwarten war, konnte die Bindung der Antikörper (1/1.000) an die Zellen durch Zugabe des fluoridierten **108** und des natürlichen T-Antigen **127** tragenden Glycopeptides vollständig unterdrückt werden. Keinen Einfluss hatte hingegen die Zugabe eines aus der MUC4-Sequenz bestehenden Peptides.

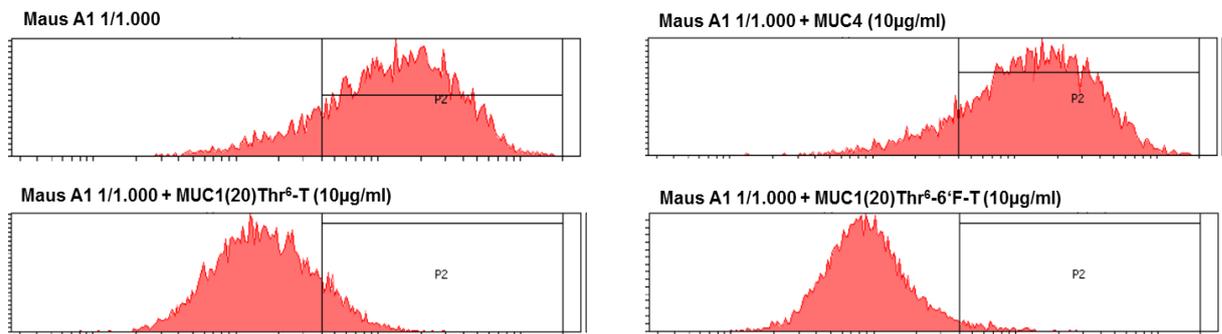


Abb. 3.153: Neutralisationsanalyse zur Bindungsspezifität der induzierten Antikörper via FACS-Experiment

Versuch zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

Die durch Immunisierung mit den synthetischen Vakzinen gewonnenen Seren sind immer polyklonal, d.h. sie bestehen aus einer Mischung von verschiedenen Antikörpern, die alle ein etwas anderes Bindungsepitop besitzen. Zu Therapie Zwecken bzw. weiteren Studien wäre es jedoch wünschenswert einen monoklonalen MUC1-spezifischen Antikörpern zu erhalten.

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern wurden die Antikörper-produzierenden Zellen aus der Milz und den Lymphknoten der Maus A1 entnommen und zur Fusion mit der Myelomzelllinie SP2/0-Ag14 nach Berlin zu der Firma *BioGenes* geschickt. Anschließend wurden die immortalisierten Hybridome im ELISA auf ihre Fähigkeit, MUC1-spezifische Antikörper zu binden, untersucht. Dabei wurde jedoch lediglich eine Hybridomkultur (KS 24) gefunden, die im ELISA das dem Vakzin entsprechenden BSA-Konjugat **120** erkannte.

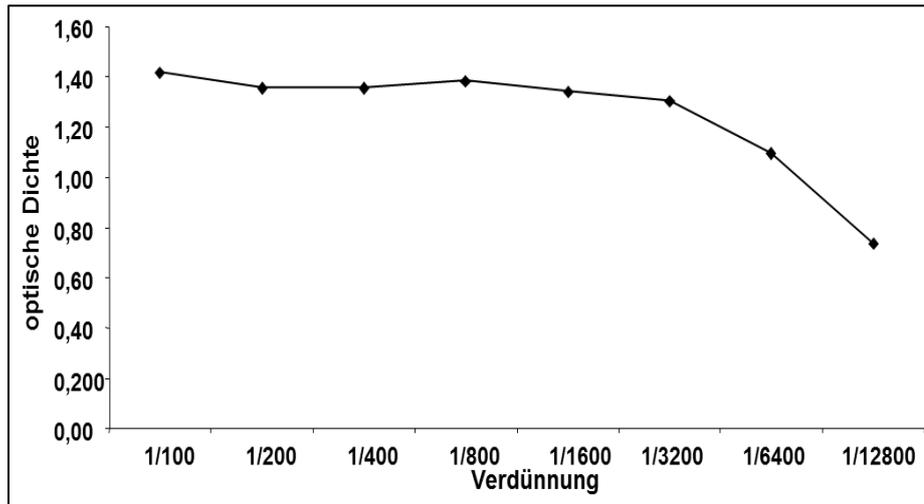


Abb. 3.154: Detektion der MUC1 spezifischen Antikörper im Kulturüberstand des Hybridoms 24

Um nachzuweisen, dass die im Kulturüberstand des Hybridoms befindlichen Antikörper nicht nur MUC1-spezifisch sind, sondern auch Tumorzellen erkennen, wurde erneut eine FACS-Analyse durchgeführt. Dafür wurden MCF-7-Zellen mit dem polyklonalen Serum der Maus A1 bzw. mit dem Kulturüberstand des Hybridoms 24 inkubiert.

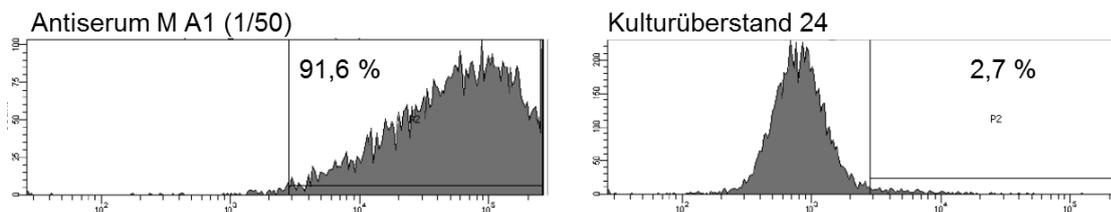


Abb. 3.155: FACS-Analyse der Bindung des Serums und des Kulturüberstandes an MCF-7-Zellen

Leider ließ jedoch der Kulturüberstand des einzigen positiv getesteten Hybridoms keine Bindung an die Brustkrebszellen erkennen, so dass keine weiteren Arbeiten zur Klonierung dieses Antikörpers durchgeführt wurden.

Vergleich der Antikörpererkennung von verschiedenen fluoridierten MUC1-Glycopeptiden

In den folgenden Neutralisationsexperimenten wurde die Erkennung unterschiedlich fluoridierter MUC1-Glycopeptidantigene durch Antikörper, die aus Immunisierungsstudien mit natürlichen Glycopeptidvakzinen und solchen, bei denen fluoridierte T-Antigen-Vakzine eingesetzt wurden, untersucht. Dabei kamen als Antigene neben den in dieser Arbeit synthetisierten Glycopeptide auch in Position 2' (zur Verfügung gestellt von C. Mersch) bzw. mehrfach fluoridierte Antigene (zur Verfügung gestellt von C. Mersch und T. Oberbillig) zum Einsatz

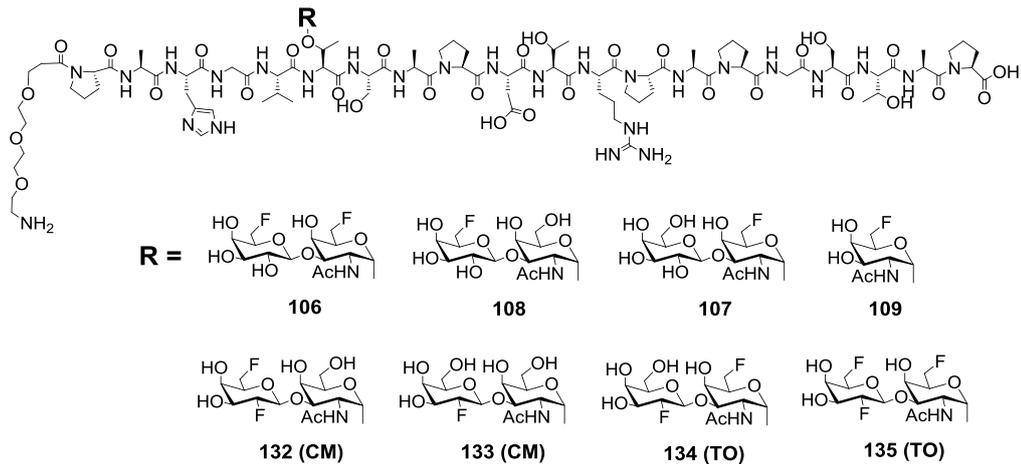


Abb. 3.156: Übersicht über die fluorierten Glycopeptide für die nachfolgenden Neutralisationsexperimente

In dem ersten Neutralisationsexperiment wurde eine Auswahl der verschiedenen fluorierten Antigene mit einem im Arbeitskreis *Kunz* durch Hybridomatechnik erhaltenen monoklonalen Antikörper TFA 40.06, der aus Impfstudien mit einem MUC(20)-Thr⁶-T-TTox Konjugat **126** resultierte, inkubiert.^[239, 241] Das anschließende ELISA-Experiment lieferte folgende Ergebnisse:

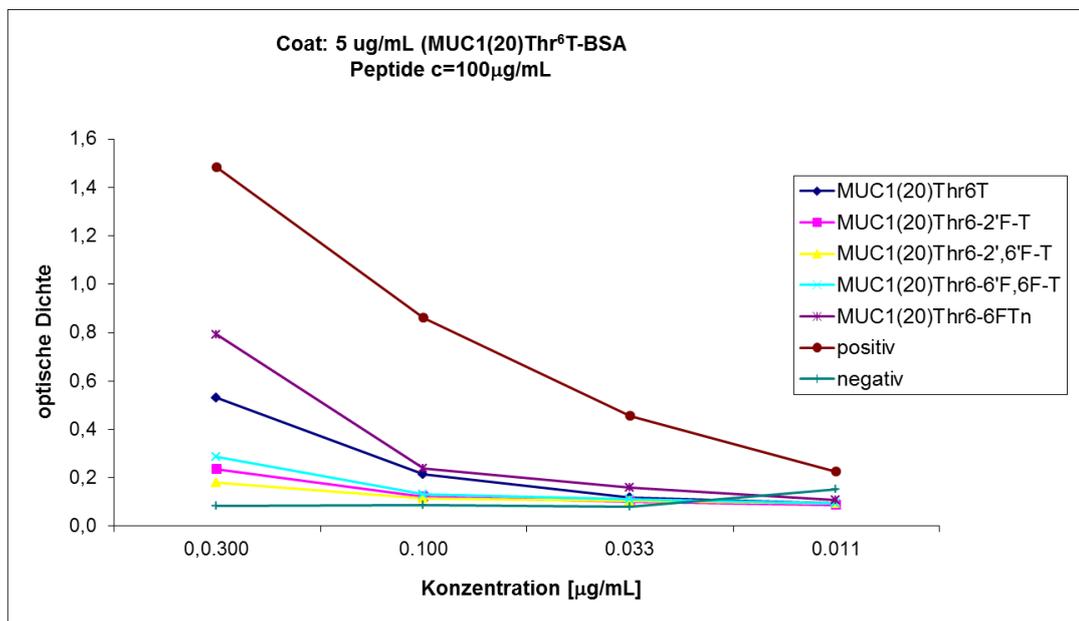


Abb. 3.157: Vergleichendes Neutralisationsexperiment mit dem monoklonalen Antikörper TFA 40.06 mit verschiedenartigen Antigenen.

Wie deutlich zu erkennen ist, neutralisierten alle eingesetzten Antigene, einschließlich des etwas schwächer bindenden 6FT_N-Glycopeptids **109** den zugesetzten Antikörper. Überraschenderweise wurden die beiden 2-fach fluorierten **132** und **106** und das in Position 2'-fluorierte-T-Antigen Glycopeptid **133** noch etwas stärker als das ursprüngliche natürliche Hapten gebunden.

In zwei weiteren Neutralisationsexperimenten, bei denen die Antikörper durch Immunisierung mit dem 6'F-6F-T-MUC1-TTox **123** bzw. 2'F-T-MUC1-TTox **131** induziert wurden, bot sich ein sehr ähnliches Bild.

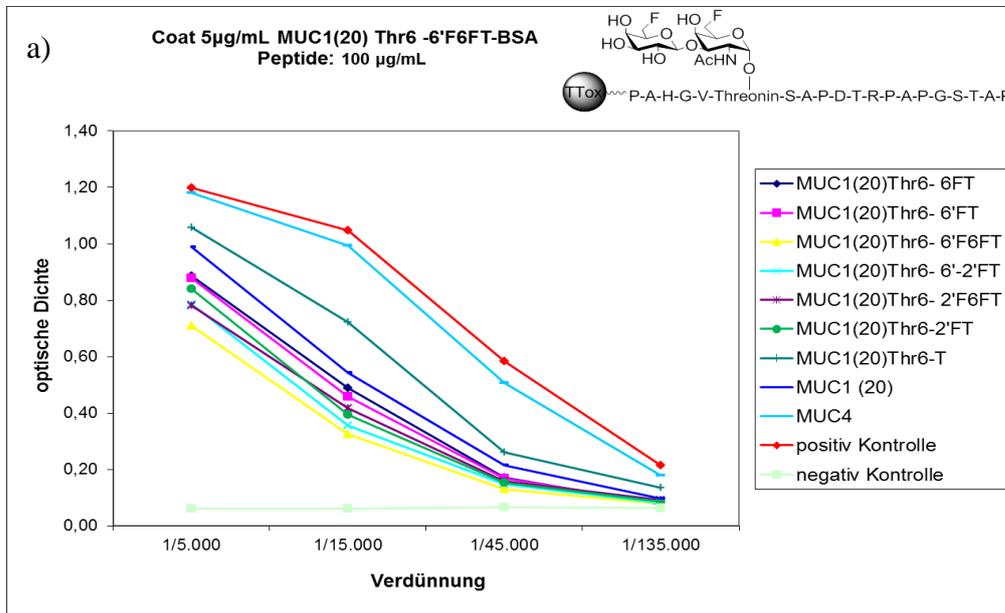


Abb. 3.158: Vergleichendes Neutralisationsexperiment mit dem durch Immunisierung mit 6'F6F-T-MUC1-TTox erhaltene Serum gegen verschiedenartigen Antigenen

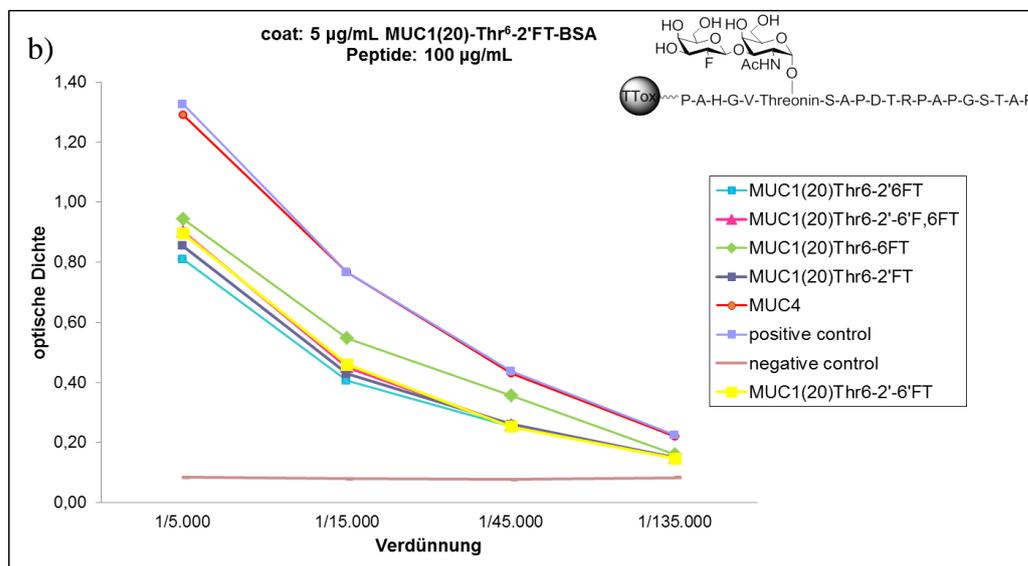


Abb. 3.159: Vergleichendes Neutralisationsexperiment mit dem durch Immunisierung mit 2'F-T-MUC1-TTox erhaltene Serum gegen verschiedenartigen Antigenen

Es wurden alle (Glyco-)Peptide, mit Ausnahme des die MUC4-Sequenz umfassenden Peptids, von den Antiseren erkannt und gebunden. Dabei war das Ausmaß der Bindung weitgehend unabhängig von der Position und der Anzahl der Fluoratome im Molekül, obwohl minimale Unterschiede in der Antigen-spezifität der induzierten Antikörper auftraten. So wurde das in

Position 6 fluorierte T-Antigen-Glycopeptid **107** in beiden Fällen etwas schwächer als die übrigen fluorierten Analoga gebunden. Zudem zeigt Graph a (Abb. 3.158), dass die natürliche T-Antigenstruktur **127** ebenfalls eine geringfügig schwächere Affinität zu Antikörpern aus der Impfung mit der fluorierten Vakzine **123** zeigt. Im Gegensatz hierzu weisen die Glycopeptide **106**, **132** und **133** eine besonders starke Bindung zu diesem Antiserum auf. Auch die nicht glycosylierte *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 konnte eine Neutralisation der Antikörper hervorrufen, wenngleich diese schwächer als die der MUC1-Glycopeptide ausfiel.

Diese Ergebnisse weisen ebenfalls auf eine geringere Bedeutung des Kohlenhydrats als zentrales Bindungsepitop der Antikörper hin, das wohl vielmehr im Peptidrückgrat zu suchen ist. Dennoch lassen sich mit der Änderung des Glycosylierungsmusters der T-Antigen-tragenden Struktur auch kleinere Affinitätsänderungen beobachten.

4 Zusammenfassung

Die mit dem Krankheitsbild Krebs einhergehende Änderung des Glycosylierungsmusters auf Zelloberflächen stellt einen wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung von neuen effektiven Behandlungsmethoden, wie der aktiven Immuntherapie dar. Diese beruht auf einer gezielten Aktivierung des menschlichen Immunsystems unter Verwendung von tumorspezifischen Vakzinen. Dabei soll eine Immunantwort gegen den Tumor selbst bzw. die im Körper zirkulierenden Metastasen induziert werden, ohne dass dabei gesundes Gewebe geschädigt wird. Die bereits oben erwähnten, auf der fehlerhaften Expression und Aktivität verschiedener Glycosyltransferasen beruhenden Veränderungen der Zelloberflächenstruktur epithelialer Mucine stellen wichtige Erkennungsmerkmale von Tumorzellen dar und bilden damit potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen. So werden auf malignen Zellen hauptsächlich stark verkürzte und hochgradig sialylierte *O*-Glycanstrukturen, wie das T_N, das T-Antigen sowie deren sialylierte Analoga ST- und ST_N-Antigen exprimiert. Diese Kohlenhydratantigene sind nicht nur selbst tumorspezifisch, sondern legen darüber hinaus auf gesunden Zellen verdeckte Epitope des MUC1-Peptidrückgrats frei. Da jedoch ein Vakzin aus der *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 und den entsprechenden Kohlenhydratantigenen allein keine ausreichende Immunogenität besitzt, muss zusätzlich ein geeignetes Carrierprotein angebunden werden. Dafür hat sich in letzter Zeit besonders das hochgradig immunogene Tetanus Toxoid bewährt.

Glycopeptidkonjugate unterliegen im Körper jedoch oft einem raschen Abbau durch verschiedene Enzyme (z.B. Glycosidasen). Daher wäre es von Vorteil, wenn sich die metabolische (und chemische) Stabilität der Verbindungen durch geringfügige chemische Veränderung verbessern ließe. Dies sollte durch den gezielten Einbau von Fluorsubstituenten in das Kohlenhydratepitop bzw. durch den Ersatz der natürlichen Pyranosen durch die entsprechenden Carbazucker erreicht werden. Zusätzlich zu der erhöhten metabolischen Stabilität könnten die modifizierten Kohlenhydratepitope auch eine erhöhte Immunogenität nach sich ziehen, wobei als Voraussetzung unbedingt der Erhalt der Antikörperspezifität gewahrt werden muss. Um Glycopeptide mit chemisch veränderten Kohlenhydratseitenketten hinsichtlich ihrer Stabilität und Immunogenität evaluieren zu können, musste in der vorliegenden Arbeit zunächst ein synthetischer Zugang zu diesen Verbindungen entwickelt werden.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den tumorspezifischen Kohlenhydratantigenen hauptsächlich um sialylierte bzw. verkürzte *O*-Glycane der *Core1*-Struktur. Daher sollten in dieser Arbeit neben den in Position 6 fluorierten Analoga des T_N, des T-Antigens auch dessen sialylierte regioisomere ST-Analoga synthetisiert werden (Abb. 4.1).

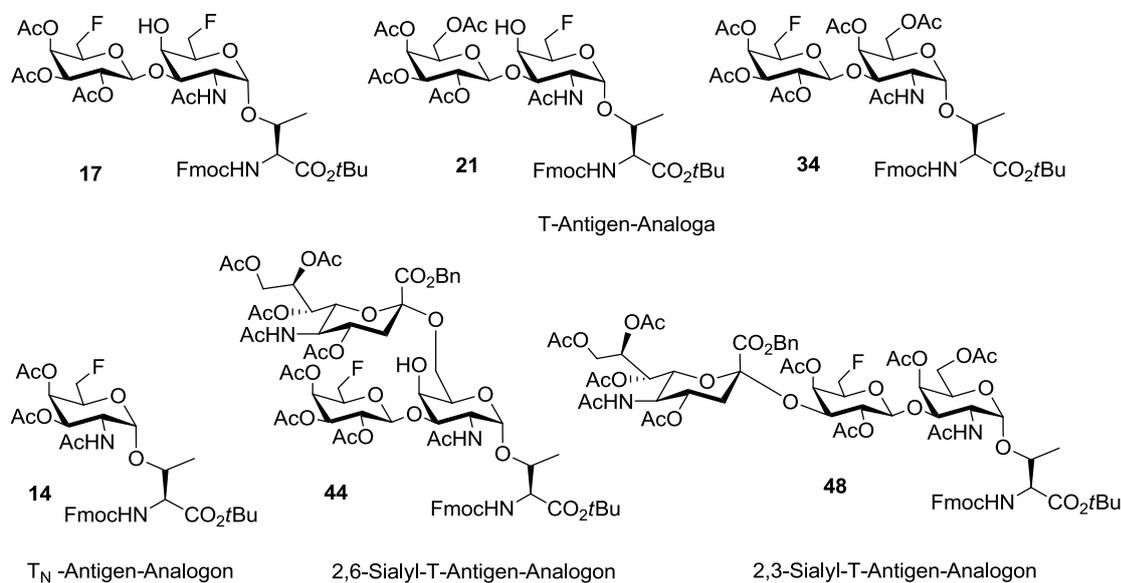


Abb. 4.1: Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten fluorierten Antigen-Analoga

Einer biomimetischen Synthesestrategie folgend, wurde zunächst der 6F-Glycosyldonor **6** hergestellt, welcher anschließend sowohl als Akzeptor als auch als Donormolekül fungieren konnte. Ausgehend von dieser Verbindung konnte ein erstes fluoriertes tumorassoziiertes Antigen in sieben weiteren Stufen hergestellt werden.

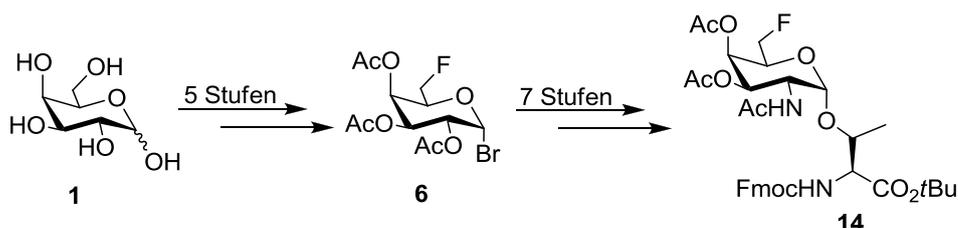


Abb. 4.2: Synthese des 6F-T_N-Antigens

Nach Deblockierung der 3- und 4-Hydroxylgruppen dieses 6-F-T_N-Bausteins wurde ein fluorierter Galactosylakzeptor **16** zum Aufbau der ersten T-Antigen-Analoga unter Verwendung eines fluorierten sowie eines nicht fluorierten Galactosyldonors erhalten.

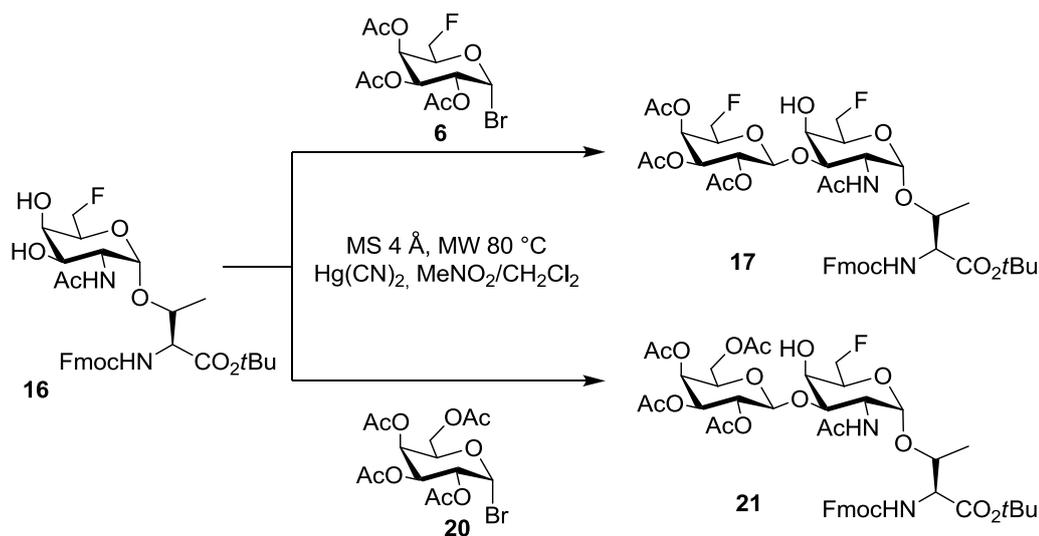


Abb. 4.3: Synthese der fluorierten T-Antigen-Analoga **17** und **21**

Zur Synthese des 6'FT-Antigens musste zunächst ein geeigneter T_N -Galactosylakzeptor dargestellt werden. Dies gelang nach einer literaturbekannten Synthesestrategie ausgehend von Galactose und Threonin in insgesamt elf Stufen. Anschließend konnte wiederum in einer Glycosylierung unter modifizierten *Helferich*-Bedingungen der fluorierte Donor **6** zum gewünschten T-Antigen-Analogon in sehr guten Ausbeuten bis zu 98% umgesetzt werden.

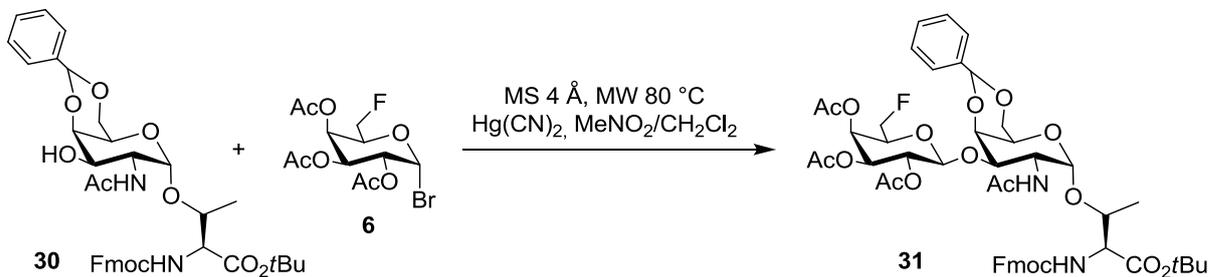


Abb. 4.4: Darstellung des 6'F-T-Analogons

Ausgehend von diesem Baustein **31** war es nun möglich, durch geeignete Schutzgruppenmanipulation sowohl das fluorierte 2,3-ST- als auch das fluorierte 2,6-ST-Analogon aufzubauen. Während ersteres die Deacetylierung der Galactoseeinheit erforderte, benötigte der Aufbau des 2,6-ST-Analogons **44** die Abspaltung der Benzylidenschutzgruppe. So konnten aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül **31** und dem bekannten Xanthogenat-Donor **43** die beiden regioisomeren ST-Analoga erhalten werden.

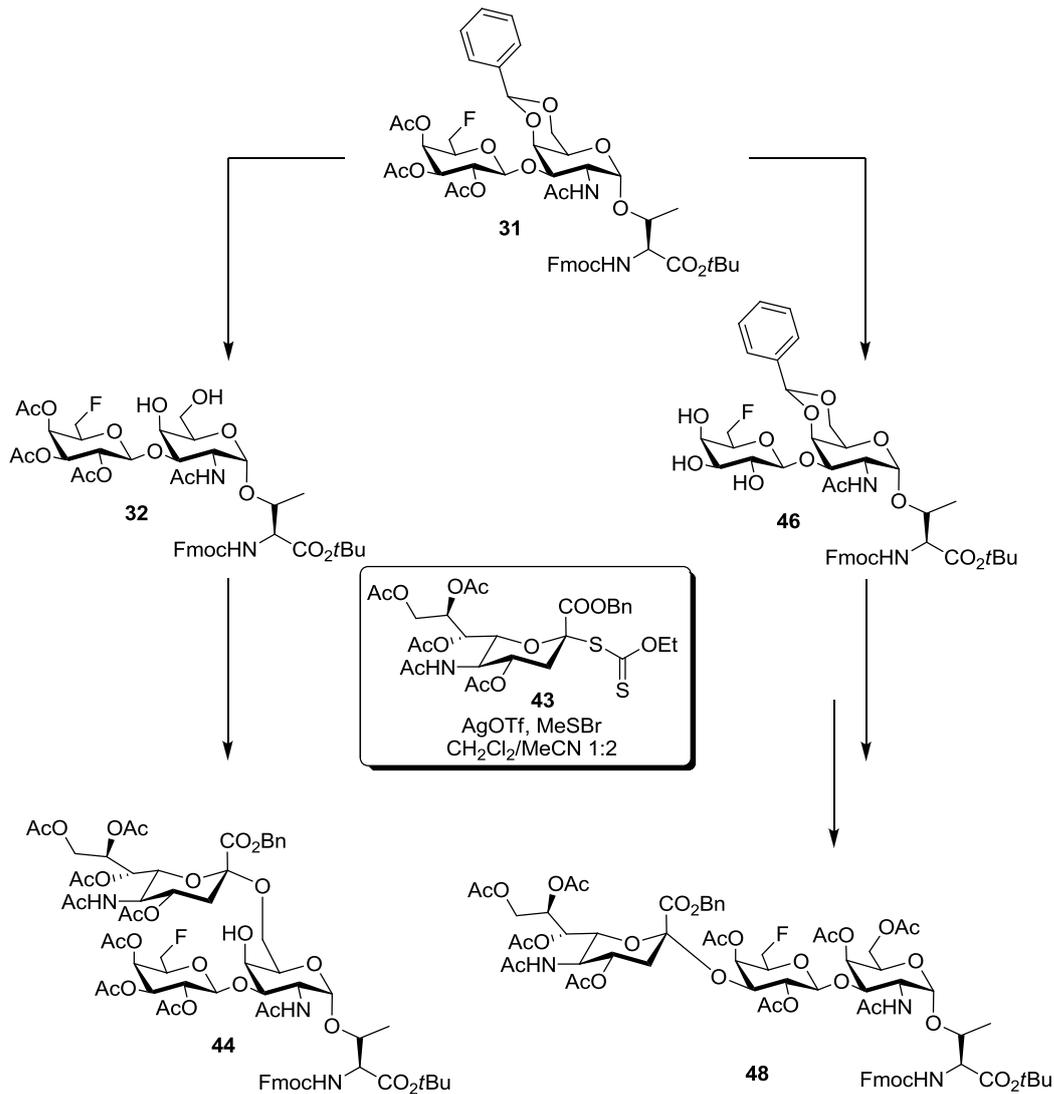


Abb. 4.5: Synthese der beiden fluorierten ST-Analoga **44** und **48**

Während der Aufbau des 2,6-ST-Antigenanalogons glatt gelang, gestaltete sich die Synthese des 2,3-ST-Antigens **48** aufgrund der geringeren Reaktivität der 3'-Hydroxylgruppe deutlich schwieriger, so dass das Produkt bislang nur in geringer Ausbeute zugänglich war.

Um die metabolische Stabilität der fluorierten Antigenanaloga untersuchen zu können, wurden diese in der Kohlenhydratseitenkette vollständig deblockiert. Enzymatische Abbaureaktionen durch β -Galactosidase aus Rinderhoden wurden von M. Johannes durchgeführt und zeigten eine deutliche Hemmung der Hydrolysegeschwindigkeit. Während das natürliche nicht fluoridierte T-Antigenderivat eine Halbwertszeit von etwa zwei Stunden aufwies, war die Hydrolyse des 6'-F-Derivats **35** nach zwei Tagen lediglich zu etwa 40% erfolgt.

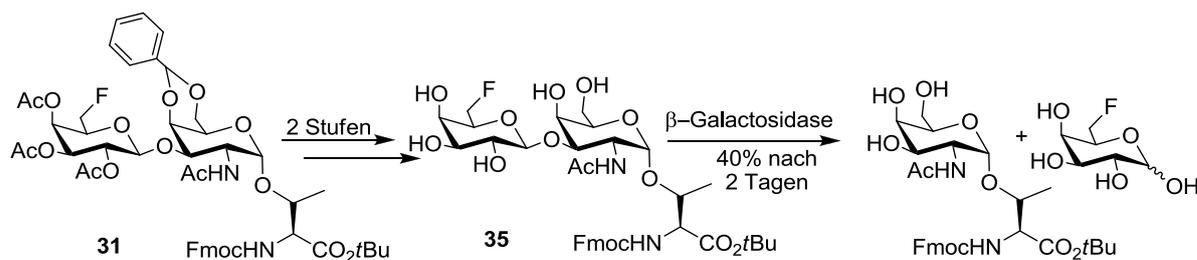


Abb. 4.6: Synthese des vollständig deblockierten T-Antigens und Hydrolysegeschwindigkeit der β -Galactosidase

Neben der Synthese der sechs fluorierten Glycosylaminosäurebausteine wurde in dieser Arbeit auch der Aufbau von bislang unbekanntem hydrolysestabilen Carba-Antigenanaloga verfolgt. Dabei konnte neben dem 1 \rightarrow 3 verknüpften Pseudodisaccharid **77** auch ein fluorierter Carbazucker, das 6F-Pseudogalactosederivat **73** hergestellt werden. Schlüsselschritte dieser Synthesen stellten dabei die durch Palladiumchlorid katalysierte Ferrier II-Umlagerung, eine Petasis-Olefinierung und eine Hydroborierungs-Oxidations-Sequenz an der erzeugten exo-Methylengruppe dar.

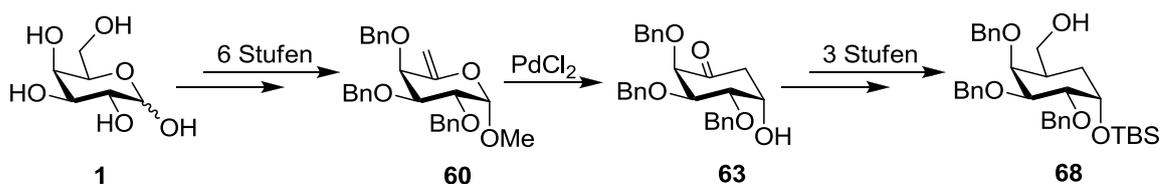


Abb. 4.7: Synthese der Pseudogalactose **68**

Während sich Verbindung **68** leicht durch eine mikrowellenunterstützte DAST-Fluorierungsreaktion in den fluorierten Baustein **73** überführen ließ, gestaltete sich die Glycosylierungsreaktion zum (1 \rightarrow 3)-Pseudodisaccharid **77** deutlich schwieriger. So musste **71** zunächst in das Triflat **83** überführt werden, bevor eine nucleophile Substitution mit dem literaturbekannten Akzeptor **75** unter basischen Bedingungen gelang. Zwar lag die erreichte Ausbeute an **77** mit 18% über 2 Stufen noch niedrig, doch ist zum ersten Mal der stereoselektive Aufbau eines solchen 1 \rightarrow 3-verknüpften Kohlenhydratmimetikums gelungen. Durch sorgfältige Optimierungsstudien sollte sich die Ausbeute an **77** steigern lassen, selbst wenn diese Arbeiten aus Zeitgründen nicht mehr im Rahmen der Dissertation durchgeführt werden konnten.

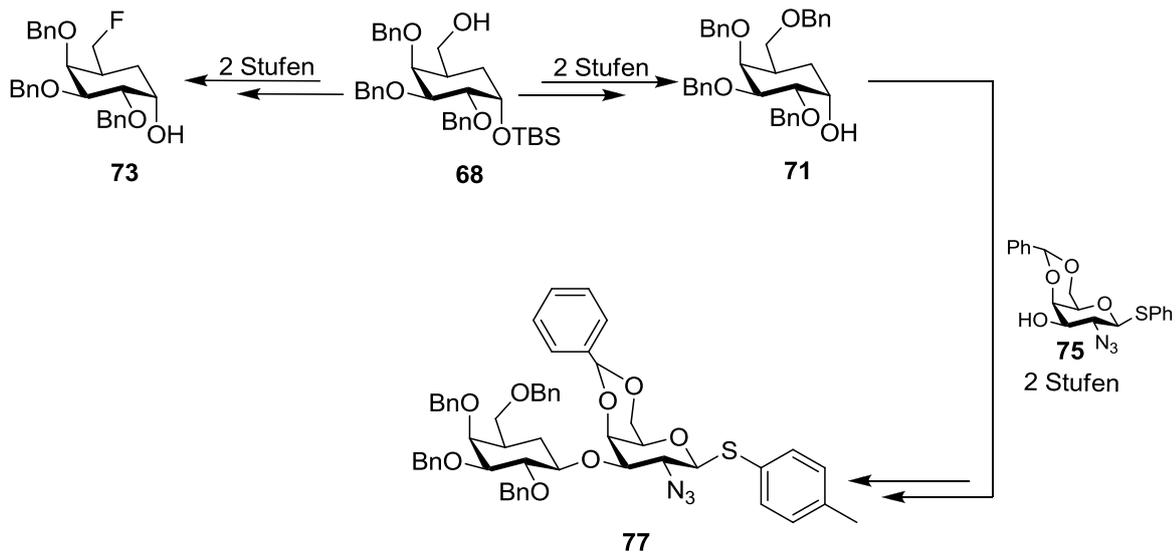


Abb. 4.8: Synthese der fluorierten Pseudogalactose **73** und des neuartigen Pseudodisaccharids **77**

Damit konnte zum ersten Mal ein 1→3 verknüpftes Pseudodisaccharid über 21, davon 14 lineare Stufen dargestellt werden. Bemerkenswerterweise konnte bei dieser Etherbildung lediglich die Bildung des β -verknüpften Disaccharides beobachtet werden.

Nach Acidolyse der *tert*-Butylesterseinheiten wurden die erhaltenen fluorierten Glycosylaminosäurebausteine zudem durch Festphasenpeptidsynthese anstelle des Threonin-6 in die aus 20 Aminosäuren bestehende *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 eingebaut. Anschließender Einbau einer geeigneten Spaceraminosäure erlaubte es, die erhaltenen fluorierten Glycopeptide **106-109** und **112** chemoselektiv mithilfe der Quadratsäure-diester-methode an immunogene Carrierproteine zu binden, so dass diese als potentielle Vakzinkandidaten für Immunisierungsstudien an Mäusen zur Verfügung standen.

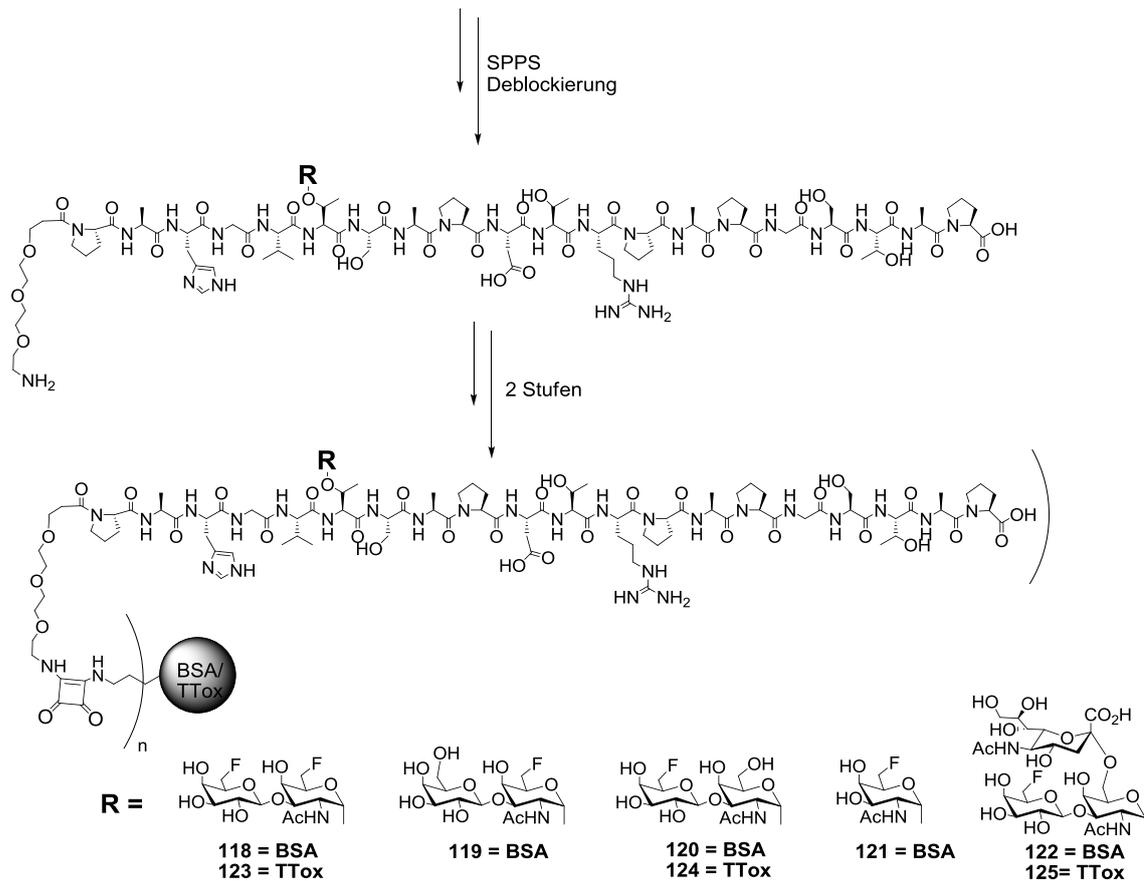


Abb. 4.9: Synthese und chemoselektive Anbindung der Glycopeptide an BSA/TTox über die Quadratsäure als bifunktionellen Linker

Da sich die BSA-Konjugate in früheren Studien als nicht ausreichend immunogen erwiesen hatten, wurden diese Verbindung hier nur in ELISA-Experimenten, d.h. als Coat für die Mikrotiterplatten eingesetzt. Im Gegensatz hierzu wurden die Tetanus Toxoid-Konjugate der Glycopeptide **123**, **124** und **125** zusammen mit einem Adjuvans (CFA oder IFA) als Vakzine eingesetzt, wobei in allen Fällen eine starke toleranzbrechende Immunantwort beobachtet wurde.

Zusätzlich wurden Neutralisationsstudien mit Antikörpern durchgeführt, die aus der Vakzinierung mit natürlichen (nicht-fluorierten) MUC1-Glycopeptidkonjugaten resultierten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden fluorierten Glycopeptid-Antigene eine zu den natürlichen nicht modifizierten Haptene vergleichbare Bindung an die Antikörper aufweisen. Im Gegensatz hierzu werden Glycopeptide mit einer abweichenden Peptidsequenz, wie bspw. aus dem MUC4, durch diese Antikörper nicht erkannt.

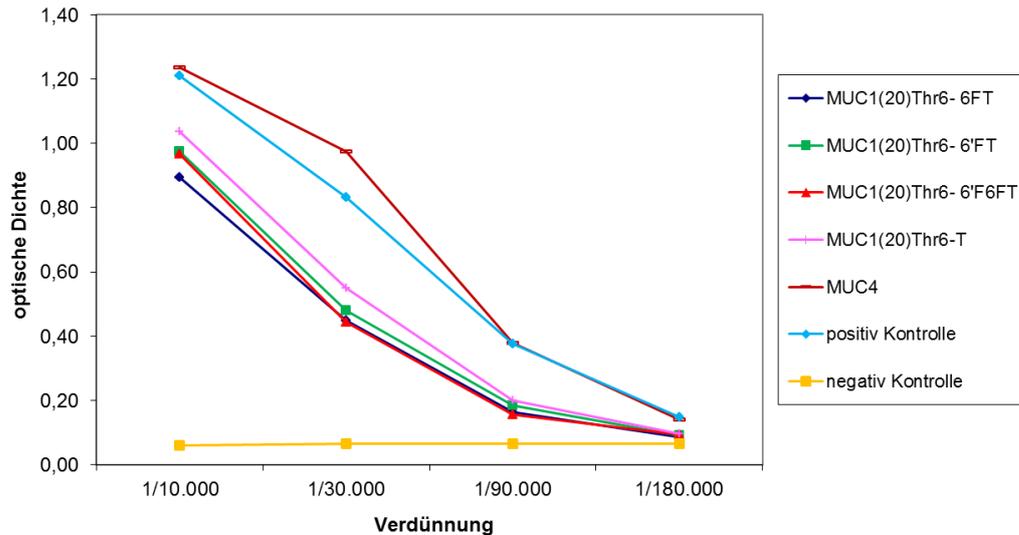


Abb. 4.10: Neutralisations-ELISA des Serums einer mit dem natürlichen T-Antigen tragenden TTox-Vakzine immunisierten Maus

Daher wurde zusätzlich eine Vakzinierungsstudie mit unterschiedlich fluorierten Glycopeptid-TTox-Konjugaten durchgeführt. Als Vakzine wurden neben den in dieser Arbeit synthetisierten 6'F-T **124** und 6'F-6F-T-Antigen **123** auch ein in Position 2' **131** und 4' fluoriertes T-Antigen **130** eingesetzt.

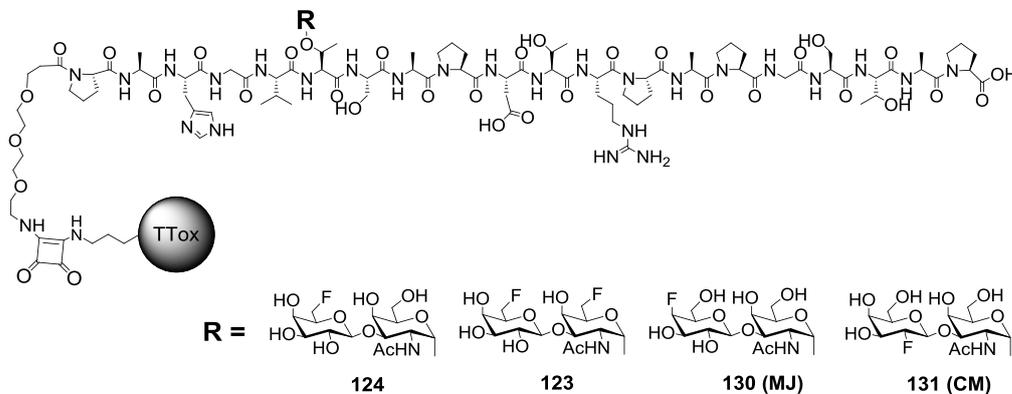


Abb. 4.11: TTox-Vakzine für die Impfstudien

Wie bereits erwähnt wurde, zeigten alle Mäuse, die mit den Vakzinen **123**, **124**, **130** und **131** behandelt wurden eine sehr starke toleranzbrechende Immunantwort, wobei Titer von 1/32.000-1/64.000 auftraten. Da die Ergebnisse der Impfstudien für alle vier Verbindungen sehr ähnlich ausfiel, sollen hier die wichtigsten Ergebnisse nur am Beispiel des 6'F-6FT-Vakzins **123** zusammengefasst werden. So wurde nach der 3. Immunisierung allen Mäusen, zur Gewinnung des Serums, Blut aus der Schwanzvene entnommen und mithilfe des ELISA auf die Bildung von TTox- bzw. MUC1-spezifischen Antikörpern untersucht.

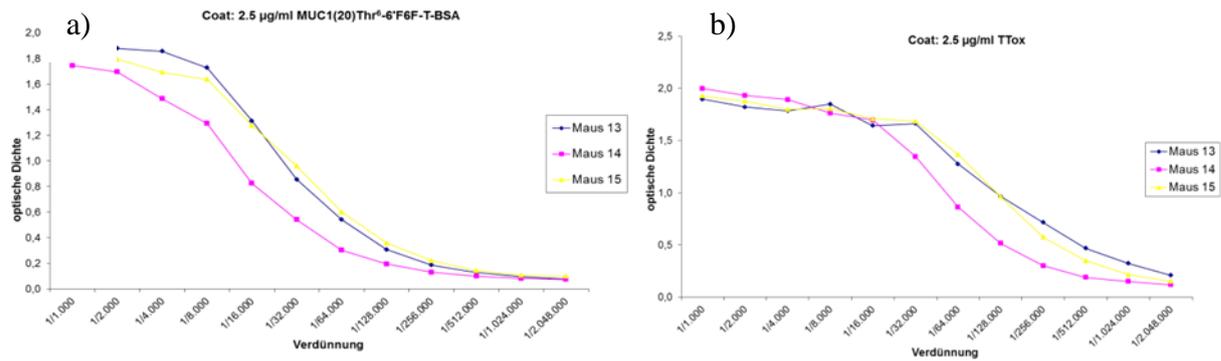


Abb. 4.12: ELISA zur Antikörperdetektion der gegen a) das MUC1 Glycopeptid b) TTTox, die Mäuse wurden immunisiert mit dem 6F-6'F-Vakzin **123**

Zur Untersuchung der Antikörperspezifität wurden die Affinitäten der erhaltenen Seren im ELISA zu verschiedenen natürlichen und fluorierten MUC1-Glycopeptidstrukturen bestimmt. Abb. 4.13 zeigt beispielhaft für das Serum einer mit dem 6'F-6F-T-Vakzin **123** immunisierten Maus, dass alle MUC1-Partialstrukturen, inklusive der nicht glycosylierten *tandem-repeat*-Sequenz und verschiedener fluoriierter MUC1-Antigene, von den induzierten Antikörpern erkannt werden. Dieses recht breite strukturelle Erkennungsspektrum der Antikörper könnte ebenso wie die gezeigte enzymatische Stabilität der Antigenmimetika für einen späteren Einsatz als Vakzine von Vorteil sein.

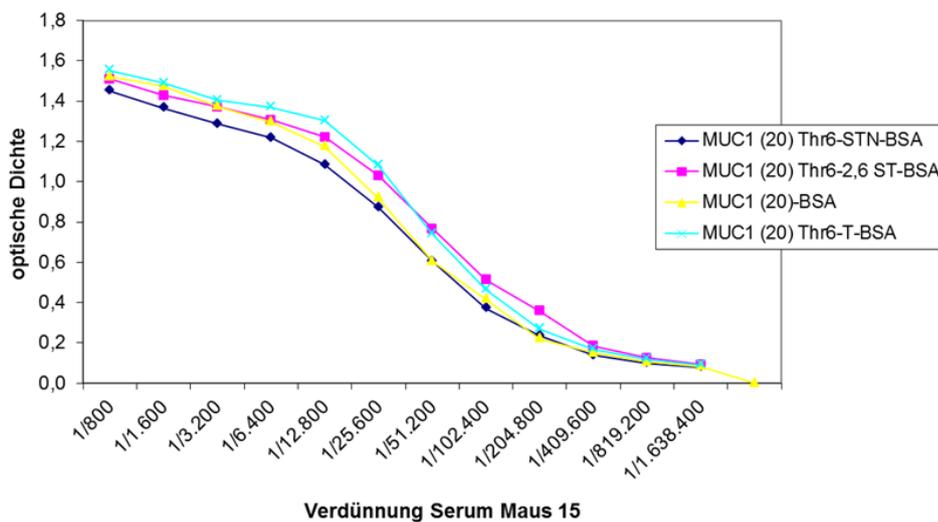


Abb. 4.13: ELISA zur Bindungsselektivität der induzierten Antikörper

Eine Analyse der Isotypen der gebildeten Antikörper belegte den für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses notwendigen Wechsel von IgM zu IgG-Antikörpern. So zeigten alle immunisierten Mäuse eine robuste IgG₁-spezifische humorale Immunantwort, wobei vereinzelt auch Antikörper der Klasse IgG_{2a,b} beobachtet werden konnten.

Neben der Bildung von MUC1-spezifischen Antikörpern musste noch eine Bindung der induzierten Antikörper an Tumorzellen nachgewiesen werden. Dafür wurden FACS-Studien mit MCF-7-Brustkrebszellen durchgeführt. Obwohl alle Mäuse im ELISA-Experiment einen hohen MUC1-spezifischen Antikörpertiter aufwiesen, wurden in den Zelltests unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Erfreulicherweise konnte jedoch mit Ausnahme von zwei Mäusen jeweils eine gute bis sehr gute Bindung an diese Brustkrebszelllinie beobachtet werden.

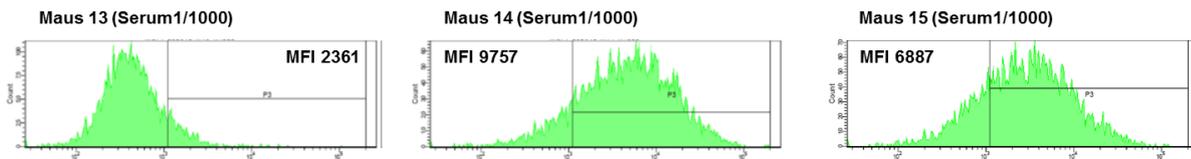


Abb. 4.14: FACS-Analyse der Bindung an MCF-7 Zellen der Seren, der mit dem 6'F-6FT-Vakzin immunisierten Mäuse

Dass es sich bei den an die Tumorzellen bindenden Antikörpern auch wirklich um MUC1-spezifische Antikörper handelt, wurde durch zusätzliche Neutralisationsexperimente belegt, bei denen die MCF-7-Zellen mit dem ursprünglichen Serum inkubiert wurden (a), und mit Seren, die zuvor durch die der Vakzinstrukturen zugrunde liegenden Glycopeptide neutralisiert wurde (b und c). Für die Antikörper aus der oben genannten Vakzinierung mit **123** sind die Ergebnisse in Abb. 4.15 gezeigt, wobei zur Neutralisation die Glycopeptide MUC(20)Thr⁶-6,6' Bis-FT **106** und MUC(20)Thr⁶-T **126** (c) eingesetzt wurden.

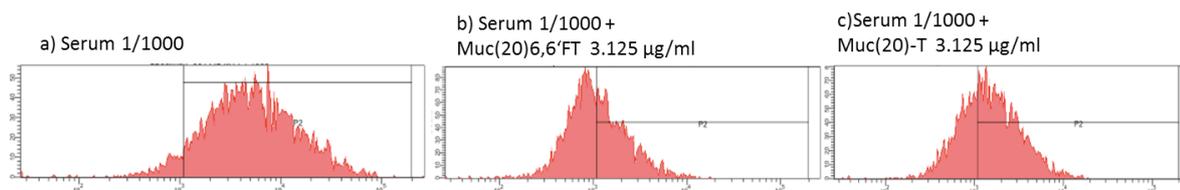


Abb. 4.15: FACS-Analyse der Bindung des Antiserums an MCF-7-Zellen und Neutralisation des Serums mit dem fluoridierten und dem natürlichen T-Antigen

Insgesamt gelang in dieser Arbeit damit der Nachweis, dass durch fluoridierte Glycopeptidvakzine nicht nur eine starke toleranzbrechende humorale Immunantwort induziert werden kann, sondern dass die resultierenden MUC1-spezifischen Antikörper in der Lage sind, Brustkrebszellen der Linie MCF-7 zu erkennen und zu binden. Zusammen mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen hinsichtlich der enzymatischen Stabilität der fluoridierten Kohlenhydratantigene stellen die erzielten Resultate einen wichtigen Schritt in der Entwicklung neuer tumorselektiver Glycopeptidvakzine dar.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Lösungsmittel:

Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysis* (p.a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Verfahren gewonnen.^[243]

Chromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigplatten der Firma Merck, beschichtet mit Kieselgel 60F254, verwendet. Die Visualisierung der Produkte erfolgte durch UV-Detektion mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$ oder durch folgende Färbereagenzien:

- Methoxyphenol-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%-iger ethanolischer *m*-Methoxyphenol-Lösung und 2 N ethanolischer Schwefelsäure).
- Seebach-Reagenz (2.5 g Molybdätdiphosphorsäure, 1.0 g Cer-(IV)-sulfat-tetrahydrat, 6 mL konzentrierte Schwefelsäure und 94 mL Wasser).
- *p*-Anisaldehydreagenz (1.7 mL Essigsäure, 6.25 mL konz. Schwefelsäure, 4.6 mL *p*-Anisaldehyd in 170 mL Ethanol)

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

Flashchromatographie:^[244]

Für die Flashchromatographie der in Lösung erzeugten Verbindungen unter erhöhtem Druck (0.5 - 1 mbar), wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 0.032-0.063 μm der Firma *Acros Organics*, Geel (Belgien) eingesetzt.

RP-HPLC^[245]

Analytische RP-HPLC wurde mit einer *Jasco*-HPLC-Pumpe (PU-2080 Plus), einer tenären *Jasco*-Gradienteneinheit (LG-2080-02) und einem *Jasco*-3-Wege-Entgaser (DG-2080-53) sowie einem *Jasco*-Diodenarraydetektor MD-2010Plus durchgeführt. Als Säule wurden eine *Perfectsil*-Säule (300 ODS, C18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm) eine *Phenomenex Luna*-Säule,

Torrance USA (C18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm) und eine *Phenomenex Jupiter*-Säule (5 μm , C18(2), 300A, 250 \times 4.6 mm) benutzt. Es wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min gearbeitet. Semipräparative RP-HPLC wurden mit Hilfe zweier *Jasco* Gradientenpumpen (PU-2087Plus) und einem UV-Detektor mit variabler Wellenlängenauswahl, ebenfalls von der Firma *Jasco*, durchgeführt. Als Säulen für die semipräparative HPLC wurden eine *Perfectsil*- (300, C18, 5 μm , 250 \times 20 mm), eine *Phenomenex Luna*-Säule, Torrance USA (300, C18, 5 μm , 250 \times 20 mm) bzw. eine *Phenomenex Jupiter*-Säule (10 μm , C18(2), 300 A, 250 \times 30.0 mm) bei einer Flussrate von 20 mL/min benutzt.

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

Drehwerte:

Die Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 241 bei Wellenlängen von $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 578$ nm (Quecksilberdampfampe) gemessen und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Lösungsmittel, Konzentrationen (s/100 mL) und Temperaturen sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

Kernresonanzspektroskopie:

Die ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten gemessen:

- Bruker AC-300, Bremen,: 300 MHz- ^1H -NMR und 75.5 MHz- ^{13}C -NMR
- Bruker ARX-400: 400 MHz- ^1H -NMR und 376.4 MHz- ^{19}F -NMR
- Bruker Avance II-400: 400 MHz- ^1H -NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC und 100.6 MHz- ^{13}C -NMR

Die angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als Standard. Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte unter Verwendung von COSY-, HSQC-, HMBC, NOESY, und TOCSY-Experimenten, soweit angegeben. Die Kopplungskonstanten J der jeweiligen Signale werden in Hertz (Hz) angegeben. Die Kennzeichnung der ^1H - und ^{13}C -Signale in der Interpretation der NMR-Spektren erfolgte nach folgendem Schema:

N-Acetyl-D-galactosamin: ohne Apostroph

(1→3)- β -Galactose: ein Apostroph
Sialinsäure: zwei Apostrophe

Für die Multiplizitäten der Signale gilt:

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

Massenspektrometrie:

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Tofspec E-Gerät der Firma *Micromass*, Eschborn, bzw. einem *Bruker* Time-of-flight REFLEX-Spektrometer, Billerica (USA) gemessen. Als Matrices dienten 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb, 17 mg/mL in H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/mL in H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA).

ESI-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* LCT-Spektrometer, Manchester (England) gemessen.

Hochaufgelöste HR-ESI-TOF-Spektren wurden mit einem *Micromass* Q-TOF Ultima Spektrometer, Manchester (England) aufgenommen.

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

Molekulare Massen:

Molekulare Massen in runden Klammern beziehen sich auf die exakten Massen der Isotope ¹H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁶O und ³²S.

Festphasenpeptidsynthese und Konjugation

Die Peptid- und Glycopeptidsynthesen an der festen Phase wurden an einem *Perkin-Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad (USA) durchgeführt, der zur Kontrolle des Syntheseverlaufs mit einem externen *Perkin-Elmer* Series 200 UV/Vis-Detektor der Firma *Applied Biosystems*, Carlsbad (USA) ausgestattet ist. Die polymeren Träger für die Festphasensynthese wurden von der Firma *Calbiochem-Novabiochem AG*,

Läufeligen, Schweiz, und der Firma *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, erworben. Die verwendeten Aminosäurebausteine wurden von den Firmen *Orpegen Pharma*, Heidelberg, bzw. *Calbiochem-Novabiochem AG*, bezogen. In den sich wiederholenden Syntheseabschnitten wird zunächst die *Fmoc*-Schutzgruppe durch Behandlung (3 x 2.5 min) des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) abgespalten. Zur Überprüfung des Abspaltungsvorgangs wird über UV-Absorption das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt in NMP bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm detektiert.

Die darauf folgenden sequentiellen Aminosäurekupplungen werden jeweils mit einer Reaktionslösung von 1 mmol des *Fmoc*-geschützten Aminosäurebausteins, 1 mmol HBTU, 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2 mmol *N*-Ethyldiisopropylamin (DIPEA) in DMF unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min) durchgeführt. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung verbleibender freier Aminofunktionen 5 min mit einer Lösung aus 0.5 M Acetanhydrid, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP (Capping-Reagenz) behandelt. Das Harz wird nach jedem Syntheseschritt mit NMP gespült, nach Abschluss der Synthese mit Dichlormethan gewaschen und schließlich im Stickstoffstrom getrocknet.

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

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

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

5.2 Immunologische Evaluierung- Materialien

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben in der Qualität p.a. (pro analysis) und von den folgenden Firmen bezogen: Sigma (Steinheim, D), Merck (Darmstadt, D), und Roth (Karlsruhe, D).

Verbrauchsmaterialien

Mikrotiter-Platten (Immuno-Plate F96 MaxiSorp) für ELISA und Neutralisations Experimente wurden von der Firma Nunc (Wiesbaden) bzw. von der Firma Greiner Labortechnik (Frickenhausen, D) bezogen.

Die FACS-Röhrchen sowie 14 und 50 mL Röhrchen wurden ebenfalls von der Firma Greiner Labortechnik (Frickenhausen, D) erhalten. Kleinere Reaktionsgefäße (0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL) wurden von der Firma Eppendorf (Hamburg, D) bezogen.

Puffer und ELISA-Materialien

Alle Medien wurden sterilfiltriert und anschließend bei 4 °C gelagert.

- **PBS (phosphat buffered saline):**

In destilliertem Wasser:

- 1.4 M NaCl (81.8 g/l)
- 0.1 M NaH₂PO₄ (15.6 g/l)
- pH = 7.2

- **BSA(Rinderserumalbumin):**

Eine sterilfiltrierte (0.2 µM) 10 %ige Lösung in PBS.

- **Coating Puffer:**

In destilliertem Wasser:

- 0.1 M Na₂HPO₄
- pH = 9.2

- **Block-Puffer:**

In PBS:

- 0.05 % Tween 20
- 1 % BSA

- **Wasch-Puffer:**

In PBS:

- 0.1% Tween 20

- **Citrat-Puffer:**

40 mM Zitronensäure 60 mM Na₂HPO₄

- **ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure)**

1 mg/mL in Citrat-Puffer gelöst

- **Wasserstoffperoxid 30 %ig**
- **SA-HPO (Streptavidin-Merrettichperoxidase 1/10 Voerverdünnt)**

Antikörper

- **s α m bio**^[246]

anti-Maus (Schaf), biotinyliert: Sekundärantikörper der im ELISA in einer Konzentration von 0.48 µg/mL eingesetzt wird.

- **α m IgG_{2a} bio (BD Pharmingen, Klon: R19-15)**

anti-Maus IgG_{2a}, biotinyliert: Sekundärantikörper der im Isotyp-ELISA in einer Konzentration von 1 µg/mL eingesetzt wird.

- **r α m IgG_{2b} bio (BD Pharmingen, Klon: G15-337)**

anti-Maus (Ratte) IgG_{2b}, biotinyliert: Sekundärantikörper der im Isotyp-ELISA in einer Konzentration von 0.5 µg/mL eingesetzt wird.

- **r α m IgG₁ bio (BD Pharmingen)**

anti-Maus (Ratte) IgG_{2a}, biotinyliert: Sekundärantikörper der im Isotyp-ELISA in einer Konzentration von 1 µg/mL eingesetzt wird.

- **α m IgA bio (eBioscience Klon: 11-44-2)**

anti-Maus IgA, biotinyliert: Sekundärantikörper der im Isotyp-ELISA in einer Konzentration von 1 µg/mL eingesetzt wird.

- **α m IgD bio (eBioscience, Klon: B121-15F9)**

anti-Maus IgD, biotinyliert: Sekundärantikörper der im Isotyp-ELISA in einer Konzentration von 1 µg/mL eingesetzt wird.

- **g α m AlexaFluor 488 (Invitrogen, Eugene, Oregon USA, A11029)**

anti-Maus (Ziege) IgG: der Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und wird als Sekundärantikörper im FACS in einer Verdünnung von 1:1000 (2 µg/mL) eingesetzt.

Zelllinien und Tiere**MCF-7^[47, 247]**

Humane Brustkrebszelllinie von der Firma CLS-Cell Lines Service, Eppenheim.

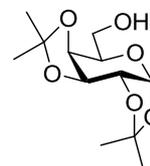
Tiere

Für die Immunisierung wurden ausschließlich weibliche Mäuse aus dem Wild-Typ-Stamm BALB/c im Alter von 6-8 Wochen verwendet. (Zentralen Versuchtiereinrichtung-ZVTE der Universitätsmedizin Mainz)

5.3 Synthese der modifizierten Glycosylaminosäuren

5.3.1 Synthesen zu Kapitel 3.1.1

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**2**)^[248] (α -Diisopropyl-Gal)



Zu einer Suspension aus 39.6 g (0.22 mol) D-Galactose und 88.6 g wasserfreiem Kupfersulfat (0.55 mol) in 700 mL Aceton wurden unter Rühren 5.3 mL konz. Schwefelsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Kupfersulfat abfiltriert wurde und das Filtrat mit festem Calciumhydroxid neutralisiert wurde. Die Mischung wurde durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 46.5 g (81%, 0.18 mol), gelbes Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +49.3$, Lit.^[249]: $[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +54.3$

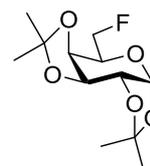
$R_f = 0.33$ (^cHex/EtOAc, 1:1)

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ (M=260.126 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 5.56 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 5.1$ Hz, 1-H), 4.61 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 2.2$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 8.1$ Hz, 3-H) 4.34-4.32 (m, 1H, 2-H), 4.27 (dd, 1H, $J_{\text{H4,H5}} = 1.5$ Hz, $J_{\text{H4,H3}} = 8.1$ Hz, 4-H), 3.87-3.83 (m, 2H, 6a-H, 5-H), 3.74 (dd, 1H, $J_{\text{H6b,H5}} = 7.4$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 14.3$ Hz, 6b-H), 1.53, 1.46, 1.33 (3s, 12H, 4 x CH_3).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[250]

6-Desoxy-6-Fluor-1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**3**)^[251] (α -Diisopropyl-Gal6F)



Zu 2.00 g (7.68 mmol) α -Diisopropyl-Gal (**2**) gelöst in 10 mL absol. Dichlormethan, wurden 2.24 g (18.4 mmol) 2,4,6-Collidin und 1.52 g (9.22 mmol) DAST hinzugefügt. Das Gemisch wurde eine Stunde bei 80 °C und 100 W ($p_{\text{max}} = 5.0$ bar, und einer Aufheizphase von $t = 5.0$ min) in der Mikrowelle reagieren gelassen. Anschließend wurde 1 mL Methanol hinzugefügt

und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.68 g (84%, 6.43 mmol) leicht gelbes Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -38.5$, Lit.:^[252] $[\alpha]_D^{23} = (3.18, \text{CHCl}_3) = -51.4$.

$R_f = 0.65$ (^cHex/EtOAc, 2:1)

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{FO}_5$ (M=262.122 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 5.55 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 4.8$ Hz, 1-H), 4.68-4.58 (m, 2H, 3-H, 6a-H) 4.53-4.42 (m, 1H, 6b-H), 4.34 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = 2.6$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 5.1$ Hz, 2-H), 4.26 (dd, 1H, $J_{\text{H4,H5}} = 1.8$ Hz, $J_{\text{H4,H3}} = 7.7$ Hz, 4-H), 4.12-4.02 (m, 1H, 5-H), 1.54, 1.44, 1.33 (3s, 12H, 4 x CH₃).

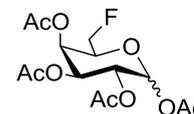
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 109.6, 108.8 (2 x C(CH₃)₂), 96.1 (C1), 83.2 (d, $J_{\text{C6,F}} = 167.4$ Hz, C-6), 70.53, 70.44, 70.36 (C-2, C-3, C-4), 66.59 (d, $J_{\text{C5,F}} = 22.5$ Hz, C-5), 26.0, 25.9, 24.9, 24.4 (4 x CH₃).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -231.5 (dt, $J_{\text{F,H5}} = 13.2$ Hz, $J_{\text{F,H6}} = 46.7$ Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[253]

1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranose (5)^[249]

(α/β Ac₄Gal6F)



Es wurden 3.21 g (12.2 mmol) α -Diisopropyl-Gal6F (**3**) in 40 mL 80% iger Essigsäure gelöst und 18 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde viermal mit je 30 mL Toluol und zweimal mit je 30 mL Dichlormethan kodestilliert. Das erhaltene gelbe Öl wurde noch weitere 2 h im Hochvakuum getrocknet und schließlich mit 100 mL Pyridin und 50 mL Acetanhydrid versetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.13 g (98%, 11.9 mmol) gelbes Öl (Anomerengemisch)

$R_f = 0.4$ (^cHex/EtOAc, 1:1)

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{FO}_9$ (M= 350.101 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), charakteristisches Signal δ [ppm] = 5.73 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 8.1$ Hz, 1-H β), 5.48 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 2.9$ Hz, 1-H α).

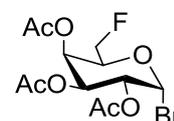
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 170.0, 169.9, 169.8 (4 x $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 92.1 (C-1 α), 89.6 (C-1 β), 80.7 (d, $J_{\text{C}_6,\text{F}}$ = 171.9 Hz, C-6 α), 80.1 (d, $J_{\text{C}_6,\text{F}}$ = 172.7 Hz, C-6 β), 72.2 (d, $J_{\text{C}_5,\text{F}}$ = 24.0 Hz, C-5 β), 70.7 (C-3 β), 69.5 (d, $J_{\text{C}_5,\text{F}}$ = 23.3 Hz, C-5 α), 67.7 (C-3 α), 67.4 (d, $J_{\text{C}_4,\text{F}}$ = 5.3 Hz, C-4 β), 67.2 (C-2 β), 66.7 (d, $J_{\text{C}_4,\text{F}}$ = 5.3 Hz, C-4 α), 66.3 (C-2 α), 21.0, 20.9, 20.6, 20.5 (4 x CH_3 (Ac))

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = - 232.2 (m, J_{F,H_5} = 15.4 Hz, J_{F,H_6} = 45.1 Hz)

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[90]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactosylbromid (**6**)^[254]

($\alpha\text{Ac}_3\text{Gal6F-Br}$)



Zu einer Lösung von 13.5 g (38.6 mmol) $\alpha/\beta\text{Ac}_4\text{Gal6F}$ (**5**) in 100 mL Dichlormethan wurden bei 0 °C langsam 27.4 mL HBr (33 %ig in Eisessig) gegeben. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h gerührt. Zur Hydrolyse wurde das Reaktionsgemisch mit 80 mL Dichlormethan verdünnt, auf Eiswasser gegossen und mit festem Natriumhydrogencarbonat unter Eiskühlung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 70 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 11.2 g (79%, 30.3 mmol) leicht gelber Feststoff.

$[\alpha]_D^{23}$ = (1.00, CHCl_3) = + 214.0, Lit.^[254]: $[\alpha]_D^{23}$ = (0.40, CHCl_3) = + 195.6

R_f = 0.65 ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1)

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrFO}_7$ (M=370.006 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 6.71 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2}$ = 4.1 Hz, 1-H), 5.58 (d, 1H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3}$ = 3.3 Hz, 4-H), 5.41 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4}$ = 3.3 Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2}$ = 10.7 Hz, 3-H), 5.07 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1}$ = 4.1 Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3}$ = 10.7 Hz, 2-H), 4.54 (t, 1H, $J_{\text{H}_5,\text{H}_{6a/b}}$ = 2.6 Hz, 5-H), 4.57-4.35 (m, 2H, 6a,b-H), 2.15, 2.11, 2.02 (3s, 9H, 3 x CH_3 (OAc)).

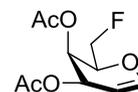
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 170.0, 169.8 (2 x C=O (OAc)), 88.0 (C-1), 80.3 (d, J_{F,C_6} = 173.4 Hz, C-6), 71.6 (d, J_{F,C_5} = 23.5 Hz, C-5), 67.9 (C-2), 67.7 (C-3), 67.0 (d, J_{F,C_4} = 5.4 Hz, C-4), 20.7, 20.6 (2 x CH_3 (OAc)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = - 232.6 (m, $J_{\text{F,H5}} = 13.5$ Hz, $J_{\text{F,H6}} = 45.1$ Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[254, 255]

3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorgalactal (**7**)^[256]

(Ac₂Gal6F)



Es wurden 7.11 g (0.11 mol) Zinkpulver mit verdünnter Salzsäure (1 M) aktiviert und je zweimal mit dest. Wasser, Essigsäureethylester und mit Diethylether gewaschen. Das so aktivierte Zink wurde in 30 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt, mit 921 mg (11.5 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 4.22 g (11.3 mmol) des $\alpha\text{Ac}_3\text{Gal6F-Br}$ (**6**), gelöst in 35 mL Essigsäureethylester, langsam in der Hitze zugetropft. Es wurde eine Stunde unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen wurde durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 40 mL Salzsäure (1 M) und 40 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.34 g (89%, 10.1 mol) farbloser kristalliner Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = - 35.8$.

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

$R_t = 6.7$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeOH/H₂O (40:60)→(75:25), 40 min; →(100:0) 50 min; $\lambda = 214$ nm)

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FO}_5$ (M= 232.075 g/mol)

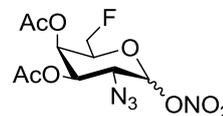
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, COSY, CDCl_3), δ [ppm] = 6.49 (dd, 1H, $J_{\text{H1,H3}} = 1.5$ Hz, $J_{\text{H1,H2}} = 6.2$ Hz, 1-H), 5.55-5.52 (m, 1H, 3-H), 5.46-5.45 (m 1H, 4-H), 4.76 (ddd, 1H, $J_{\text{H2,H4}} = 1.1$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 2.9$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 6.2$ Hz, 2-H), 4.63 (ddd, 1H, $J_{\text{H6a,H5}} = 7.4$ Hz, $J_{\text{H6a,H6b}} = 9.9$ Hz, $J_{\text{H,6aF}} = 47.8$ Hz, 6a-H), 4.51 (ddd, 1H, $J_{\text{H6b,H5}} = 4.1$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 9.9$ Hz, $J_{\text{H6b,F}} = 45.9$ Hz, 6b-H), 4.45-4.34 (m, 1H, 5-H), 2.12, 2.03 (2s, 6H, 2 x CH₃ (OAc)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 170.2, 170.0 (2 x C=O (OAc)), 145.5 (C-1), 98.8 (C-2), 82.1 (d, $J_{\text{F,C6}} = 169.6$ Hz, C-6), 73.5 (d, $J_{\text{F,C5}} = 21.3$ Hz, C-5), 63.8 (d, $J_{\text{F,C4}} = 6.1$ Hz, C-4), 63.7 (C-3), 20.7, 20.6 (2 x CH₃ (OAc)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = - 230.2 (dt, $J_{\text{F,H6a}} = 45.2$ Hz, $J_{\text{F,H5}} = 10.2$ Hz).

FD-MS (positiv), m/z : 231.8 ([M], ber.: 232.07), 463.7([2M], ber.: 464.14), 695.7 ([3M], ber.: 696.21)⁶

3,4-Di-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranosylnitrat (8)^[256]
(α/β Ac₃GalN₃ONO₂6F)



Es wurden 16.4 g (29.7 mmol) Cer(IV)-ammoniumnitrat und 969 mg (14.9 mmol) Natriumazid, welche zuvor im Hochvakuum getrocknet wurde, in 50 mL absol. Acetonitril suspendiert. Die Suspension wurde auf -25 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur tropfenweise unter Argonatmosphäre mit 2.34 g (9.91 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluorogalactal (**7**), gelöst in 25 mL absol. Acetonitril, versetzt. Es wurde 5 h bei -18 °C gerührt. Bevor die intensiv gelbe Reaktionslösung durch Zugabe von 100 mL kaltem Diethylether verdünnt und auf Eiswasser gegossen wurde. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.59 g (47% 4.73 mmol) gelbes Öl (Anomerengemisch)

$R_f = 0.75$ (^cHex/EtOAc, 1:1)

C₁₀H₁₃FN₄O₈ (M=336.072 g/mol)

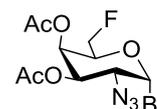
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), charakteristische Signale δ [ppm] = 6.37 (d, 1H, $J_{H1\alpha,H2\alpha} = 4.0$ Hz, 1 α -H), 5.61 (d, 1H, $J_{H1\beta,H2\beta} = 8.8$ Hz, 1 β -H), 5.57 (d, 1H, $J_{H4\alpha,H3\alpha} = 2.9$ Hz, 4 α -H), 5.46 (d, 1H, $J_{H4\beta,H3\beta} = 3.3$ Hz, 4 β -H), 5.26 (dd, 1H, $J_{H3\alpha,H4\alpha} = 2.9$ Hz, $J_{H3\alpha,H2\alpha} = 11.0$ Hz, 3 α -H), 4.98 (dd, 1H, $J_{H3\beta,H4\beta} = 3.3$ Hz, $J_{H3\beta,H2\beta} = 10.7$ Hz, 3 β -H), 4.60-4.29 (m, 6H, 5 α -H, 5 β -H, 6 α ,b-H), 4.15 (dd, 1H, $J_{H2\alpha,H1\alpha} = 4.4$ Hz, $J_{H2\alpha,H3\alpha} = 11.4$ Hz, 2 α -H) 3.85 (dd, 1H, $J_{H2\beta,H1\beta} = 8.8$ Hz, $J_{H2\beta,H3\beta} = 10.7$ Hz, 2 β -H), 2.17, 2.08 (2s, 6H, 2 x CH₃ (OAc)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 169.3, 169.2, 169.1, 169.0 (4 x C=O), 97.6 (C-1 β), 96.3 (C-1 α), 80.4 (d, $J_{C6,F} = 173.7$ Hz, C-6 β), 80.1 (d, $J_{C6,F} = 173.4$ Hz, C-6 α), 72.0 (d, $J_{C5,F} = 23.8$ Hz, C-5 β), 71.2 (C-3 β), 69.6 (d, $J_{C5,F} = 23.2$ Hz, C-5 α), 68.1 (C-3 α), 66.3 (d, $J_{C4,F} = 5.2$ Hz, C-4 α), 65.4 (d, $J_{C4,F} = 5.3$ Hz, C-4 β), 57.0 (C-2 β), 55.5 (C-2 α), 20.1 (4 x CH₃ (OAc)).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 232.2 (dt, $J_{F,H5} = 12.0$ Hz, $J_{F,H6} = 46.2$ Hz), - 232.7 (m).

⁶ Die Messung einer hochaufgelösten Masse war leider nicht möglich

3,4-Di-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosylbromid (9)^[256]
(α Ac₃GalN₃F-Br)



Zu 2.71 g (31.2 mmol) Lithiumbromid, suspendiert in 20 mL absol. Acetonitril, wurden unter Argonatmosphäre 1.51 g (4.46 mmol) α/β Ac₃GalN₃ONO₂6F (**8**), gelöst in 10 mL absol. Acetonitril, getropft. Die Suspension wurde 14 h unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde mit 80 mL Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je 60 mL dest Wasser und ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.05 g (67%, 2.97 mmol) gelbes Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +156.3$.

$R_f = 0.56$ (^cHex/EtOAc, 3:1)

C₁₀H₁₃BrFN₃O₅ (M=353.002 g/mol)

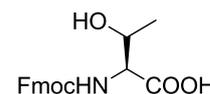
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.49 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 4.1$ Hz, 1-H), 5.57 (d, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, 4-H), 5.35 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 10.7$ Hz, 3-H), 4.58-4.34 (m, 3H, $J_{\text{H6,F}} = 44.1$ Hz, 5-H, 6a-H, 6b-H), 4.02 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 3.7$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 10.7$ Hz, 2-H), 2.16, 2.07 (2s, 6H, 2 x CH₃ (OAc)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 169.9, 169.7 (2 x C=O (OAc)), 88.9 (C-1), 80.5 (d, $J_{\text{F,C6}} = 171.9$ Hz, C-6), 72.1 (d, $J_{\text{F,C5}} = 23.1$ Hz, C-5), 70.0 (C-3), 66.7 (d, $J_{\text{F,C4}} = 5.2$ Hz, C-4), 58.8 (C-2), 20.7, 20.6 (2 x CH₃ (OAc)).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -232.7 (m, $J_{\text{F,H5}} = 13.5$ Hz, $J_{\text{F,H6}} = 45.5$ Hz).

FD-MS (positiv), m/z : 273.8 ([M-Br], ber.: 273.098)⁷

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-threonin (11)**^[110, 112]
(Fmoc-Thr-OH)



Es wurden 10.0 g (0.08 mol) L-Threonin und 7.11 g (0.08 mol) Natriumhydrogencarbonat in 460 mL eines Aceton/Wasser-Gemisches (1:1) gelöst. Anschließend wurden 28.4 g (0.08 mol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) portionsweise unter Rühren hinzugegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit

⁷ Eine Messung der hochaufgelösten Masse war leider nicht möglich

konz. Salzsäure auf pH = 2 angesäuert und das Aceton wurde i. Vak. abdestilliert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend je zweimal mit 100 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und 100 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 27.5 g (96%, 0.08 mol) farbloser Feststoff

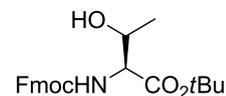
$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -5.3.$$

C₁₉H₁₉NO₅ (M= 341.126 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.72 (d, 2H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60-7.54 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38-7.22 (m, 4H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 6.07 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 8.8 Hz, NH-Urethan), 4.45-4.31 (m, 4H, CH₂-Fmoc, T^α, T^β), 4.16 (t, 1H, J_{H9,CH2} = 6.9 Hz, 9-H-Fmoc), 1.23 (d, 3H, J_{Tγ, Tβ} = 6.2 Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[257]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (12)^[110, 112]
(Fmoc-Thr-*O*tBu)**



Eine Mischung aus 36.9 g (0.09 mol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 7.53 g (0.10 mol) *tert*-Butanol und 400 mg (4.04 mmol) wasserfreiem Kupferchlorid wurden unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss vier Tage lang gerührt. Die dunkelgrüne Reaktionsmischung wurde dann mit 30 mL absol. Dichlormethan verdünnt und tropfenweise mit einer Lösung aus 10.0 g (0.029 mol) Fmoc-Thr-OH (**11**), gelöst in 40 mL absol. Dichlormethan, unter Eiskühlung binnen 1.5 h versetzt. Nach dem Zutropfen wurde 2 h lang unter Kühlung gerührt, wobei farbloser, feinkristalliner Harnstoff ausfiel, welcher abfiltriert wurde. Es war dabei mehrmaliges Abfiltrieren und Waschen mit kaltem Dichlormethan notwendig da aus dem Filtrat immer wieder Harnstoff auskristallisierte. Das Filtrat wurde schließlich i. Vak. eingengt und der ausgefallene Harnstoff abgesaugt. Die so erhaltene organische Phase wurde dreimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand in wenig Essigsäureethylester aufgenommen und 5 h im Tiefkühlfach aufbewahrt. Nach erneuter Abtrennung des ausgefallenen Harnstoffs wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an

Kieselgel (Laufmittel: $^{\circ}\text{Hex}/\text{EE}$ 3:1 \rightarrow 2:1) mit anschließender Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether gereinigt.

Ausbeute: 3.42 g (30%, 8.60 mmol), farbloser kristalliner Feststoff

$R_f = 0.40$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EE}$ 2:1)

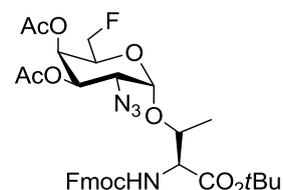
$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -10.1$, Lit.^[258] $[\alpha]_D^{20} = (1.15, \text{CHCl}_3) = -9.0$.

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ ($M = 397.189$ g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = J_{\text{H}_8, \text{H}_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43-7.29 (m, 4H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 5.60 (d, 1H, $J_{\text{NH}, \text{T}\alpha} = 8.5$ Hz, NH-Urethan), 4.41 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{H}_9} = 7.0$ Hz, CH_2 -Fmoc), 4.31-4.21 (m, 3H, 9-H-Fmoc, T^α , T^β), 1.49 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.25 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma, \text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[259, 260]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-azido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (13)^[256]
(Fmoc-Thr-($\alpha\text{Ac}_2\text{FGalN}_3$)-*Ot*Bu)**



Eine Lösung von 283 mg (0.71 mmol) Fmoc-Thr-*Ot*Bu (**12**) in 6 mL einer Mischung aus absol. Toluol und absol. Dichlormethan (1:1) wurde mit 0.5 g frisch aktiviertem Molekularsieb 45 min bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Die Suspension wurde auf 0 °C abgekühlt und mit 206 mg (0.75 mmol) Silbercarbonat und 28.1 mg (0.14 mmol) Silberperchlorat, gelöst in 1 mL absol. Toluol, versetzt. Anschließend wurden 250 mg (0.68 mmol) $\alpha\text{Ac}_3\text{GalN}_3\text{F-Br}$ (**9**), gelöst in 6 mL einer Mischung aus absol. Toluol und absol. Dichlormethan, binnen 25 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 10 °C gerührt. Anschließend wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert und die organische Phase wurde jeweils mit 30 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 328 mg (70%, 0.49 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +59.8$

$R_f = 0.27$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1)

$R_t = 39.9$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(75:25), 40 min; →(100:0) 50 min; $\lambda = 208$ nm)

C₃₃H₃₉FN₄O₁₀ (670.265 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.0$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H, $J_{H_2,H_1} = J_{H_7,H_8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.66 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Urethan), 5.52 (d, 1H, $J_{H_4,H_3} = 2.9$ Hz, 4-H), 5.35 (dd, 1H, $J_{H_3,H_4} = 2.9$ Hz, $J_{H_3,H_2} = 11.4$ Hz, 3-H), 5.15 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, 1-H), 4.51-4.21 (m, 8H, 5-H, 6a-H, 6b-H, 9-H-Fmoc, CH₂-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 3.66 (dd, 1H, $J_{H_2,H_1} = 3.7$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 11.4$ Hz, 2-H), 2.15, 2.09 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 1.49 (s, 9H, (tBu)), 1.25 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

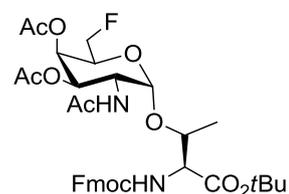
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.1, 170.0 (2 x C=O (OAc), 169.5 (C=O (Ester)), 157.0 (C=O (Urethan)), 144.1, 144.0 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.9, 127.3 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.5, 125.3 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.2, 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 99.3 (C-1), 83.0 (Cq (tBu)), 81.6 (d, $J_{F,C6} = 173.9$ Hz, C-6), 76.6 (T ^{β}), 68.4 (d, $J_{F,C5} = 26.7$ Hz, C-5), 68.0 (C-3), 67.7 (d, $J_{F,C4} = 6.2$ Hz, C-4), 67.3 (CH₂ (Fmoc)), 59.4 (T ^{α}), 58.0 (C-2), 47.4 (CH (Fmoc)), 28.2 (CH₃ (tBu)), 20.9, 20.8 (2 x CH₃ (OAc)), 19.2 (T ^{γ}).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 231.5 (dt, $J_{F,H5} = 14.8$ Hz, $J_{F,H6} = 46.5$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 364.11 ([Fmoc-NH-Thr + Na]⁺, ber.: 364.12), 420.17 ([Fmoc-NH-Thr-OtBu + Na]⁺, ber.: 420.44), 693.25 ([M + Na]⁺, ber.: 693.25).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 693.2455 ([M + Na]⁺, ber.: 693.2550).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*butylester (**14**)^[256]
(Fmoc-Thr-(α Ac₂FGalNAc)-OtBu)**



In 18 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) wurden 290 mg (0.43 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₂FGalN₃)-OtBu (**13**) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 280 mg (4.3 mmol) Zink-Staub gegeben, welcher zunächst durch 2%ige Kupfersulfatlösung-Lösung aktiviert und mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether getrocknet wurde. Es wurde während 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 10 mL

Tetrahydrofuran verdünnt und durch *Hyflo (Supercell, Roth)* filtriert. Das Filtrat wurde i. Vak. eingengt und anschließend fünfmal mit je 10 mL Toluol und zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 2 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 15 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 15 mL einer ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 222 mg (75%, 0.32 mmol) farbloser amorpher Feststoff

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

$$R_f = 0.16 (\text{^cHex/EtOAc, 1:1})$$

$R_t = 3.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O (30:70)→(77:23), 30 min; →(100:0), 60 min; $\lambda = 214$ nm)

C₃₅H₄₃FN₂O₁₁ (M= 686.721 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.0$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 6.6$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H_3,H_2} = J_{H_6,H_7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H, $J_{H_2,H_3} = J_{H_7,H_6} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.06 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.9$ Hz, NH-Ac), 5.66 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 8.8$ Hz, NH-Urethan), 5.41 (bs, 1H, 4-H), 5.11 (dd, 1H, $J_{H_3,H_4} = 2.9$ Hz, $J_{H_3,H_2} = 11.4$ Hz, 3-H), 4.92 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 2.9$ Hz, 1-H), 4.63 (dt, 1H, $J_{H_2,H_1} = 3.0$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 9.9$ Hz, 2-H) 4.53-4.39 (m, 3H, 5-H, 6a-H, 6b-H), 4.34-4.21 (m, 5H, 9-H-Fmoc, CH₂-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 2.15, 2.00 (2s, 6H, 2 x CH₃ (OAc)), 1.48 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.46 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.25 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

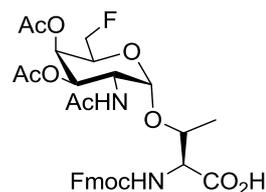
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 171.1 (C=O (NHAc)), 170.6, 170.5, 170.2 (3 x C=O (OAc, Ester)), 156.7 (C=O (Urethan)), 144.0, 143.9 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 128.0, 127.3 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.2 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.3, 125.2 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.3, 120.2 (C-4-, C-5-Fmoc), 100.0 (C-1), 83.4 (Cq (*t*Bu)), 81.8 (d, $J_{F,C_6} = 171.0$ Hz, C-6), 76.8 (T ^{β}), 68.8 (C-3), 68.5 (d, $J_{F,C_5} = 22.5$ Hz, C-5), 67.5 (d, $J_{F,C_4} = 6.7$ Hz, C-4), 67.4 (CH₂ (Fmoc)), 60.6 (C-2), 59.1 (T ^{α}), 47.4 (CH (Fmoc)), 28.3 (CH₃ (*t*Bu)), 23.5 (CH₃ (NHAc)), 20.9, 20.8 (2 x CH₃ (OAc)), 18.8 (T ^{γ}).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 231.1 (m, $J_{F,H_5} = 14.6$ Hz, $J_{F,H_6} = 45.1$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 709.26 ([M + Na]⁺, ber.: 709.27), 1395.55 ([2M + Na]⁺, ber.: 1396.43).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 709.2744 ([M + Na]⁺, ber.: 709.2751).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (15)
(Fmoc-Thr-(α Ac₂FGalNAc)-OH)**



Eine Lösung von 300 mg (0.44 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₂FGalNAc)-OtBu (**14**) in 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Anisol wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05) gereinigt.

Ausbeute: 241 mg (87%, 0.38 mmol) farbloser Feststoff

R_f = 0.69 (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05)

R_t = 20.9 min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (30:70) → (90:10), 30 min; → (100:0), 60 min; λ = 214 nm)

C₃₁H₃₅FN₂O₁₁ (M = 630.223 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, COSY), δ [ppm] = 7.91-7.83 (m, 3H, NHAc, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.75-7.72 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.44-7.39 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34-7.26 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.94-6.91 (m, 1H, NH-Urethane), 5.34 (d, 1H, J_{H_3,H_4} = 3.4 Hz, 4-H), 5.03 (d, 1H, J_{H_3,H_4} = 3.3 Hz, 3-H), 5.00-4.98 (m, 1H, 1-H), 4.51-4.18 (m, 8H, 6a-H {4.48}, CH₂-Fmoc {4.39}, 6b-H {4.36}, CH₂-Fmoc {4.32}, 5-H {4.31}, T ^{β} {4.30}, 2-H {4.29}, 9H-Fmoc {4.26}), 3.88 (d, 1H, $J_{T\alpha,NH}$ = 10.3 Hz, T ^{α}), 2.08 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.89, 1.87 (2s, 6H, 4 x CH₃ (OAc)), 1.13 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.3 Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, DMSO), δ [ppm] = 170.5 (C=O (NHAc)), 170.1, 170.0, (2 x C=O (OAc, Ester)), 156.6 (C=O (Urethane)), 144.0, 143.9 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 140.8 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 129.5, 129.0 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.2 (C-2-, C-7-Fmoc), 124.3, 124.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.2 (C-4-, C-5-Fmoc), 98.1 (C-1), 82.3 (d, $J_{F,C6}$ = 167.5 Hz, C-6), 75.3 (T ^{β}), 68.3 (C3), 68.2 (d, $J_{F,C5}$ = 20.2 Hz, C-5), 67.3 (d, $J_{F,C4}$ = 6.9 Hz, C-4), 65.5 (CH₂ (Fmoc)), 48.7 (T ^{α}), 46.9 (C-2), 46.8 (CH (Fmoc)), 22.9 (CH₃ (NHAc)), 20.6, 20.5 (3 x CH₃ (OAc)), 18.7 (T ^{γ}).

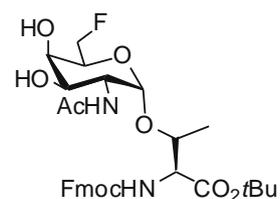
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 230.30 (dt, $J_{F,H5}$ = 16.3 Hz, $J_{F,H6}$ = 46.4 Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 653.20 ([M + Na]⁺, ber.: 653.21), 669.17 ([M + K]⁺, ber.: 669.32), 1283.43 ([2M + Na]⁺, ber.: 1283.44).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 653.2122 ([M + Na]⁺, ber.: 653.2125).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (16)^[256]**

(Fmoc-Thr-(α FGalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 770 mg (1.13 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₂FGalNAc)-OtBu (**15**) in 10 mL Methanol wurde so lange tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolatlösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde vier Tage bei Raumtemperatur und ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von saurem Ionenaustauscher *Amberlyst IR 120* neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc:MeOH 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 580 mg (85%, 0.96 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 26.5.$$

$$R_f = 0.1 \text{ (EtOAc:MeOH, 20:1)}$$

$R_t = 8.1$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O 5 min (30:70); (30:70)→(77:23), 30 min; →(100:0), 60 min; $\lambda = 208$ nm)

C₃₁H₃₉FN₂O₉(M= 602.264 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H3,H2} = J_{H6,H7} = 7.3$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H, $J_{H2,H3} = J_{H7,H6} = 6.9$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.89 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 7.6$ Hz, NH-Ac), 5.61 (d, 1H, $J_{NH, T\alpha} = 9.4$ Hz, NH-Urethan), 4.86 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.74 (m, 1H, 2-H), 4.59-4.38 (m, 3H, 5-H, 6a-H, 6b-H), 4.29-4.06 (m, 5H, 9-H-Fmoc, CH₂-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 3.93 (bs, 1H, 4-H), 3.83 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.7$ Hz, $J_{H3,H2} = 10.1$ Hz, 3-H), 2.11 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.46 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.32 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 174.2 (C=O (NHAc)), 171.5 (C=O (Ester)), 156.6 (C=O (Urethan)), 144.0, 143.8 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 128.01 128.0 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.3, 120.2 (C-4-, C-5-Fmoc), 99.7 (C-1), 83.7 (Cq (*t*Bu)), 83.6 (d, $J_{F,C6} = 167.8$ Hz, C-6), 76.8 (T ^{β}), 71.4 (C-3), 69.7 (d, $J_{F,C5} = 20.7$ Hz, C-5), 68.3 (d, $J_{F,C4} = 7.2$ Hz, C-4), 67.3 (CH₂ (Fmoc)), 59.1 (T ^{α}), 51.3 (C-2), 47.4 (CH (Fmoc)), 28.3 (CH₃ (*t*Bu)), 23.0 (CH₃ (NHAc)), 18.9 (T ^{γ}).

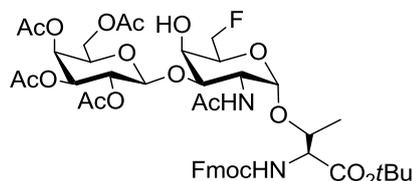
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -230.68 (s).

ESI-MS (positiv), m/z : 547.24 ([M - *t*Bu], ber.: 546.20), 625.29 ([M + Na]⁺, ber.: 625.25), 1227.59 ([2M + Na]⁺, ber.: 1227.52).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 625.2521 ($[M + Na]^+$, ber.: 625.2540).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (21)**^[256]

(Fmoc-Thr-(β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α FGalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 380 mg (0.63 mmol) Fmoc-Thr(α 6FGalNAc)-OtBu (**16**) in 7.5 mL einer Mischung aus absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (3:2) wurde mit 400 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å und 321 mg (1.26 mmol) Quecksilber(II)cyanid versetzt und 30 min unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von 512 mg (1.26 mmol) Ac₄GalBr (**20**) in 7.5 mL einer Mischung aus absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (3:2) dazugegeben und es wurde weitere zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Da kein Reaktionsumsatz zu erkennen war, wurde die Suspension mit einer weiteren Spatelspitze Quecksilber (II)cyanid versetzt und 5 h bei 80 °C (100W, 5 min Aufheizphase, p_{\max} = 5.0 bar) in der Mikrowelle reagieren gelassen. Danach wurde durch *Hyflo* (Supercell, Roth) in 40 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung filtriert und mit 40 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit je 30 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/°Hex, 5:2) gereinigt.

Ausbeute: 364 mg (61%, 0.39 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23}$ = (1.00, CHCl₃) = + 32.9.

R_f = 0.49 (EtOAc/MeOH, 20:1)

R_t = 18.7 min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O (50:50) \rightarrow (85:15), 40 min; \rightarrow (100:0) 50 min; λ = 214 nm)

C₄₅H₅₇FN₂O₁₈ (M = 932.359 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42 (t, 2H, $J_{H_3,H_2} = J_{H_6,H_7} = 7.3$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H, $J_{H_2,H_3} = J_{H_7,H_6} = 6.9$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.98 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.2$ Hz, NH-Ac), 5.46 (m, 1H, 4'-H), 5.36 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 8.9$ Hz, NH-Urethan), 5.19 (dd, 1H, $J_{H_3',H_4'} = 3.2$ Hz, $J_{H_3',H_2'} = 10.4$ Hz, 3'-H), 5.99-4.95 (m, 1H, 2'-H), 4.95 (m, 1H,

1-H), 4.83-4.81 (m, 1H, 1'-H), 4.70-4.47 (m, 5H, CH₂-Fmoc, 2-H, 5-H, 6a-H), 4.25-3.91 (m, 8H, T^α, T^β, 9H-Fmoc, 4-H, 5'-H, 6b-H, 6a/b'-H), 3.72-3.69 (m, 1H, 3-H), 2.18, 2.16, 2.08, 2.00 (4s, 12H, 4 x CH₃ (OAc)), 1.98 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.45 (s, 9H, (tBu)), 1.29 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 5.8$ Hz, T^γ).

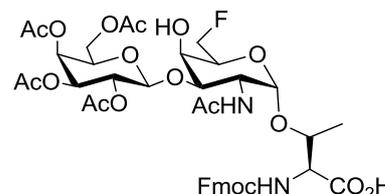
¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 170.4 (C=O (NHAc)), 170.2, 170.1, 170.0 (4 x C=O (OAc, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.9, 127.8 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 124.9, 124.8 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 101.6 (C-1'), 100.2 (C-1), 83.2 (d, $J_{F,C6} = 116.1$ Hz, C-6), 83.3 (Cq (tBu)), 77.2 (C-3), 76.7 (T^β), 70.7 (d, $J_{F,C5} = 18.5$ Hz, C-5), 70.6 (C-5'), 68.6 (C-3'), 67.9 (d, $J_{F,C4} = 6.6$ Hz, C-4), 67.5 (C-2'), 66.8 (CH₂ (Fmoc)), 66.0 (C-4'), 61.2 (C-6') 59.1 (T^α), 47.5 (C-2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (tBu)), 20.9, 20.8, 20.7 20.6, 20.5 (5 x CH₃ (OAc)), 18.7 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -229.8 (dt, $J_{F,H5} = 14.3$ Hz, $J_{F,H6} = 47.4$ Hz), -230.0 (dt, $J_{F,H5} = 13.9$ Hz, $J_{F,H6} = 47.4$ Hz).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 955.44 ([M + Na]⁺, ber.: 955.34).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 955.3470 ([M + Na]⁺, ber.: 955.3490).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galacto-pyranosyl)-L-threonin (23)^[256]
(Fmoc-Thr-(βAc₄Gal-(1→3)-αFGalNAc)-OH)**



Eine Lösung von 360 mg (0.39 mmol) Fmoc-Thr-(βAc₄Gal-(1→3)-αFGalNAc)-*O*tBu (**21**) in 5 mL Trifluoressigsäure und 0.5 mL Wasser wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05) gereinigt.

Ausbeute: 149 mg (44%, 0.17 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.29$ (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05)

$R_t = 20.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA 5 min (30:70); (30:70)→(90:10), 30 min; →(100:0), 60 min; $\lambda = 214$ nm)

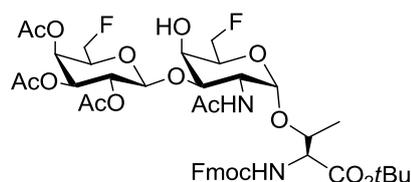
C₄₁H₄₉FN₂O₁₈ (M = 876.296 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 899.37 ($[M + Na]^+$, ber.: 899.28), 915.34 ($[M + K]^+$, ber.: 915.39).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 899.2861 ($[M + Na]^+$, ber.: 899.2864).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor-3-*O*-[6-desoxy-6-fluor,2,3,4,-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (17)^[256]**

(Fmoc-Thr-(β Ac₃FGal-(1 \rightarrow 3)- α AcFGalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 150 mg (0.25 mmol) Fmoc-Thr-(α 6FGalNAc)-OtBu (**16**) in 4 mL einer Mischung aus absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (3:2) wurde mit 200 mg frisch aktivierten Molekularsieb 4 Å und 125 mg (0.49 mmol) Quecksilber(II)cyanid versetzt und 30 min unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde eine Lösung von 185 mg (0.49 mmol) Ac₃GalFBr (**6**) in 4 mL einer Mischung aus absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (3:2) zugegeben. Das Gemisch wurde viermal je eine Stunde in der Mikrowelle bei 80 °C und 100 W (5 min Aufheizzeit, P_{\max} = 5.0 bar) reagieren gelassen. Anschließend wurde durch *Hyflo* (Supercell, Roth) in 20 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung filtriert und die wässrige Phase wurde mit 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde jeweils mit 10 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 162 mg (73%, 0.18 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +39.4.$$

R_f = 0.53 (^cHex/EtOAc, 1:5)

R_t = 27.2 min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O 5 min (30:70), (30:70)→(77:23), 30 min; →(100:0), 60 min; λ = 214 nm)

C₄₃H₅₄F₂N₂O₁₆ (M = 892.344 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42 (t, 2H, $J_{H_3,H_2} = J_{H_6,H_7} = 7.3$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H, $J_{H_2,H_3} = J_{H_7,H_6} = 6.9$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.96 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 8.8$ Hz, NH-Ac), 5.43 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz, NH-Urethan), 5.40 (bs, 1H, 4'-H), 5.20 (dd, 1H, $J_{H_2',H_1'} = 8.0$ Hz, $J_{H_2',H_3'} = 10.3$ Hz, 2'-H), 5.00-4.95 (m, 1H, 3'-H), 4.80

(m, 1H, 1-H), 4.74-4.63 (m, 2H, 1'-H, 6a-H), 4.60-4.49 (m, 6H, CH₂-Fmoc, 2-H, 5-H, 6b-H, 6a'-H), 4.39-4.34 (m, 1H, 6b'-H), 4.28-4.19 (m, 2H, T^α, 9H-Fmoc), 4.15-3.94 (m, 3H, T^β, 4-H, 5'-H), 3.71 (d, 1H, $J_{H3,H2} = 10.3$ Hz, 3-H), 2.15, 2.08, 1.97 (3s, 9H, 3 x CH₃ (OAc)), 2.00 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.45 (s, 9H, (tBu)), 1.25 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 170.2 (C=O (NHAc)), 170.1, 170.1, 170.0 (3 x C=O (OAc, Ester)), 156.3 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C-1a-,C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.8, 127.7 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.0 (C-2-, C-7-Fmoc), 124.9, 124.8 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 101.7 (C-1'), 100.0 (C-1), 83.4 (d, $J_{F,C6} = 168.3$ Hz, C-6), 83.1 (Cq (tBu)), 81.0 (d, $J_{F,C6} = 174.4$ Hz, C-6'), 77.3 (C-3), 76.8 (T^β), 71.8 (d, $J_{F,C5} = 22.2$ Hz, C-5'), 70.5 (C-3'), 69.2 (d, $J_{F,C5} = 22.3$ Hz, C-5), 68.3 (d, $J_{F,C4} = 7.2$ Hz, C-4), 68.2 (C-2'), 66.9 (d, $J_{F,C4} = 6.5$ Hz, C-4'), 66.8 (CH₂ (Fmoc)), 59.0 (T^α), 47.5 (C-2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (tBu)), 20.9, 20.8, 20.6 (3 x CH₃ (OAc)), 18.7 (T^γ).

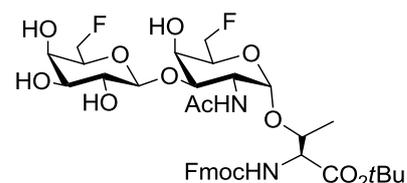
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -229.5 (dt, $J_{F,H5} = 14.7$ Hz, $J_{F,H6} = 46.7$ Hz), -230.6 (dt, $J_{F,H5} = 12.4$ Hz, $J_{F,H6} = 46.3$ Hz), -232.2 (dt, $J_{F,H5} = 13.9$ Hz, $J_{F,H6} = 45.5$ Hz).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 915.31 ([M + Na]⁺, ber.: 915.33), 1807.65 ([2M + Na]⁺, ber.: 1807.6).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 915.3334 ([M + Na]⁺, ber.: 915.3338).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor-3-*O*-[6-desoxy-6-fluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (36)**

(Fmoc-Thr-(βFGal-(1→3)-αFGalNAc)-*O*tBu)



Eine Lösung von 250 mg (0.28 mmol) Fmoc-Thr-(βAc₄Gal-(1→3)-αFGalNAc)-*O*tBu (**17**) in 20 mL Methanol wurde so lange tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanatlösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur und ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von verdünnter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA 10 min (50:50)→(77:23), 30 min, →(100:0) 50 min $\lambda = 214$ nm, $R_t = 22.6$ min) gereinigt.

Ausbeute: 159 mg (74%, 0.21 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 37.6.$

$R_t = 8.1$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (50:50)→(77:23), 10 min; →(100:0), 25 min; $\lambda = 214$ nm)

C₃₇H₄₈F₂N₂O₁₃ (M = 766.312 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, d-DMSO, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.90 (d, 1H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.73 (d, 1H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.62 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.8$ Hz, NH-Urethan),), 7.50 (d, 1H, $J_{NH,2H} = 9.7$ Hz, NH-Ac), 7.43-7.38 (m, 2H, 2-H-, 3-H-Fmoc), 7.34-7.25 (m, 2H, 6-H-, 7-H-Fmoc), 4.68 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.63-4.37 (m, 6H, 6a/b'-H, 6^a/b-H, CH₂-Fmoc {4.44}), 4.32 (d, 1H, $J_{H1',H2'} = 7.8$ Hz, 1'-H), 4.33-4.25 (m, 2H, 2-H {4.31}, 9H-Fmoc {4.30}), 4.22 (d, 1H, $J_{T\beta,T\alpha} = 1.4$ Hz, $J_{T\beta,T\gamma} = 6.4$ Hz, T ^{β}), 4.09 (d, 1H, $J_{T\alpha,T\beta} = 1.5$ Hz, $J_{T\alpha,NH} = 9.9$ Hz, T ^{α}), 4.00-3.97 (m, 1H, 5'-H), 3.95 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.8$ Hz, 4-H), 3.78-3.41 (m, 3H, 5-H {3.71}, 4'-H {3.63}, 3-H {3.62}), 3.36 (dd, 1H, $J_{H2',H1'} = 7.6$ Hz, $J_{H2',H3'} = 9.4$ Hz, 2'-H), 3.28 (dd, 1H, $J_{H3',H4'} = 3.2$ Hz, $J_{H3',H2'} = 9.5$ Hz, 3'-H), 1.85 (s, 3H, NHAc), 1.35 (s, 9H, (tBu)), 1.12 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, d-DMSO), δ [ppm] = 169.6 (C=O (NHAc)), 169.1 (C=O (Ester)), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 140.8 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.7 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.3, 125.2 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.2, 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 104.9 (C-1'), 99.4 (C-1), 83.8 (d, $J_{F,C6'} = 165.7$ Hz, C-6'), 83.3 (d, $J_{F,C6} = 165.3$ Hz, C-6), 81.3 (Cq (tBu)), 77.0 (C-3), 74.3 (T ^{β}), 73.1 (d, $J_{F,C5} = 20.4$ Hz, C-5), 72.9 (C-3'), 70.2 (C-2'), 69.7 (d, $J_{F,C5'} = 19.9$ Hz, C-5'), 68.0 (d, $J_{F,C4'} = 6.8$ Hz, C-4'), 67.7 (d, $J_{F,C4} = 7.6$ Hz, C-4), 65.6 (CH₂ (Fmoc)), 59.3 (T ^{α}), 47.2 (C-2), 46.7 (CH (Fmoc)), 27.6 (CH₃ (tBu)), 23.0 (CH₃ (NHAc)), 19.0 (T ^{γ}).

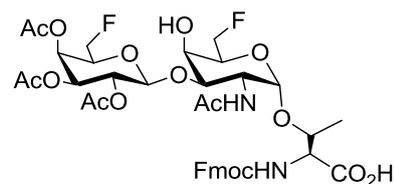
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 228.15 -228.89 (m).

ESI-MS (positiv), m/z : 789.29 ([M + Na]⁺, ber.: 789.30), 1555.63 ([2M + Na]⁺, ber.: 1555.61

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 767.3224 ([M + H]⁺, ber.: 768.3192).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor-3-*O*-[6-desoxy-6-fluor,2,3,4,-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (18)**^[256]

(Fmoc-Thr-(β Ac₃FGal-(1→3)- α FGalNAc)-OH)



Eine Lösung von 130 mg (0.15 mmol) Fmoc-Thr-(β Ac₃FGal-(1→3)- α FGalNAc)-OtBu (**17**) in 4 mL Trifluoressigsäure und 0.4 mL Anisol wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde mit 25 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05) gereinigt.

Ausbeute: 106 mg (87%, 0.13 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.46$ (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05)

$R_t = 20.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA 5 min (30:70); (30:70)→(90:10), 30 min; →(100:0), 60 min; $\lambda = 208$ nm)

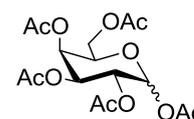
C₃₉H₄₆F₂N₂O₁₆ (M = 836.282 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 859.29 ([M + Na]⁺, ber.: 859.27), 1695.60 ([2M + Na]⁺, ber.: 1695.55).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 859.2726 ([M + Na]⁺, ber.: 859.2715).

Penta-*O*-acetyl- α/β -D-galactopyranose (19) ^[261, 262, 263]

(α/β Ac₅Gal)



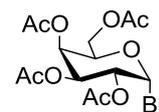
Unter Argonatmosphäre wurden 5.00 g (27.8 mmol) D-Galactose in 100 mL Pyridin gelöst und unter Rühren bei 0 °C langsam mit 50 mL Acetanhydrid versetzt. Die Suspension wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt bis eine klare Lösung entstand, welche schließlich auf Eiswasser gegossen wurde. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i.Vak entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 8.93 g (83%, 22.9 mmol), farbloser amorpher Feststoff (Anomerengemisch).

$R_f = 0.33$ (°Hex/EE 1:1).

C₁₆H₂₂O₁₁ (M = 390.116 g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[261]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid (20) ^[262, 263]**(α/β Ac₅GalBr)**

Es wurden 5 g (12.8 mmol) α/β Ac₅Gal (**19**), gelöst in 30 mL Dichlormethan, auf 0 °C abgekühlt und langsam mit 10 mL Bromwasserstoffsäure (33 % in Eisessig) versetzt. Anschließend wurde die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Hydrolyse wurde das Reaktionsgemisch mit 30 mL Dichlormethan verdünnt, auf Eiswasser gegossen und mit festem Natriumhydrogencarbonat unter Eiskühlung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit je 20 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und 20 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 4.24 g (85%, 10.8 mol) gelbes Öl

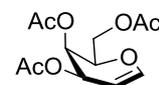
$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +183.7, \text{ Lit}^{[264]}: [\alpha]_D^{25} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +210$$

$R_f = 0.47$ (^cHex/EtOAc, 2:1)

C₁₄H₁₉BrO₉ (M=410.021 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.68 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.9$ Hz, 1-H), 5.50 (d, 1H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = 2.3$ Hz, 4-H), 5.39 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = 10.6$ Hz, 3-H), 5.03 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2, \text{H}_1} = 4.0$ Hz, $J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 10.6$ Hz, 2-H), 4.47 (t, 1H, $J_{\text{H}_5, \text{H}_{6a/b}} = 6.6$ Hz, 5-H), 4.20-4.06 (m, 2H, 6a,b-H), 2.14, 2.10, 2.04, 2.00 (4s, 12H, 4 x CH₃ (OAc))

Weitere analytische Daten siehe Literatur ^[264, 265]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (24) ^[266]**(Ac₃Gal)**

Es wurden 26.0 g (0.39 mol) Zinkpulver mit verdünnter Salzsäure (1 M) aktiviert und je zweimal mit dest. Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether gewaschen. Das aktivierte Zink wurde in 120 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt, mit 3.32 g (0.04 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 16.3 g (0.04 mol) des α Ac₄GalBr (**20**), gelöst in 100 mL Essigsäureethylester, langsam in der Hitze zugegeben. Es wurde noch eine weitere Stunde unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen wurde durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 70 mL Salzsäure (1 M) und 70 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde

mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 8.71 g (81%, 0.03 mol) farbloses Öl

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -20.1.$$

$$R_f = 0.43 (\text{^cHex/EtOAc, 2:1})$$

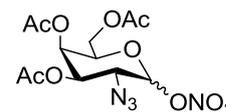
$$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7 \quad (M = 272.085 \text{ g/mol})$$

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.43 (dd, 1H, $J_{\text{H1,H3}} = 1.7 \text{ Hz}$, $J_{\text{H1,H2}} = 6.3 \text{ Hz}$, 1-H), 5.57-5.45 (m, 1H, 3-H), 5.44-5.40 (m, 1H, 4-H), 4.72-4.67 (m, 1H, 2-H), 4.32-4.29 (m, 1H, 5-H), 4.24-4.14 (m, 2H, 6a/b-H), 2.09, 2.05, 2.00 (3s, 9H, 3 x CH₃ (OAc))

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[267]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosyl-nitrat (**25**)^[107, 266]

(α/β Ac₃GalN₃ONO₂)

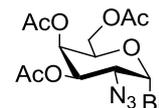


Zu einer auf -25 °C gekühlten Suspension aus, zuvor im Hochvakuum getrockneten, 95.2 g (0.17 mol) Cer(IV)-ammoniumnitrat und 5.63 g (0.09 mol) Natriumazid in 150 mL absol. Acetonitril wurden tropfenweise unter Argonatmosphäre 15.8 g (0.06 mol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**24**), gelöst in 60 mL absol. Acetonitril gegeben. Die Suspension wurde 18 h bei -18 °C kräftig gerührt. Danach wurde die intensiv gelbe Reaktionslösung durch Zugabe von 300 mL kaltem Diethylether verdünnt und auf Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 100 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

$$R_f = 0.58 (\text{^cHex/EtOAc, 2:1})$$

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

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[107]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (26)^[107, 266]**(α Ac₃GalN₃Br)**

Zu 35.2 g (0.41 mol) Lithiumbromid, suspendiert in 100 mL absol. Acetonitril, wurden unter Argonatmosphäre 16.5 g (0.04 mol) α/β Ac₃GalN₃ONO₂ (**25**) gelöst in 50 mL absol. Acetonitril getropft. Die Suspension wurde anschließend 14 h unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre gerührt. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und je zweimal mit 60 mL dest Wasser und ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.32 g (32%, 18.5 mmol über 2 Stufen) gelbes Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +140.9$, Lit. ^[266]: $[\alpha]_D^{25} = (1.95, \text{CHCl}_3) = +188.3$.

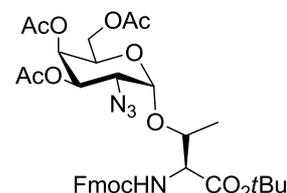
$R_f = 0.49$ (^cHex/EtOAc, 2:1)

C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (M = 393.017 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 6.45 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, 1-H), 5.48 (m, 1H, 4-H), 5.34 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.9$ Hz, $J_{H3,H2} = 10.7$ Hz, 3-H), 4.45 (pt, 1H, 5-H), 4.16-4.07 (m, 2H, 6a/b-H), 3.99 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 2.9$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.7$ Hz, 2-H), 2.14, 2.04, 2.03 (3s, 9H, 3 x CH₃(Ac)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.3, 169.7, 169.5 (3 x C=O (Ac)), 88.8 (C-1), 71.4 (C-5), 69.8 (C-3), 66.5 (C-4), 60.7 (C-6), 58.6 (C-2), 20.5, 20.6 (3 x CH₃ (OAc)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[105, 268]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-azido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galacto-pyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (27)**^[131, 258]**(Fmoc-Thr-(α Ac₃GalN₃)-OtBu)**

Eine Lösung von 7.71 g (18.7 mmol) Fmoc-Thr-OtBu (**12**) in 120 mL absol. Toluol/Dichlormethan-Gemisch (1:1) wurden mit 7 g frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å 45 min bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Die Suspension wurde auf 0 °C abgekühlt und mit 5.60 mg (19.6 mmol) Silbercarbonat und 857 mg (3.56 mmol) Silberperchlorat, gelöst in 6 mL absol. Toluol versetzt. Anschließend wurden 7.00 g (17.81 mmol) α Ac₃GalN₃Br (**26**), gelöst in 100 mL eines absol. Toluol/Dichlormethan-

Gemisches (1:1), über 25 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0 °C gerührt und schließlich binnen 18 h auf Raumtemperatur erwärmt und weitere vier Tage bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend wurde mit 150 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert und je zweimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/EtOAc, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: α Anomer: 6.92 g (54%, 9.76 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$\alpha + \beta$ Anomer 2.09 g (17%, 2.94 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.77$ (Dichlormethan/EtOAc, 10:1)

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 70.8$, Lit.^[258] $[\alpha]_D^{20} = (1.15, \text{CHCl}_3) = + 69.3$.

$\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{12}$ (M = 710.279 g/mol)

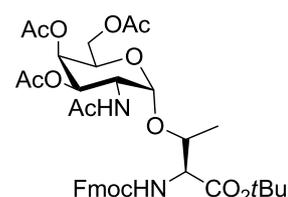
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.2$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = J_{\text{H}_6,\text{H}_7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35-7.31 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.66 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Urethan), 5.47 (d, 1H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 2.7$ Hz, 4-H), 5.35 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.2$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.1$ Hz, 3-H), 5.11 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.7$ Hz, 1-H), 4.46-4.28 (m, 6H, 5-H, 6a/b-H, 9-H-Fmoc, T^α , T^β), 4.11-4.09 (m, 2H, CH_2 -Fmoc), 3.64 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 3.8$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 11.1$ Hz, 2-H), 2.17 2.08, 2.05 (3 s, 9H, 3 x CH_3 (Ac)), 1.50 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.36 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.5$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.5, 170.2, 170.1 (3 x C=O(Ac)), 169.4 (C=O(Ester)), 157.0 (C=O(Urethan)), 144.0 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 129.2, 128.4 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.9 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.5 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.2, 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 99.4 (C-1), 83.1 (Cq (*t*Bu)), 76.5 (T^β), 69.2 (C-3), 67.8 (C-4), 67.3 (C-5), 66.0 (CH_2 (Fmoc)), 62.3 (C-6), 59.2 (T^α), 57.9 (C-2), 47.3 (CH (Fmoc)), 28.2 (CH_3 (*t*Bu)), 20.7, 20.7, 20.6 (3 x CH_3 (Ac)), 18.2 (T^γ).

ESI-MS (positiv), m/z : 733.15 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.:733.26).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[131, 132]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**28**)** ^[131, 258, 269]
(Fmoc-Thr-(α Ac₃GalNAc)-OtBu)



In 180 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) wurden 4.00 g (5.63 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₃GalN₃)-OtBu (**27**) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 7.42 g (0.11 mol) Zink-Staub gegeben, welcher zunächst durch eine 2%ige Kupfersulfat-Lösung (2.84 g in 80 mL dest Wasser) aktiviert und mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether getrocknet wurde. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 200 mL Tetrahydrofuran verdünnt und durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert. Das Filtrat wurde i. Vak. eingengt und anschließend fünfmal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 300 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit je 100 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:3) gereinigt.

Ausbeute: 3.57 mg (87%, 4.91 mmol) farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 59.8$, Lit. ^[258]: $[\alpha]_D^{20} = (1.03, \text{CHCl}_3) = + 61.3$

$R_f = 0.25$ (^cHex/EtOAc, 2:3)

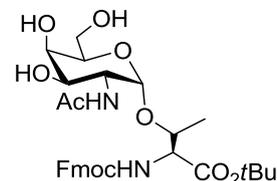
C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (M= 726.300 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.3$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = J_{\text{H}_8, \text{H}_7} = 7.2$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43-7.26 (m, 4H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 6.03 (d, 1H, $J_{\text{NH}, \text{T}\alpha} = 10.2$ Hz, NH-Urethan), 5.63 (d, 1H, $J_{\text{NH}, \text{H}_2} = 8.9$ Hz, NH-Ac), 5.39 (s, 1H, 4-H), 5.10 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 3.2$ Hz, $J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = 11.4$ Hz, 3-H), 4.89 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.5$ Hz, 1-H), 4.65-4.57 (m, 1H, 2-H), 4.48-4.43 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.28-4.08 (m, 6H, 5-H, 6a/b-H, 9H-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 2.16 (s, 3H, CH₃(Ac)), 2.04 (s, 3H, CH₃(AcNH)), 1.99 (s, 6H, 2 x CH₃(Ac)), 1.46 (s, 9H, (tBu)), 1.32 (d, 3H, $J_{\text{T}\beta, \text{T}\gamma} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.9 (C=O(NHAc)), 170.3, 170.3 (3 x C=O(Ac)), 170.0 (C=O(Ester)), 156.4 (C=O(Urethan)), 143.7, 143.7 (C-1a, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a, C-5a-Fmoc), 127.8, 127.8 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 100.0 (C-1), 83.2 (Cq (tBu)), 77.2 (T ^{β}), 68.7 (C-3), 67.4 (C-4, C-5), 67.3 (CH₂ (Fmoc)), 62.1 (C-6), 58.9 (T ^{α}), 47.3, 47.2 (C-2, CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (tBu)), 23.2 (CH₃ (NHAc)), 20.7, 20.7, 20.6 (3 x CH₃ (OAc)), 18.5 (T ^{γ}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[131]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (29)^[120, 146]
(Fmoc-Thr-(α GalN_{Ac})-OtBu)**



Eine Lösung von 5.00 g (6.88 mmol) Fmoc-Thr(α C₃GalN_{Ac})-OtBu (**28**) in 80 mL Methanol wurde so lange tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen Natriummethanolatlösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde drei Tage bei Raumtemperatur und ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von saurem Ionenaustauscher *Amberlyst IR 120* neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc: MeOH 20:1) gereinigt. Das als Nebenprodukt entstandene freie Amin wurde in 40 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 1.1 g (3.26 mmol) Fmoc-OSu versetzt. Anschließend wurde mit DIPEA ein pH-Wert von 9.5 eingestellt. Nach zwei Tagen Rühren bei Raumtemperatur wurde mit Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc: MeOH 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.06 g (74%, 5.09 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

$[\alpha]_D^{23}$ = (1.00, CHCl₃) = + 31.5; Lit.^[120]: $[\alpha]_D^{22}$ = (1.00, CHCl₃) = + 40.2

R_f = 0.14 (EtOAc:MeOH, 20:1)

C₃₁H₄₀N₂O₁₀ (M = 600.268 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H3,H2} = J_{H6,H7} = 7.0$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.31 (t, 2H, $J_{H2,H3} = J_{H7,H6} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.90 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.1$ Hz, NH-Ac), 5.82 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.2$ Hz, NH-Urethan), 4.87 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, 1-H), 4.44- 4.24 (m, 4H, CH₂-Fmoc, 9H-Fmoc, 2-H) 4.16-4.07 (m, 3H, T ^{α} , T ^{β} , 4-H), 3.86-3.83 (m, 4H, 3-H, 5-H, 6a/b-H), 2.10 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.45 (s, 9H, (tBu)), 1.29 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, T ^{γ}).

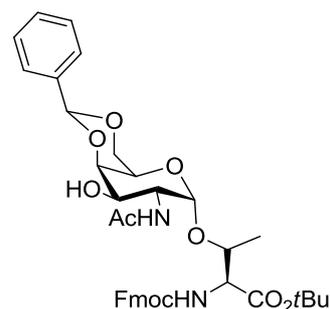
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.6 (C=O (NHAc)), 170.9 (C=O (Ester)), 156.5 (C=O(Urethan)), 143.7, 143.7 (C-1a, C-8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C-4a, C-5a-Fmoc), 129.0, 128.2 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.8, 127.7 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.3, 125.1 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 99.6 (C-1), 83.2 (Cq (tBu)), 76.4 (T ^{β}), 70.6 (C-3), 70.0 (C-4),

69.4 (C-5), 67.2 (CH₂(Fmoc)), 62.4 (C-6), 58.9 (T^α), 50.7 (C-2) 47.1 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 22.9 (CH₃ (NHAc)), 18.9 (T^γ).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 623.32 ([M + Na]⁺, ber.: 623.26), 1223.66 ([2 x M + Na]⁺, ber.: 1223.53).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[146]

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (30)**^[125, 131, 269]
(Fmoc-Thr-(α 4,6BznGalNAc)-*Ot*Bu)



Zu 2.10 g (3.49mmol) Fmoc-Thr(α GalNAc)-*Ot*Bu (**29**), gelöst in 50 mL Acetonitril, wurde 1.05 mL (6.99 mmol) Benzaldehyddimethylacetal gegeben. Durch Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure wurde ein pH-Wert von 4.0 eingestellt und die Lösung wurde 3 h bei 40 °C am Rotationsverdampfer bei einem Vakuum von 250 mbar gerührt. Es wurde mit Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 1.70 g (71%, 2.50 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 63.2$$

$$R_f = 0.30 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 1:3)}$$

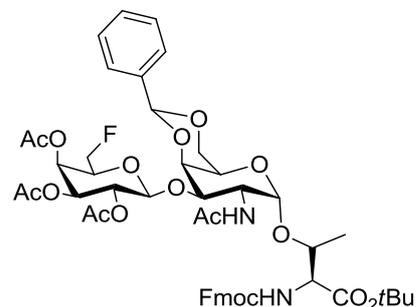
$$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10} (\text{M} = 688.763 \text{ g/mol})$$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = J_{\text{H}_8, \text{H}_7} = 6.9$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.55-7.50 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.44-7.31 (m, 7H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar} (Bzn)), 6.51 (d, 1H, $J_{\text{NH}, \text{H}_2} = 8.5$ Hz, NH-Ac), 5.57 (bs, 2H, CH (Bzn)), 5.52 (d, 1H, $J_{\text{NH}, \text{T}\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Urethan), 4.96 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.53-4.43 (m, 3H, 2-H-, 6a/b-H), 4.27-4.07 (m, 6H, CH-Fmoc, T^α, 4-H, CH₂-Fmoc, T^β), 3.87 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = 10.9$ Hz, $J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 2.9$ Hz, 3-H), 3.71 (s, 1H, 5-H), 2.04 (s, 3H, CH₃ (NHAc)), 1.47 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.29 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma, \text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[131]

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6-fluorgalacto-pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (31)^[256]**

(Fmoc-Thr-(β -Ac₃FGal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6BznGalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 812 mg (1.18 mmol) Fmoc-Thr-(α -4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu (**30**) in 12.5 mL einer Mischung aus absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (2:3) wurde mit 800 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å und 596 mg (2.36 mmol) Quecksilber(II)cyanid versetzt und 30 min unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde eine Lösung von 876 mg (2.36 mmol) Ac₃GalFBr (**6**), gelöst in einer Mischung aus 12.5 mL absol. Nitromethan und absol. Dichlormethan (2:3), zugegeben. Das Gemisch wurde eine Stunde in der Mikrowelle bei 80 °C und 100 W (5 min Aufheizphase, $p_{\max}=5.0$ bar) reagieren gelassen. Anschließend wurde durch *Hyflo* (*Supercell, Roth*) in 80 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung filtriert und die wässrige Phase wurde mit 80 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit je 40 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:3) gereinigt.

Ausbeute: 1.13 g (98% 1.15 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 64.7.$$

$$R_f = 0.29 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 2:3)}$$

$R_t = 7.7$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O (70:30) \rightarrow (85:15), 30 min; \rightarrow (100:0) 40 min; $\lambda = 208$ nm)

$$\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{FN}_2\text{O}_{17} \text{ (M = 975.405 g/mol)}$$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.79 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 6.8$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.57-7.53 (m, 2H, H_{Ar}-Bzn), 7.45-7.31 (m, 7H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}-Bzn), 5.85 (d, 1H, $J_{\text{NH,2H}} = 8.8$ Hz, NH-Ac), 5.56 (s, 1H, CH-Bzn), 5.44 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.0$ Hz, NH-Urethan), 5.40-5.37 (m, 1H, 4'-H), 5.21 (dd, 1H, $J_{\text{H2',H1'}} = 7.4$ Hz, $J_{\text{H2',H3'}} = 9.8$ Hz, 2'-H), 5.00-4.94 (m, 2H, 3'-H {4.99}, 1-H {4.94}), 4.76 (d, 1H, $J_{\text{H1',H2'}} = 7.2$ Hz, 1'-H), 4.67-4.61 (m, 1H, 2-H), 4.50-4.37

(m, 3H, CH₂-Fmoc {4.50}, 6a'-H {4.48}), 4.37-4.33 (m, 1H, 4-H), 4.30-4.21 (m, 4H, 6b'-H {4.30}, 9H-Fmoc {4.25}, T^α {4.23}, 6a-H {4.21}, T^β {4.18}), 4.14-4.05 (m, 2H, 6b-H {4.10}, 5'-H {4.06}), 3.88 (d, 1H, $J_{H3,H2} = 8.7$ Hz, 3-H), 3.70 (bs, 1H, 5-H), 2.15, 2.09, 2.00, 1.92 (4s, 12H, 4 x CH₃ (Ac)), 1.46 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.25 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 170.7 (C=O (NHAc)), 170.2, 170.0, 169.9 (3 x C=O (OAc, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 137.4 (Cq (Bzn)), 128.8, 128.2, 128.1 (C_{Ar} (Bzn)), 127.8, 127.7 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 126.2 (C_{Ar} (Bzn), 124.9 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 101.4 (C-1'), 100.6 (CH (Bzn)), 100.2 (C-1), 83.2 (Cq (*t*Bu)), 81.3 (d, $J_{F,C6'} = 171.5$ Hz, C-6'), 76.1 (T^β), 75.2 (C-4), 75.1 (C-3), 71.4 (d, $J_{F,C5'} = 21.3$ Hz, C-5'), 70.3 (C-3'), 69.3 (C-6), 68.7 (C-2'), 67.6 (d, $J_{F,C4'} = 5.3$ Hz, C-4'), 66.8 (CH₂ (Fmoc)), 63.7 (C-5), 58.9 (T^α), 47.9 (C-2), 47.3 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 20.8, 20.7, 20.6, 20.1 (4 x CH₃ (Ac)), 18.9 (T^γ).

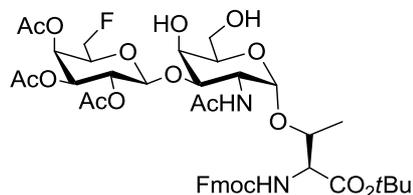
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -229.6 (m), -230.1 (dt, $J_{F,H5} = 13.3$ Hz, $J_{F,H6} = 46.7$ Hz), -232.2 (dt, $J_{F,H5} = 13.8$ Hz, $J_{F,H6} = 46.2$ Hz).²

ESI-MS (positiv), *m/z*: 979.41 ([M + Na]⁺, ber.: 978.37), 1017.34 ([M + K]⁺, ber.: 1017.47), 996.75 ([2M + K]⁺, ber.: 1995.85).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1001.3681 ([M + Na]⁺, ber.: 1001.3698), 1017.34 ([M + K]⁺, ber.: 1017.47), 1996.75 ([2M + K]⁺, ber.: 1995.85).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-D-6-desoxy-6-fluor-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (32)**

(Fmoc-Thr-(β-Ac₃FGal-(1→3)-α4,6GalNAc)-*Ot*Bu)**



Variant A:

Eine Lösung aus 819 mg (0.84 mmol) Fmoc-Thr-(β-Ac₃FGal-(1→3)-α4,6BznGalNAc)-*O**t*Bu (**31**) in 50 mL eines Gemisches aus Dichlormethan und Methanol (4:1) wurde mit 800 mg aktiviertem Kieselgel (SiO₂*NaHSO₄)^[126] versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit festem NaHCO₃ neutralisiert, dreimal mit je 50 mL einer ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 50 mL einer gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im

Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 460 mg (62%, 0.52 mmol) farbloser, amorpher Feststoff

Variante B:

Eine Lösung von 847 mg (0.87 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃GalF-(1 \rightarrow 3)- α 4,6BznGalNAc)-OtBu (**31**) in 90 mL Methanol wurde mit einer Mikrospatelspitze Iod und zwei Tropfen dest. Wasser versetzt. Das Gemisch wurde bis zum vollständigen Reaktionsumsatz unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und mit je 60 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 617 mg (80%, 0.69 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 43.2$$

$$R_f = 0.13 \text{ (}^c\text{Hex/EtOAc, 1:5)}$$

$R_t = 13.1$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O (50:50) \rightarrow (85:15), 40 min; \rightarrow (100:0) 50 min; $\lambda = 214$ nm)

C₄₃H₅₅FN₂O₁₇ (M = 891.333 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.79 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 6.3$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42 (t, 2H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = J_{\text{H}_7,\text{H}_8} = 7.3$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.13 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.5$ Hz, NH-Ac), 5.67 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 8.8$ Hz, NH-Urethan), 5.42 (d, 1H, $J_{\text{H}_4',\text{H}_3'} = 3.3$ Hz, 4'-H), 5.21 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2',\text{H}_1'} = 8.2$ Hz, $J_{\text{H}_2',\text{H}_3'} = 10.5$ Hz, 2'-H), 5.00 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3',\text{H}_4'} = 3.1$ Hz, $J_{\text{H}_3',\text{H}_2'} = 10.5$ Hz, 3'-H), 4.85 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 2.9$ Hz, 1-H), 4.66 (d, 1H, $J_{\text{H}_1',\text{H}_2'} = 7.8$ Hz, 1'-H), 4.60-4.47 (m, 3H, 2-H, 6 a-H, 6a'-H), 4.44-4.36 (m, 2H, 6b-H, 6b'-H), 4.30-4.12 (m, 4H, 4-H, 9H-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 3.99 (dd, 1H, $J_{\text{H}_5',\text{H}_6'} = 5.8$ Hz, $J_{\text{H}_5',\text{H}_6'} = 12.0$ Hz, 5'-H), 3.91-3.81 (m, 3H, CH₂-Fmoc, 5-H), 3.73 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.3$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 10.8$ Hz, 3-H), 2.17, 2.11, 2.01 (3s, 9H, 3 x CH₃), 2.04 (s, 3 H, NHAc) 1.46 (s, 9H, (tBu)), 1.28 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.2$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, HMQC), δ [ppm] = 170.2 (C=O (NHAc)), 170.1, 170.0, 169.8 (3 x C=O (OAc, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7, (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.4 (C-4a, C-5a-Fmoc), 127.8 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.2 (C-4-, C-5-Fmoc), 101.7 (C-1'), 100.2 (C-1), 83.3 (Cq (tBu)), 81.0 (d, $J_{\text{F},\text{C}6'} = 172.2$ Hz, C-6'), 77.3 (C-3), 76.5 (T ^{β}), 71.9 (d, $J_{\text{F},\text{C}5'} = 22.4$ Hz, C-5'), 70.7 (C-3'), 70.1 (C-5),

69.7 (C-4), 68.5 (C-2'), 67.1 (d, $J_{F,C4'} = 6.2$ Hz, C-4'), 66.8 (C-6), 62.7 (CH₂ (Fmoc)), 59.2 (T^α), 47.8 (C-2), 47.3 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 23.4 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.7, 20.6 (3 x CH₃ (Ac)), 18.8 (T^γ).

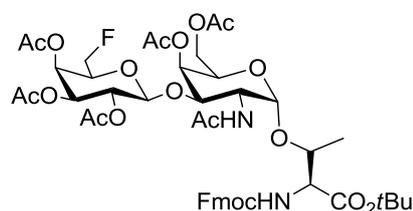
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = -230.7 (dt, $J_{F,H5} = 12.4$ Hz, $J_{F,H6} = 46.1$ Hz).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 913.30 ([M + Na]⁺, ber.: 914.32), 1803.63 ([2M + Na]⁺, ber.: 1805.65).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 913.3383 ([M + Na]⁺, ber.: 913.3385).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-D-6-desoxy-6-fluorgalacto-pyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (34)**

(Fmoc-Thr-(β-Ac₃FGal-(1→3)-αAc₂GalNAc)-*Ot*Bu)



Es wurden 290 mg (0.33 mmol) von Fmoc-Thr-(β-Ac₃FGal-(1→3)-αGalNAc)-*Ot*Bu (**32**) in 10 mL Pyridin und 5 mL Acetanhydrid gelöst. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 283 mg (89%, 0.29 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +48.40$

$R_f = 0.35$ (^cHex/EtOAc, 1:3)

$R_t = 21.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(85:15), 40 min; →(100:0) 50 min; $\lambda = 214$ nm)

C₄₇H₅₉FN₂O₁₉ (M = 974.370 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC) δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.9$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43-7.39 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33-7.30 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.04 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.6$ Hz, NH-Ac), 5.55 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.3$ Hz, NH-Urethan), 5.40 (dd, 1H, $J_{H4',H5'} = 0.8$ Hz, $J_{H4',H3'} = 3.3$ Hz, 4'-H), 5.36 (bs, 1H, 4-H), 5.08 (dd, 1H, $J_{H2',H1'} = 7.8$ Hz, $J_{H2',H3'} = 10.5$ Hz, 2'-H), 4.94 (dd, 1H, $J_{H3',H4'} = 3.3$ Hz, $J_{H3',H2'} = 10.5$ Hz, 3'-H), 4.80 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 2.9$ Hz, 1-H), 4.60 (d, 1H, $J_{H1',H2'} = 7.8$ Hz, 1'-H), 4.59-4.50 (m, 3H, 2-H, 6a/b-H), 4.43 (ddd, 2H, $J_{H6a/b',H5} = 5.0$ Hz, $J_{H6a',H6b'} = 9.7$ Hz, $J_{H6a/b',F} = 46.8$ Hz, 6a/b'-H), 4.26-4.12 (m, 4H, 9H-Fmoc, CH₂-Fmoc, 5-H,

T^β), 4.01-3.89 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, T^α , 5^γ-H), 3.84 (d, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.2$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 10.9$ Hz, 3-H), 2.15, 2.13, 2.07, 2.05, 1.99(5s, 15H, 5 x CH_3 (Ac)), 1.96 (s, 3H, NHAc) 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.27 (d, 3H, $J_{\text{T}_\gamma,\text{T}^\beta} = 6.0$ Hz, 3 T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , HMQC), δ [ppm] = 170.6, 170.5, 170.4, 170.3, 170.2 (5 x C=O (OAc, Ester)), 169.8 (C=O (NHAc)), 156.6 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7, (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 128.0 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.0, (C-1-, C-8-Fmoc), 120.3 (C-4-, C-5-Fmoc), 101.0 (C-1'), 100.3 (C-1), 83.4 (Cq (*t*Bu)), 81.1 (d, $J_{\text{F},\text{C}6'} = 171.1$ Hz, C-6'), 77.4 (T^β), 72.9 (C3), 71.9 (d, $J_{\text{F},\text{C}5'} = 22.6$ Hz, C-5'), 70.8 (C-3'), 69.4 (C-4), 68.6 (C-2'), 68.1 (C5), 67.0 (d, $J_{\text{F},\text{C}4'} = 6.2$ Hz, C-4'), 66.9 (C-6), 63.1 (CH_2 (Fmoc)), 59.2 (T^α), 48.7 (C-2), 47.4 (CH (Fmoc)), 28.2 (CH_3 (*t*Bu)), 23.5 (CH_3 (NHAc)), 20.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (5 x CH_3 (OAc)), 18.8 (T^γ).

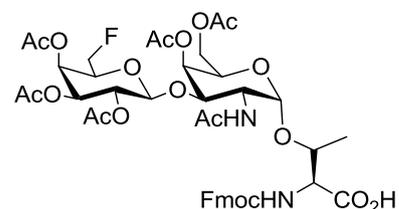
$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = - 229.95 (dt, $J_{\text{F},\text{H}5} = 12.2$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}6} = 46.5$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 997.31 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 997.35), 1972.69 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1971.73).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 997.3606 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 997.3594).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6-fluorgalacto-pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (33)**

(Fmoc-Thr-(β -Ac₃FGal-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-OH)



Eine Lösung von 320 mg (0.33 mmol) Fmoc-Thr-(β -Ac₃FGal-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu (**34**) in 5 mL Trifluoressigsäure und 0.5 mL dest. Wasser wurde 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05) gereinigt.

Ausbeute: 252 mg (83%, 0.27 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.44$ (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05)

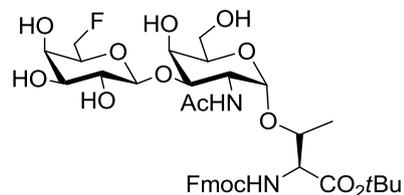
$R_t = 20.0$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA 5 min (30:70); (30:70)→(90:10), 30 min; →(100:0), 60 min; $\lambda = 214$ nm)

C₄₃H₅₁FN₂O₁₉ (M = 918.307 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 941.34 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 941.30).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 941.3003 ($[M+Na]^+$, ber.: 941.2968).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-desoxy-3-*O*-[β -D-6-desoxy-6-fluor-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**35**)
(Fmoc-Thr-(β FGal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-OtBu)**



Eine Lösung von 170 mg (0.19 mmol) **32** in 10 mL Methanol wurde so lange tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolatlösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur und ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von verdünnter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (30:70) \rightarrow (90:10), 30 min, \rightarrow (100:0) 60 min λ = 214 nm, R_t = 29.3 min) gereinigt.

Ausbeute: 71 mg (49%, 0.09 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 37.8.$$

R_t = 15.8 min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (70:30) \rightarrow (90:10), 30 min; \rightarrow (100:0), 60 min; λ = 214 nm)

C₃₇H₄₉FN₂O₁₄ (M = 764.317 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, d-DMSO, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.90 (d, 1H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.74 (d, 1H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.63 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.8$ Hz, NH-Urethan),), 7.48 (d, 1H, $J_{NH,2H} = 9.8$ Hz, NH-Ac), 7.43-7.38 (m, 2H, 2-H-, 3-H-Fmoc), 7.34-7.27 (m, 2H, 6-H-, 7-H-Fmoc), 4.63 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, 1-H), 4.60-4.37 (m, 4H, 6a/b'-H, CH₂-Fmoc {4.24}), 4.31 (d, 1H, $J_{H1',H2'} = 7.4$ Hz, 1'-H), 4.31-4.19 (m, 3H, 9H-Fmoc {4.31}, 2-H {4.28}, T ^{β} {4.20}), 4.07 (d, 1H, $J_{T\alpha,T\beta} = 1.4$ Hz, $J_{T\alpha,NH} = 9.9$ Hz, T ^{α}), 3.92 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.3$ Hz, 4-H), 3.72-3.55 (m, 4H, 5'-H {3.71}, 4'-H {3.64}, 5-H {3.63}, 3-H {3.60}), 3.50-3.43 (m, 2H, 6a/b-H), 3.35 (dd, 1H, $J_{H2',H1'} = 7.7$ Hz, $J_{H2',H3'} = 9.4$ Hz, 2'-H), 3.27 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, $J_{H3,H2} = 9.5$ Hz, 3'-H), 2.08 (s, 3H, NHAc), 1.37 (s, 9H, (tBu)), 1.15 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, d-DMSO), δ [ppm] = 169.7 (C=O (NHAc)), 169.1 (C=O (Ester)), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 140.8 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.8 127.7 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.1 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.2, 124.9 (C-1-, C-8-

Fmoc), 120.2, 120.1 (C-4-, C-5-Fmoc), 104.9 (C-1'), 99.3 (C-1), 83.4 (d, $J_{F,C6'} = 165.4$ Hz, C-6'), 81.3 (Cq (*t*Bu)), 77.7 (C-3), 74.0 (T^β), 73.1 (d, $J_{F,C5'} = 19.6$ Hz, C-5'), 72.9 (C-3'), 71.7 (C-5), 70.3 (C-2'), 68.1 (d, $J_{F,C4'} = 6.8$ Hz, C-4'), 67.9 (C-4), 65.7 (CH₂ (Fmoc)), 60.7 (C-6), 59.3 (T^α), 47.4 (C-2), 46.8 (CH (Fmoc)), 27.6 (CH₃ (*t*Bu)), 23.0 (CH₃ (NHAc)), 19.1 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 227.23 -227.67 (m).

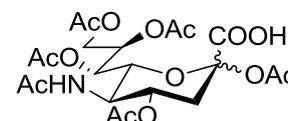
ESI-MS (positiv), *m/z*: 787.38 ([M + Na]⁺, ber.: 787.31), 1551.77 ([2M + Na]⁺, ber.: 1551.70).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 787.3047 ([M + Na]⁺, ber.: 787.3066).

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

(40)^[270]

(α/β Ac₅NeuNAcCOOH)



Eine Lösung von 10.0 g (0.03 mol) *N*-Acetylneuraminsäure in 120 mL Pyridin wurde unter Eiskühlung langsam mit 60 mL Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde viermal mit je 80 mL Toluol und zweimal mit je 80 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

$R_f = 0.22$ (EtOAc)

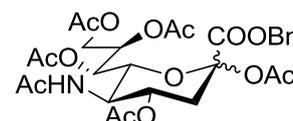
C₂₁H₂₉NO₁₄ (M = 519.159 g/mol)

ESI-MS (positiv), *m/z*: 542.13 ([M + Na]⁺, ber.: 542.15), 1061.26 ([2M + Na]⁺, ber.: 1061.31).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[271]

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5,-dideoxy- α,β -D-galacto-2-nonulopyranosid (41)^[270]

(α/β Ac₅NeuNAcCOOBn)



Zu einer Lösung von 16.6 g (0.03 mol) α/β Ac₅NeuAcCOOH (40) in 100 mL Ethanol wurde unter Rühren portionsweise eine Lösung von 17.9 g (0.06 mol) Cäsiumcarbonat in 30 mL Wasser gegeben. Nach Abklingen der Gasentwicklung wurde noch weitere 45 min gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit

je 80 mL Toluol kodestilliert, bevor er in 100 mL DMF aufgenommen und langsam mit 42 mL (0.35 mol) Benzylbromid versetzt wurde. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL Essigester aufgenommen und von dem ausgefallenen Cäsiumbromid abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:7) gereinigt.

Ausbeute: 15.1 g (76% über 2 Stufen, 0.025) leicht gelber Feststoff.

$R_f = 0.30$ (EtOAc)

$C_{28}H_{35}NO_{14}$ (M=609.206 g/mol)

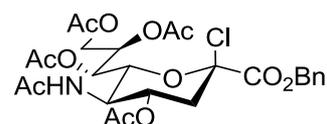
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.34-7.30 (m, 5H, H_{Ar}-Bn), 5.60 (d, 1H, $J_{NH,H5} = 9.4$ Hz, NH). 5.36 (dd, 1H, $J_{H4,H3ax} = 1.7$ Hz, $J_{H4,H3äq} = 5.2$ Hz, 4-H), 5.23-5.05 (m, 4H, 6-H, 7-H, CH₂-Bn,) 4.43 (dd, 1H, $J_{H9a,H8} = 2.6$ Hz, $J_{H9a,H9b} = 12.4$ Hz, 9a-H), 4.15-4.10 (m, 3H, 5-H, 8-H, 9b-H), 2.52 (dd, 1H, $J_{H3äq,H4} = 5.0$ Hz, $J_{H3äq,H3ax} = 13.5$ Hz, 3-H_{äq}), 2.10, 2.08, 2.07, 1.99, 1.85 (s, 19H, NHAc, OAc, 3-H_{ax}).

ESI-MS (positiv), m/z : 632.17 ([M + Na]⁺, ber.: 632.19), 1241.40 ([2M + Na]⁺, ber.: 1241.40).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[272]

Benzyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chlor-3,5,-dideoxy- α,β -D-galacto-2-nonulopyranosid (42)^[59]

(α/β Ac₅NeuNAcCOOBn-Cl)



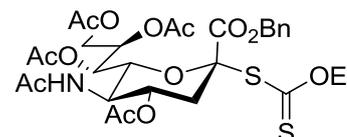
Zu 15.1 g (0.03 mol) α/β Ac₅NeuAcCOOBn (**41**) wurden 37.8 mL auf 0°C gekühltes Acetylchlorid und 0.4 mL Wasser gegeben. Die Mischung wurde vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Acetylchlorid i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

$R_f = 0.49$ (EtOAc)

$C_{26}H_{32}ClNO_{12}$: (M = 585.161 g/mol)

***O*-Ethyh-*S*-(benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chloro-3,5,-dideoxy- α,β -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat)dithiocarbonat (43)^[270, 273]**

(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)



Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Lösung von 14.7 g (25.1 mmol) α Ac₄NeuNAcCOOBnCl (42) in 300 mL Ethanol 7.65 g (0.047 mol) Kaliumxanthogenat gegeben. Nach drei Tagen Rühren unter Lichtausschluss wurde mit Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je 100 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:5) gereinigt.

Ausbeute: 10.4 g (61% über 2 Stufen, 15.5 mmol) leicht gelber Feststoff.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 34.5, \text{Lit.}^{[274]}$; $[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 34.1$

$R_f = 0.38$ (EtOAc)

C₂₉H₃₇NO₁₃S₂: (M = 671.171 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.35-7.30 (m, 5H, H_{Ar}-Bn), 5.34-5.14 (m, 5H, 7-H, 8-H, CH₂-Bn, NH), 4.82 (td, 1H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 4.2$ Hz, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 10.7$ Hz, 4-H), 4.57 (dd, 1H, $J_{\text{H}_6,\text{H}_7} = 2.1$ Hz, $J_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 10.8$ Hz, 6-H), 4.42-3.87 (m, 4H, 5-H, 9-H, OCH₂CH₃), 2.63 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3\text{äq},\text{H}_4} = 4.4$ Hz, $J_{\text{H}_3\text{eq},\text{H}_3\text{ax}} = 12.6$ Hz, 3-H_{äq}), 2.12-1.96 (m, 19H, 6 x CH₃, 3-H_{ax}), 1.23 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, OCH₂CH₃).

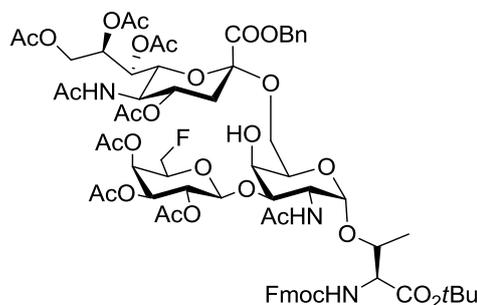
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 207.1 ((C=S), 170.8, 170.6, 170.3, 170.2, (C=O), 168.0 (C-1), 135.0 (C_q (Bn)), 128.9, 128.7, 128.4, 128.0 (C_{Ar} (Bn)), 86.6 (C-2), 75.4, 70.8, 70.7, 68.1, 68.0 (C-4, C-6, C-7, C-8, CH₂ (Bn), OCH₂CH₃), 62.2 (C-9), 49.1 (C-5), 37.2 (C-3), 23.2 (CH₃ (NHAc)), 21.2, 20.9 (CH₃ (OAc)), 13.1 (OCH₂CH₃).

ESI-MS (positiv), m/z : 694.26 ([M + Na]⁺, ber.: 694.16), 1365.56 ([2M + Na]⁺, ber.: 1365.33).

Weitere analytischen Daten siehe Literatur^[131, 274]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (44)^[256]**

(Fmoc-Thr-(β Ac₃FGal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcOOBn-(2,6)]- α GalNAc)-OtBu)



Methylsulphenylbromid-Lösung:

Eine Lösung von 354 μ L Dimethylsulfid in 5 mL absol. Dichlorethan wurde unter Argonatmosphäre mit 205 μ L Brom versetzt. Die Lösung wurde 13 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt.

Sialylierung:

Es wurden 678 mg (1.01 mmol) Ac₄NeuNAcCOOBn-Xan (**43**) in 3 mL absol. Dichlorethan und 6 mL absol. Acetonitril gelöst, mit 1 g frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å versetzt und über Nacht unter Argonatmosphäre gerührt. Abschließend wurden 360 mg (0.40 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃GalF-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-OtBu (**32**), gelöst in 4 mL absol. Dichlorethan und 8 mL absol. Acetonitril, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde auf -40 °C abgekühlt, bevor unter Lichtausschluss 260 mg (1.01 mmol) Silbertriflat und 631 μ L einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulphenylbromid-Lösung zugesetzt wurden. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei -45 °C bis -30 °C gerührt. Anschließend wurde DIPEA zur Hydrolyse zugeben und weitere 15 min bei -40 °C gerührt. Die auf Raumtemperatur erwärmte Reaktionsmischung wurde schließlich mit 20 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1 \rightarrow EE) gereinigt.

Ausbeute: 514 mg (88%, 0.36 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +15.85$

$R_f = 0.12$ (^cHex/EtOAc, 1:5)

$R_t = 26.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O 5 min (30:70), (30:70)→(77:23), 30 min, →(100:0), 60 min $\lambda = 208$ nm)

C₆₉H₈₆FN₃O₂₉ (M = 1439.533 g/mol)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY) δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.3$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43-7.32 (m, 9H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 5.89 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.8$ Hz, NH-Ac), 5.43 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.1$ Hz, NH-Urethan), 5.43-5.41 (m, 1H, 4'-H), 5.33-5.28 (m, 2H, 8''-H {5.33}, 7''-H {5.30}), 5.23- 5.18 (m, 3H, 2'-H {5.22}, CH₂-Bn {5.20}), 5.12 (d, 1H, $J_{NH,H5} = 8.7$ Hz, NH-NeuNAc), 4.98 (dd, 1H, $J_{H3',H4'} = 2.7$ Hz, $J_{H3',H2'} = 10.5$ Hz, 3'-H), 4.87-4.80 (m, 1H, 4''-H), 4.73 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, 1-H), 4.66 (d, 1H, $J_{H1',H2'} = 7.7$ Hz, 1'-H), 4.55-4.50 (m, 3H, CH₂-Fmoc {4.53}, 2-H {4.52}), 4.46-4.43 (m, 1H, 6a'-H), 4.36-4.25 (m, 3H, 6b'-H {4.33}, 9a''-H {dd, 4.30, $J_{H9a'',H8''} = 2.1$ Hz, $J_{H9a'',H9b''} = 12.1$ }), 9H-Fmoc {4.25}), 4.16 (d, 1H, $J_{T\alpha,T\beta} = 10.0$ Hz, T ^{α}), 4.11-4.01 (m, 4H, T ^{β} {4.11}, 9a''-H {4.08}, 5''-H, 6''-H {4.05}), 3.98-3.89 (m, 3H, 5'-H {3.95}, 4-H {3.93}, 6a-H {3.89}), 3.81 (bs, 1H, 5-H), 3.55 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 5.1$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.0$ Hz, 6b-H), 2.61 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.4$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q, H3ax} = 12.7$ Hz, 3''-H _{$\ddot{a}q$}), 2.48 (s, 1H, OH), 2.15, 2.11, 2.09, 2.00, 1.98, 1.95, 1.86 (7s, 27 H, 9 x CH₃ (OAc)), 1.94-1.90 (m, 1H, 3''-H_{ax}), 1.45 (s, 9H, *t*Bu), 1.24 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 170.3 (2 x C=O (NHAc)), 170.3, 170.2, 169.9 169.8 167.5 (6 x C=O (OAc, Ester)), 156.6 (C=O (Urethan)), 143.9, 143.8 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 135.0 (Cq (Bn)), 128.9, 128.6, (C_{Ar} (Bn)), 128.5 (C-3-, C-6- Fmoc), 128.0 (C-2-, C-7-Fmoc), 127.3 (C_{Ar} (Bn)), 125.0 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.2 (C-4-, C-5-Fmoc), 101.8 (C-1'), 100.4 (C-1), 98.9 (C-2''), 83.2 (Cq (*t*Bu)), 81.1 (d, $J_{F,C6'} = 171.0$ Hz, C-6'), 77.4 (C-3), 77.2 (T ^{β}), 72.9 (C-6''), 71.9 (d, $J_{F,C5'} = 23.4$ Hz, C-5'), 70.8 (C-3'), 69.1 (C-8''), 69.1 (C-5), 69.0 (C-4''), 68.6 (C-2'), 67.6 (C-4), 67.5 (CH₂ (Bn)), 67.1 (d, $J_{F,C4'} = 6.2$ Hz, C-4'), 67.0 (C-7''), 66.9 (CH₂ (Fmoc), C-1'), 63.7 (C-6), 62.5 (C-9''), 59.2 (T ^{α}), 49.2 (C-5''), 47.8 (C-2), 47.3 (CH (Fmoc)), 37.5 (C-3''), 28.2 (CH₃ (*t*Bu)), 23.5, 23.2 (2 x CH₃, (NHAc)), 20.9, 20.8, 20.7 (7 x CH₃ (OAc)), 18.8 (T ^{γ}).

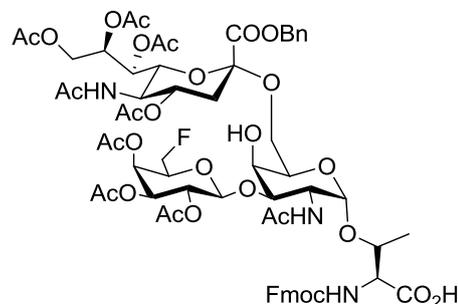
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 230.4 (dt, $J_{F,H5} = 12.8$ Hz, $J_{F,H6} = 46.2$ Hz)

ESI-MS (positiv), m/z : 1462.46 ([M +Na]⁺, ber.: 1462.52).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1462.5206 ([M +Na]⁺, ber.: 1462.5228).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- 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-threonin (45)**

(Fmoc-Thr-(β Ac₃FGal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcOOBn-(2,6)]- α GalNAc)-OH)



Eine Lösung von 200 mg (0.14 mmol) Fmoc-Thr-(β Ac₃FGal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcOOBn-(2,6)]- α GalNAc)-*O**t*Bu (**44**) in 4 mL Trifluoressigsäure und 0.4 mL Anisol wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05) gereinigt.

Ausbeute: 124 mg (62%, 0.09 mmol) farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 23.49.$

$R_f = 0.14$ (EtOAc/MeOH/AcOH, 4:1:0.05)

$R_t = 8.1$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (50:50) \rightarrow (77:23), 10 min, \rightarrow (100:0), 30 min $\lambda = 256$ nm)

C₆₅H₇₈FN₃O₂₉ (M = 1383.471 g/mol)

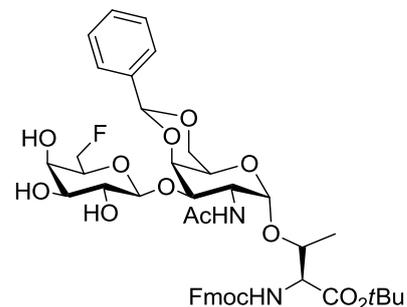
¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = - 230.5 - -231.1 (m, $J_{F,H5} = 12.7$ Hz, $J_{F,H6} = 46.6$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 1406.43 ([M + Na]⁺, ber.: 1406.46).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1406.5483 ([M + Na]⁺, ber.: 1406.4602).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-desoxy-3-*O*-[β -D-6-desoxy-6-fluorgalacto-pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (46)**

(Fmoc-Thr-(β FGal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6BznGalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 1.30 g (1.33 mmol) (**31**) in 100 mL Methanol wurde so lange tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolatlösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde durch Zugabe von verdünnter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt. Das als Nebenprodukt entstandene freie Amin wurde in 20 mL einer Mischung aus Dioxan und Wasser (1:1) gelöst und mit 499 mg (1.48 mmol) Fmoc-OSu und mit 163 μ L (1.48 mmol) *N*-Methylmorpholin versetzt. Nach zwei Tagen Rühren bei Raumtemperatur wurde mit verd. Salzsäure (1N) auf pH 6 angesäuert und das Dioxan wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde je zweimal mit 100 mL HCl (1 N) und Wasser gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt. Ausbeute: 760 mg (66%, 0.89 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 70.29$$

$$R_f = 0.48 \text{ (Toluol/EtOH, 4:1)}$$

$$R_t = 26.3 \text{ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H}_2\text{O 5 min (30:70); (30:70) \rightarrow (77:23), 30 min, \rightarrow (100:0), 60 min; \lambda = 264 \text{ nm)}$$

$$\text{C}_{44}\text{H}_{53}\text{FN}_2\text{O}_{14} \text{ (M = 852.348 g/mol)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.66-7.62 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.51-7.49 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-Bzn}}$), 7.41-7.26 (m, 7H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, $\text{H}_{\text{Ar-Bzn}}$), 6.82 (d, 1H, $J_{\text{NH},2\text{H}} = 8.4$ Hz, NH-Ac), 6.09 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{Ta}} = 8.6$ Hz, NH-Urethan), 5.49 (s, 1H, CH-Bzn), 4.92 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.0$ Hz, 1-H), 4.62-4.30 (m, 6H, 2-H {4.60}, 6a'-H {4.49}, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ {4.46}, 4-H {4.38}, 6b'-H {3.37}), 4.28-4.20 (m, 3H, T^a {4.25}, 1'-H {4-23}, 9H-Fmoc {4.21}), 4.20-4.01 (m, 2H, 6a-H {4.15}, 6b-H {4.02}), 3.85 (d, 1H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 10.9$ Hz, 3-H), 3.80-3.67 (m, 4H, 5-H {3.72}, 3 x

OH), 3.55-3.43 (m, 3H, 2'-H {3.53}, 4'-H {3.51}, 5'-H {3.46}), 3.25 (d, 1H, $J_{H3',H2'} = 6.9$ Hz, 3'-H), 2.03 (s, 3H, NHAc), 1.42 (s, 9H, (tBu)), 1.28 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.1$ Hz, T $^{\gamma}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 172.8 (C=O (NHAc)), 170.4 (C=O (Ester)), 156.9 (C=O (Urethan)), 144.0, 143.9 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 137.9 (Cq (Bzn)), 129.2, 128.4 (C_{Ar} (Bzn)), 128.0, 127.9 (C-3-, C-6- Fmoc), 127.3 (C-2-, C-7-Fmoc), 126.9 (C_{Ar} (Bzn)), 125.3, 125.2 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.2 (C-4-, C-5-Fmoc), 105.4 (C-1'), 101.5 (CH (Bzn)), 100.7 (C-1), 83.2 (Cq (tBu)), 81.6 (d, $J_{F,C6'} = 169.1$ Hz, C-6'), 76.8 (T $^{\beta}$), 76.7 (C-3), 76.0 (C-4), 73.6 (d, $J_{F,C5'} = 19.8$ Hz, C-5'), 73.2 (C-3'), 70.5 (C-2'), 69.3 (C-6), 68.5 (d, $J_{F,C4'} = 7.4$ Hz, C-4'), 67.2 (CH₂ (Fmoc)), 63.8 (C-5), 59.4 (T $^{\alpha}$), 48.3 (C-2), 47.3 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (tBu)), 23.4 (CH₃ (NHAc)), 19.3 (T $^{\gamma}$).

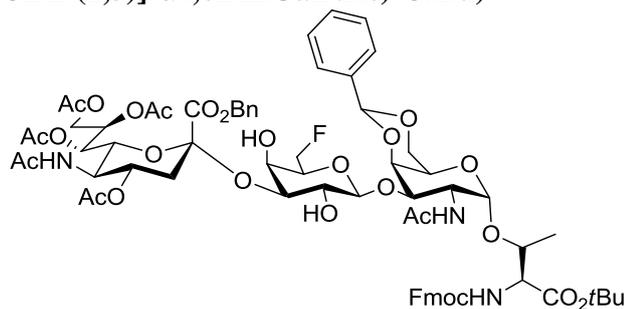
$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = - 229.2 (dt, $J_{F,H5} = 14.3$ Hz, $J_{F,H6} = 47.5$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 853.38 ([M + H] $^+$, ber.: 853.35), 1743.70 ([2 x M + K] $^+$, ber.: 1743.79).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 853.3561 ([M + H] $^+$, ber.: 853.3514).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[(6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl]-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (47)**

(Fmoc-Thr-(β FGal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcOOBn-(2,3)]- α 4,6BznGalNAc)-OtBu)



Methylsulfenylbromid-Lösung:

Eine Lösung von 354 μL Dimethylsulfid in 5 mL absol. Dichlorethan wurde unter Argonatmosphäre mit 205 μL Brom versetzt. Die Lösung wurde 13 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt.

Sialylierung:

Es wurden 629 mg (0.94 mmol) Ac₄NeuNAcCOOBn-Xan (**43**) in 3 mL absol. Dichlorethan und 6 mL absol. Acetonitril gelöst, mit 800 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å versetzt

und über Nacht unter Argonatmosphäre gerührt. Abschließend wurden 320 mg (0.37 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃-GalF-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-OtBu (**46**) gelöst in 4 mL absol. Dichlormethan und 8 mL absol. Acetonitril, hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde auf -40 °C abgekühlt und unter Lichtausschluss wurden 241 mg (0.94 mmol) Silbertriflat und 586 μ L einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde fünf Tage bei -45 °C bis -20 °C gerührt. Anschließend wurde DIPEA zur Hydrolyse zugeben und weitere 15 min bei -40 °C gerührt. Die auf Raumtemperatur erwärmte Reaktionsmischung wurde schließlich mit 20 mL Dichlormethan verdünnt durch *Hyflo (Supercell, Roth)* filtriert und das Lösungsmittel wurde i.Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1 \rightarrow EE) gereinigt. Zur vollständigen Charakterisierung wurde eine kleine Menge durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (30:70) \rightarrow (50:50), 5 min, \rightarrow (77:23), 25 min \rightarrow (100:0) 35 min λ = 214 nm, R_t = 32.7 min) gereinigt.

Ausbeute: 130 mg (25%, 0.09 mmol) farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 42.26$$

$$R_f = 0.11 (\text{EtOAc})$$

R_t = 29.9 min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O 5 min (30:70); (30:70) \rightarrow (77:23), 30 min, \rightarrow (100:0), 60 min λ = 264 nm)

C₇₀H₈₄FN₃O₂₆ (M = 1401.533 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, d-MeCN, COSY) δ [ppm] = 7.85 (dd, 2H, J_{HBn,HBn} = 2.3 Hz, J_{HBn,HBn} = 7.5 Hz, H_{Ar-Bn}), 7.72 (d, 1H, J_{H4,H3} = 7.5 Hz, 4-H-Fmoc), 7.68 (d, 1H, J_{H5,H6} = 7.7 Hz, 5-H-Fmoc), 7.49-7.43 (m, 5H, H_{Ar-Bzn}), 7.42-7.38 (m, 7H, 1-H-, 8-H-, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar-Bn}) 7.37-7.31 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 6.61 (d, 1H, J_{NH,H2} = 9.7 Hz, NH-Ac), 6.37 (d, 1H, J_{NH,T α} = 9.9 Hz, NH-Urethan), 6.17-6.15 (m, 1H, NH-NeuNAc), 5.58 (s, 1H, CH-Bzn), 5.33-5.30 (m, 1H, 8''-H), 5.32 (d, 1H, J = 12.1 Hz, CH-Bn), 5.20-5.15 (m, 2H, 7''-H, CH-Bn), 4.93 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.7 Hz, 1-H), 4.91-4.84 (m, 1H, 4''-H), 4.59-4.62 (m, 2H, 6'a-H, 9''a-H), 4.45-4.32 (m, 6H, 2-H {4.40}, T ^{β} {4.38}, CH₂-Fmoc {4.37}, 4-H {4.36}, 6'b-H), 4.27-4.23 (m, 2H, 1'-H {4.27}, 9H-Fmoc {4.25}), 4.15 (dd, 1H, J_{T α ,T β} = 1.5 Hz, J_{T α ,NH} = 10.0 Hz, T ^{α}), 4.12-4.03 (m, 2H, 6a/b-H), 4.00-3.95 (m, 3H, 6''-H {3.99}, 9b''-H {3.97}, 5''-H {3.96}), 3.94 (dd, 1H, J_{H3',H4'} = 3.2 Hz, J_{H3',H2'} = 9.6 Hz, 3'-H), 3.84 (dd, 1H, J_{H3,H4} = 3.1 Hz, J_{H3,H2} = 11.2 Hz, 3-H), 3.78 (s, 1H, 5-H), 3.53-3.47 (m, 1H, 5'-H), 3.45 (s, 1H, 4'-H), 3.35-3.30 (m, 1H, 2'-H), 3.17 (d, 1H, J_{OH,H} = 3.5 Hz, 4'-OH), 3.09 (s, 1H, 2'-OH), 2.72 (dd, 1H, J_{H3äq,H4} = 4.8 Hz,

$J_{\text{H3äq, H3ax}} = 12.7$ Hz, $3''\text{-H}_a$), 2.05, 2.02, 1.99, 1.94, 1.85, 1.72 (7 x s, 18H, 6 x CH_3 (OAc)), 1.94-1.90 (m, 1H, $3''\text{-H}_{ax}$), 1.45 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.27 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma, \text{T}\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, d-MeCN), δ [ppm] = 172.8, 171.6 (2 x C=O (NHAc)), 171.4 (C=O (Ester)), 171.1, 171.0, 170.9 170.6 (4 x C=O (OAc, Ester)), 168.7 (C=O (Ester)), 157.9 (C=O (Urethan)), 145.3, 144.8 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 142.3, 142.1 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 139.6 (Cq (Bn)), 136.0 (Cq (Bzn)) 130.0, 129.8 (C_{Ar} (Bn)), 129.3 (C-3-, C-6-Fmoc), 128.9, 128.8 (C-2-, C-7-Fmoc), 128.3, 128.1 (C_{Ar} (Bn)), 127.4 (C-1-, C-8-Fmoc), 126.4, 126.2 (C-4-, C-5-Fmoc), 121.1, 121.0 (C_{Ar} (Bn)), 106.9 (C-1'), 101.7 (CH (Bzn)), 101.1 (C-1), 98.9 (C-2''), 84.2 (d, $J_{\text{F,C6}'} = 166.7$ Hz, C-6'), 83.3 (Cq (*t*Bu)), 78.3 (C-3), 79.2 (C1''), 77.1 (C-3'), 77.0 (C-4) 76.1 (T^β), 74.1 (C-6''), 74.0 (d, $J_{\text{F,C5}'} = 20.5$ Hz, C-5'), 70.8 (C-8''), 70.1 (C-4''), 69.9 (C-6), 69.6 (C-2'), 69.1 (C-7''), 69.05 (CH_2 (Bn)), 68.3 (d, $J_{\text{F,C4}'} = 7.4$ Hz, C-4'), 67.6 (CH_2 (Fmoc)), 64.4 (C-5), 64.4 (C-9''), 60.5 (T^α), 49.2 (C-5''), 48.9 (C-2), 48.1 (CH (Fmoc)), 37.9 (C-3''), 28.3 (CH_3 (*t*Bu)), 23.8, 23.2 (2 x CH_3 (NHAc)), 21.5, 21.3, 21.2, 21.1 (4 x CH_3 (OAc)), 19.9 (T^γ).

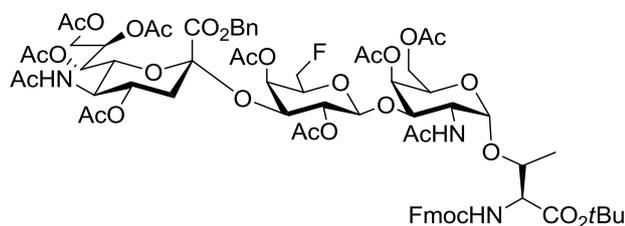
$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = - 229.3 (dt, $J_{\text{F,H5}} = 14.8$ Hz, $J_{\text{F,H6}} = 47.0$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 1424.53 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1424.52).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1424.5220 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1424.5225).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl]-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (48)**

(Fmoc-Thr-(β Ac₂FGal-(1→3)-[α Ac₄NeuNAcOOBn-(2,3)]- α Ac₂GalNAc)-OtBu)



Es wurden 220 mg (0.16 mmol) **47** in 10 mL 80%iger Essigsäure gelöst. Nach 2 h Rühren bei 80 °C wurde mit 15 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Anschließend wurde das Rohprodukt in 5 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C mit einer Spatelspitze DMAP und 2.5 mL Acetanhydrid versetzt. Die Lösung wurde zwei Tage

bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 154 mg (66%, 0.10 mmol), leicht gelber amorpher Feststoff.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 35.81$$

$$R_f = 0.13 (\text{EtOAc})$$

$R_t = 31.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O 5 min (30:70); (30:70)→(77:23), 30 min, →(100:0), 60 min $\lambda = 264$ nm)

C₇₁H₈₈FN₃O₃₀ (M = 1481.544 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, d-MeCN, COSY) δ [ppm] = 7.85 (d, 2H, $J_{\text{HBn,HBn}} = 7.6$ Hz, H_{Ar}-Bn), 7.70 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = 7.3$ Hz, 4-H-Fmoc, 5-H-Fmoc), 7.49-7.30 (m, 9H, 1-H-, 8-H-, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}-Bn, 3-H-, 6-H-Fmoc), 6.46 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 10.0$ Hz, NH-Ac), 6.19 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.9$ Hz, NH-Urethan), 6.07 (d, 1H, $J_{\text{NH,H5''}} = 9.8$ Hz, NH-NeuNAc), 5.46-5.42 (m, 1H, 8''-H), 5.38 (d, 1H, $J = 12.4$ Hz, CH-Bn), 5.33 (d, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 2.9$ Hz, 4-H), 5.28 (dd, 1H, $J_{\text{H7'',H6''}} = 2.4$ Hz, $J_{\text{H7'',H8''}} = 8.3$ Hz, 7''-H), 5.09-5.06 (m, 2H, 4'-H, CH-Bn), 4.93-4.87 (m, 1H, 4''-H), 4.80 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.74-4.68 (m, 2H, 2'-H {4.71}, 1'-H {4.69}), 4.60 (dd, 1H, $J_{\text{H3',H4'}} = 3.8$ Hz, $J_{\text{H3',H2'}} = 9.3$ Hz, 3'-H), 4.47-4.27 (m, 7H, 6'a-H {4.45}, CH₂-Fmoc {4.43}, 6'b-H {4.35}, 9'a-H {4.34}, 2-H {4.32}, T ^{β} {4.27}), 4.21-4.18 (m, 1H, 5-H), 4.14 (dd, 1H, $J_{\text{T}\alpha,\text{T}\beta} = 1.7$ Hz, $J_{\text{T}\alpha,\text{NH}} = 9.90$ Hz, T ^{α}), 4.10-4.08 (m, 1H, 6a-H), 4.00-3.80 (m, 6H, 3-H {3.98}, 9b''-H {3.95}, 6b-H {3.93}, 9H-Fmoc {3.91}, 5''-H {3.90}, 5'-H {3.84}), 3.76 (dd, 1H, $J_{\text{H6'',H7''}} = 2.4$ Hz, $J_{\text{H6'',H5''}} = 10.7$ Hz, 6''-H), 2.56 (dd, 1H, $J_{\text{H3}\ddot{\text{a}}\text{q},\text{H4}} = 4.8$ Hz, $J_{\text{H3}\ddot{\text{a}}\text{q},\text{H3ax}} = 12.5$ Hz, 3''-H_{äq}), 2.20, 2.05, 2.04, 2.01, 2.00, 1.98, 1.97, 1.96, 1.89, 1.72 (10s, 30H, 10 x CH₃ (OAc)), 1.49-1.40 (m, 1H, 3''-H_{ax}), 1.42 (s, 9H, (tBu)), 1.28 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.8$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, d-MeCN), δ [ppm] = 172.3, 171.9 (2 x C=O (NHAc)), 171.7 (C=O (Ester)), 171.6, 171.5, 171.3, 171.2, 170.8 (8 x C=O (OAc, Ester)), 168.7 (C=O (Ester)), 158.1 (C=O (Urethan)), 145.5, 145.3 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 142.5 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 139.3 (Cq (Bn)), 129.9 (C-3-, C-6- Fmoc), 128.8, 129.7 (C-2-, C-7-Fmoc), 129.2, 129.1 (C_{Ar} (Bn)), 128.5 (C-1-, C-8-Fmoc), 126.6, 126.5 (C-4-, C-5-Fmoc), 121.5, 121.4 (C_{Ar} (Bn)), 102.5 (C-1'), 101.1 (C-1), 98.1 (C-2''), 83.6 (Cq (tBu)), 82.4 (d, $J_{\text{F,C6'}} = 168.6$ Hz, C-6'), 77.2 (T ^{β}), 74.6 (C-3), 73.4 (C-6''), 72.5 (d, $J_{\text{F,C5'}} = 22.7$ Hz, C-5'), 72.3 (C-3'), 71.3 (C-4) 70.8 (C-2'), 70.6 (C-4''), 69.6 (CH₂ (Bn)), 69.4 (C-8''), 69.2 (C-5), 68.6 (d, $J_{\text{F,C4'}} = 5.4$ Hz, C-4'), 68.8 (C-7''), 67.9 (C-6), 64.2 (CH₂ (Fmoc)), 63.7 (C-9''), 60.7 (T ^{α}), 49.8 (C-5''), 49.7 (CH (Fmoc)), 48.4 (C-2), 38.9 (C-3''), 28.6 (CH₃ (tBu)), 24.1, 23.5 (2 x CH₃ (NHAc)), 22.1, 21.9, 21.6, 21.4, 21.3, 21.2 (8 x CH₃ (OAc)), 19.8 (T ^{γ}).

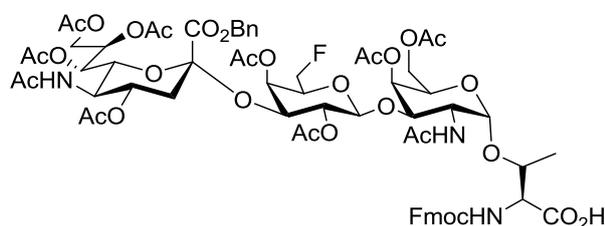
$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = - 230.7 (dt, $J_{\text{F,H5}} = 13.0$ Hz, $J_{\text{F,H6}} = 46.6$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 1504.52 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1504.53).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1504.5363 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1504.5334).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -*D*-galactopyranosyl]-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin (**49**)**

(Fmoc-Thr-(β Ac₂FGal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcOOBn-(2,3)]- α Ac₂GalNAc)-OH)



Eine Lösung von 160 mg (0.11 mmol) **48** in 2 mL Trifluoressigsäure und 0.2 mL dest Wasser wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 150 mg (97%, 0.10 mmol) farbloser Feststoff

$R_f = 0.23$ (EtOAc/MeOH, 1:1)

$R_t = 27.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA 5 min (30:70); (30:70) \rightarrow (77:23), 30 min, \rightarrow (100:0), 60 min $\lambda = 214$ nm)

$\text{C}_{67}\text{H}_{80}\text{FN}_3\text{O}_{30}$ ($M = 1425.481$ g/mol)

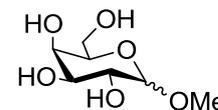
ESI-MS (positiv), m/z : 1448.49 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1448.47).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1426.4894 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, ber.: 1426.4889).

5.3.2 Synthesen zu Kapitel 3.1.2

Methyl- α/β -D-galactopyranosid (52)

(MeGal)



Variante A:^[148]

Es wurden 20.0 g (0.16 mol) D-Galactose in 250 mL Methanol gelöst und mit 15 g saurem Ionenaustauscher *Amberlite IR120* versetzt. Die Suspension wurde 18 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

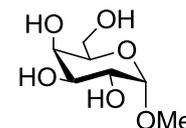
Ausbeute: 21.5(quant.) farbloses Öl.

$R_f = 0.31$ (β -Anomer), 0.23 (α -Anomer) (DCM/EtOH, 9:1)

$C_7H_{14}O_6$ (M = 194.079 g/mol)

Variante B:

Methyl- α -D-galactopyranosid (65)



Es wurden 20.0 g (0.16 mol) D-Galactose in 350 mL Methanol gelöst und mit 2.00 g (0.03 mol) Acetylchlorid versetzt. Die Suspension wurde 36 h unter Rückfluss erhitzt, mit Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde aus Isopropanol umkristallisiert

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, H_2O) = +100.3$.

Ausbeute: 16.7 g (54%, 0.09 mmol) farbloser Feststoff.

$R_f = 0.23$ (α -Anomer) (DCM/EtOH, 9:1)

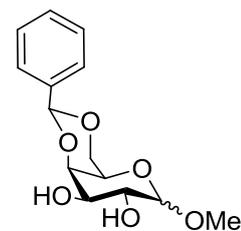
Smp: $112^{[275]}$ °C Lit. 115-117 °C

$C_7H_{14}O_6$ (M = 194.079 g/mol)

FD-MS (positiv), m/z : 195.2 ($[M + H]^+$, ber.: 195.1), 389.2 ($[2M + H]^+$, ber.: 389.2).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[148]

Methyl-4,6-*O*-benzyliden- α/β -D-galactopyranosid ^[150] (53)
(4,6BznGalMe)



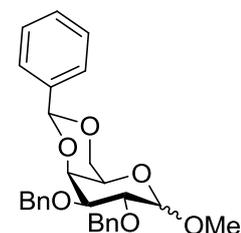
Zu einer Lösung von 21.5 g (0.11 mol) Methyl- α/β -D-Galactose in 200 mL absol. Acetonitril wurde 19.8 mL (20.2 g, 0.13 mol) Benzaldehyddimethylacetal gegeben. Durch Zugabe von *p*-Toluolsulfonsäure wurde der pH-Wert der Lösung auf pH = 2 eingestellt und es wurde 18 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde mit wenigen Tropfen Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i.Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

$R_f = 0.62$ (DCM/EtOH, 9:1)

$C_{14}H_{18}O_6$ (M = 282.110 g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[276]

Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-benzyl- α/β -D-galactopyranosid ^[151] (54)
(Bn₂4,6BznGalMe)



Zu einer Suspension von 10.2 g (0.27 mol) Natriumhydrid in 50 mL absol. *N,N*-Dimethylformamid wurde unter Eiskühlung langsam eine Lösung von 31.3 g (0.11 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden- α/β -D-galactopyranose (53) in 50 mL absol. *N,N'*-Dimethylformamid zugetropft. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurden 31.6 mL (46.2 g, 0.27 mol) Benzylbromid zugetropft und die Reaktionsmischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Wasser und Ethylacetat verdünnt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 70 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit 50 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung und 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 34.0 g (46%, 0.07 mmol) leicht gelbes Öl.

$R_f = 0.12$ (^cHex/EtOAc, 5:1)

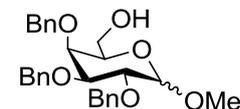
$C_{28}H_{30}O_6$ ($M = 462.204$ g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 485.20 ($[M + Na]^+$, ber.: 485.19), 947.52 ($[2M + Na]^+$, ber.: 947.40).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[277]

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α/β -D-galactopyranosid (**55**)

(**Bn₃GalMe**)



Zu einer Lösung von 15.8 g (34.1 mmol) **54** in 136 mL (0.17 mol) $BH_3 \cdot THF$ (1 M in THF) wurden 620 mg (1.71 mmol) Kupfertriflat gegeben. Die Suspension wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt bevor langsam 4.74 (34.1 mmol) Triethylamin und 60 mL Methanol bei 0 °C zugeben wurde. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde je zweimal mit Toluol und Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 14.6 g (92%, 31.4 mmol) farbloses Öl.

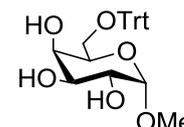
$R_f = 0.37$ (c Hex/EtOAc, 1:1)

$C_{28}H_{32}O_6$ ($M = 464.220$ g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[156, 278]

Methyl-6-*O*-trityl- α -D-galactopyranosid (α -**56**)

(**TrtGalMe**)



Zu einer Lösung von 10.6 g (0.06 mol) Methyl- α -D-galactose (**65**) und 340 mg (2.75 mmol) 4-(Dimethylamino)pyridin in 60 mL N,N' Dimethylformamid wurden 15 mL Triethylamin gegeben. Anschließend wurden der Reaktionsmischung portionsweise bei 0 °C 16.9 g (0.06 mol) Tritylchlorid zugesetzt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und auf 80 mL Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 30 mL Ammoniumchloridlösung (1 N) gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 7.30 g (30% 16.8 mmol, über 2 Stufen) gelbes Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 39.1$, Lit.^[279]: $[\alpha]_D^{24} = (0.94, \text{CHCl}_3) = + 63.3$.

$R_f = 0.29$ (EtOAc)

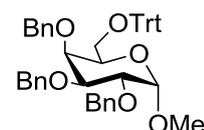
$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_6$ (M = 436.189 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 459.22 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 459.18), 895.47 ($[2\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 895.37).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[279, 280]

Methyl-6-*O*-trityl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosid (α -57)

(**Bn₃TrtGalMe**)



Zu einer Suspension von 2.30 g (60.1 mmol) Natriumhydrid in 30 mL absol. *N,N'* Dimethylformamid wurde unter Eiskühlung langsam eine Lösung von 7.30 g (16.7 mmol) Methyl-6-*O*-trityl- α -D-galactopyranosid (α -56) in 40 mL absol. *N,N'* Dimethylformamid getropft. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurden langsam 7.1 mL (10.3 g, 60.1 mmol) Benzylbromid zugegeben und die Reaktionsmischung wurde weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Eiswasser und 60 mL Ethylacetat verdünnt und die wässrige Phase wurde viermal mit je 70 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

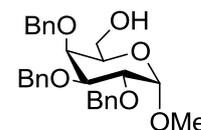
Rohausbeute: 9.80 g (83% 13.9 mmol) leicht gelbes Öl.

$R_f = 0.56$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1)

$\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{O}_6$ (M = 706.329 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 729.37 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 729.32).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[281]

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosid (α -55)^[282]**(Bn₃GalMe)**

Zu einer Lösung von 11.0 g (15.6 mmol) Methyl-6-*O*-trityl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosid (α -57) in 450 mL absol. Dichlormethan wurden bei Raumtemperatur 5 mL BF₃-Methanol-Komplex (1.7 mL BF₃-Etherat wurde für einige Minuten in 5.3 mL Methanol vorgerührt) gegeben. Die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und bei 0 °C mit 50 mL Wasser versetzt. Die organische Phase wurden je zweimal mit 50 mL Wasser und 50 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.85 g (53%, 8.74 mmol) farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 16.4$, Lit.^[278]: $[\alpha]_D^{21} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 7.01$.

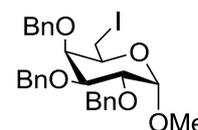
$R_f = 0.39$ (^cHex/EtOAc, 1:1)

C₂₈H₃₂O₆ (M = 464.220 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.34-7.19 (m, 15H, H_{Ar}-Bn), 4.98 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz, CH_{Bn}), 4.90 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, CH_{Bn}), 4.86 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, CH_{Bn}), 4.76 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, CH_{Bn}), 4.71-4.69 (m, 2H, CH_{Bn}, 1-H), 4.65 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz, CH_{Bn}), 4.06 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 3.6$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 10.0$ Hz, 2-H), 3.95 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H4}} = 2.8$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 10.1$ Hz, 3-H), 3.88 (d, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 2.7$ Hz, 4-H), 3.72-3.68 (m, 2H, 5-H, 6a-H), 3.49-3.47 (m, 1H, 6b-H), 3.36 (s, 3H, OCH₃),

ESI-MS (positiv), m/z : 487.25 ([M + Na]⁺, ber.: 487.21), 503.24 ([M + K]⁺, ber.: 503.32).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[278]

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-desoxy-6-iod- α -D-galactopyranosid (α -59)^[283]**(Bn₃IGalMe)**

Zu einer Lösung von 18.0 g (38.7 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosid, 25.4 g (96.9 mmol) Triphenylphosphin und 6.60 g (96.9 mmol) Imidazol in 300 mL absol. Tetrahydrofuran wurde in der Siedehitze langsam eine Lösung von 24.6 g (96.9 mmol) Iod in 50 mL absol. Tetrahydrofuran getropft. Nach 2 h Erhitzen unter Rückfluss wurde mit 50 mL Ethylacetat verdünnt und die organische Phase wurde je zweimal mit 100 mL gesättigter

Natriumthiosulfat- und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 6:1) gereinigt.

Ausbeute: 21.5 g (96%, 37.4 mmol) leicht rötliches Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 17.1$, Lit.^[283]: $[\alpha]_D^{20} = (0.80, \text{CHCl}_3) = + 23$.

$R_f = 0.65$ (^cHex/EtOAc, 4:1)

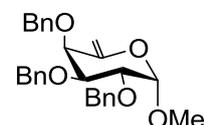
$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{IO}_5$ (M = 574.122 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.41-7.30 (m, 15 H, H_{Ar}-Bn), 5.05 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz, CH_{Bn}), 4.91 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH_{Bn}), 4.85 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, CH_{Bn}), 4.78 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz, CH_{Bn}), 4.71-4.63 (m, 3H, CH_{Bn}, 1-H), 4.05-4.01 (m, 2H, 4-H, 2-H), 3.94 (dd, 1H, *J*_{H3,H4} = 2.8 Hz, *J*_{H3,H2} = 10.1 Hz, 3-H), 3.87-3.84 (m, 1H, 5-H), 3.34 (s, 3H, OCH₃), 3.23 (dd, 1H, *J*_{H6a,H5} = 7.7 Hz, *J*_{H6a,H6b} = 10.0 Hz, 6a-H), 3.08 (dd, 1H, *J*_{H6b,H5} = 6.2 Hz, *J*_{H6b,H6a} = 10.1 Hz, 6b-H).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 597.16 ([M + Na]⁺, ber.: 597.11), 613.13 ([M + K]⁺, ber.: 613.22).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[283]

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-desoxy-5en- α -D-galactopyranosid (α -60)



Zu einer Lösung von 8.2 g (14.3 mol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-desoxy-6-iodo- α -D-galactopyranosid (α -59) in 60 mL absol. *N,N'* Dimethylformamid wurden 8.62 g (57.1 mol) Cäsiumfluorid gegeben und die Reaktionsmischung wurde 72 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde mit 100 mL Ethylacetat und 50 mL Wasser verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 60 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit je 30 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 9:1) gereinigt.

Ausbeute: 5.92 g (92% 13.2 mol) farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 13.1$

$R_f = 0.56$ (^cHex/EtOAc, 5:1)

$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_5$: (M = 446.209 g/mol)

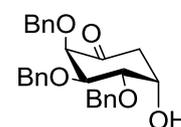
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.41-7.29 (m, 15 H, H_{Ar}-Bn), 4.93 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz, CH_{Bn}), 4.80-4.44 (m, 8H, CH_{Bn}, 1-H {4.70, d, 1H, *J*_{H1,H2} = 3.9 Hz}, 6a/b-H), 4.19 (dd, 1H, *J*_{H2,H1} = 3.5 Hz, *J*_{H2,H3} = 9.9 Hz, 2-H), 4.08 (d, 1H, *J*_{H4,H3} = 3.5 Hz, 4-H), 3.98 (dd, 1H, *J*_{H3,H4} = 3.5 Hz, *J*_{H3,H4} = 9.9 Hz, 3-H), 3.43 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 151.8 (C-5), 138.8, 138.7, 138.1 (3 x C_q (Bn)), 128.6, 128.5, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, (18 x C_{Ar} (Bn)), 102.1 (C-6), 100.1 (C-1), 76.7 (C-3), 75.8 (C-2), 74.9 (C-4), 74.1, 72.7, 69.4 (3 x CH₂ (Bn)), 55.8 (OCH₃)

ESI-MS (positiv), *m/z*: 469.17 ([M + Na]⁺, ber.: 469.20).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 469.2009 ([M + Na]⁺, ber.: 469.1993).

2,3,4-Tri-*O*-benzyl-5-hydroxy-cyclohexanon (63)^[101, 147]



Zu einer Lösung von 1.94 mg (4.34 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-desoxy-5en- α -D-galactopyranosid (**α -60**) in 30 mL eines Gemisches aus Dioxan/Wasser (2:1) wurden 76 mg (0.43 mmol) Palladium(II)chlorid gegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei 60 °C gerührt, mit 30 mL Ethylacetat verdünnt und durch *Hyflo* (Supercell, Roth) filtriert. Die organische Phase wurde je zweimal mit 30 mL Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 6:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.36 g (73%, 3.15 mmol) leicht gelbes Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 80.2.$

R_f = 0.10 (^cHex/EtOAc, 4:1)

C₂₇H₂₈O₅ (M = 432.194 g/mol)

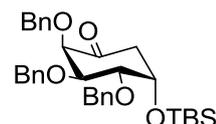
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.38-7.26 (m, 15H, H_{Ar}-Bn), 4.85 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz, CH_{Bn}), 4.78 (d, 1H, *J* = 12.1 Hz, CH_{Bn}), 4.58-4.55 (m, 3H, CH_{Bn}), 4.43 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz, CH_{Bn}), 4.31 (dd, 1H, *J*_{H2,H4} = 0.9 Hz, *J*_{H2,H3} = 3.1 Hz, 2-H), 4.28 (bs, 1H, 5-H), 4.03 (dd, 1H, *J*_{H3,H2} = 3.1 Hz, *J*_{H3,H4} = 5.2 Hz, 3-H), 3.93-3.91 (m, 1H, 4-H), 2.76 (ddd, 1H, *J*_{H6a,H4} = 0.9 Hz, *J*_{H6a,H5} = 5.2 Hz, *J*_{H6a,H6b} = 13.4 Hz, 6a-H), 2.57 (ddd, 1H, *J*_{H6b,H4} = 0.7 Hz, *J*_{H6b,H5} = 9.9 Hz, *J*_{H6b,H6a} = 13.4 Hz, 6b-H), 2.36 (bs, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 204.6 (C=O), 138.1, 138.0 137.6 (3 x C_q (Bn)), 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0 (18 x C_{Ar} (Bn)), 81.2 (C-2), 78.7 (C-4), 77.4 (C-3), 73.7, 73.5, 72.6 (3 x CH₂ (Bn)), 68.2 (C-5), 44.9 (C-6).

ESI-MS (positiv), m/z : 455.20 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 455.18), 887.46 ($[\text{2M} + \text{Na}]^+$, ber.: 887.38)

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 455.1847 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 455.1837).

2,3,4-Tri-O-benzyl-5-*tert*-butyldimethylsilyl-cyclohexanon (66)



Es wurden 250 mg (0.58 mmol) 2,3,4-Tri-O-benzyl-5-hydroxy-cyclohexanon (**63**) in 4 mL absol. *N,N'* Dimethylformamid gelöst und mit 78 mg (1.16 mmol) Imidazol und 174 mg (1.16 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid versetzt. Nach 3 h Rühren bei 50 °C wurde mit 20 mL Ethylacetat verdünnt und je einmal mit je 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 6:1) gereinigt.

Ausbeute: 270 g (85%, 0.49 mmol) gelbes Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 56.4$, Lit.^[100]: $[\alpha]_D^{25} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 60.8$.

$R_f = 0.59$ (^cHex/EtOAc, 5:1)

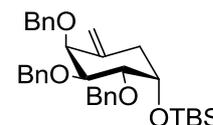
$\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{Si}$ (M = 546.280 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.36-7.18 (m, 15H, H_{Ar}-Bn), 4.86 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz, CH_{Bn}), 4.84 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz, CH_{Bn}), 4.76 (d, 1H, $J = 12.3$ Hz, CH_{Bn}), 4.58-4.42 (m, 3H, CH_{Bn}), 4.39 (d, 1H, $J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 3.1$ Hz, 2-H), 4.34 (m, 1H, 5-H), 3.96 (m, 1H, 3-H), 3.78 (bs, 1H, 4-H), 2.81 (m, 1H, 6a-H), 2.57 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{6b}, \text{H}_5} = 5.0$ Hz, $J_{\text{H}_{6b}, \text{H}_{6a}} = 13.2$ Hz, 6b-H), 0.89 (s, 9H, (*t*Bu)), 0.07 (s, 6H, 2 x CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 206.2 (C=O), 138.7, 138.4, 138.1 (3 x C_q (Bn)), 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (18 x C_{Ar}), 81.5 (C-2), 78.8 (C-4), 78.5 (C-3), 74.1, 73.7, 72.7 (3 x CH₂ (Bn)), 70.0 (C-5), 45.5 (C-6), 25.9 (3 x CH₃ (*t*Bu)), 18.2 (C_q (*t*Bu)), -5.5, -5.6 (2 x CH₃ (TBS)).

ESI-MS (positiv), m/z : 569.25 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 569.27), 1115.52 ($[\text{2M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1115.55)

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 569.2717 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 592.2702).

tert*-Butyldimethylsilyl -2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-desoxy-5-en-carba- α -D-galactopyranosid*(67)**

Es wurden 100 mg (0.18 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-benzyl-5-*tert*-butyldimethylsilyl-cyclohexanon (**66**) mit 1.7 mL Dimethyltitanocen (5 wt% in Toluol, 0.37 mmol) für 3 h auf 75 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. Entfernt und das Rohprodukt wurde in Cyclohexan aufgenommen und flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex \rightarrow c Hex /EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 89 mg (89%, 0.16 mmol) leicht gelbes Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 16.3$, Lit.^[100]: $[\alpha]_D^{26} = (1.08, \text{CHCl}_3) = + 22.1$.

$R_f = 0.86$ (c Hex/EtOAc, 4:1)

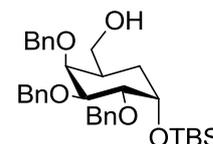
$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}$ (M = 544.301 g/mol)

${}^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.34-7.26 (m, 15H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$), 5.02-4.99 (m, 2H, 6a/b-H), 4.74-4.63 (m, 5H, CH_{Bn}), 4.42 (d, 1H, $J = 12.6$ Hz, CH_{Bn}), 4.18-4.10 (m, 1H, 1-H), 4.12 (bs, 1H, 3-H), 3.84-3.81 (m, 2H, 2-H, 4-H), 2.44 (dd, 1H, $J_{\text{H7a,H1}} = 2.9$ Hz, $J_{\text{H7a,H7b}} = 13.2$ Hz, 7a-H), 2.30-2.26 (m, 1H, 7b-H), 0.86 (s, 9H, (*t*Bu)), 0.07 (s, 6H, 2 x CH_3)

${}^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 141.7 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 139.5, 139.2, 138.8 (3 x C_q (Bn)), 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5, 127.4 (18 x C_{Ar}), 114.2 ($\text{C}=\text{CH}_2$), 79.8 (C-4), 79.2 (C-3), 78.7 (C-2), 73.4, 72.8, 70.1 (3 x CH_2 (Bn)), 69.6 (C-1), 37.5 (C-7), 26.0 (3 x CH_3 (*t*Bu)), 18.3 (C_q (*t*Bu)), -4.4, -4.6 (2 x CH_3 (TBS)).

ESI-MS (positiv), m/z : 567.32 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 567.29).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 567.2908 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 567.2902).

***tert*-Butyldimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranosid (**68**)^[100]**

Zu einer Lösung von 50 mg (0.09 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyl -2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-desoxy-5-en-carba- α -D-galactopyranosid (**67**) in 1 mL absol. Tetrahydrofuran wurden bei 0 °C 460 μL (0.46 mmol) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1M in Tetrahydrofuran) getropft. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und jeweils mit 0.5 mL Natriumacetatlösung (3M) und 0.5 mL Wasserstoffperoxid (30%) versetzt. Die

Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit 5 mL Tetrahydrofuran verdünnt. Anschließend wurde die Lösung mit Kaliumcarbonat gesättigt und je einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 9:1) gereinigt. Ausbeute: 26 mg (50%, 0.05 mmol) farbloses Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +24.6$, Lit.^[100]: $[\alpha]_D^{26} = (1.18, \text{CHCl}_3) = +27.9$.

$R_f = 0.51$ (^cHex/EtOAc, 5:1)

$\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_5\text{Si}$ (M = 562.312 g/mol)

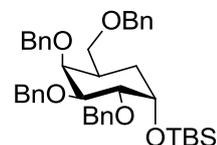
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC, NOESY), δ [ppm] = 7.39-7.27 (m, 15H, H_{Ar}-Bn), 5.03 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, CH_{Bn}), 4.84 (d, 1H, $J = 12.1$, CH_{Bn}), 4.74 (d, 3H, $J = 12.6$ Hz, CH_{Bn}), 4.65 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, CH_{Bn}), 4.25-4.23(m, 1H, 1-H), 4.09 (bs, 1H, 4-H), 3.89 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H4}} = 2.3$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 9.7$ Hz, 3-H), 3.81 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 2.4$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 9.7$ Hz, 2-H), 3.60-3.57 (m, 2H, 6a/b-H), 2.09-2.04 (m, 1H, 5-H), 1.73-1.66 (m, 1H, 7a-H), 1.45-1.41 (m, 1H, 7b-H), 0.86 (s, 9H, (tBu)), 0.05 (s, 6H, 2 x CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 139.5, 139.3, 139.2 (3 x C_q (Bn)), 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.3 (15 x C_{Ar}), 80.8 (C-3), 80.1 (C-2), 77.7 (C-4), 74.2, 73.5, 72.8 (3 x CH₂ (Bn)), 68.6 (C-1), 64.8 (C-6), 37.1 (C-5), 30.3 (C-7), 26.0 (3 x CH₃ (tBu)), 18.3 (C_q (tBu)), -4.3, -4.7 (2 x CH₃ (TBS)).

ESI-MS (positiv), m/z : 585.25 ([M + Na]⁺, ber.: 585.30).

HRESI-MS (positiv), m/z : 585.3021 ([M + Na]⁺, ber.: 585.3015).

***tert*-Butyldimethylsilyl -2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranosid (70)**



Zu einer Suspension von 26 mg (0.69 mol) Natriumhydrid in 2 mL absol. *N,N'*-Dimethylformamid wurde unter Eiskühlung langsam eine Lösung von 260 mg (0.46 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranosid (**68**) in 3 mL absol. *N,N'*-Dimethylformamid getropft. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurden 82 μ L (0.69 mmol) Benzylbromid zugetropft und eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumiodid zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 5 mL Wasser und 10 mL Ethylacetat verdünnt. Die wässrige Phase wurde viermal

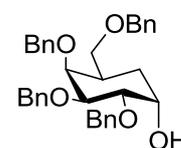
mit je 20 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 10 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt

Ausbeute: 420 mg Rohprodukt

$R_f = 0.86$ (c Hex/EtOAc, 4:1)

$C_{41}H_{52}O_5Si$ (M = 652.358 g/mol)

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (71)^[100]



Zu einer Lösung von 420 mg *tert*-Butyldimethylsilyl -2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranosid (70) in 6 mL absol. Tetrahydrofuran wurden unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur langsam 1.4 mL TBAF (1 M in Tetrahydrofuran) getropft. Die Mischung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 5 mL Wasser und 10 mL Ethylacetat verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 10 mL einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 143 mg (57% über 2 Stufen, 0.27 mmol) farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, CHCl_3) = +24.1$, Lit.^[100]: $[\alpha]_D^{25} = (1.09, CHCl_3) = +21.3$.

$R_f = 0.44$ (c Hex/EtOAc, 4:1)

$C_{35}H_{38}O_5$ (M = 538.272 g/mol)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.41-7.30 (m, 20H, H_{Ar-Bn}), 5.01 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, CH_{Bn}), 4.82-4.70 (m, 4H, CH_{Bn}), 4.56 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz, CH_{Bn}), 4.47 (s, 2H, CH_{Bn}), 4.21-4.20 (m, 1H, 4-H), 4.20-4.17 (m, 1H, 1-H), 3.94 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.3$ Hz, $J_{H2,H3} = 9.7$ Hz, 2-H), 3.80 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.4$ Hz, $J_{H3,H2} = 9.7$ Hz, 3-H), 3.55-3.50 (m, 1H, 6a-H), 3.34 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 5.1$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 8.9$ Hz, 6b-H), 2.35-2.27 (m, 1H, 5-H), 1.64-1.60 (m, 2H, 7a/b-H).

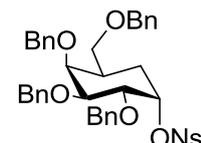
^{13}C -NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, $CDCl_3$), δ [ppm] = 139.7, 139.2, 138.7, 138.6 (4 x Cq (Bn)), 128.6, 128.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, (20 x C_{Ar}), 81.2 (C-3), 80.2

(C-2), 75.7 (C-4), 74.7, 73.2, 73.0, 72.9 (4 x CH₂ (Bn)), 70.7 (C-6), 67.4 (C-1), 35.2 (C-5), 27.8 (C-7).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 561.25 ([M + Na]⁺, ber.: 561.26).

HRESI-MS (positiv), *m/z*: 561.2631 ([M + Na]⁺, ber.: 561.2617).

***p*-Nitrobenzylsulfonat-2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranosid (76)**



Zu einer Lösung von 66 mg (0.12 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**71**) und 74 mg (0.33 mmol) Nosylchlorid in 2 mL absol. Dichlormethan wurden unter Argonatmosphäre bei 0 °C langsam einige Tropfen Triethylamin getropft. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde eine Spatelspitze 4-(Dimethylamino)pyridin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde mit 10 mL einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 9:1) gereinigt.

Ausbeute: 41 mg (48%, 0.06 mmol) gelbes Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 54.3$.

$R_f = 0.64$ (^cHex/EtOAc, 4:1)

C₄₁H₄₁NO₉S (M = 723.250g/mol)

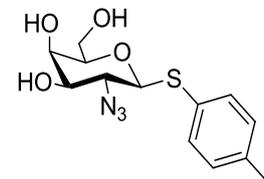
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.97-7.92 (m, 4H, H_{Nos}), 7.37-7.22 (m, 18H, H_{Ar}-Bn), 7.08-7.06 (m, 2 H, H_{Ar}-Bn), 5.13 (m, 1H, 1-H), 4.93 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, CH_{Bn}), 4.75-4.68 (m, 2H, CH_{Bn}), 4.60 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz, CH_{Bn}), 4.49 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz, CH_{Bn}), 4.44-4.36 (m, 3H, CH_{Bn}), 4.19 (bs, 1H, 4-H), 3.92 (dd, 1H, *J*_{H2,H1} = 3.0 Hz, *J*_{H2,H3} = 10.0 Hz, 2-H), 3.72 (dd, 1H, *J*_{H3,H4} = 2.3 Hz, *J*_{H3,H2} = 10.0 Hz, 3-H), 3.49 (t, 1H, *J*_{H6a,H6b/H5} = 9.1 Hz, 6a-H), 3.32 (dd, 1H, *J*_{H6b,H5} = 5.2 Hz, *J*_{H6b,H6a} = 8.8 Hz, 6b-H), 2.30-2.25 (m, 1H, 5-H), 1.90 (dt, 1H, *J*_{H7,H5} = 3.4 Hz, *J*_{H7,H7/1} = 14.6 Hz, 7ax-H) 1.78-1.71 (m, 1H, 7äq-H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 150.2, 142.9 (2 x C_q (Nos)), 139.2, 138.6, 138.2, 137.9 (4 x C_q (Bn)), 129.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, (21 x C_{Ar}), 124.0 (C_{Nos}), 82.2 (C-1), 81.0 (C-3), 77.5 (C-2), 75.1 (CH₂ (Bn)), 75.0 (C-4), 73.8, 73.4, 72.9 (3 x CH₂ (Bn)), 70.1 (C-6), 35.8 (C-5), 28.3 (C-7).

ESI-MS (positiv), m/z : 746.14 ($[M + Na]^+$, ber.: 746.24).

Synthese des Carbaglycosidakzeptors

4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-1-thio- α -D-galactopyranosid (74)^[174]



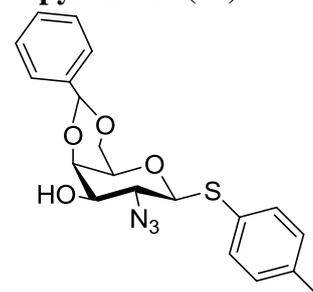
Es wurden 1.50 g (3.82 mmol) α Ac₃GalN₃Br (**26**) gelöst in 9 mL Chloroform langsam zu einer Lösung aus 356 mg (6.48 mmol) Kaliumhydroxid und 568 mg (4.57 mmol) Thiocresol in 9 mL Ethanol getropft. Die Lösung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor mit 10 mL Dichlormethan verdünnt wurde. Die organische Phase wurde zweimal mit je 20 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Rohausbeute: 1.21 g

C₁₃H₁₇N₃O₄S (M = 311.094 g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[175]

4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-4,6-benzyliden-1-thio- α -D-galactopyranosid (75)^[175]



Zu einer Lösung von 1.21 g (3.82 mmol) 4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-1-thio- α -D-galactopyranose (**74**) in 15 mL absol. Acetonitril wurde 748 μ L (4.96 mmol) Benzaldehyddimethylacetal und 43 mg (0.23 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei Raumtempertarur gerührt. Anschließend wurde mit wenigen Tropfen Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt
Ausbeute: 826 mg (54%, 2.07 mmol über 2 Stufen) gelbes Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -38.2$, Lit.^[284]: $[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CH}_2\text{Cl}_2) = -31.9$

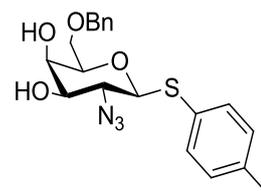
$R_f = 0.31$ (^cHex/EtOAc, 2:1)

$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (M = 399.125 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.63 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ar}), 7.40-7.39 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{Ar-Bzn}}$), 7.12 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, CH_{Bzn}), 5.52 (s, 1H, CH-Bzn), 4.43 (dd, 1H, $J_{\text{H6a,H5}} = 1.7$ Hz, $J_{\text{H6a,H6b}} = 12.2$ Hz, 6a-H), 4.37 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 9.7$ Hz, 1-H) 4.17 (dd, 1H, $J_{\text{H4,H5}} = 0.8$ Hz, $J_{\text{H4,H3}} = 3.5$ Hz, 4-H), 4.03 (dd, 1H, $J_{\text{H6b,H5}} = 1.7$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 12.5$ Hz, 6b-H), 3.64 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H4}} = 3.5$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 9.6$ Hz, 3-H), 3.50 (s, 1H, 5-H), 3.48 (t, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 9.7$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 9.7$ Hz, 2-H), 2.36 (s, 3H, SPhMe).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[175, 284]

4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-6-benzyl-1-thio- α -D-galactopyranosid (79)



Eine Lösung von 200 mg (0.50 mmol) 4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-4,6-benzyliden-1-thio- α -D-galactopyranosid (**75**) in 4 mL absol. Dichlormethan wurde mit 150 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å bei Raumtemperatur 30 min unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde auf -78 °C abgekühlt und die Lösung wurde zuerst mit 259 μL (1.62 mmol) Triethylsilan und dann mit 127 μL (1.45 mmol) Trifluormethansulfonsäure versetzt. Nach 2 h Rühren bei -78 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Triethylamin und 1 mL Methanol abgebrochen. Anschließend wurde mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde mit je 10 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat und einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 65 mg (32%, 0.16 mmol) leicht gelbes Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = + 8.6$.

$R_f = 0.70$ (EtOAc)

$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (M = 401.141 g/mol)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.50-7.48 (m, CH_{Ar}), 7.38-7.31 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{Ar-Bn}}$), 7.09 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, CH_{Bzn}), 4.60-4.54 (m, 2H, CH_{Bzn}), 4.37-4.35 (m, 1H, 1-H), 3.99 (d, 1H,

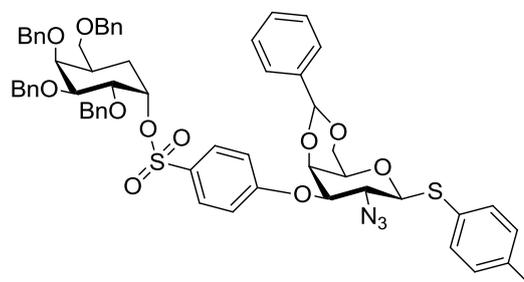
$J_{\text{H4,H3}} = 1.4$ Hz, 4-H), 3.82-3.75 (m, 2H, 6a/b-H), 3.57-3.54 (m, 1H, 5-H), 3.49-3.48 (m, 2H, 2-H, 3-H), 2.32 (s, 3H, SPhMe).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 138.7, 137.6 (3 x C_q (C_{Ar})), 133.8, 129.9 (4 x C_{Ar}) 128.7, 128.2 128.0, 127.9, 127.8 (5 x C_{Ar}), 86.9 (C-1), 77.0 (C-5), 74.3 (C-3), 74.0 (CH_2 (Bn)), 70.0 (C-6), 69.1 (C-4), 62.9 (C-2), 21.3(CH_3 -Ar).

ESI-MS (positiv), m/z : 424.13 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 424.13).

HRESI-MS (positiv), m/z : 424.1290 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 424.1309).

4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-4,6-benzyliden-3-*O*-(*p*-benzylsulfonat-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-carba- β -D-galactopyranosyl)-1-thio- α -D-galactopyranosid (**78**)



Zu einer Lösung von 17.6 mg (44.1 μmol) 4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-4,6-benzyliden-1-thio- α -D-galactopyranosid (**75**) in 1 mL absol. Tetrahydrofuran wurden bei 0 °C 3 mg (88.1 μmol) Natriumhydrid und 83 μL (0.48 μmol) HMPA gegeben. Nach einer Stunde Rühren bei 0 °C wurde langsam eine Lösung von 32 mg (44.1 μmol) *p*-Nitrobenzylsulfonat-2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**76**) in 0.5 mL absol. Tetrahydrofuran zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde mit 5 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde je einmal mit 5 mL 1 N Salzsäure und 5 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{c}}$ Hex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 3 mg (6%, 2.78 μmol) leicht gelber amorpher Feststoff.

$R_f = 0.30$ ($^{\text{c}}$ Hex/EtOAc, 3:1)

$R_t = 30.7$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/ H_2O (70:30) \rightarrow (100:0), 30 min; $\lambda = 214$ nm)

$\text{C}_{61}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{S}_2$ (M = 1078.375 g/mol) 7

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, COSY, NOESY, TOCSY, HMQC, HMBC, CDCl_3), δ [ppm] = 7.83 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, H_{Nos}), 7.64 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_{Tol}), 7.39-7.17 (m, 25H, CH_{Ar}), 7.08 (d, 2H, J

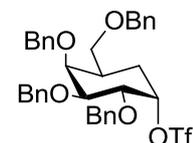
= 7.8 Hz, H_{Tol}), 6.87 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_{Nos}), 5.35 (s, 1H, CH_{Bzn}), 4.96 (s, 1H, 1'-H), 4.91 (d, 1H, $J = 0.9$ Hz, CH_{Bn}), 4.75-4.68 (m, 2H, CH_{Bn}), 4.51-4.38 (m, 8H, 1-H, 6a-H, CH_{Bn}), 4.18-4.15 (m, 3H, 4-H {4.18}, 3-H {4.16}, 4'-H {4.15}), 4.97-4.95 (m, 1H, 6b-H), 3.91 (t, 1H, $J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = J_{\text{H}_2, \text{H}_1} = 9.6$ Hz, 2-H), 3.87 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2', \text{H}_1'} = 2.4$ Hz, $J_{\text{H}_2', \text{H}_3'} = 9.9$ Hz, 2'-H), 3.74 (d, 1H, $J_{\text{H}_3', \text{H}_2'} = 9.9$ Hz, 3'-H), 3.46 (s, 1H, 5-H), 3.45 (t, 1H, $J_{\text{H}_{6a'}, \text{H}_{6b'}} = J_{\text{H}_{6a'}, \text{H}_5'} = 9.0$ Hz, 6a'-H), 3.28-3.26 (m, 1H, 6b'-H), 2.48 (bs, 1h, 5'-H), 2.35 (s, 3H, SPhMe), 1.85-1.83 (m, 1H, 7a'-H), 1.63-1.59 (m, 1H, 7b'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 161.0 (Cq (Phenol)), 139.3, 139.1, 139.0, 138.6, 138.3, 137.5 (6 x Cq (Bn)), 135.1, 130.6 (4 x C_{Tol}), 128.5 (Cq (Sulfonat)), 130.5, 130.1, 129.5, 128.0, 127.5, 126.7, 126.2, 125.9 (27 x C_{Ar}), 125.9 (Cq (S-Tol)), 116.9, 116.7 (2 x C_{Ar}), 101.2 (CH (Bzn)), 85.3 (C-1), 80.3 (C-3'), 79.5 (C-3), 79.3 (C-1'), 77.3 (C-2'), 75.3, (CH₂ (Bn)), 75.0 (C-4'), 73.3, 73.2, 72.7 (CH₂ (Bn)), 72.0 (C-4), 70.1 (C-6'), 69.8 (C-5), 69.4 (C-6), 59.4 (C-2), 35.7 (C-5'), 27.5 (C-7'), 21.5 (CH₃-Ar).

ESI-MS (positiv), m/z : 1098.39 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1098.36).

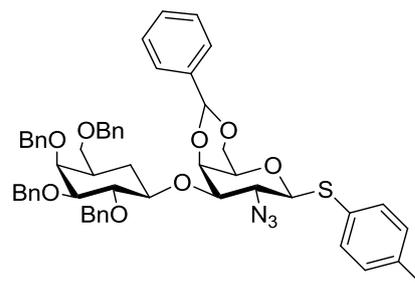
HRESI-MS (positiv), m/z : 1098.3668 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 1098.3645), 1114.3785 ($[\text{M} + \text{K}]^+$, ber.: 1114.3385).

1-*O*-Trifluormethansulfonyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**83**)



Zu einer Lösung von 100 mg (0.18 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**71**) in 2 ml absol. Dichlormethan wurden bei 0 °C 38 μL (0.24 mmol) Trifluormethansulfonsäureanhydrid und 37 μL (0.46 mmol) Pyridin zugegeben. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wurden weitere 38 μL Trifluormethansulfonsäureanhydrid hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde mit 5 mL Dichlormethan und 2 mL Eiswasser verdünnt, die organische Phase wurde mit 10 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde für 2 h im Hochvakuum getrocknet, bevor er ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-4,6-benzyliden-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl-carba- β -D-galactopyranosyl)-1-thio- α -D-galactopyranose (77)



Zu einer Lösung von 74 mg (0.18 mmol) 4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-4,6-benzyliden-1-thio- α -D-galactopyranose (**75**) in 2 mL absol. Tetrahydrofuran wurden bei 0 °C 10 mg (0.26 mmol) Natriumhydrid gegeben. Nach 2 h Rühren bei 0 °C wurde langsam eine Lösung von (0.18 mmol) Trifluormethansulfonat-2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**83**) in 1 mL Tetrahydrofuran zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend noch für weitere 2 h auf 50 °C erhitzt. Es wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde mit jeweils 5 mL Salzsäure (1N) und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (18%, 0.03 mmol über 2 Stufen) gelbes Öl.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -15.69.$$

$R_t = 53.7$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(85:15), 40 min; →(100:0), 50 min; $\lambda = 208$ nm)

$R_f = 0.22$ (^cHex/EtOAc, 3:1)

C₅₅H₅₇N₃O₈S (M = 919.387 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, COSY, NOESY, HMQC, HMBC, CDCl₃), δ [ppm] = 7.60 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Tol}), 7.41-7.25 (m, 25H, CH_{Ar}), 7.00 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, H_{Tol}), 5.50 (s, 1H, CH_{Bzn}), 5.02 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, CH_{Bn}), 4.98 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, CH_{Bn}), 4.85 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, CH_{Bn}), 4.79 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz, CH_{Bn}), 4.70 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, CH_{Bn}), 4.52 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, CH_{Bn}), 4.37 (s, 2H, CH_{Bn}), 4.34 (dd, 1H, $J_{H6a,H5} = 1.4$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 12.3$ Hz, 6a-H), 4.28 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 9.9$ Hz, 1-H), 4.21 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.9$ Hz, 4-H), 4.06 (bs, 1H, 4'-H), 4.00 (t, 1H, $J_{H2',H3'} = J_{H2',H1'} = 9.2$ Hz, 2'-H), 3.96 (dd, 1H, $J_{H6b,H5} = 1.4$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 12.3$ Hz, 6b-H), 3.94 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 3.1$ Hz, $J_{H3,H2} = 9.9$ Hz, 3-H), 3.69 (t, 1H, $J_{H2,H3} = J_{H2,H1} = 9.9$ Hz, 2-H), 3.64-3.57 (m, 1H, 1'-H), 3.46-3.40 (m, 2H, 3'-H, 6a-H), 3.25 (dd, 1H, $J_{H6'b,H5} = 5.2$ Hz, $J_{H6'b,H6'a} = 8.8$ Hz, 6b'-H), 3.22 (bs, 1H, 5-H), 2.32 (s, 3H, SPhMe), 1.70-1.60 (m, 3H, 5'-H, 7a/b'-H).

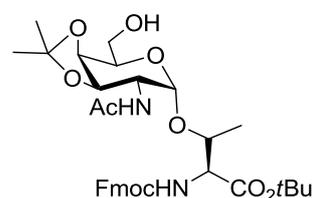
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 139.4, 139.0, 138.6, 138.5, 138.2, 138.0 (7 x C_q (Bn)), 134.7, 129.9 (4 x C_{Tol}), 129.0, 128.5, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 126.5 (25 x C_{Ar}), 100.8 (CH (Bzn)), 85.5 (C-1, C-3'), 83.7 (C-2'), 79.6 (C-3), 76.6 (C-1'), 75.6, 74.3 (CH_2 (Bn)), 74.2 (C-4'), 73.4, 72.8 (CH_2 (Bn)), 71.8 (C-4), 71.0 (C-6'), 69.7 (C-5), 69.6 (C-6), 60.0 (C-2), 37.8 (C-5'), 29.2 (C-7'), 21.4 (CH_3 -Ar).

ESI-MS (positiv), m/z : 942.41 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 942.38), 958.40 ($[\text{M} + \text{K}]^+$, ber.: 958.35).

HRESI-MS (positiv), m/z : 942.3771 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 942.3764).

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-isopropyliden- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (86)^[188]**

(Fmoc-Thr-(α 3,4IsopropylGalNAc)-OtBu)



Zu einer Lösung aus 480 mg (0.80 mmol) Fmoc-Thr-(α GalNAc)-OtBu (**29**) in 8 mL Dimethoxypropan wurden 16 mg (0.07 mmol) (-)-Camphersulfonsäure gegeben und die Mischung wurde zwei Tage bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Nachdem 55 μL Triethylamin zugesetzt wurden, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde 4 h auf 65 °C in 11 mL einer Mischung aus Methanol und Wasser (10:1) erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 430 mg (84%, 0.67 mmol) farbloser amorpher Feststoff.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +50.7$$

$$R_f = 0.52 (\text{EtOAc})$$

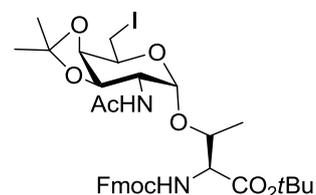
$$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10} (\text{M} = 640.721 \text{ g/mol})$$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ [ppm] = 7.75 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.34$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.34$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41–7.35 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33–7.26 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.01 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.7$ Hz, NHAc), 5.43 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.4$ Hz, NH-Urethan), 4.77 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.03$ Hz, 1-H), 4.45 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.7$ Hz, CH_2 -Fmoc), 4.32–4.17 (m, 3H, 2-H, CH-Fmoc, T^{α}), 4.19–4.15 (m, 1H, 4-H), 4.15–4.08 (m, 2H, T^{β} , 5-H), 4.03 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H4}} = 4.89$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 9.20$ Hz, 3-H), 3.94 (dd, 1H, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 6.38$ Hz, $J_{\text{H6a/b,H6a/b}} = 11.77$ Hz, 6a/b-H), 3.82 (dd, 1H, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 3.98$ Hz, $J_{\text{H6a/b,H6a/b}} = 11.67$ Hz, 6a/b-H), 2.02 (s, 3H, CH_3 (NHAc)), 1.57 (s, 3H, CH_3), 1.44 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.32 (s, 3H, CH_3) 1.27 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$ Hz, T^{γ}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[188]

***N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy,6-iodo-6-desoxy,3,4-isopropyliden- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (88)**

(Fmoc-Thr-(α 3,4IsopropylIGalNAc)-OtBu)



Zu einer Lösung von 50 mg (0.08 mmol) Fmoc-Thr-(α -3,4IsopropylGalNAc)-OtBu (**86**), 40.9 mg (0.16 mmol) Triphenylphosphin und 10.6 mg (0.16 mmol) Imidazol in 1 mL absol. Tetrahydrofuran wurde in der Siedehitze langsam eine Lösung von 39 mg (0.16 mmol) Iod in 1 mL absol. Tetrahydrofuran getropft. Nach weiteren 2 h Erhitzen unter Rückfluss wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase wurde zweimal mit je 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 54 mg (92% 0.07 mmol) leicht rötliches Öl.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +59.2$$

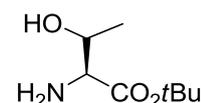
$R_f = 0.65$ (EtOAc)

$\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{IN}_2\text{O}_9$ (M = 750.201 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ [ppm] = 7.78 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.3$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43-7.39 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35-7.29 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.04 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.7$ Hz, NHAc), 5.42 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.4$ Hz, NH-Urethan), 4.75 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.1$ Hz, 1-H), 4.51-4.47 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.29-4.15 (m, 6H, 2-H, CH-Fmoc, T ^{α} , 4-H, T ^{β} , 5-H), 4.03 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 9.2$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 4.9$ Hz, 3-H), 3.42 (dd, 1H, $J_{\text{H6a/b,H6a/b}} = 10.2$ Hz, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 6.2$ Hz, 6_{a/b}-H), 3.33 (dd, 1H, $J_{\text{H6a/b,H6a/b}} = 9.9$ Hz, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 8.1$ Hz, 6_{a/b}-H), 2.03 (s, 3H, (NHAc)), 1.59 (s, 3H, CH₃), 1.46 (s, 9H, (tBu)), 1.34 (s, 3H, CH₃), 1.33 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 7.3$ Hz, T ^{γ}).

ESI-MS (positiv), m/z : 751.20 ([M + H]⁺, ber.: 751.21), 773.18 ([M + Na]⁺, ber.: 773.19).

HRESI-MS (positiv), m/z : 773.1932 ([M + Na]⁺, ber.: 773.1911).

L-Threonin-*tert*-butylester (90)**(NH₂-Thr-*Ot*Bu)**

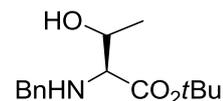
Zu einer Lösung von 1.00 g (2.52 mmol) Fmoc-Thr-*Ot*Bu (**12**) in 30 mL Dichlormethan wurde 1.5 mL Piperidin gegeben. Die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt

Ausbeute: 407 mg (92 %, 2.32 mmol) farbloses Öl.

$R_f = 0.42$ (EtOAc/MeOH, 6:1)

$C_8H_{17}NO_3$ (M = 175.12 g/mol)

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[285]

N-Benzyl-L-threonin-*tert*-butylester (91)**(Bn-Thr-*Ot*Bu)**

Zu einer Lösung von 407 mg (2.32 mmol) NH₂-Thr-*Ot*Bu (**90**) in 20 mL absol. Dichlormethan und 4 mL absol. Tetrahydrofuran wurden 260 µL (2.77 mmol) Benzaldehyd und 400 mg Magnesiumsulfat gegeben. Nach 36 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Magnesiumsulfat abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL Methanol aufgenommen und bei 0 °C mit 97 mg (2.62 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit jeweils 20 mL Wasser und Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wurde mit 10 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 347 mg (56%, 1.31 mmol) farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, CHCl_3) = -20.19$.

$R_f = 0.78$ (^cHex/EtOAc, 1:1)

$C_{15}H_{23}NO_3$ (M = 265.168 g/mol)

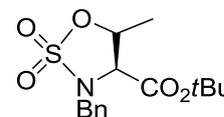
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.37-7.28 (m, 5H, H_{Ar}), 3.84 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, CH_{Bn}) 3.79 (d, 1H, $J = 12.9$ Hz, CH_{Bn}), 3.62-3.60 (m, 1H, T^β), 2.91 (d, 1H, $J_{T\alpha, T\beta} = 7.9$ Hz, T^α), 1.47 (s, 9H, (*t*Bu)), 1.21 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 172.9 (C=O (Ester)), 139.4 (Cq (Bn)), 128.8, 128.7, 128.6, 127.6 (4 x C_{Ar}), 82.2 (Cq (*t*Bu)), 68.3, 68.2 (T^α , T^β), 52.8 (CH_2 (Bn)), 28.3 (CH_3 (*t*Bu)), 19.5 (T^γ)

ESI-MS (positiv), m/z : 232.09 ($[\text{M} - \text{tBu} + \text{Na}]^+$, ber.: 232.10), 288.15 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 288.16).

HRESI-MS (positiv), m/z : 288.1569 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 288.1582).

(3S, 4S)-5-Benzyl-4-tert-butylcarbonyl-3-methyl-1,2,5-thioxazolidin-1,1-dioxid (93)



Zu einer Lösung von 307 mg (1.16 mmol) Bn-Thr-*O*tBu (**91**) in 20 mL absol. Dichlormethan wurden 642 μL Triethylamin gegeben. Zu dieser Lösung wurden bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 108 μL Thionylchlorid langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch wurde auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach einer Stunde Rühren bei dieser Temperatur wurde die Reaktionslösung mit kaltem Diethylether verdünnt und die organische Phase wurde jeweils mit 10 mL dest. Wasser und 10 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde 2 h im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt in 30 mL einer Mischung aus Acetonitril und Chloroform (1:1) gelöst und bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ mit 3 mg (13.9 μmol) $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 495 mg (2.32 mmol) Natriumperiodat, gelöst in 6 mL Wasser versetzt. Die Reaktionslösung wurde 40 min bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, bevor durch Zusatz von 20 mL Diethylether und 10 mL dest. Wasser verdünnt wurde. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 130 mg (34%, 0.40 mmol) farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -36.60$.

$R_f = 0.66$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1)

$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{S}$ (M = 327.114 g/mol)

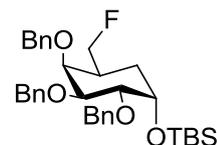
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.41-7.33 (m, 5H, H_{Ar}), 4.86 (p, 1H, $J_{\text{T}\beta, \text{T}\alpha} = J_{\text{T}\beta, \text{T}\gamma} = 6.3\text{ Hz}$ T^β), 4.47 (s, 2H, CH_{Bn}), 3.59 (d, 1H, $J_{\text{T}\alpha, \text{T}\beta} = 6.5\text{ Hz}$, T^α), 1.55 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma, \text{T}\beta} = 6.3\text{ Hz}$, T^γ), 1.42 (s, 9H, (*t*Bu)),

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 166.4 (C=O (Ester)), 133.9 (C_q (C_{Ar})), 129.3, 128.9, 128.6. (4 x C_{Ar}), 84.1 (C_q ($t\text{Bu}$)), 78.0 (T^β), 65.7 (T^α), 50.4 (CH_2 (Bn)), 28.0 (CH_3 ($t\text{Bu}$)), 19.6 (T^γ)

ESI-MS (positiv), m/z : 350.11 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 350.10).

HRESI-MS (positiv), m/z : 350.1035 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 350.1038).

***tert*-Butyldimethylsilyl-6-desoxy-6-fluor-2,3,4-tri-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranosid
(72)**



Zu 40 mg (0.07 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranosid (**68**), gelöst in 1 mL absol. Dichlormethan, wurden 18 μL (0.14 mmol) 2,4,6-Collidin und 13.0 μL (0.11 mmol) DAST hinzugefügt. Das Gemisch wurde 2 h bei 80 °C und 100 W ($p_{\text{max}} = 5.0$ bar, und einer Aufheizphase von $t = 5.0$ min) in der Mikrowelle reagieren gelassen. Anschließend wurde 1 mL Methanol hinzugefügt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 15:1) gereinigt.

Ausbeute: 22 mg (55%, 0.04 mmol) farbloses Öl

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +44.8$.

$R_f = 0.79$ ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1)

$\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{FO}_4\text{Si}$ ($M = 564.307\text{g/mol}$)

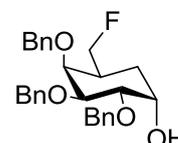
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.38-7.27 (m, 15H, H_{Ar}), 5.01 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, CH_{Bn}), 4.81 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz, CH_{Bn}), 4.76-4.71 (m, 3H, CH_{Bn}), 4.56 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, CH_{Bn}), 4.44 (dt, 1H, $J_{\text{H6a,H6b}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{H6a,F}} = 47.5$ Hz, 6a-H), 4.34-4.19 (m, 2H, 6b-H, 1-H), 4.05 (bs, 1H, 4-H), 3.88 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H4}} = 2.4$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 9.7$ Hz, 3-H), 3.80 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 2.5$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 9.7$ Hz, 2-H), 2.37-2.35 (m, 1H, 5-H), 1.55-1.38 (m, 2H, 7a/b-H), 0.86 (s, 9H, ($t\text{Bu}$)), 0.05 (s, 6H, 2 x CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl_3), δ [ppm] = 139.5, 139.4, 139.3 (3 x C_q (Bn)), 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4 (15 x C_{Ar}), 84.5 (d, $J_{\text{F,C6}} = 166.4$ Hz, C-6), 80.5 (C-3), 80.0 (C-2), 75.7 (d, $J_{\text{F,C4}} = 4.2$ Hz, C-4), 74.7, 73.2, 72.9 (3 x CH_2 (Bn)), 68.6 (C-1), 36.2 (d, $J_{\text{F,C5}} = 17.0$ Hz, C-5), 29.1 (d, $J_{\text{F,C7}} = 7.1$ Hz, C-7), 26.0 (3 x CH_3 ($t\text{Bu}$)), 18.3 (C_q ($t\text{Bu}$)), -4.3, -4.8 (2 x CH_3 (TBS)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -221.9 (t, $J_{\text{F,H6}} = 43.2$ Hz).

HRESI-MS (positiv), m/z : 587.2965 ($[M + Na]^+$, ber.: 587.2971).

6-Desoxy-6-fluor-2,3,4-tri-O-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (73)



Zu einer Lösung von 33 mg (0.06 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyl-6-desoxy-6-fluor-2,3,4-tri-O-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**72**) in 1 mL absol. Tetrahydrofuran wurden unter Argonatmosphäre langsam 170 μ L TBAF (1 M in Tetrahydrofuran) bei Raumtemperatur getropft. Die Mischung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 2 mL Wasser und 5 mL Ethylacetat verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 10 mL einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 24 mg (91%, 0.05 mmol) farbloses Öl.

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, CHCl_3) = + 31.7$.

$R_f = 0.29$ (^cHex/EtOAc, 4:1)

$R_t = 12.2$ min (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O, (70:30)→(100:0), 30 min; $\lambda = 214$ nm)

C₂₈H₃₁FO₄ (M = 450.221g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HMQC), δ [ppm] = 7.41-7.28 (m, 15H, H_{Ar}), 5.02 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz, CH_{Bn}), 4.81-4.78 (m, 3H, CH_{Bn}), 4.71(d, 1H, $J = 11.2$ Hz, CH_{Bn}), 4.59 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz, CH_{Bn}), 4.45 (dt, 1H, $J_{H6a,H6b} = 9.1$ Hz, $J_{H6a,F} = 47.5$ Hz, 6a-H), 4.31 (ddd, 1H, $J_{H6b,H5} = 5.6$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 8.7$ Hz, $J_{H6b,F} = 46.8$ Hz, 6b-H), 4.20-4.18 (m, 1H, 1-H), 4.12 (bs, 1H, 4-H), 3.93 (dd, 1H, $J_{H2,H1} = 3.2$ Hz, $J_{H2,H3} = 9.6$ Hz, 2-H), 3.79 (dd, 1H, $J_{H3,H4} = 2.4$ Hz, $J_{H3,H2} = 9.6$ Hz, 2-H), 2.41-2.33 (m, 1H, 5-H), 1.60-1.56 (m, 2H, 7a/b-H).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DEPT, HMQC, CDCl₃), δ [ppm] = 139.3, 139.0, 138.6 (3 x C_q(Bn)), 128.6, 128.4, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6 (15 x C_{Ar}), 84.0 (d, $J_{F,C6} = 167.4$ Hz, C-6), 80.8 (C-3), 80.0 (C-2), 75.0 (d, $J_{F,C4} = 3.6$ Hz, C-4), 74.8, 73.2, 73.1 (3 x CH₂ (Bn)), 67.2 (C-1), 35.8 (d, $J_{F,C5} = 18.7$ Hz, C-5), 26.2 (d, $J_{F,C7} = 8.3$ Hz, C-7).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -221.9 (dt, $J_{F,H5} = 7.9$ Hz, $J_{F,H6} = 47.8$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 473.24 ($[M + Na]^+$, ber.: 473.21).

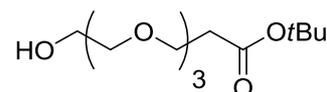
HRESI-MS (positiv), m/z : 473.2118 ($[M + Na]^+$, ber.: 473.2106).

5.4 Synthese der Glycopeptidkonjugate und deren Immunologische Evaluierung

5.4.1 Synthesen zu Kapitel 3.2.1 und 3.2.2

12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**97**)^[131]

(HO-PEG-*Ot*Bu)



Eine Lösung von 25.0 mL (0.19 mol) wasserfreiem Triethylenglycol in 100 mL absol. Tetrahydrofuran wurde unter Argon mit 40 mg (1.7 mmol) Natrium versetzt. Nachdem das Natrium vollständig gelöst war, wurden 9.6 mL (66.0 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 1.6 mL 1N Salzsäurelösung neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 70 mL ges. Natriumchloridlösung aufgenommen und dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 13.0 g (71%, 46.8 mmol), klare, farblose Flüssigkeit.

$R_f = 0.30$ (EtOAc).

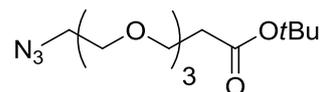
$C_{13}H_{26}O_6$ ($M = 278.173$ g/mol).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ [ppm] = 3.70-3.62 (m, 14H, CH_2O), 2.50 (t, 2H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.5$ Hz, $CH_2-COOtBu$), 1.43 (s, 9H, (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[286]

12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**98**)^[131]

(N_3 -PEG-*Ot*Bu)



Es wurden 17.5 g (62.8 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **97** in 25 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 21.8 mL (0.16 mol) Triethylamin versetzt. Unter Eiskühlung wurden 10.1 mL (0.13 mol, 2.1 Äq.) Mesylchlorid zugetropft und die Reaktionsmischung wurde über einen Zeitraum von 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das gebildete Triethylamin-hydrochlorid durch *Hyflo* (Supercell, Roth)

filtriert und der Rückstand wurde mit 100 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL Eiswasser und einmal mit 20 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 25 mL Dimethylformamid aufgenommen und mit 25.3 g (0.39 mol) Natriumazid versetzt. Es wurde 18 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde das Dimethylformamid i. Vak. entfernt und der Rückstand in 60 mL Wasser gelöst. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 50 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 13.6 g (71%, 44.7 mmol), gelbe Flüssigkeit.

$R_f = 0.29$ (^cHex/EtOAc 2:1).

$C_{13}H_{25}N_3O_5$ (M = 303.179 g/mol).

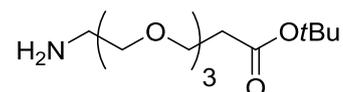
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 3.76-3.62 (m, 12H, CH₂O), 3.38 (t, 2H, $J_{CH_2,CH_2} = 5.1$ Hz, N₃-CH₂), 2.49 (t, 2H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz, CH₂-COO*t*Bu), 1.44 (s, 9H, (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.9 (C=O (Ester)), 80.5 (C_q (*t*Bu)), 70.7, 70.6, 70.6, 70.4 (4 x CH₂O), 70.0 (N₃-CH₂CH₂), 66.9 (CH₂CH₂-COO*t*Bu), 50.7 (N₃-CH₂), 36.2 (CH₂-COO*t*Bu), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

12-Amino-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester (99)^[131]

(H₂N-PEG-O*t*Bu)



Zu einer Suspension von 9.70 g einer Ni-Al-Legierung in 130 mL destilliertem Wasser wurde solange festes Natriumhydroxid gegeben, bis bei weiterer Zugabe kein Schäumen mehr auftrat. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 30 min lang auf 70 °C erwärmt. Die überstehende Lösung wurde dann vom gebildeten Raney-Nickel abdekantiert, bevor dieses mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und mehrmals mit Isopropanol gespült wurde. Zum so erhaltenen Katalysator wurden 13.0 g (42.8 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (98), gelöst in 80 mL Isopropanol, gegeben. Durch wiederholtes Anlegen von Vakuum und Belüften mit Wasserstoff wurde die Reaktionsmischung vom Sauerstoff befreit. Die Suspension wurde vier Tage unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Raney-Nickel durch *Hyflo* (Supercell, Roth) abfiltriert und das Filtrat wurde i. Vak. vom

Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Rohausbeute: 11.4 g gelbliches Öl.

$R_f = 0.15$ (Et₂O/MeOH, 1:1).

C₁₃H₂₇NO₅ (M = 277.189 g/mol).

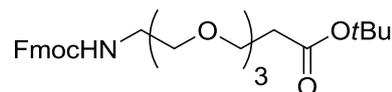
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 3.72-3.62 (m, 12H, CH₂O), 3.38 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 5.0$ Hz, NH₂-CH₂), 2.49 (t, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 6.6$ Hz, CH₂-COO*t*Bu), 1.43 (s, 9H, (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.9 (C=O Ester), 80.5 (C_q (*t*Bu)), 73.5 (NH₂-CH₂CH₂), 70.7, 70.6, 70.6, 70.5 (4×CH₂O), 66.9 (CH₂CH₂-COO*t*Bu), 41.8 (NH₂-CH₂), 36.2 (CH₂-COO*t*Bu), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure-*tert*-butylester (100)^[131]

(FmocHN-PEG-OfBu)



Zu einer Lösung von 11.4 g (41.3 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester **99** in 150 mL einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) wurden 3.46 g (41.3 mmol) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Unter Rühren wurde die Reaktionsmischung portionsweise mit 14.0 g (41.3 mmol) Fmoc-OSu versetzt und 18 h bei Raumtemperatur stark gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 2 N Salzsäurelösung auf pH = 6 angesäuert, wobei sich das Produkt als Öl abschied. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der verbleibende Rückstand wurde viermal mit jeweils 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 300 mL 1N Salzsäurelösung und 150 mL Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt. (Laufmittel: ^cHex/EE (2:1) → (1:1)).

Ausbeute: 6.59 g (33%, 13.9 mmol, über 2 Stufen), gelbliches Öl.

$R_f = 0.14$ (^cHex/EtOAc 1:1).

C₂₈H₃₇NO₇ (M = 499.257 g/mol).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.76 (d, 2H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.5$ Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = J_{\text{H}_8, \text{H}_7} = 7.5$ Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = J_{\text{H}_6, \text{H}_7} = J_{\text{H}_6, \text{H}_5} = 7.3$ Hz, H-3-, H-6-Fmoc), 7.34-7.28 (m, 2H, H-2-, H-7-Fmoc), 5.40 (sb, 1H, NH-Urethan), 4.40 (d, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{H}_9} = 6.9$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1H, $J_{\text{H}_9, \text{CH}_2} = 6.8$ Hz, 9H-

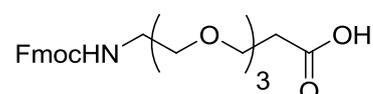
Fmoc), 3.71-3.55 (m, 12H, CH₂O), 3.42-3.37 (m, 2H, FmocHN-CH₂), 2.49 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂-COO*t*Bu), 1.44 (s, 9H, *t*Bu)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 170.9 (C=O (Ester)), 144.0 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.6 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.0 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.1 (C-1-, C-8-Fmoc), 120.0 (C-4-, C-5-Fmoc), 80.5 (C_q (*t*Bu)), 70.0 (FmocHN-CH₂CH₂), 70.5, 70.5, 70.3, 70.3 (4 x OCH₂), 66.9 (CH₂CH₂-COO*t*Bu), 47.2 (FmocHN-CH₂), 28.1 (3 x CH₃ (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure (101)^[131]**

(FmocHN-PEG-OH)



Es wurden 6.95 g (13.9 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadecansäure-*tert*-butylester **100** in einer Mischung aus 40 mL Trifluoressigsäure und 4 mL Wasser 4 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 15 mL Toluol verdünnt, i. Vak. eingengt und der erhaltene Rückstand wurde dreimal mit je 15 mL Toluol und dreimal mit jeweils 10 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH/AcOH 40:1:0.5) und erneut viermal mit jeweils 25 mL Toluol und dreimal mit jeweils 25 mL Dichlormethan kodestilliert. Ausbeute: 4.94 g (82%, 11.1 mmol), gelbes Öl.

R_f = 0.14 (DCM/MeOH/AcOH, 40:1:0.5).

C₂₄H₂₉NO₇ (M = 443.194 g/mol)].

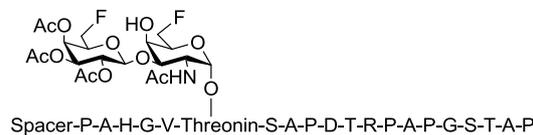
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, *J*_{H₄,H₃} = *J*_{H₅,H₆} = 7.5 Hz, H-4-, H-5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, *J*_{H₁,H₂} = *J*_{H₈,H₇} = 7.2 Hz, H-1-, H-8-Fmoc), 7.42-7.29 (m, 4H, H-2-, H-3-, H-6-, H-7-Fmoc), 6.54 (sb, 1H, -COOH), 5.40 (sb, 1H, NH-Urethan), 4.40 (d, 2H, *J*_{CH₂,H₉} = 6.9 Hz, CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1H, *J*_{H₉,CH₂} = 6.8 Hz, 9H-Fmoc), 3.71-3.55 (m, 12H, CH₂O), 3.45-3.38 (m, 2H, FmocHN-CH₂), 2.49 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, CH₂-COO*t*Bu), 1.44 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 173.9 (COOH), 162.8 (C=O (Urethan)), 144.0 (C-1a-, C-8a-Fmoc), 141.3 (C-4a-, C-5a-Fmoc), 127.6 (C-3-, C-6-Fmoc), 127.0 (C-2-, C-7-Fmoc), 125.1 (C-1-, C-8-Fmoc), 119.9 (C-4-, C-5-Fmoc), 77.2 (FmocHN-CH₂CH₂), 70.5, 70.3, 70.2, 70.1 (4 x OCH₂), 66.4 (CH₂CH₂-COOH), 47.2 (FmocHN-CH₂), 34.7 (CH₂COOH).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 444.12 ([M + H]⁺, ber.: 444.20); 466.15 ([M + Na]⁺, ber.: 466.18).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluoro-3-*O*-[6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (102)



Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert, ausgehend von 435 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.23 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll (s. Seite 80) am Peptidsynthesizer gekoppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte manuell. Zunächst wurde die Fmoc Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 106 mg (0.13 mmol) der Glycosylaminosäure zusammen mit 53 mg (0.14 mmol) HATU und 18.7 mg (0.14 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 30 μ L *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und 8 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit NMP gewaschen und noch freie Aminogruppen wurden in einem Capping Schritt acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylenglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptides wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und 2 h in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest. Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz zweimal mit ca. 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 30.1 min)) gereinigt:

Ausbeute: 77 mg (29%, 0.03 mmol) farbloses Lyophilisat

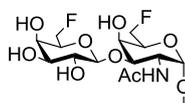
$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -134.38$$

C₁₀₉H₁₇₁F₂N₂₇O₄₃ (M = 2584.199 g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 870.15 ([M + 2H + 1Na]³⁺, ber.: 869.73).

MALDI-TOF-MS (dhb positive ion mode), m/z : 2586.04 ([M + H]⁺, ber.: 2586.68)

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-6-deoxy-6-fluorgalactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (106)



Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Es wurden 66 mg (0.025 mmol) des Glycopeptides in 100 mL wässriger NaOH Lösung (pH = 10) gelöst und zwei Tage unter ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde mit verdünnter Essigsäure (1N) neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 18.0 min) gereinigt.

Ausbeute: 39 mg (55%, 0.016 mmol) farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -166.64$$

C₁₀₃H₁₆₅F₂N₂₇O₄₀ (2458.1675 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.62 (d, 1H, $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 1.4$ Hz, H ^{ϵ}), 7.32 (d, 1H, $J_{\text{H}_\delta, \text{H}_\epsilon} = 1.2$ Hz, H ^{δ}), 5.01 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.8$, 1-H), 4.83- 4.63 (m, 7H, D ^{α} {4.73}, H ^{α} {4.69}, 6a'-H {4.68}, 6a-H {4.67}, T ^{α *} {4.66}, R ^{α} {4.65}, A₃ ^{α} {4.64}), 4.61-4.51 (m, 5H, A₂ ^{α} {4.59}, 6b'-H {4.58}, A₄ ^{α} {4.57}, 6b-H {4.56}, S₁ ^{α} {4.52}), 4.48-4.19 (m, 17H, S₂ ^{α} {4.67}, 1'-H {4.47}, V ^{α} {4.42}, P₁₋₅ ^{α} {4.41, 4.39, 4.38, 4.35, 4.33}, T₁₋₂ ^{α} {4.36, 4.31}, T ^{β *} {4.31}, 5-H {4.28}, 2-H {4.24}, A₁ ^{α} {4.23}, 4-H {4.22}, T₁₋₂ ^{β} {4.21, 4.20}), 4.03 (d, 1H, $J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 4.8$ Hz, 3-H), 4.00-3.95 (m, 5H, G ^{α} {3.99, 3.97}, 4'-H {3.95}), 3.93- 3.74 (m 17H, 5'-H {3.91}, S_{1,2} ^{β} {3.87, 3.83}, P₁₋₄ ^{δ} {3.85, 3.81, 3.78, 3.75}, CH₂O-Spacer {3.75, 3.74}), 3.69-3.65 (m, 10H, P₅ ^{δ} {3.69}, CH₂O-Spacer {3.69, 3.68, 3.67, 3.64}, 3.62 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 3.2$ Hz, $J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = 10.1$ Hz, 3'-H), 3.51 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2, \text{H}_1} = 7.8$ Hz, $J_{\text{H}_2, \text{H}_3} = 9.9$ Hz, 2'-H), 3.31 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{\beta\text{a}}, \text{H}_\alpha} = 5.5$ Hz, $J_{\text{H}_{\beta\text{a}}, \text{H}_{\beta\text{b}}} = 15.5$ Hz, H ^{βa}), 3.21-3.16 (m 5H, R ^{δ} {3.2}, H ^{β} {3.19} CH₂NH₂-Spacer {3.17}), 3.00- 2.87 (m, 2H, D ^{β}), 2.79-2.63 (m, 2H, CH₂-Amid-Spacer), 2.38-2.21 (m, 6H, P₁₋₃ ^{β} {2.34, 2.30, 2.24}, 2.12-1.84 (m, 19H, V ^{β} {2.10}, P₁₋₅ ^{γ} {2.08, 2.05, 2.00, 1.94, 1.93}, CH₃ (NHAc) {2.00}, P_{4,5} ^{β} {1.92}, R ^{βa} {1.84}), 1.75-1.68 (m, 3H, R ^{βb} {1.72}, R ^{γ} {1.66}), 1.39-1.30 (m, 12H, A₁₋₄ ^{β} {1.38, 1.36, 1.34, 1.32}), 1.26 (d, 3H, $J_{\text{T}_\gamma, \text{T}_\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ *}), 1.20 (d, 3H, $J_{\text{T}_\gamma, \text{T}_\beta} = 6.5$ Hz, T₁ ^{γ}), 1.18 (d, 3H, $J_{\text{T}_\gamma, \text{T}_\beta} = 6.4$ Hz, T₂ ^{γ}), 0.97 (d, 3H, $J_{\text{V}_\gamma, \text{V}_\beta} = 4.9$ Hz, V ^{γ}), 0.96 (d, 3H, $J_{\text{V}_\gamma, \text{V}_\beta} = 4.8$ Hz, V ^{γ}).

¹³C-NMR (100,6 MHz, D₂O, DEPT) δ (ppm): 176.5, 175.8, 174.9, 174.5, 174.4, 174.0, 173.7, 173.6, 173.5, 173.1, 173.0, 172.7, 172.5, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.1 170.9,

170.7, (C=O, (NHAc, Carboxyl), 156.7 (C=NH), 133.4 (H^ε), 128.4 (H^γ), 117.3 (H^δ), 104.5 (C-1'), 99.2 (C1), 83.7 (d, $J_{F,C6} = 164.4$ Hz, C-6), 83.2 (d, $J_{F,C6} = 165.1$ Hz, C-6'), 77.5 (T^{β*}), 76.9 (C-3), 73.07 (d, $J_{F,C5} = 20.4$ Hz, C-5'), 72.3 (C-3'), 70.4 (C-2'), 69.5 (C-5), 69.6, 69.5, 69.5, 69.4 (CH₂O (Spacer)), 68.5 (d, $J_{F,C4} = 9.0$ Hz, C-4), 68.1 (d, $J_{F,C4} = 7.1$ Hz, C-4'), 67.0 (T₁^β), 66.3 (T₂^β), 66.0 (CH₂ (Spacer)), 61.4, 61.1 (S_{1,2}^β), 60.8, 60.5, 60.1, 60.0 (P₁₋₅^α), 59.4 (V^α), 59.9, 58.8 (T_{1,2}^α), 57.0 (T^{α*}), 55.6, 55.0 (S_{1,2}^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6 (C-2), 48.2, (A^α), 48.1, 47.9, 47.8, (P₁₋₃^δ), 47.7, 47.6 (A^α), 47.4, 47.3 (P_{4,5}^δ), 42.4, 42.3 (G_{1,2}^α), 40.5 (R^δ), 39.1 (CH₂NH₂ (Spacer)), 34.9 (D^β), 34.0 (CH₂Amid (Spacer)), 30.1 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 (P₁₄^β), 27.5 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P₁₋₅^γ), 23.9 (R^γ), 22.3 (CH₃ (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^γ), 18.5 (V^γ), 18.2 (T^{γ*}), 17.8 (V^γ), 16.3, 15.3, 15.2, 15.1 (A₁₋₄^β).

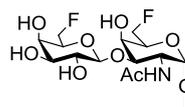
¹⁹F-NMR (376.4 Hz, D₂O): ¹⁹F-NMR (376.5 MHz, D₂O), δ (ppm): -229.2 - -229.5 (m, 2F, {-229.4 (dt, $J_{F,H5} = 12.7$ Hz, $J_{F,H6} = 48.5$ Hz)}).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 820.77 ([M + 3H]³⁺, ber.: 820.39), 1230.63 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1230.09)

HR ESI-MS (positiv), *m/z*: 1230.5902 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1230.0916).

MALDI-TOF-MS (dhb positive ion mode), *m/z*: 2460.90 ([M + H]⁺, ber.: 2460.57)

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-6-deoxy-6-fluor galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (113)



Quadratsäure-Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Zu einer Lösung von 26 mg (0.01 mmol) Glycopeptid in 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden 1.63 μL (0.011 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion gegeben. Anschließend wurden ca. 25 μL einer ges. Natriumcarbonatlösung zugegeben bis ein pH-Wert von 8 erreicht wurde. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (HPLC-Kontrolle), verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% 10:90)→(25:75), 40 min, →(70:30) 60 min, λ = 214 nm, R_t = 25.1 min) gereinigt.

Ausbeute: 20 mg (73%, 7.70 μmol) farbloses Lyophilisat

$C_{109}H_{169}F_2N_{27}O_{43}$ ($M = 2582.1836$ g/mol)

$[\alpha]_D^{23}$ (1.00, H_2O) = -82.85

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY, HMQC) δ (ppm): 8.61 (d, 1H, $J_{H\epsilon, H\delta} = 1.4$ Hz, H^ϵ), 7.31 (d, 1H, $J_{H\delta, H\epsilon} = 1.1$ Hz, H^δ), 5.01 (d, 1H, $J_{H1, H2} = 3.7$, 1-H), 4.75- 4.50 (m, 15H, D^α {4.72}, CH_2O -Squarat {4.71}, H^α {4.69}, $6a'$ -H {4.68}, $6a$ -H {4.67}, $T^{\alpha*}$ {4.65}, R^α {4.65}, S_1^α {4.52}, A_3^α {4.58}, $6b'$ -H {4.58}, $6b$ -H {4.56}, A_2^α {4.53},), 4.48-4.19 (m, 18H, A_4^α {4.45}, S_2^α {4.46}, $1'$ -H {4.45}, P_{1-5}^α {4.39, 4.38, 4.37, 4.35, 4.33}, T_{1-2}^α {4.34, 4.30}, $T^{\beta*}$ (4.31), V^α {4.29}, 5 -H {4.30}, A_1^α {4.23}, 4 -H {4.21}, T_{1-2}^β {4.20, 4.19}, 2 -H {4.18}), 4.02-4.01 (m, 1H, 3-H), 4.00-3.94 (m, 5H, G^α {3.99, 3.96}, $4'$ -H {3.94}), 3.93- 3.74 (m 15H, $5'$ -H {3.90}, $S_{1,2}^\beta$ {3.89, 3.82}, P_{1-4}^δ {3.85, 3.81, 3.78, 3.75}, CH_2NH -Spacer {3.78}, CH_2O -Spacer {3.74}), 3.67-3.56 (m, 15H, P_5^δ {3.67}, CH_2O -Spacer {3.69, 3.66, 3.65, 3.62, 3.59, 3.56}, CH_2NH -Spacer {3.66}, $3'$ -H {3.60}), 3.51 (dd, 1H, $J_{H2, H1} = 7.8$ Hz, $J_{H2, H3} = 9.9$ Hz, $2'$ -H), 3.31 (dd, 1H, $J_{H\beta a, H\alpha} = 5.4$ Hz, $J_{H\beta a, H\beta b} = 15.5$ Hz, $H^{\beta a}$), 3.21-3-14 (m 3H, R^δ {3.20}, H^β {3.16}), 2.96 (dd, 1H, $J_{D\beta a, D\alpha} = 6.4$, $J_{D\beta a, D\beta b} = 17.0$, $D^{\beta a}$), 2.88 (dd, 1H, $J_{D\beta b, D\alpha} = 6.9$ Hz, $J_{D\beta b, D\beta a} = 17.1$ Hz, $D^{\beta b}$), 2.77-2.61 (m, 2H, CH_2 -Amid-Spacer), 2.33-2.20 (m, 6H, P_{1-3}^β {2.33, 2.29, 2.24}, 2.10-1.80 (m, 17H, V^β {2.10}, P_{1-5}^γ {2.08, 2.05, 2.00, 1.94, 1.93}, CH_3 (NHAc) {1.96}, $P_{4,5}^\beta$ {1.92}, $R^{\beta a}$ {1.84}), 1.75-1.63 (m, 3H, $R^{\beta b}$ {1.74}, R^γ {1.65}), 1.42 (t, 3H, $J_{CH_3/CH_2} = 7.0$ Hz, CH_3 -Squarat), 1.39-1.30 (m, 12H, A_{1-4}^β {1.38, 1.36, 1.34, 1.32}), 1.24 (d, 3H, $J_{T\gamma^*, T\beta^*} = 6.3$ Hz, $T^{\gamma*}$), 1.19 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.5$ Hz, T_1^γ), 1.17 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, T_2^γ), 0.96 (d, 3H; $J_{V\gamma, V\beta} = 4.4$ Hz, V^γ), 0.95 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta} = 4.3$ Hz, V^γ).

^{13}C -NMR (100,6 MHz, D_2O , DEPT) δ (ppm): 188.8, 183.3 (C=O (Squarat)), 177.1, 176.0, 174.9, 174.9, 174.0, 173.7, 173.5, 173.1, 172.5, 172.0, 171.5, 171.5, 171.4, 171.2, 171.1, 171.0, 170.8, 170.7 (C=O, (NHAc, Ester), C=C (Squarat)), 156.7 (C=NH), 133.4 (H^ϵ), 128.4 (H^γ), 117.3 (H^δ), 104.5 ($C1'$), 99.2 (C1), 83.7 (d, $J_{F, C6} = 167.2$ Hz, C-6), 83.2 (d, $J_{F, C6} = 165.4$ Hz, C-6'), 77.5 ($T^{\beta*}$), 76.9 (C-3), 73.1 (d, $J_{F, C5} = 19.9$ Hz, C-5'), 72.3 (C-3'), 70.6 (C-2'), 70.5 (CH_2 (Squarat)), 69.4 (C5), 70.3, 69.6, 69.5, 69.3 (CH_2O (Spacer)), 68.5 (d, $J_{F, C4} = 8.1$ Hz, C-4), 68.1 (d, $J_{F, C4} = 7.7$ Hz, C-4'), 67.0 (T_1^β), 66.3 (T_2^β), 61.4, 61.1 ($S_{1,2}^\beta$), 60.5, 60.2, 60.1, 59.8 (P_{1-5}^α), 59.4 (V^α), 59.8, 58.7 ($T_{1,2}^\alpha$), 56.9 ($T^{\alpha*}$), 55.5, 55.0 ($S_{1,2}^\alpha$), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.7 (C2), 48.0, (A^α), 47.9, 47.8, 47.7 (P_{1-3}^δ), 47.6, 47.4, 74.3 (A^α), 47.2, 47.2, 47.0 ($P_{4,5}^\delta$), 43.9, 43.8 (CH_2NH_2 (Spacer)), 42.4, 42.3 ($G_{1,2}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 35.09 (D^β), 34.1 (CH_2 Amid (Spacer)), 30.1 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.8 (P_{1-5}^β), 27.5 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P_{1-5}^γ), 23.9 (R^γ), 22.3 (CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^γ), 18.5 (V^γ), 18.2 ($T^{\gamma*}$), 17.8 (V^γ), 16. 2, 15.2, 15.1, 15.0 ($A_{1,4}^\beta$), 14.9 (CH_3 (Squarat)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 Hz, D_2O), δ (ppm): -229.1 - -229.4 (m, 2F, {-229.3 (dt, $J_{\text{F,H5}} = 13.7$ Hz, $J_{\text{F,H6}} = 47.1$ Hz)}).

ESI-MS (positiv), m/z : 874.70 ($[\text{M} + \text{K} + 2\text{H}]^{3+}$, ber.: 874.92), 1292.59 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1292.84).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1292.6168 ($[\text{M} + 2\text{H}]^+$, ber.: 1292.8379).

MALDI-TOF-MS (dhb positive ion mode), m/z : 2585.60 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, ber.: 2582.1836).

Konjugation an Rinderserumalbumin

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 3 mg (0.045 μmol) Rinderserumalbumin und 2.9 mg (1.13 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 4 mg Konjugat erhalten.

MALDI-TOF-MS (*Sinapinsäure*, positiv), m/z : 69355.3-86802.77

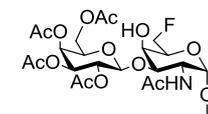
Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde eine Belegung von 2 - 8 Molekülen **XX** pro Molekül BSA ermittelt.

Konjugation an das Tetanus-Toxoid

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat₄ in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 4 mg (0.026 μmol) Tetanus Toxoid und 3.8 mg (1.48 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 8 mg Konjugat erhalten.

**Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-
(2-acetamido-2,6-dideoxy-6-fluoro-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -**

D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (104)



Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert, ausgehend von 455 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.22 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll (s. Seite 80) am Peptidsynthesizer gekoppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte manuell. Zunächst wurde die Fmoc Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 149 mg (0.17 mmol) der Glycosylaminosäure zusammen mit 71 mg (0.19 mmol) HATU und 25 mg (0.19 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 41 μ L *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und 8 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit NMP gewaschen und noch freie Aminogruppen wurden mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylenglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptides wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und 2 h in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Es wurde filtriert und das Harz wurde zweimal mit ca. 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert.

Rohausbeute: 166 mg farbloses Lyophilisat

$C_{111}H_{174}FN_{27}O_{45}$ ($M = 2624.2141$ g/mol)

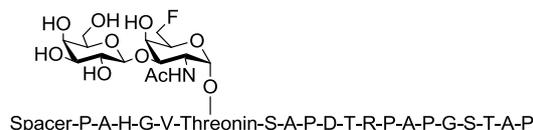
ESI-MS (positiv), m/z : 876.05 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 875.75), 1313.58 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1313.11).

HRESI-MS (positiv), m/z : 1313.1149 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1313.1149).

MALDI-TOF-MS (dhb positive ion mode), m/z : 2625.03 ($[M + H]^+$, ber.: 2625.22)

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-3-O-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galacto-pyranosyl)-L-

threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (107)



Es wurden 166 mg (0.06 mmol) des Glycopeptides in 100 mL wässriger NaOH Lösung (pH = 10) gelöst und sieben Tage unter ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde mit verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(70:30) 30 min, →(100:0), 80 min λ = 214 nm, R_t = 15.4 min) gereinigt.

Ausbeute: 109 mg (44%, 0.044 mmol) farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -98.89$$

C₁₀₃H₁₆₆FN₂₇O₄₁ (M = 2456.1719 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.60 (bs, 1H, H^ε), 7.30 (bs, 1H, H^δ), 4.99 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.7, 1-H), 4.75- 4.54 (m, 8H, D^α {4.72}, H^α {4.68}, 6a-H {4.66}, T^{α*} {4.66}, R^α {4.63}, A₂^α {4.60}, A₃^α {4.53}, 6b'-H {4.55}), 4.51-4.18 (m, 19H, S₁^α {4.49}, A₄^α {4.46}, S₂^α {4.45}, 1'-H {4.41}, P₁₋₅^α {4.40, 4.38, 4.37, 4.35}, V^α {4.35}, T^{β*} {4.33}, T₁₋₂^α {4.32, 4.30}, 5-H {4.29}, A₁^α {4.23}, 2-H {4.21}, T₁₋₂^β {4.20, 4.19}, 4-H {4.19}), 4.03 (dd, 1H, J_{H3,H4} = 2.9 Hz, J_{H3, H2} = 10.8 Hz, 3-H), 4.00-3.85 (m, 5H, G^α {3.97, 3.94}, 4'-H {3.87}), 3.90- 3.56 (m 30H, S_{1,2}^β {3.85, 3.75}, P_{1,2}^δ {3.78, 3.761}, 6'a-H {3.78}, CH₂O-Spacer {3.75, 3.74}, 6'b-H {3.68}, P₃₋₅^δ {3.64, 3.60, 3.57}, CH₂O-Spacer {3.66, 3.63, 3.62, 3.61}, 5'-H {3.60}, 3.58 (dd, 1H, J_{H3',H4'} = 2.9 Hz, J_{H3', H2'} = 10.1 Hz, 3'-H), 3.47 (dd, 1H, J_{H2',H1'} = 7.8 Hz, J_{H2', H3'} = 9.8 Hz, 2'-H), 3.29 (dd, 1H, J_{Hβa,Hα} = 5.6 Hz, J_{Hβa, Hβb} = 15.6 Hz, H^{βa}), 3.18-3.14 (m 5H, R^δ {3.18}, H^β {3.16}, CH₂NH₂-Spacer {3.14}), 2.96 (dd, 1H, J_{Dβa,Dα} = 6.2 Hz, J_{Dβa, Dβb} = 16.9 Hz, D^{βa}), 2.88 (dd, 1H, J_{Dβb,Dα} = 6.8 Hz, J_{Dβb, Dβa} = 17.1 Hz, D^{βb}), 2.76-2.62 (m, 2H, CH₂-Amid-Spacer), 2.35-2.20 (m, 6H, P₁₋₃^β {2.35, 2.30, 2.20}), 2.10-1.81 (m, 19H, V^β {2.05}, P₁₋₅^γ {2.04, 2.00, 1.98, 1.95, 1.93}, CH₃ (NHAc) {1.98}, P_{4,5}^β {1.98, 1.95}, R^{βa} {1.85}), 1.75-1.64 (m, 3H, R^{βb} {1.73}, R^γ {1.65}), 1.36-1.32 (m, 9H, A₁₋₃^β {1.36, 1.34, 1.32}), 1.31 (d, 3H, J_{Aβ,Aα} = 7.2 Hz, A^β), 1.23 (d, 3H, J_{Tγ*,Tβ*} = 6.2 Hz, T^{γ*}), 1.18 (d, 3H, J_{Tγ,Tβ} = 6.6 Hz, T₁^γ), 1.16 (d, 3H, J_{Tγ,Tβ} = 6.5 Hz, T₂^γ), 0.95 (d, 3H, J_{Vγ,Vβ} = 6.5 Hz, V^γ), 0.93 (d, 3H, J_{Vγ,Vβ} = 6.6 Hz, V^γ).

¹³C-NMR (100,6 MHz, D₂O, DEPT) δ (ppm): 175.7, 174.9, 174.5, 174.4, 173.9, 173.7, 173.4, 173.1, 173.0, 172.7, 172.6, 172.5, 172.4, 172.3, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.1, 171.0, 170.9, 170.7, (C=O, (NHAc, Ester)), 156.7 (C=NH), 133.4 (H^ε), 128.4 (H^γ), 117.2

(H^δ), 104.5 (C1'), 99.2 (C1), 83.7 (d, $J_{F,C6} = 166.5$ Hz, C-6), 77.4 (T^{β*}), 76.6 (C-3), 74.9 (C-5'), 72.4 (C3'), 70.5 (C-2'), 69.6, 69.5, 69.4, 69.4 (CH₂O (Spacer)), 69.5 (C-5), 68.4 (C-4'), 68.4 (d, $J_{F,C4} = 6.6$ Hz, C-4), 67.0 (T₁^β), 66.9 (T₂^β), 66.3, 66.1 (CH₂ (Spacer)), 61.1, 61.0 (S_{1,2}^β), 60.7 (C-6), 60.6, 60.5, 60.1, 60.0 (P₁₋₅^α), 59.3 (V^α), 58.9, 58.7 (T_{1,2}^α), 57.0 (T^{α*}), 55.6, 54.9 (S_{1,2}^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6, (A^α), 48.2 (C-2), 48.1, 47.9, 47.8, (P₁₋₃^δ), 47.8, 47.7 (A^α), 47.5, 47.4 (P_{4,5}^δ), 42.4, 42.3 (G_{1,2}^α), 40.5 (CH₂NH₂ (Spacer)), 39.0 (R^δ), 34.9 (D^β), 34.0 (CH₂Amid (Spacer)), 30.2 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 (P₁₋₅^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.4, 24.3 (P₁₋₅^γ), 24.0 (R^γ), 22.3 (CH₃ (NHAc)), 18.9, 18.8 (T^γ), 18.5 (V^γ), 18.2 (V^γ), 17.8 (T^{γ*}), 16.2, 15.3, 15.2, 15.1 (A₁₋₄^β).

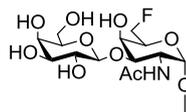
¹⁹F-NMR (376.4 Hz, D₂O), δ (ppm): - 229.4 (dt, $J_{F,H5} = 16.6$ Hz, $J_{F,H6} = 48.5$ Hz).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 819.72 ([M + 3H]³⁺, ber.: 819.73), 1229.61 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1229.09).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1229.0952 ([M + Na]⁺, ber.: 1229.0937).

MALDI-TOF-MS: (dnhb positive ion mode), *m/z*: 2457.53 ([M + H]⁺, ber.: 2458.58)

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (114)



Quadratsäure-Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Zu einer Lösung von 30 mg (0.012 mmol) Glycopeptid in 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden 1.9 μL (0.013 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion gegeben. Anschließend wurden ca. 25 μL einer ges. Natriumcarbonatlösung zugesetzt bis ein pH-Weert von 8 erreicht war. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt (HPLC-Kontrolle) mit verdünnter Essigsäure (1N) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: CH₃CN/H₂O + 0.1% (10:90)→(25:75), 30 min, →(70:30) 60 min, λ = 214 nm, R_t = 38.1 min) gereinigt.

Ausbeute: 18 mg (57%, 6.31 μmol) farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = - 73.77$

C₁₀₉H₁₇₀FN₂₇O₄₄ (M = 2580.1879 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.61 (d, 1H, $J_{H\epsilon, H\delta} = 1.3$ Hz, H^ε), 7.31 (bs, 1H, H^δ), 5.00 (d, 1H, $J_{H1, H2} = 3.8$, 1-H), 4.75- 4.50 (m, 11H, D^α {4.73}, CH₂O-Squarat {4.71}, H^α {4.69}, 6a-H {4.68}, T^{α*} {4.66}, R^α {4.62}, A₂^α {4.59}, A₃^α {4.53}, 6b'-H {4.55}, S₁^α {4.51}), 4.48-4.26 (m, 13H, A₄^α {4.46}, S₂^α {4.45}, 1'-H {4.42}, P₁₋₅^α {4.42, 4.39, 4.38, 4.37, 4.35}, V^α {4.35}, T^{β*} {4.32}, T₁₋₂^α {4.32, 4.30}, 5-H {4.29}), 4.23-4.17 (m, 5H, A₁^α {4.24}, 2-H {4.20}, T₁₋₂^β {4.20, 4.19}, 4-H {4.19}), 4.04 (dd, 1H, $J_{H3, H4} = 2.4$ Hz, $J_{H3, H2} = 10.4$ Hz, 3-H), 3.98 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, G^α), 3.95 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, G^α), 3.92-3.85 (m, 4H, 4'-H {3.86}, S₁^β {3.87}, 6'a-H {3.85}), 3.84-3.57 (m, 29H, P_{1,2}^δ {3.80, 3.76}, CH₂NH-Spacer {3.78}, CH₂O-Spacer {3.75, 3.74}, S₂^β {3.72}, 6'b-H {3.72}, CH₂NH-Spacer {3.68}, P₃₋₅^δ {3.65, 3.64, 3.60}, 5'-H {3.61}, CH₂O-Spacer {3.67, 3.66, 3.63, 3.59}, 3.59 {dd, 1H, $J_{H3', H4'} = 2.3$ Hz, $J_{H3', H2'} = 9.8$ Hz, 3'-H}), 3.48 (dd, 1H, $J_{H2', H1'} = 7.7$ Hz, $J_{H2', H3'} = 9.8$ Hz, 2'-H), 3.31 (dd, 1H, $J_{H\beta a, H\alpha} = 5.5$ Hz, $J_{H\beta a, H\beta b} = 15.6$ Hz, H^{βa}), 3.21-3-15 (m, 3H, R^δ {3.18}, H^β {3.16}), 2.96 (dd, 1H, $J_{D\beta a, D\alpha} = 6.4$ Hz, $J_{D\beta a, D\beta b} = 17.1$ Hz, D^{βa}), 2.88 (dd, 1H, $J_{D\beta b, D\alpha} = 6.8$ Hz, $J_{D\beta b, D\beta a} = 17.1$ Hz, D^{βb}), 2.77-2.61 (m, 2H, CH₂Amid-Spacer), 2.34-2.19 (m, 6H, P₁₋₃^β {2.35, 2.30, 2.20}), 2.10-1.81 (m, 19H, V^β {2.05}, P₁₋₅^γ {2.04, 2.00, 1.99, 1.97, 1.95}, CH₃ (NHAc) {1.98}, P_{4,5}^β {1.93, 1.89}, R^{βa} {1.85}), 1.74-1.63 (m, 3H, R^{βb} {1.73}, R^γ {1.65}), 1.43 (t, 3H, $J_{CH3/CH2} = 7.0$ Hz, CH₃ (Squarat)), 1.39-1.34 (m, 9H, A₁₋₃^β {1.39, 1.36, 1.35}), 1.32 (d, 3H, $J_{A\beta, A\alpha} = 7.2$ Hz, A^β), 1.24 (d, 3H, $J_{T\gamma^*, T\beta^*} = 6.3$ Hz, T^{γ*}), 1.19 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.6$ Hz, T₁^γ), 1.17 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, T₂^γ), 0.96 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta} = 6.4$ Hz, V^γ), 0.95 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta} = 6.4$ Hz, V^γ).

¹³C-NMR (100,6 MHz, D₂O, DEPT) δ (ppm): 188.8, 183.3 (C=O (Squarat)), 175.9, 175.0, 174.4, 174.0, 173.7, 173.5, 173.1, 172.5, 172.0, 171.5, 171.2, 171.1, 170.9, 170.7, (C=O, (Ester, NHAc), C=C (Squarat)), 156.7 (C=NH), 133.4 (H^ε), 128.4 (H^γ), 117.3 (H^δ), 104.6 (C-1'), 99.2 (C-1), 83.7 (d, $J_{F, C6} = 166.7$ Hz, C-6), 77.4 (T^{β*}), 76.7 (C-3), 75.0 (C-5'), 72.5 (C-3'), 70.6 (C-2'), 70.5 (CH₂ (Squarat)), 69.5 (CH₂O (Spacer)), 69.5 (d, $J_{F, C5} = 21.8$ Hz, C-5), 68.5 (C-4'), 68.4 (d, $J_{F, C4} = 8.8$ Hz, C-4), 67.0 (T_{1,2}^β), 66.3, 66.1 (CH₂ (Spacer)), 61.4, 61.1 (S_{1,2}^β), 61.0 (C-6), 60.8, 60.5, 60.1, 59.4 (P₁₋₅^α), 59.3 (V^α), 58.9, 58.7 (T_{1,2}^α), 59.9 (T^{α*}), 55.3, 55.0 (S_{1,2}^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6, (C-2), 48.1 (A^α), 48.0, 47.9, 47.8, (P₁₋₃^δ), 47.8, 47.7 (A^α), 47.6, 47.4 (P_{4,5}^δ), 43.9 (CH₂NH (Spacer)), 42.4, 42.3 (G_{1,2}^α), 40.5 (R^δ), 34.9 (D^β), 34.0 (CH₂Amid (Spacer)), 30.2 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 (P₁₋₅^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3, (P₁₋₅^γ), 24.0 (R^γ), 22.3 (CH₃ (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^γ), 18.5 (V^γ), 18.2 (V^γ), 17.8 (T^{γ*}), 16.2, 15.3, 15.2, 15.1 (A₁₋₄^β), 14.9 (CH₃ (Squarat)).

¹⁹F-NMR (376.4 Hz, D₂O), δ (ppm): - 229.7 (dt, $J_{F, H5} = 16.7$ Hz, $J_{F, H6} = 47.6$ Hz)).

ESI-MS (positiv), m/z : 868.81 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 868.40), 1291.71 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1291.10).

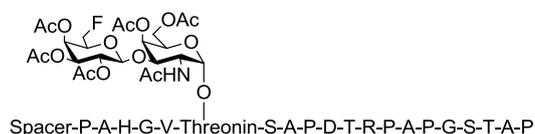
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1291.1034 ($[M + Na]^+$, ber.: 1291.1018).

MALDI-TOF-MS: (dhb positive ion mode), m/z : 2581.63 ($[M + H]^+$, ber.: 2581.20).

Konjugation an Rinderserumalbumin

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 3 mg (0.045 μ mol) Rinderserumalbumin und 2.9 mg (1.13 μ mol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde 4 d bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 8 mg Konjugat erhalten.

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy-5,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (103)



Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert, ausgehend von 455 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-*O*-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.22 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc Aminosäuren nach dem Standardprotokoll (s. Seite 80) am Peptidsynthesizer gekoppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte manuell. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 230 mg (0.25 mmol) der Glycosylaminosäure zusammen mit 105 mg (0.28 mmol) HATU und 37 mg (0.28 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 60 μ L *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und 8 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit NMP gewaschen und noch freie Aminogruppen wurde mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin

in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptides wurde das Harz in einen Merrifield-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und 2 h in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz zweimal mit ca. 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Rohausbeute: 320 mg, farbloses Lyophilisat

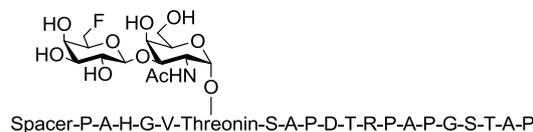
$C_{113}H_{176}FN_{27}O_{46}$ ($M = 2666.2247$ g/mol)

ESI-MS (positiv), m/z : 890.11 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 889.75), 1334.65 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1334.12).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 889.7524 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 889.7494).

MALDI-TOF-MS (dhb positive ion mode), m/z : 2666.60 ($[M + H]^+$, ber.: 2667.23)

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (108)



Es wurden 320 mg des Glycopeptides in 100 mL wässriger NaOH Lösung (pH =10) gelöst und vier Tage unter ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde mit verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(70:30), 30 min, →(100:0), 80 min $\lambda = 214$ nm, $R_t = 15.0$ min) gereinigt.

Ausbeute: 117 mg (48%, 0.048 mmol, über 2 Stufen) farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, H_2O) = - 60.72$

$C_{103}H_{166}FN_{27}O_{41}$ ($M = 2456.1719$ g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.58 (d, 1H, $J_{H\epsilon, H\delta} = 1.1$ Hz, H $^{\epsilon}$), 7.28 (bs, 1H, H $^{\delta}$), 4.91 (d, 1H, $J_{H1, H2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.75- 4.51 (m, 7H, D $^{\alpha}$ {4.74}, H $^{\alpha}$ {4.68}, A₂ $^{\alpha}$ {4.64}, 6a'-H {4.62}, T $^{\alpha*}$ {4.61}, R $^{\alpha}$ {4.60}, A₃ $^{\alpha}$ {4.56}, 6b'-H {4.51}), 4.50-4.25 (m, 13H, S₁ $^{\alpha}$ {4.48}, A₄ $^{\alpha}$ {4.44}, 1'-H {4.43}, S₂ $^{\alpha}$ {4.42}, P₁₋₅ $^{\alpha}$ {4.43, 4.40, 4.38, 4.30, 4.25}, V $^{\alpha}$ {4.35}, T₁₋₂ $^{\alpha}$ {4.31, 4.27}, T $^{\beta*}$ (4.30)), 4.27 (d, 1H, $J_{A\alpha, A\beta} = 7.2$ Hz, A₁ $^{\alpha}$), 4.19-4.17 (m, 3H, 2-H {4.19}, T₁₋₂ $^{\beta}$ {4.18, 4.17}), 4.12 (bs, 1H, 4-H), 4.00-3.91 (m, 7H, 5-H {3.99}, 3-H

{3.98}, G^{α} {3.94, 3.93}, 4'-H {3.92}), 3.90- 3.53 (m 30H, 5'-H {3.87}, $S_{1,2}^{\beta}$ {3.85, 3.75}, $P_{1,2}^{\delta}$ {3.78, 3.761}, 6a-H {3.77}, CH_2O -Spacer {3.74, 3.72}, $P_{3,5}^{\delta}$ {3.64, 3.60, 3.57}, 6b-H {3.68}), CH_2O -Spacer {3.64, 3.63, 3.61, 3.60}, 3.58 (dd, 1H, $J_{H_3,H_4} = 3.4$ Hz, $J_{H_3, H_2} = 10.1$ Hz, 3'-H), 3.47 (dd, 1H, $J_{H_2,H_1} = 7.8$ Hz, $J_{H_2, H_3} = 9.8$ Hz, 2'-H), 3.28 (dd, 1H, $J_{H_{\beta a},H_{\alpha}} = 5.7$ Hz, $J_{H_{\beta a}, H_{\beta b}} = 15.6$ Hz, $H^{\beta a}$), 3.17-3-12 (m, 5H, H^{β} {3.16}, R^{δ} {3.15}), CH_2NH_2 -Spacer {3.13}), 2.97- 2.83 (m, 2H, D^{β}), 2.74-2.61 (m, 2H, CH_2 Amid-Spacer), 2.31-2.19 (m, 6H, P_{1-3}^{β} {2.31, 2.25, 2.20}, 2.12-1.79 (m, 19H, V^{β} {2.05}, P_{1-5}^{γ} {1.98, 1.97, 1.86, 1.84, 1.83}, CH_3 (NHAc) {1.96}, $P_{4,5}^{\beta}$ {1.90, 1.88}, $R^{\beta a}$ {1.79}), 1.73-1.62 (m, 3H, $R^{\beta b}$ {1.68}, R^{γ} {1.61}), 1.35-1.30 (m, 9H, A_{1-3}^{β} {1.35, 1.33, 1.30}), 1.29 (d, 3H, $J_{A_{\beta},A_{\alpha}} = 7.3$ Hz, A^{β}), 1.23 (d, 3H, $J_{T_{\gamma^*},T_{\beta^*}} = 6.3$ Hz, T^{γ^*}), 1.16 (d, 3H, $J_{T_{\gamma},T_{\beta}} = 6.7$ Hz, T_1^{γ}), 1.14 (d, 3H, $J_{T_{\gamma},T_{\beta}} = 6.5$ Hz, T_2^{γ}), 0.94 (d, 3H, $J_{V_{\gamma},V_{\beta}} = 6.5$ Hz, V^{γ}), 0.92 (d, 3H, $J_{V_{\gamma},V_{\beta}} = 6.5$ Hz, V^{γ}).

^{13}C -NMR (100,6 MHz, D_2O , DEPT) δ (ppm): 175.7, 174.9, 174.5, 174.4, 173.9, 173.7, 173.4, 173.1, 173.0, 172.7, 172.6, 172.5, 172.4, 172.3, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.1, 171.0, 170.9, 170.7, (C=O (NHAc, Ester)), 156.6 (C=NH), 133.4 (H^{ϵ}), 128.4 (H^{γ}), 117.2 (H^{δ}), 104.4 (C-1'), 99.1 (C-1), 83.1 (d, $J_{F,C_6} = 164.9$ Hz, C-6'), 77.3 (C-3), 77.0 (T^{β^*}), 73.0 (d, $J_{F,C_5} = 20.3$ Hz, C-5'), 72.2 (C-3'), 70.9 (C-5), 70.4 (C-2'), 69.6, 69.5, 69.4, 69.4 (CH_2O (Spacer)), 68.8 (C-4), 68.1 (d, $J_{F,C_4} = 6.8$ Hz, C-4'), 67.0 (T_1^{β}), 66.9 (T_2^{β}), 66.3, 66.0 (CH_2 (Spacer)), 61.4, 61.3 ($S_{1,2}^{\beta}$), 61.1 (C-6), 60.8, 60.5, 60.1, 60.0, 59.0 (P_{1-5}^{α}), 59.4 (V^{α}), 59.9, 58.8 ($T_{1,2}^{\alpha}$), 57.0 (T^{α^*}), 55.5, 54.9 ($S_{1,2}^{\alpha}$), 52.3 (H^{α}), 51.1 (R^{α}), 50.1 (D^{α}), 49.6, (A^{α}), 48.6 (C-2), 48.3, 48.0, 47.7, (P_{1-3}^{δ}), 47.8, 47.7 (A^{α}), 47.5, 47.4 ($P_{4,5}^{\delta}$), 42.4, 42.3 ($G_{1,2}^{\alpha}$), 40.5 (CH_2NH_2 (Spacer)), 39.0 (R^{δ}), 34.9 (D^{β}), 34.0 (CH_2 Amid (Spacer)), 30.1 (V^{β}), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 (P_{1-4}^{β}), 27.4 (R^{β}), 26.2 (H^{β}), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P_{1-5}^{γ}), 23.9 (R^{γ}), 22.2 (CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^{γ}), 18.4 (V^{γ}), 18.3 (T^{γ^*}), 17.8 (V^{γ}), 16.3, 15.2, 15.1, 15.0 (A_{1-4}^{β}).

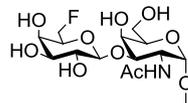
^{19}F -NMR (376.4 Hz, D_2O): δ (ppm): - 229.5 (dt, $J_{F,H_5} = 15.7$ Hz, $J_{F,H_6} = 47.5$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 819.74 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 819.73), 1229.13 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1229.09).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1229.0967 ($[M + H]^{2+}$, ber.: 1229.0938).

MALDI-TOF-MS: (dhhb positive ion mode), m/z : 2457.82 ($[M + H]^+$, ber.: 2458.58)

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[6-deoxy-6-fluoro-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (115)



Quadratsäure-Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Zu einer Lösung von 30 mg (0.012 mmol) Glycopeptid in 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden 1.9 μ L (0.013 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion gegeben. Anschließend wurden ca. 25 μ L einer ges. Natriumcarbonatlösung zugegeben bis ein pH von 8 erreicht war. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (HPLC Kontrolle) und anschließend mit verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1 % TFA (10:90)→(25:75), 30 min, →(70:30) 60 min, λ = 214 nm, R_t = 37.1 min) gereinigt.

Ausbeute: 19 mg (61%, 7.36 μ mol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -57.8$$

C₁₀₉H₁₇₀FN₂₇O₄₄ (M = 2580.1879)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.62 (d, 1H, $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 1.3$ Hz, H ^{ϵ}), 7.31 (bs, 1H, H ^{δ}), 4.95 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.9$ Hz, 1-H), 4.76-4.45 (m, 13H, D ^{α} {4.73}, CH₂O-Squarat {4.72}, H ^{α} {4.70}, 6a'-H {4.67}, T ^{α^*} {4.64}, R ^{α} {4.62}, A₂ ^{α} {4.67}, A₃ ^{α} {4.59}, 6b'-H {4.55}, S₁ ^{α} {4.52}, A₄ ^{α} {4.46}, 1'-H {4.42}), 4.44-4.17 (m, 18H, S₂ ^{α} {4.46}, P₁₋₅ ^{α} {4.43, 4.39, 4.37, 4.34, 4.32}, T ^{β^*} {4.33}, V ^{α} {4.31}, T₁₋₂ ^{α} {4.31, 4.29}, A₁ ^{α} {4.24}, 2-H {4.21}, T₁₋₂ ^{β} {4.22, 4.19}), 4.15 (d, 1H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = 2.5$ Hz, 4-H), 4.03-3.76 (m, 20H, 5-H {4.02}), 3-H {3.98}, G_{1,2} ^{α} {3.95-3.93}, 4'-H {3.94}, S₁ ^{β} {3.89}, 6a-H {3.88}, 5'-H {3.88}, P_{1,2} ^{δ} {3.80, 3.73}, CH₂NH-Spacer {3.78}, CH₂O-Spacer {3.76, 3.74}), 3.74-3.58 (m, 19, 6'b-H {3.72}, S₂ ^{β} {3.72}, CH₂NH-Spacer {3.67}, P₃₋₅ ^{δ} {3.65, 3.62, 3.57}, CH₂O-Spacer {3.69, 3.66, 3.63, 3.60}, 3'-H {3.59}), 3.50 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2', \text{H}_1'} = 7.8$ Hz, $J_{\text{H}_2', \text{H}_3'} = 9.9$ Hz, 2'-H), 3.31 (dd, 1H, $J_{\text{H}_{\beta\alpha}, \text{H}_\alpha} = 5.6$ Hz, $J_{\text{H}_{\beta\alpha}, \text{H}_{\beta\beta}} = 15.4$ Hz, H ^{$\beta\alpha$}), 3.22-3.15 (m, 3H, R ^{δ} {3.20}, H ^{β} {3.18}), 2.94 (dd, 1H, $J_{\text{D}_{\beta\alpha}, \text{D}_\alpha} = 6.4$ Hz, $J_{\text{D}_{\beta\alpha}, \text{D}_{\beta\beta}} = 16.9$ Hz, D ^{$\beta\alpha$}), 2.86 (dd, 1H, $J_{\text{D}_{\beta\beta}, \text{D}_\alpha} = 6.9$ Hz, $J_{\text{D}_{\beta\beta}, \text{D}_{\beta\alpha}} = 17.0$ Hz, D ^{$\beta\beta$}), 2.77-2.63 (m, 2H, CH₂Amid-Spacer), 2.31-2.21 (m, 6H, P₁₋₃ ^{β} {2.31, 2.25, 2.22}), 2.11-1.83 (m, 19H, V ^{β} {2.09}, P₁₋₅ ^{γ} {2.04, 2.00, 1.99, 1.97, 1.95}, CH₃ (NHAc) {1.99}, P_{4,5} ^{β} {1.96, 1.88}, R ^{$\beta\alpha$} {1.80}), 1.75-1.67 (m, 3H, R ^{$\beta\beta$} {1.73}, R ^{γ} {1.68}), 1.43 (t, 3H, $J_{\text{CH}_3/\text{CH}_2} = 7.0$ Hz, CH₃-Squarat), 1.39-1.34 (m, 9H, A₁₋₃ ^{β} {1.39, 1.36, 1.35}), 1.32 (d, 3H,

$J_{A\beta, A\alpha} = 7.2$ Hz, A^β), 1.26 (d, 3H, $J_{T\gamma^*, T\beta^*} = 6.3$ Hz, T^{γ^*}), 1.20 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.6$ Hz, T_1^γ), 1.17 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.5$ Hz, T_2^γ), 0.97 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta} = 6.4$ Hz, V^γ), 0.95 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta} = 6.3$ Hz, V^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , DEPT) δ (ppm): 188.8, 183.3 (C=O (Squarat)), 175.0, 174.9, 174.4, 173.9, 173.7, 173.5, 173.1, 172.7, 172.5, 171.9, 171.5, 171.4, 171.3, 171.1, 170.9, (C=O (Ester, NHAc) C=C (Squarat)), 156.7 (C=NH), 133.5 (H^ϵ), 128.4 (H^γ), 117.3 (H^δ), 104.5 (C-1'), 99.2 (C-1), 83.1 (d, $J_{\text{F}, \text{C}6} = 165.3$ Hz, C-6), 77.3 (C-3), 77.0 (T^{β^*}), 73.1 (d, $J_{\text{F}, \text{C}5} = 22.1$ Hz, C-5'), 72.3 (C-3'), 71.0 (C-5), 70.6 (C-2'), 70.4 (CH_2 (Squarat)), 69.6, 69.4 (CH_2O (Spacer)), 68.9 (C-4), 68.1 (d, $J_{\text{F}, \text{C}4} = 7.6$ Hz, C-4'), 67.0 ($\text{T}_{1,2}^\beta$), 66.1 (CH_2 (Spacer)), 61.4, 61.3 ($\text{S}_{1,2}^\beta$), 61.2 (C-6), 60.8, 60.5, 60.1, 59.8 (P_{1-5}^α), 59.3 (V^α), 58.9, 58.8 ($\text{T}_{1,2}^\alpha$), 57.0 (T^{α^*}), 55.5, 55.0 ($\text{S}_{1,2}^\alpha$), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.3 (D^α), 49.7 (A^α), 48.6, (C-2), 48.4, 48.3, 48.1, (P_{1-3}^δ), 47.8, 47.4 (A^α), 47.2, 47.1 ($\text{P}_{4,5}^\delta$), 43.9 (CH_2NH (Spacer)), 42.4, 42.3 ($\text{G}_{1,2}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 35.4 (D^β), 34.1 (CH_2Amid (Spacer)), 30.3 (V^β), 30.1, 29.6, 29.3, 29.2, 28.9 (P_{1-5}^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3, 24.0 (P_{1-5}^γ), 23.0 (R^γ), 22.3 (CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^γ), 18.5 (T^{γ^*}), 18.4 (V^γ), 17.8 (V^γ), 16.2, 15.2, 15.1, 15.0 (A_{1-4}^β), 14.9 (CH_3 (Squarat)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, D_2O), δ (ppm): - 229.4 (dt, $J_{\text{F}, \text{H}5} = 15.3$ Hz, $J_{\text{F}, \text{H}6} = 46.5$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 861.43 ($[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, ber.: 861.07), 1291.65 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1291.10).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1291.1033 ($[\text{M} + \text{H}]^{2+}$, ber.: 1291.1018).

MALDI-TOF-MS: (dhh positive ion mode), m/z : 2581.43 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, ber.: 2581.20)

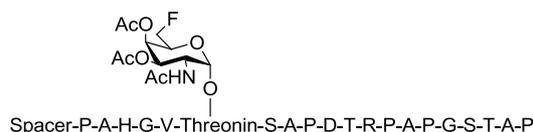
Konjugation an Rinderserumalbumin

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat₄ in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 3 mg (0.045 μmol) Rinderserumalbumin und 2.9 mg (1.13 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 7 mg Konjugat erhalten.

Konjugation an das Tetanus-Toxoid

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumphosphat in 1 mL Wasser (pH= 9.5) wurden 1.2 mg (0.008 μ mol) Tetanus Toxoid und 1.3 mg (0.49 μ mol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 3 mg Konjugat erhalten.

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-3,4-di-O-acetyl- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (105)



Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert, ausgehend von 476 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.21 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll (s. Seite 80) am Peptidsynthesizer gekuppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte manuell. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 158 mg (0.25 mmol) der Glycosylaminosäure zusammen mit 105 mg (0.28 mmol) HATU und 37 mg (0.28 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 60 μ L *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und 8 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit NMP gewaschen und noch freie Aminogruppen wurde mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylenglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptides wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und anschließend 2 h in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Es wurde filtriert und das Harz wurde zweimal mit ca. 5 mL Trifluoressigsäure

gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Rohausbeute: 179 mg, farbloses Lyophilisat

Das Rohprodukt wird durch semipräparative RP_HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 35.4 min) gereinigt.

Ausbeute: 122 mg (51%, 0.051 mmol) farbloses Lyophilisat

C₁₀₁H₁₆₀FN₂₇O₃₈ (M = 2378.140 g/mol)

ESI-MS (positiv), *m/z*: 793.76 ([M + 3H]³⁺, ber.: 793.72), 1190.69 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1190.08)

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-α-D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (109)



Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Es wurden 122 mg (0.05 mmol) des Glycopeptides in 100 mL wässriger NaOH Lösung (pH = 10) gelöst und vier Tage unter ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde mit verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (20:80)→(100:0), 40 min, λ = 214 nm, R_t = 11.7 min) gereinigt.

Ausbeute: 101 mg (74%, 0.044 mmol) farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -22.55$

C₉₇H₁₅₆FN₂₇O₃₆ (M = 2294.119 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, d-DMSO, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.86 (bs, 1H, H^e), 8.39-8.17 (m, 5H, G^{NH} {8.30, 8.23} D^{NH} {8.23}, H^{NH} {8.21}, A^{NH} {8.20}, 8.12 (d, 2H, J_{NH,Aα} = 6.4 Hz, A^{NH}), 8.06-7.75 (8H, A^{NH} {8.05}, T^{NH*} {7.90}, R^{NH} {7.94}, T^{NH} {7.80}, V^{NH} {7.81}, S_{1,2}^{NH} {7.79}), 7.37 (d, 1H, J_{NH,Tα} = 7.3 Hz, T^{NH}), 7.32 (bs, 1H, H^δ), 7.16 (d, 1H, J_{NH,H2} = 6.4Hz, GalNAc), 4.78 (d, 1H, J_{H1,H2} = 2.6, 1-H), 4.58- 3.97 (m, 25H, 6a-H {4.58}, D^α {4.53}, H^α {4.55}, R^α {4.46}, A₂^α {4.51}, A₃^α {4.42}, V^α {4.41}, 6b'-H {4.38}, S₁^α {4.37}, P_{1,5}^α {4.39, 4.36, 4.34, 4.32}, T^{α*} {4.30}, S₂^α {4.31}, A₄^α {4.21}, T_{1,2}^α {4.18, 4.16}, A₁^α {4.13}, T^{β*} {4.11}, T_{1,2}^β {4.04, 3.95}, 5-H {3.98}, 2-H {4.96}), 3.89-2.96 (m 35H, G^α {3.88, 3.72}, 4-H {3.74}, 3-H {3.67}, S_{1,2}^β {3.64, 3.55}, P_{1,2}^δ {3.63, 3.60}, CH₂O-Spacer {3.65, 3.64}, P_{3,5}^δ {3.59, 3.50, 3.43}, CH₂O-Spacer {3.53, 3.50, 3.49, 3.47}, R^δ {3.10}, H^{βa} {2.99}), 3.00-2.93 (m, 3H, H^{βb}

{2.99}, CH_2NH_2 -Spacer {2.97}), 2.74 (dd, 1H, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\alpha} = 5.3$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\beta\text{b}} = 16.0$ Hz, $\text{D}^{\beta\text{a}}$), 2.58-2.45 (m, 3H, CH_2 Amid-Spacer {2.52}, $\text{D}^{\beta\text{b}}$ {2.49}), 2.16-1.60 (m, 25H, P_{1-3}^{β} {2.15, 2.05, 1.97}, V^{β} {1.96}, P_{1-5}^{γ} {1.96, 1.94, 1.89, 1.85, 1.79}, CH_3 (NHAc) {1.85}, $\text{P}_{4,5}^{\beta}$ {1.88, 1.75}, $\text{R}^{\beta\text{a}}$ {1.69}), 1.58-1.47 (m, 3H, R^{γ} {1.57}, $\text{R}^{\beta\text{b}}$ {1.50}), 1.18 (d, 9H, $J_{\text{A}\beta,\text{A}\alpha} = 6.7$ Hz, A_{1-4}^{β}), 1.09 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma^*,\text{T}\beta^*} = 5.9$ Hz, T^{γ^*}), 1.03 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$ Hz, T_1^{γ}), 1.00 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.2$ Hz, T_2^{γ}), 0.89 (d, 3H, $J_{\text{V}\gamma,\text{V}\beta} = 6.6$ Hz, V^{γ}), 0.83 (d, 3H, $J_{\text{V}\gamma,\text{V}\beta} = 6.6$ Hz, V^{β}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, d-DMSO, DEPT) δ (ppm): 173.3, 172.6, 172.6, 172.3, 172.1, 171.9, 171.5, 171.2, 171.1, 171.0, 170.5, 170.4, 170.3, 170.0, 169.8, 169.6, 169.5, 169.1, 169.0, 168.9, 168.8 (C=O, (NHAc, Ester)), 157.2 (C=NH), 133.9 (H^{ϵ}), 129.6 (H^{γ}), 117.1 (H^{δ}), 98.9 (C-1), 84.1 (d, $J_{\text{F},\text{C}6} = 165.5$ Hz, C-6), 75.5 (T^{β^*}), 69.5 (C-5), 69.8, 69.6 (CH_2O (Spacer)), 68.3 (d, $J_{\text{F},\text{C}4} = 8.1$ Hz, C-4), 68.2 (C-3), 66.9 (T_1^{β}), 66.5 (T_2^{β}), 66.8, 66.3 (CH_2 (Spacer)), 61.8, ($\text{S}_{1,2}^{\beta}$), 60.0, 58.7, 57.6, 56.1 (P_{1-5}^{α}), 59.8 (T^{α^*}), 59.2 (V^{α}), 58.1, 57.9 ($\text{T}_{1,2}^{\alpha}$), 55.1, 54.9 ($\text{S}_{1,2}^{\alpha}$), 51.7 (H^{α}), 50.3 (R^{α}), 49.7 (D^{α}), 49.3 (C-2), 48.6, (A^{α}), 47.2, 47.1, 46.9, (P_{1-3}^{δ}), 46.8, 46.6 (A^{α}), 46.5, 46.4 ($\text{P}_{4,5}^{\delta}$), 42.3, 42.1 ($\text{G}_{1,2}^{\alpha}$), 40.6 (R^{δ}), 38.6 (CH_2NH_2 (Spacer)), 35.7 (D^{β}), 34.4 (CH_2 Amid (Spacer)), 30.8 (V^{β}), 29.4, 29.2, 29.1, 28.7 (P_{1-5}^{β}), 28.3 (R^{β}), 27.1 (H^{β}), 24.6, 24.5, 24.4 (P_{1-5}^{γ}), 24.3 (R^{γ}), 23.0 (CH_3 (NHAc)), 19.9, 19.6 (T^{γ}), 19.3 (V^{γ}), 18.2, 17.2 (V^{γ}), 18.4 (T^{γ^*}), 16.9, 16.7, 16.6 (A_{1-4}^{β}).

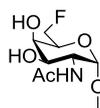
$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 Hz, d-DMSO), δ (ppm): - 227.6 (dt, $J_{\text{F},\text{H}5} = 15.0$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}6} = 46.3$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 820.77 ($[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, ber.: 820.39), 1230.63 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1230.09).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1148.5732 ($[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1148.7250)

MALDI-TOF-MS (dhb positive ion mode), m/z : 2302.28 ($[\text{M} + \text{Li}]^+$, ber.: 2302.37)

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor- α -D-galacto-pyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (116)



Quadratsäure-Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Zu einer Lösung von 30 mg (0.013 mmol) Glycopeptid in 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden 2.03 μL (0.014 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion gegeben. Anschließend wurden ca. 25 μL einer ges. Natriumcarbonatlösung zugegeben bis

ein pH-Wert von 8 erreicht war. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (HPLC-Kontrolle), mit verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1 % TFA (10:90)→(25:75), 30 min, →(70:30) 60 min, λ = 214 nm, R_t = 41.9 min) gereinigt.

Ausbeute: 7 mg (22%, 2.89 μmol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (0.7, \text{H}_2\text{O}) = -19.3$$

C₁₀₃H₁₆₀FN₂₇O₃₉ (M = 2418.135 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.61 (d, 1H, J_{Hε,Hδ} = 1.3 Hz, H^ε), 7.31 (bs, 1H, H^δ), 4.98 (d, 1H, J_{H1,H2} = 3.8 Hz, 1-H), 4.76-4.5 (m, 13H, D^α {4.73}, CH₂O-Squarat {4.72}, H^α {4.67}, 6a-H {4.66}, T^{α*} {4.65}, R^α {4.64}, 6b'-H {4.56}, A₂^α {4.55}, A₃^α {4.50}, S₁^α {4.50}, A₄^α {4.46}, S₂^α {4.45},), 4.48-4.07 (m, 14H, P₁₋₅^α {4.42, 4.39, 4.38, 4.37, 4.35}, T₁₋₂^α {4.32, 4.30}, V^α {4.31}, T^{β*} {4.29}, 5-H {4.26}, A₁^α {4.23}, T₁₋₂^β {4.22, 4.17}, 2-H {4.09}), 4.03-3.75 (m, 19H, 4-H {3.98}, G_{1,2}^α {3.98, 3.90}, 3-H {3.86}, S₁^β {3.87}, S₂^β {3.81}, P_{1,2}^δ {3.80, 3.76}, CH₂NH-Spacer {3.78}, CH₂O-Spacer {3.75, 3.74}), 3.68-3.56 (m, 15H, CH₂NH-Spacer {3.67}, P₃₋₅^δ {3.65, 3.64, 3.60}, CH₂O-Spacer {3.68, 3.66, 3.63, 3.57}), 3.30 (dd, 1H, J_{Hβa,Hα} = 5.5 Hz, J_{Hβa,Hβb} = 15.5 Hz, H^{βa}), 3.21-3.15 (m, 3H, R^δ {3.18}, H^β {3.16}), 2.94 (dd, 1H, J_{Dβa,Dα} = 6.5 Hz, J_{Dβa,Dβb} = 17.0 Hz, D^{βa}), 2.86 (dd, 1H, J_{Dβb,Dα} = 6.8 Hz, J_{Dβb,Dβa} = 17.0 Hz, D^{βb}), 2.76-2.62 (m, 2H, CH₂-Amid-Spacer), 2.35-2.20 (m, 6H, P₁₋₃^β {2.35, 2.30, 2.20}), 2.10-1.81 (m, 19H, V^β {2.07}, P₁₋₅^γ {2.06, 2.05, 1.99, 1.97, 1.95}, CH₃ (NHAc) {1.99}, P_{4,5}^β {1.98, 1.94}, R^{βa} {1.82}), 1.74-1.65 (m, 3H, R^{βb} {1.69}, R^γ {1.65}), 1.42 (t, 3H, J_{CH3/CH2} = 7.0 Hz, CH₃-Squarat), 1.39-1.34 (m, 9H, A₁₋₃^β {1.39, 1.36, 1.35}), 1.31 (d, 3H, J_{Aβ,Aα} = 7.2 Hz, A^β), 1.23 (d, 3H, J_{Tγ*,Tβ*} = 7.2 Hz, T^{γ*}), 1.19-1.16 (m, 6H, T₁^γ {1.18}, T₂^γ {1.16}), 0.95 (d, 3H, J_{Vγ,Vβ} = 4.8 Hz, V^γ), 0.94 (d, 3H, J_{Vγ,Vβ} = 4.8 Hz, V^γ).

¹³C-NMR (100,6 MHz, D₂O, DEPT) δ (ppm): 188.8, 183.3 (C=O (Squarat)), 176.2, 175.0, 174.9, 174.4, 174.0, 173.6, 173.0, 172.6, 172.5, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.0, 170.9, 170.6, (C=O (NHAc, Ester, Carboxylat), C=C (Squarat)), 156.7 (C=NH), 133.4 (H^ε), 128.9 (H^γ), 117.3 (H^δ), 99.1 (C1), 83.6 (d, J_{F,C6} = 161.2 Hz, C-6), 77.3 (T^{β*}), 70.6 (CH₂ (Squarat)), 69.8 (C-5), 69.6, 69.4 (CH₂O (Spacer)), 68.0 (d, J_{F,C4} = 7.8 Hz, C-4), 67.9 (C-3), 67.0 (T_{1,2}^β), 66.1 (CH₂ (Spacer)), 61.6, 61.4 (S_{1,2}^β), 61.1, 60.8, 60.5, 60.1, 59.7 (P₁₋₅^α), 59.4 (V^α), 58.9, 58.7 (T_{1,2}^α), 56.9 (T^{α*}), 55.5, 54.9 (S_{1,2}^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6 (C-2), 49.4 (A^α), 48.0, 47.9, 47.8, (P₁₋₃^δ), 47.8, 47.7 (A^α), 47.6, 47.4 (P_{4,5}^δ), 43.9 (CH₂NH (Spacer)), 42.4, 42.3 (G_{1,2}^α), 40.5 (R^δ), 35.2 (D^β), 34.0 (CH₂Amid (Spacer)), 30.2 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.8, 28.6 (P₁₋₅^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3, (P₁₋₅^γ), 24.0 (R^γ),

22.2 (CH₃ (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^γ), 18.4 (V^γ), 18.1 (V^γ), 17.8 (T^{γ*}), 16.2, 15.2, 15.1, 15.0 (A₁₋₄^β), 14.9 (CH₃ (Squarat)).

¹⁹F-NMR (376.4 Hz, D₂O), δ (ppm): - 230.0 (dt, J_{F,H5} = 11.9 Hz, J_{F,H6} = 46.5 Hz).

ESI-MS (positiv), m/z: 820.03 ([M + H + 2H]³⁺, ber.: 821.70), 1210.57 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1210.08).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1210.0758 ([M + H]²⁺, ber.: 1210.0754).

MALDI-TOF-MS: (dnh positive ion mode), m/z: 2420.02 ([M + 1H]⁺, ber.: 2420.53)

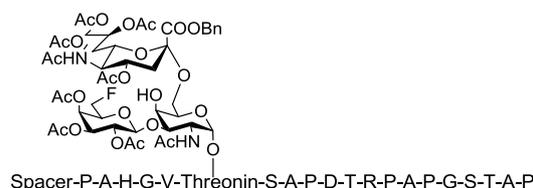
Konjugation an Rinderserumalbumin

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat₄ in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 3 mg (0.045 μmol) Rinderserumalbumin und 2.7 mg (1.13 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 4 mg Konjugat erhalten.

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z: 68579.26 – 76834.22.

Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde eine Belegung von 1 - 5 Molekülen **XX** pro Molekül BSA ermittelt.

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-O-[6-deoxy-6-fluoro-2,3,4-tri-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-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (110)



Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert, ausgehend von 500 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.20 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll (s. Seite 80) am Peptidsynthesizer gekuppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte

manuell. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 200 mg (0.15 mmol) der Glycosylaminosäure zusammen mit 62.3 mg (0.16 mmol) HATU und 22.3 mg (0.16 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 36 μ L *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und 16 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit NMP gewaschen und noch freie Aminogruppen wurden mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylenglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptides wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und 2 h in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz wurde zweimal mit ca. 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert.

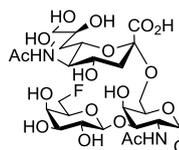
Rohausbeute: 186 mg, farbloses Lyophilisat

$C_{135}H_{203}FN_{28}O_{56}$ (M = 3131.388)

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1045.26 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 1044.80), 1567.37 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1566.70).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1566.7073 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1566.7019).

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (112)



Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Es wurden 163 mg (0.052 mmol) des Glycopeptides in 40 mL wässriger NaOH Lösung (pH = 11) gelöst und zwei Tage bei ständiger pH-Kontrolle gerührt. Anschließend wurde mit verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde durch

semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(70:30), 30 min, →(100:0), 80 min $\lambda = 214$ nm, $R_t = 14.8$ min) gereinigt.

Ausbeute: 87 mg (33%, 0.032 mmol, über 2 Stufen) farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{H}_2\text{O}) = -85.25$$

C₁₁₄H₁₈₃FN₂₈O (M = 2747.2673 g/mol)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ (ppm): 8.60 (d, 1H, $J_{\text{He,H}\delta} = 1.4$ Hz, H ^{ϵ}), 7.28 (d, 1H, $J_{\text{H}\delta,\text{He}} = 1.1$ Hz, H ^{δ}), 4.93 (d, 1H, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.74- 4.50 (m, 9H, D ^{α} {4.72}, H ^{α} {4.68}, 6a'-H {4.63}, T ^{α^*} {4.62}, R ^{α} {4.61}, A₂ ^{α} {4.59}, 6b'-H {4.52}, S₁ ^{α} {4.51}, A₃ ^{α} {4.50}), 4.46-4.15 (m, 16H, S₂ ^{α} {4.44}, A₄ ^{α} {4.43}, 1'-H {4.42}, P₁₋₅ ^{α} {4.43, 4.38, 4.30, 4.25, 4.23}, V ^{α} {4.33}, T₁₋₂ ^{α} {4.31, 4.29}, T ^{β^*} (4.28), A₁ ^{α} {4.22}, 2-H {4.18}, T₁₋₂ ^{β} {4.18, 4.17}), 4.11 (d, 1H, $J_{\text{H}4,\text{H}3} = 1.8$ Hz, 4-H), 4.06-3.71 (m, 25H, 5-H {4.05}, 4'-H {3.97}, 6a-H {3.96}, 3-H {3.94}, G ^{α} {3.94, 3.93}, 5'-H {3.85}, S_{1,2} ^{β} {3.85, 3.76}, 7''-H {3.83}, 9a''-H {3.82}, 5''-H {3.82}, P_{1,2} ^{δ} {3.78, 3.76}, 6''-H {3.78}, CH₂O-Spacer {3.74, 3.72}, 4''-H {3.71}), 3.67-3.45 (m, 20H, P₃₋₅ ^{δ} {3.67, 3.63, 3.59}, CH₂O-Spacer {3.67, 3.65, 3.61, 3.60}, 6b-H {3.61}, 9b''-H {3.60}, 3'-H {3.57}, 8''-H {3.51}, 2'-H {3.45}), 3.29 (dd, 1H, $J_{\text{H}\beta\text{a},\text{H}\alpha} = 5.7$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{a},\text{H}\beta\text{b}} = 15.6$ Hz, H ^{βa}), 3.19-3.14 (m, 5H, H ^{β} {3.16}, R ^{δ} {3.15}, CH₂NH₂-Spacer {3.17}), 2.95 (dd, 1H, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\alpha} = 6.3$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\beta\text{b}} = 17.0$ Hz, D ^{βa}), 2.87 (dd, 1H, $J_{\text{D}\beta\text{b},\text{D}\alpha} = 6.6$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{b},\text{D}\beta\text{a}} = 16.9$ Hz, D ^{βb}), 2.75-2.58 (m, 3H, CH₂Amid-Spacer, 3a''-H {2.60}), 2.34-2.22 (m, 6H, P₁₋₃ ^{β} {2.33, 2.29, 2.23}), 2.08-1.75 (m, 22H, V ^{β} {2.05}, P₁₋₅ ^{γ} {2.07, 1.99, 1.95, 1.92, 1.89}), CH₃ (NHAc) {2.00, 1.97}, P_{4,5} ^{β} {1.99, 1.84}, R ^{βa} {1.79}), 1.74-1.61 (m, 4H, 3ax''-H {1.71}, R ^{βb} {1.68}, R ^{γ} {1.61}), 1.36-1.33 (m, 9H, A₁₋₃ ^{β} {1.36, 1.35, 1.33}), 1.31 (d, 3H, $J_{\text{A}\beta,\text{A}\alpha} = 7.2$ Hz, A ^{β}), 1.26 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma^*,\text{T}\beta^*} = 6.0$ Hz, T ^{γ^*}), 1.17 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.5$ Hz, T₁ ^{γ}), 1.15 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.5$ Hz, T₂ ^{γ}), 0.95 (d, 3H, $J_{\text{V}\gamma,\text{V}\beta} = 5.4$ Hz, V ^{γ}), 0.93 (d, 3H, $J_{\text{V}\gamma,\text{V}\beta} = 6.5$ Hz, V ^{γ}).

¹³C-NMR (100,6 MHz, D₂O, DEPT) δ (ppm): 175.8, 174.9, 174.4, 174.3, 173.9, 173.7, 173.5, 173.1, 173.0, 172.7, 172.6, 172.5, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.2, 171.0, 170.7, (C=O, (Ester, NHAc, Carboxylat), C-1''), 156.7 (C=NH), 133.4 (H ^{ϵ}), 128.3 (H ^{γ}), 117.4 (H ^{δ}), 104.5 (C-1'), 99.3 (C-2''), 98.8 (C-1), 83.2 (d, $J_{\text{F},\text{C}6} = 164.6$ Hz, C-6'), 77.7 (T ^{β^*}), 77.2 (C-3), 73.0 (d, $J_{\text{F},\text{C}5} = 19.4$ Hz, C-5'), 72.7 (C-6''), 72.2 (C-3'), 70.8 (C-7''), 70.4 (C-2'), 69.5 (C-5), 69.6, 69.5, 69.4, 69.4 (CH₂O (Spacer)), 68.9 (C-4), 68.3 (C-8''), 68.1 (d, $J_{\text{F},\text{C}4} = 6.5$ Hz, C-4'), 67.4 (C-4''), 67.0 (T₁ ^{β}), 66.9 (T₂ ^{β}), 66.3, 66.0 (CH₂ (Spacer)), 64.0 (C-6), 62.9 (C-9''), 61.4, 61.1 (S_{1,2} ^{β}), 60.7, 60.5, 60.1, 59.3 (P₁₋₅ ^{α}), 59.9 (V ^{α}), 58.9, 58.8 (T_{1,2} ^{α}), 57.0 (T ^{α^*}), 55.5, 54.9 (S_{1,2} ^{α}), 52.3 (H ^{α}), 51.7 (C-5''), 51.1 (R ^{α}), 50.1 (D ^{α}), 49.6, (A ^{α}), 48.1 (C-2), 48.0, 47.9, 47.8, (P₁₋₃ ^{δ}), 47.7, 47.7 (A ^{α}), 47.6, 47.4 (P_{4,5} ^{δ}), 42.4, 42.3 (G_{1,2} ^{α}), 40.5 (CH₂NH₂ (Spacer)), 39.1 (C-3''),

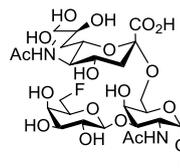
39.0 (R^δ), 34.9 (D^β), 34.0 (CH_2 Amid (Spacer)), 30.1 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 (P_{1-5}^β), 27.4 (R^β), 26.3 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 24.0 (P_{1-5}^γ), 23.9 (R^γ), 22.3, 22.0 (2 x CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^γ), 18.5 (V^γ), 18.3 ($T^{\gamma*}$), 17.8 (V^γ), 16.3, 15.2, 15.1, 15.0 (A_{1-4}^β).

^{19}F -NMR (376.4 Hz, D_2O): δ (ppm): - 229.7 (dt, $J_{F,H5} = 15.3$ Hz, $J_{F,H6} = 47.1$ Hz).

ESI-MS (positiv), m/z : 917.10 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 916.76), 1375.18 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1374.64).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1374.6401 ($[M + 2H]^{2+}$, ber.: 1374.6415).

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-[6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactopyranosyl]-6-O-[(5-acetamido--3,5-dideoxy- α -Dglycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (117)



Quadratsäure-Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Zu einer Lösung von 30 mg (0.011 mmol) Glycopeptid in 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden 1.7 μ L (0.011 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,3-dion gegeben. Anschließend wurden ca. 25 μ L einer ges. Natriumcarbonatlösung zugegeben bis ein pH-Wert von 8 erreicht war. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt (HPLC-Kontrolle), mit verdünnter Essigsäure (1 N) neutralisiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-Jupiter, Grad.: MeCN/ H_2O + 0.1 % TFA (10:90) \rightarrow (25:75), 40 min, \rightarrow (70:30) 60 min, $\lambda = 214$ nm, $R_t = 28.9$ min) gereinigt.

Ausbeute : 10 mg (32%, 3.48 μ mol) farbloses Lyophilisat.

$$[\alpha]_D^{23} = (1.00, H_2O) = - 86.8$$

$C_{120}H_{187}FN_{28}O_{52}$ (M = 2871.283 g/mol)

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY, HMQC) δ (ppm): 8.61 (d, 1H, $J_{He,H\delta} = 1.3$ Hz, H^ϵ), 7.28 (s, 1H, H^δ), 4.94 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.73- 4.50 (m, 11H, D^α {4.72}, CH_2O -Squarat {4.70}, H^α {4.68}, A_2^α {4.67}, $6a'$ -H {4.66}, $T^{\alpha*}$ {4.64}, R^α {4.63}, A_3^α {4.59}, $6b'$ -H {4.54}, S_1^α {4.52}), 4.46-4.18 (m, 16H, S_2^α {4.45}, A_4^α {4.44}, $1'$ -H {4.44}, P_{1-5}^α {4.43, 4.38, 4.30, 4.25, 4.23}, V^α {4.31}, T_{1-2}^α {4.33, 4.29}, $T^{\beta*}$ (4.27), A_1^α {4.23}, 2-H {4.19}, T_{1-2}^β {4.20, 4.18}), 4.12 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.2$ Hz, 4-H), 4.06-3.71 (m, 28H, 5-H {4.05}, G^α

{3.98, 3.97}, 4'-H {3.94}, 3-H {3.93}, 5'-H {3.89}, 7''-H {3.86}, S_{1,2}^β {3.85, 3.76}, 9a''-H {3.85}, 5''-H {3.81}, P_{1,2}^δ {3.78, 3.76}, CH₂NH-Spacer {3.77}, 6a/b-H {3.76}, CH₂O-Spacer {3.75, 3.72}, 6''-H {3.71}), 3.68-3.51 (m, 19H, P₃₋₅^δ {3.67, 3.63, 3.59}, 4''-H {3.67}, CH₂NH-Spacer {3.66}, CH₂O-Spacer {3.67, 3.65, 3.61, 3.60}, 9b''-H {3.61}, 3'-H {3.57}, 8''-H {3.51}), 3.49 (dd, 1H, $J_{H2',H1'} = 7.8$ Hz, $J_{H2',H3'} = 9.9$ Hz, 2'-H), 3.31 (dd, 1H, $J_{Hβa,Hα} = 5.6$ Hz, $J_{Hβa,Hβb} = 15.5$ Hz, H^{βa}), 3.21-3.15 (m 3H, H^β {3.19}, R^δ {3.17}), 2.96 (dd, 1H, $J_{Dβa,Dα} = 6.2$ Hz, $J_{Dβa,Dβb} = 17.1$ Hz, D^{βa}), 2.88 (dd, 1H, $J_{Dβb,Dα} = 7.1$ Hz, $J_{Dβb,Dβa} = 17.2$ Hz, D^{βb}), 2.77-2.64 (m, 3H, CH₂Amid-Spacer, 3a''-H {2.66}), 2.32-2.23 (m, 6H, P₁₋₃^β {2.31, 2.29, 2.24}), 2.08-1.82 (m, 22H, V^β {2.06}, P₁₋₅^γ {2.07, 1.99, 1.95, 1.92, 1.89}, CH₃ (NHAc) {2.00, 1.98}, P_{4,5}^β {1.99, 1.84}, R^{βa} {1.80}), 1.72-1.63 (m, 4H, 3ax''-H {1.67}, R^{βb} {1.65}, R^γ {1.64}), 1.42 (t, 3H, $J_{CH3/CH2} = 7.0$ Hz, CH₃-Squarat), 1.38-1.33 (m, 9H, A₁₋₃^β {1.38, 1.36, 1.33}), 1.32 (d, 3H, $J_{Aβ,Aα} = 7.2$ Hz, A^β), 1.29 (d, 3H, $J_{Tγ*,Tβ*} = 6.4$ Hz, T^{γ*}), 1.19 (d, 3H, $J_{Tγ,Tβ} = 6.5$ Hz, T₁^γ), 1.17 (d, 3H, $J_{Tγ,Tβ} = 6.7$ Hz, T₂^γ), 0.96 (d, 3H, $J_{Vγ,Vβ} = 6.5$ Hz, V^γ), 0.95 (d, 3H, $J_{Vγ,Vβ} = 6.6$ Hz, V^γ).

¹³C-NMR (100,6 MHz, D₂O, DEPT) δ (ppm): 188.8, 183.3 (C=O (Squarat)), 175.9, 174.9, 174.4, 174.1, 173.7, 173.1, 173.0, 172.7, 172.6, 172.5, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.0, 170.7, (C=O, (NHAc, Ester, Carboxylat), C=C (Squarat), C-1''), 156.7 (C=NH), 133.4 (H^ε), 128.3 (H^γ), 117.4 (H^δ), 104.5 (C-1'), 99.8 (C-2''), 99.3 (C-1), 83.0 (d, $J_{F,C6} = 166.4$ Hz, C-6'), 77.7 (T^{β*}), 77.1 (C-3), 73.0 (d, $J_{F,C5} = 21.3$ Hz, C-5'), 72.5 (C-6''), 72.3 (C-3'), 71.4 (C-7''), 70.6 (CH₂ (Squarat)), 70.3 (C-2'), 69.6 (CH₂O (Spacer)), 69.3 (C-5), 69.0 (C-4), 68.2 (C-8''), 68.0 (d, $J_{F,C4} = 9.2$ Hz, C-4'), 67.7 (C-4''), 67.0 (T₁^β, T₂^β), 66.1 (C-6), 62.6 (C-9''), 61.4, 61.1 (S_{1,2}^β), 60.7, 60.5, 60.0, 59.4 (P₁₋₅^α), 59.3 (V^α), 58.8, 58.6 (T_{1,2}^α), 56.9 (T^{α*}), 55.5, 54.9 (S_{1,2}^α), 52.3 (H^α), 51.8 (C-5''), 51.1 (R^α), 50.2 (D^α), 49.6, (A^α), 48.3 (C-2), 48.2, 48.0, 47.8, (P₁₋₃^δ), 47.5, 47.4 (A^α), 47.4 (P_{4,5}^δ), 43.9 (CH₂NH (Spacer)), 42.4, 42.2 (G_{1,2}^α), 40.5 (R^δ), 39.8 (C-3''), 35.0 (D^β), 34.0 (CH₂Amid (Spacer)), 30.1 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 (P₁₋₅^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 23.9 (P₁₋₅^γ), 23.8 (R^γ), 22.3, 22.0 (2 x CH₃ (NHAc)), 18.8, 18.7 (T^γ), 18.5 (V^γ), 18.4 (T^{γ*}), 17.8 (V^γ), 16.2, 15.2, 15.1, 15.0 (A₁₋₄^β), 14.9 (CH₃ (Squarat)).

¹⁹F-NMR (376.4 Hz, D₂O): δ (ppm): - 229.7 (dt, $J_{F,H5} = 14.9$ Hz, $J_{F,H6} = 46.3$ Hz).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 958.3 ([M + 3H]³⁺, ber.: 958.1), 1437.3 ([M + 2H]²⁺, ber.: 1436.7).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 958.0975 ([M + 3H]³⁺, ber.: 958.1023).

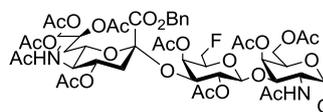
Konjugation an Rinderserumalbumin

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 3 mg (0.045 μmol) Rinderserumalbumin und 3.1 mg (1.13 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 6 mg Konjugat erhalten.

Konjugation an das Tetanus-Toxoid

Zu einer Lösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 1 mL Wasser (pH = 9.5) wurden 2 mg (0.013 μmol) Tetanus Toxoid und 2.1 mg (0.74 μmol) Glycopeptid-Quadratsäure gegeben. Die Mischung wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage (Membran 30.000 Da) überführt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit 50 mL entionisiertem Wasser filtriert. Nach Gefriertrocknung wurden 4 mg Konjugat erhalten.

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-deoxy-3-O-[2,4-di-O-acetyl-6-deoxy-6-fluoro-3-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl)- α -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (111)



Spacer-P-A-H-G-V-Threonin-S-A-P-D-T-R-P-A-P-G-S-T-A-P

Die Glycopeptidsynthese erfolgte automatisiert, ausgehend von 455 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-Harzes (Rapp Polymere, Beladung 0.22 mmol/g). Es wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren nach dem Standardprotokoll (s. Seite 80) am Peptidsynthesizer gekuppelt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte manuell. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe des am Harz gebundenen Peptides durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Anschließend wurden 150 mg

(0.11 mmol) der Glycosylaminosäure zusammen mit 48 mg (0.12 mmol) HATU und 17 mg (0.12 mmol) HOAt in 2 mL *N*-Methylpyrrolidon gelöst und mit 28 μ L *N*-Methylmorpholin versetzt. Die Lösung wurde in das Reaktionsgefäß des Synthesizers überführt und 16 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung wurde das Harz mit NMP gewaschen und noch freie Aminogruppen wurden mit dem Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplung der restlichen fünf Aminosäuren und des Triethylenglycolspacers erfolgte nach dem Standardprotokoll. Abschließend wurde die terminale Fmoc Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptides wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan gewaschen und 2 h in einer Mischung aus 15 mL Trifluoressigsäure, 0.8 mL dest Wasser und 0.8 mL Triisopropylsilan geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz wurde zweimal mit ca. 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert.

Rohausbeute: 135 mg, farbloses Lyophilisat

$C_{137}H_{205}FN_{28}O_{57}$ ($M = 3173.399$)

ESI-MS (positiv), m/z : 1059.28 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 1058.81).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1058.8073 ($[M + 3H]^{3+}$, ber.: 1058.8073).

5.4.2 Immunologische Evaluierung- Methoden

ELISA:

1. Beschichtung der der Mikrotiterplatten (Coat):

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 μL der Substanzlösung (BSA-Konjugat, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in Coatingpuffer gegeben. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank oder eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

3. Blockierung noch freier Bindungsstellen:

Dazu wurde in jede Vertiefung 100 μL Blockpuffer gegeben und die Platte wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

4. Ausklopfen der Mikrotiterplatten

5. Titration der Seren:

Es wurde je 50 μL Blockpuffer in jede Vertiefung der Platte vorgelegt. Anschließend wurde in die erste Vertiefung jeder Reihe 50 μL der zu titrierenden Substanz gegeben und gründlich vermischt. Im Folgenden wurde im Verhältnis 1:2 verdünnt bevor die Mikrotiterplatte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde.

6. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

7. Zugabe des Sekundärantikörpers:

Es wurden je 50 μL einer Sekundärantikörperlösung (sheep anti mouse biotinyliert (0.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) in Blockpuffer in jede Vertiefung gegeben und die Mikrotiterplatte wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

8. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

9. Zugabe der Streptavidin-Meerrettichperoxidase(SA-HPO):

Es wurden je 50 μL einer SA-HPO-Lösung (1:10.000 verdünnt) in Blockpuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte wurde 30 min bei 37 °C inkubiert.

10. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

11.: Zugabe der ABTS/ H_2O_2 -Lösung:

Es wurden je 50 μL einer Lösung aus ABTS (1mg/mL) und H_2O_2 (30%ig, 1:4 verdünnt) in Citratpuffer in jede Vertiefung gegeben. Nach 10 min wurde die Absorption bei 410 nm gemessen.

Neutralisations-ELISA

Neutralisationslösung:

Es wurden je 40 μL PBS Puffer mit 0.1% BSA in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde in die ersten drei Vertiefungen jeder Reihe 20 μL des entsprechenden vorverdünnten Serums gegeben und zunehmend verdünnt (Standard 1:3). Im Folgenden wurden je 10 μL der zu neutralisierenden Substanz ($c = 500 \mu\text{g/mL}$) zugeben und die Mikrotiterplatte wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert.

1. Beschichtung der der Mikrotiterplatten (Coat):

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 μL der Substanzlösung (BSA-Konjugat, 5 $\mu\text{g/mL}$) in Coatingpuffer gegeben. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank oder eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

3. Blockierung noch freier Bindungsstellen:

Dazu wurde in jede Vertiefung 100 μL Blockpuffer gegeben und die Platte wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

4. Ausklopfen der Mikrotiterplatten

5. Übertragung der Neutralisationlösung auf die ELISA-Mikrotiterplatte.

Inkubation der Mikrotiterplatte für eine Stunde bei 37°C .

6. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

7. Zugabe des Sekundärantikörpers:

Es wurden je 50 μL einer Sekundärantikörperlösung (sheep anti mouse biotinyliert (0.48 $\mu\text{g/mL}$)) in Blockpuffer in jede Vertiefung gegeben und die Mikrotiterplatte wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert.

8. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

9. Zugabe der Streptavidin-Meerrettichperoxidase(SA-HPO):

Es wurden je 50 μL einer SA-HPO-Lösung (1:10.000 verdünnt) in Blockpuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

10. Die Platten wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen

11.: Zugabe der ABTS/ H_2O_2 -Lösung:

Es wurden je 50 μL einer Lösung aus ABTS (1mg/mL) und H_2O_2 (30%ig, 1:4 verdünnt) in Citratpuffer in jede Vertiefung gegeben. Nach 10 min wurde die Absorption bei 410 nm gemessen.

Isotyp-ELISA

Die Durchführung erfolgt analog zu dem Standard-ELISA-Protokoll. Als Sekundätkörper werden hier jedoch die entsprechenden Isotyp-Antikörper in der obengenannten Verdünnung eingesetzt.

Immunisierungen

Vakzin Formulierung-Erstimmunisierung:

In einem 2.5 mL Röhrchen wurden aus 500 μ L CFA (vollständiges Freund'sches Adjuvans) und 500 μ L einer Lösung des TTox-Konjugates in PBS-Puffer ($c= 500 \mu\text{g/mL}$) unter Eiskühlung mittels eines Ultraturax eine viskose Emulsion hergestellt.

Jeder Maus wurden 40 μ L dieser Emulsion subkutan (Fußsohl) injiziert.

Die Auffrischungsimmunisierungen erfolgten alle 21 Tage intraperitoneal.

Vakzin Formulierung-Auffrischungsimmunisierung:

In einem 2.5 mL Röhrchen wurden aus 500 μ L IFA (unvollständiges Freund'sches Adjuvans) und 500 μ L einer Lösung des TTox-Konjugates in PBS-Puffer ($c= 400 \mu\text{g/mL}$) unter Eiskühlung mittels eines Ultraturax eine viskose Emulsion hergestellt.

Jeder Maus wurden 40 μ L dieser Emulsion i.p. injiziert

Blutentnahme:

Jeweils fünf Tage nach jeder Immunisierung wurde aus der Schwanzvene jeder Maus etwas Blut entnommen. Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut zweimal 10 min bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert wobei das klare Serum jeweils vorsichtig vom Bodensatz abgenommen wurde.

5.4.3 Immunologische Evaluierung-Ergebnisse

Vergleich der Antikörperbindung verschieden fluorierter Antigene im Neutralisations-experiment:

Daten zu Abb. 3.131

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	1/10.000	1/30.000	1/90.000	1/180.000
MUC1(20)Thr ⁶ - 6FT	0,8936	0,4489	0,1651	0,0860
MUC1(20)Thr ⁶ - 6'FT	0,9732	0,4803	0,1851	0,0919
MUC1(20)Thr ⁶ - 6'F6FT	0,9658	0,4445	0,1560	0,0931
MUC1(20)Thr ⁶ -T	1,0361	0,5489	0,2007	0,0967
MUC4	1,2370	0,9736	0,3788	0,1401
positiv Kontrolle	1,2113	0,8320	0,3764	0,1480
negativ Kontrolle	0,0605	0,0644	0,0665	0,0664

Daten zur Immunisierung der Glycopeptidvakzine 123

Titerbestimmung 3. Bluten nach 4. Immunisierung (Coat $5\mu\text{g/mL}$ **118** bzw. **TTox**)

Daten zu Abb. 3.133

Verdünnung	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000	1/32.000
Maus 13	1,9008	1,8785	1,8570	1,7276	1,3132	0,8559
Maus 14	1,7449	1,6958	1,4849	1,2917	0,8256	0,5418
Maus 15	1,8616	1,7926	1,6912	1,6366	1,2785	0,9597

Verdünnung	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000	1/2.048.000
Maus 13	0,5414	0,3082	0,1868	0,1296	0,0974	0,0777
Maus 14	0,3033	0,1945	0,1307	0,0996	0,0824	0,0744
Maus 15	0,6005	0,3588	0,2203	0,1434	0,1068	0,1001

Daten zu Abb. 3.134

Verdünnung	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000	1/32.000
Maus 13	1,8960	1,8220	1,7830	1,8491	1,6433	1,6619
Maus 14	1,9980	1,9305	1,8926	1,7616	1,6957	1,3455
Maus 15	1,9255	1,8758	1,7970	1,8050	1,7078	1,6833
(+)-Kontrolle	1,9341	1,9468	1,8644	1,7424	1,5730	1,4978
(-)-Kontrolle	0,0700	0,0689	0,0875	0,0796	0,0778	0,0777

Verdünnung	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000	1/2.048.000
Maus 13	1,2758	0,9640	0,7154	0,4668	0,3220	0,2074
Maus 14	0,8631	0,5142	0,3004	0,1891	0,1498	0,1176
Maus 15	1,3658	0,9634	0,5729	0,3486	0,2149	0,1487
(+)-Kontrolle	1,1240	0,6417	0,4334	0,2434	0,1743	0,1179
(-)-Kontrolle	0,0670	0,0807	0,1071	0,0917	0,1060	0,1056

Studien zur Bindungsselektivität der induzierten Antikörper

Daten zu Abb. 3.136

Coat	Verdünnung	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800	1/25.600
MUC1 (20) Thr6-ST _N -BSA	Maus 15	1,4507	1,3650	1,2855	1,2168	1,0824	0,8729
MUC1 (20) Thr6-2,6 ST-BSA	Maus 15	1,5083	1,4276	1,3710	1,3068	1,2203	1,0298
MUC1 (20)-BSA	Maus 15	1,5221	1,4718	1,3739	1,2965	1,1739	0,9189
MUC1 (20) Thr6-T-BSA	Maus 15	1,5518	1,4885	1,4026	1,3683	1,3021	1,0802

Coat	Verdünnung	1/51.200	1/102.400	1/204.800	1/409.600	1/819.200	1/1.638.400
MUC1 (20) Thr6-ST _N -BSA	Maus 15	0,6052	0,3703	0,2351	0,1380	0,0991	0,0785
MUC1 (20) Thr6-2,6 ST-BSA	Maus 15	0,7667	0,5124	0,3595	0,1836	0,1262	0,0936
MUC1 (20)-BSA	Maus 15	0,6035	0,4157	0,2201	0,1500	0,1047	0,0830
MUC1 (20) Thr6-T-BSA	Maus 15	0,7412	0,4635	0,2691	0,1680	0,1193	0,0913

Isotypbestimmung der induzierten Antikörper

Daten zu Abb. 3.137

Verdünnung	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000	1/32.000
IgG1	2,2071	2,1896	1,8645	1,3551	0,8300	0,4725
IgG2a	1,8131	1,5002	0,9515	0,5609	0,3407	0,2016
IgG2b	1,6969	1,2804	0,7899	0,4215	0,2619	0,1626
IgM	0,0894	0,0930	0,0710	0,0709	0,0676	0,0653
IgA	0,1502	0,1005	0,0847	0,0808	0,0688	0,0642
IgD	0,0660	0,0617	0,0647	0,0677	0,0607	0,0608
smbio	2,0265	1,8926	1,5889	1,1574	0,7151	0,4139
negativ	0,0516	0,0457	0,0549	0,0499	0,0577	0,0688

Verdünnung	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000	1/2.048.000
IgG1	0,2983	0,1751	0,1429	0,1003	0,0839	0,0749
IgG2a	0,1434	0,1083	0,0877	0,0801	0,0703	0,0663
IgG2b	0,1339	0,0893	0,0939	0,0809	0,0676	0,0678
IgM	0,0807	0,0683	0,0649	0,0658	0,0613	0,0643
IgA	0,0705	0,0664	0,0729	0,0673	0,0661	0,0631
IgD	0,0658	0,0617	0,0609	0,0649	0,0669	0,0622
smbio	0,2464	0,1508	0,1084	0,0792	0,0718	0,0720
negativ	0,0609	0,0554	0,0605	0,0587	0,0614	0,0582

Daten zur Immunisierung der Glycopeptidvakzine **124**, **130**, **131**

Titerbestimmung 2. Bluten nach 3. Immunisierung

Gruppe A (Coat 5µg/mL **120**), Daten zu Abb. 3.145

Verdünnung	1/500	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000
Maus A1	2,1002	2,1356	2,1548	2,2651	2,1644	1,9130
Maus A2	2,0491	2,1572	2,2283	2,1033	1,7555	1,2484
Maus A3	2,0347	2,0100	2,0366	1,9942	1,9618	1,8196
Verdünnung	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000	1/32.000
(+)-Kontrolle	1,8682	1,4747	0,9892	0,5716	0,3393	0,2136

Verdünnung	1/32.000	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000
Maus A1	1,3145	0,8635	0,5357	0,2993	0,1810	0,1288
Maus A2	0,7838	0,4501	0,2691	0,1638	0,1072	0,0941
Maus A3	1,5661	1,1947	0,7510	0,4696	0,2973	0,2019
(-) Kontrolle	0,0623	0,0620	0,0607	0,0592	0,0561	0,0572

Gruppe B, Daten zu Abb. 3.146

Verdünnung	1/500	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000
Maus B1	1,6571	1,5965	1,5652	1,4698	1,4029	1,2699
Maus B2	1,9411	1,9138	1,8812	1,8116	1,7490	1,5503
Maus B3	1,5476	1,4913	1,4600	1,3050	1,1381	0,8931

Verdünnung	1/32.000	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000
Maus B1	1,0961	0,8812	0,6742	0,5222	0,4499	0,4411
Maus B2	1,2664	0,9544	0,7513	0,6054	0,5102	0,4858
Maus B3	0,6827	0,5628	0,4799	0,4260	0,4026	0,3866

Gruppe C, Daten zu Abb. 3.147

Verdünnung	1/500	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000
Maus C1	1,9292	1,6262	1,1211	0,6473	0,4017	0,2371
Maus C2	1,9442	1,9451	2,0703	1,9768	1,7683	1,3805
Maus C3	1,8778	1,7895	1,8787	1,7324	1,6842	1,4450

Verdünnung	1/32.000	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000
Maus C1	0,0677	0,0554	0,0580	0,0564	0,0684	0,0558
Maus C2	0,9071	0,6074	0,3585	0,2237	0,1401	0,1094
Maus C3	1,1095	0,7641	0,4911	0,2921	0,1852	0,1326

Gruppe B, TTox-Titer, Daten zu Abb. 3.148

Verdünnung	1/500	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/8.000	1/16.000
Maus B1	2,5654	2,5990	2,6522	2,6706	2,6638	2,6038
Maus B2	2,2910	2,2970	2,4405	2,4188	2,3850	2,3292
Maus B3	2,2389	2,1929	2,1602	2,1647	2,1257	1,9895

Verdünnung	1/32.000	1/64.000	1/128.000	1/256.000	1/512.000	1/1.024.000
Maus B1	2,3519	1,8796	1,4062	0,8734	0,5470	0,3178
Maus B2	2,1173	1,6999	1,1742	0,7542	0,4355	0,2630
Maus B3	1,6461	1,2455	0,7783	0,5563	0,3478	0,2344

Isotypbestimmung der induzierten Antikörper

Gruppe A, Daten zu Abb. 3.149

<i>Verdünnung</i>	<i>1/2.000</i>	<i>1/4.000</i>	<i>1/8.000</i>	<i>1/16.000</i>
Ig G2a	0,7451	0,3481	0,1799	0,1140
Ig G2b	0,7262	0,3361	0,1865	0,1255
Ig G1	1,6259	1,5370	1,1784	0,7497
Ig A	0,1037	0,0869	0,0696	0,0660
Ig D	0,0715	0,0725	0,0910	0,0632
Ig M	0,1635	0,0973	0,0850	0,0688
(+)-Kontrolle	1,5639	1,4553	1,3156	1,0312
(-)-Kontrolle	0,0727	0,0699	0,0737	0,0639

Gruppe B, Daten zu Abb. 3.150

<i>Verdünnung</i>	<i>1/2.000</i>	<i>1/4.000</i>	<i>1/8.000</i>	<i>1/16.000</i>
Ig G2a	0,6756	0,4138	0,2196	0,1384
Ig G2b	0,9384	0,5529	0,2959	0,2007
Ig G1	1,2567	1,2279	1,0274	0,7982
Ig A	0,0942	0,0777	0,0708	0,0711
Ig D	0,0687	0,0603	0,0667	0,0687
Ig M	0,0922	0,0807	0,0743	0,0677
(+)-Kontrolle	1,2762	1,2610	1,1268	0,8813
(-)-Kontrolle	0,0707	0,0724	0,0826	0,0774

Gruppe C, Daten zu Abb. 3.151

<i>Verdünnung</i>	<i>1/2.000</i>	<i>1/4.000</i>	<i>1/8.000</i>	<i>1/16.000</i>
Ig G2a	0,5249	0,2575	0,1783	0,1342
Ig G2b	0,4970	0,2337	0,1460	0,1040
Ig G1	1,5465	1,3422	0,9589	0,6057
Ig A	0,0658	0,0609	0,0763	0,0609
Ig D	0,0614	0,0660	0,0603	0,0586
Ig M	0,1007	0,0771	0,0640	0,0605
(+)-Kontrolle	1,3783	1,3029	1,0747	0,8700
(-)-Kontrolle	0,0625	0,0610	0,0603	0,0623

Vergleich der Antikörperbindung verschieden fluorierter Antigene im Neutralisations-
experiment:

Daten zu **Abb. 3.157**

Konzentration	0.300	0.100	0.033	0.011
MUC1(20)Thr6-T	0,5317	0,2150	0,1192	0,0940
MUC1(20)Thr6-2'FT	0,2353	0,1223	0,1020	0,0866
MUC1(20)Thr6- 2'F6FT	0,1792	0,1138	0,1028	0,0946
MUC1(20)Thr6- 6'F6FT	0,2860	0,1330	0,1111	0,0933
MUC1(20)Thr6- 6TN	0,7914	0,2389	0,1582	0,1065
positiv	1,4817	0,8597	0,4534	0,2246
negativ	0,0855	0,0857	0,0813	0,1510

Daten zu **Abb. 3.158**

Konzentration [µg/ml]	1/5.000	1/15.000	1/45.000	1/135.000
MUC1(20)Thr ⁶ - 6FT	0,8849	0,4891	0,1697	0,0759
MUC1(20)Thr ⁶ - 6'FT	0,8783	0,4578	0,1676	0,0790
MUC1(20)Thr ⁶ - 6'F6FT	0,7092	0,3243	0,1292	0,0789
MUC1(20)Thr ⁶ - 6'-2'FT	0,7867	0,3545	0,1466	0,0819
MUC1(20)Thr ⁶ - 2'F6FT	0,7797	0,4174	0,1574	0,0904
MUC1(20)Thr ⁶ -2'FT	0,8390	0,3927	0,1533	0,0865
MUC1(20)Thr ⁶ -T	1,0586	0,7217	0,2618	0,1357
MUC1 (20)	0,9876	0,5419	0,2146	0,0958
MUC4	1,1817	0,9929	0,5068	0,1780
positiv Kontrolle	1,1998	1,0478	0,5827	0,2139
negativ Kontrolle	0,0596	0,0612	0,0663	0,0620

Daten zu **Abb. 3.159**

Verdünnung	1/5.000	1/15.000	1/45.000	1/135.000
MUC1(20)Thr6-6FT	0,9437	0,5463	0,3552	0,1605
MUC1(20)Thr6-2'-6'FT	0,8959	0,4593	0,2520	0,1460
MUC1(20)Thr6-2'- 6'F,6FT	0,9027	0,4512	0,2572	0,1502
MUC1(20)Thr6-2'FT	0,8548	0,4279	0,2611	0,1495
MUC1(20)Thr6-2'6FT	0,8108	0,4069	0,2536	0,1484
MUC4	1,2899	0,7659	0,4294	0,2209
positive Kontrolle I	1,3258	0,7661	0,4362	0,2242
negative Kontrolle I	0,0840	0,0792	0,0774	0,0827

6 Literaturverzeichnis

- [1] in *Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends*, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., **2010**.
- [2] H. K. S. Wittrock, *Rot-Grün-Weiss* **2006**, 2-5.
- [3] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [4] M. A. Blasco, *Nat Rev Genet* **2005**, *6*, 611-622.
- [5] D. L. Burkhardt, J. Sage, *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 671-682.
- [6] J. M. Adams, S. Cory, *Oncogene* **2007**, *26*, 1324-1337.
- [7] N. Ferrara, *Arterioscl Throm Vas* **2009**, *29*, 789-791.
- [8] H. zur Hausen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5798-5808.
- [9] R. E. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, *2*, 305-327, und darin zitierte Literatur.
- [10] R. A. Graham, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, *Cancer Immunology Immunotherapy* **1996**, *42*, 71-80.
- [11] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 1072-1076.
- [12] T. M. Cardillo, R. Blumenthal, Z. L. Ying, D. V. Gold, *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 386-392.
- [13] M. R. McDevitt, D. A. Scheinberg, *Cell Death Differ* **2002**, *9*, 593-594.
- [14] C. F. Qu, Y. Li, Y. J. Song, S. M. A. Rizvi, C. Raja, D. Zhang, J. Samra, R. Smith, A. C. Perkins, C. Apostolidis, B. J. Allen, *Brit J Cancer* **2004**, *91*, 2086-2093.
- [15] P. Sabbatini, K. Odunsi, *Journal of Clinical Oncology* **2007**, *25*, 2884-2893.
- [16] C. Kruger, T. F. Greten, F. Korangy, *Histol Histopathol* **2007**, *22*, 687-696.
- [17] S. B. T. Pfitzner, A. Engert, *Der Onkologe* **2000**, *1*, 31-35.
- [18] C. Janeway, *Immunologie*, Spektrum, **2002**.
- [19] T. Buskas, P. Thompson, G. J. Boons, *Chem. Commun.* **2009**, 5335-5349.
- [20] J. Copier, A. Dalglish, *Int Rev Immunol* **2006**, *25*, 297-319.
- [21] S. K. Nair, D. Boczkowski, D. Snyder, E. Gilboa, *European Journal of Immunology* **1997**, *27*, 589-597.
- [22] D. M. Ashley, B. Faiola, S. Nair, L. P. Hale, D. D. Bigner, E. Gilboa, *J Exp Med* **1997**, *186*, 1177-1182.
- [23] J. M. Lang, A. C. Andrei, D. G. McNeel, *Expert Rev Vaccines* **2009**, *8*, 1657-1661.
- [24] P. G. Coulie, T. Hanagiri, M. Takenoyama, *International Journal of Clinical Oncology* **2001**, *6*, 163-170.
- [25] M. A. Cheever, J. P. Allison, A. S. Ferris, O. J. Finn, B. M. Hastings, T. T. Hecht, I. Mellman, S. A. Prindiville, J. L. Viner, L. M. Weiner, L. M. Matrisian, *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 5323-5337.
- [26] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- [27] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [28] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Correa, D. Miles, M. Smith, *J Mammary Gland Biol* **2002**, *7*, 209-221.
- [29] G. Springer, *Science* **1984** *224* 1198-1206
- [30] S. Yonezawa, M. Goto, N. Yamada, M. Higashi, M. Nomoto, *Proteomics* **2008**, *8*, 3329-3341.
- [31] M. C. Rose, *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, L413-L429.
- [32] J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Millis, D. Lampion, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476-5482.
- [33] S. Muller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A. M. Lawson, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24780-24793.
- [34] J. Hilkens, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci* **1992**, *17*, 359-363.
- [35] M. Yamamoto, A. Bharti, Y. Q. Li, D. Kufe, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12492-12494.
- [36] Y. Q. Li, A. Bharti, D. S. Chen, J. L. Gong, D. Kufe, *Mol. Cell Biol.* **1998**, *18*, 7216-7224.

- [37] P. Pandey, S. Kharbanda, D. Kufe, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4000-4003
- [38] R. A. Budiu, G. Mantia-Smaldone, E. Elishaev, T. J. Chu, J. Thaller, K. McCabe, D. Lenzner, R. P. Edwards, A. M. Vlad, *Cancer Immunology Immunotherapy* **2011**, *60*, 975-984.
- [39] T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 491-517.
- [40] J. Wesseling, S. W. v. d. Valk, H. L. Vos, A. Sonnenberg, J. Hilkens, *J. Biol. Chem.* **1995**, *129*, 255-265.
- [41] J. Wesseling, S. W. vanderValk, J. Hilkens, *Mol. Biol. Cell.* **1996**, *7*, 565-577.
- [42] S. Muller, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26103-26112.
- [43] S. Wilkie, G. Picco, J. Foster, D. M. Davies, S. Julien, L. Cooper, S. Arif, S. J. Mather, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, J. Maher, *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4901-4909.
- [44] T. Ju, G. S. Lanneau, T. Gautam, Y. Wang, B. Xia, S. R. Stowell, M. T. Willard, W. Wang, J. Y. Yja, R. E. Zuma, Z. Laszik, D. M. Benbrook, M. H. Hanigan, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 3076-3076.
- [45] T. Z. Ju, G. S. Lanneau, T. Gautam, Y. C. Wang, B. Y. Xia, S. R. Stowell, M. T. Willard, W. Y. Wang, J. Y. Xia, R. E. Zuna, Z. Laszik, D. M. Benbrook, M. H. Hanigan, R. D. Cummings, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1636-1646.
- [46] T. Ju, V. I. Otto, R. D. Cummings, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1808-1830.
- [47] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- [48] M. Fukuda, S. R. Carlsson, J. C. Klock, A. Dell, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 2796-2806.
- [49] J. Burchell, J. Taylorpapadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691-696.
- [50] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Research* **1993**, *53*, 5386-5394.
- [51] A. J. Pantuck, A. van Ophoven, B. J. Gitlitz, C. L. Tso, B. Acres, P. Squiban, M. E. Ross, A. S. Belldegrun, F. A. Figlin, *J. Immunotherapy* **2004**, *27*, 240-253.
- [52] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-912.
- [53] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551-7556.
- [54] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew Chem Int Edit* **1986**, *25*, 360-362.
- [55] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629-631.
- [56] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366-369.
- [57] M. Pudelko, A. Lindgren, T. Tengel, C. A. Reis, M. Elofsson, J. Kihlberg, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 713-720.
- [58] S. Ingale, T. Buskas, G. J. Boons, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5785-5788.
- [59] T. Becker, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität **2006**.
- [60] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y. M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688-3692.
- [61] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *Journal of Clinical Oncology* **2003**, *21*, 4292-4298.
- [62] S. F. Slovin, S. J. Keding, G. Ragupathi, *Immunol Cell Biol* **2005**, *83*, 418-428.
- [63] P. Hoffmann, K. H. Wiesmuller, J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1989**, *370*, 575-582.
- [64] W. G. Bessler, M. Cox, A. Lex, B. Suhr, K. H. Wiesmuller, G. Jung, *J. Immunol.* **1985**, *135*, 1900-1905.
- [65] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K. H. Wiesmuller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494-2499.
- [66] S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G. J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455-463.
- [67] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1673-1677.
- [68] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7555.
- [69] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688-7692.

- [70] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977-9981.
- [71] T. Eisele, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann-Recl* **1997**, 1303-1313.
- [72] E. Bousquet, A. Spadaro, M. S. Pappalardo, R. Bernardini, R. Romeo, L. Panza, G. Ronsisvalle, *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 527-541.
- [73] J. R. Rich, D. R. Bundle, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 897-900.
- [74] C. H. Rohrig, M. Takhi, R. R. Schmidt, *Synlett* **2001**, 1170-1172.
- [75] F. Peri, L. Cipolla, M. Rescigno, B. La Ferla, F. Nicotra, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 325-328.
- [76] S. Wittrock, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität **2006**.
- [77] D. C. Koester, A. Holkenbrink, D. B. Werz, *Synthesis* **2010**, 3217-3242.
- [78] J. L. Asensio, F. J. Canada, X. H. Chen, N. Khan, D. R. Mootoo, J. Jimenez-Barbero, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1035-1041.
- [79] G. Resnati, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9385-9445.
- [80] J. C. Biffinger, H. W. Kim, S. G. DiMugno, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 622-627.
- [81] P. Jeschke, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 570-589.
- [82] F. Yang, X. J. Zheng, C. X. Huo, Y. Wang, Y. Zhang, X. S. Ye, *Acs Chem Biol* **2011**, *6*, 252-259.
- [83] M. Johannes, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität Mainz **2011**.
- [84] C. Mersch, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität **2010**.
- [85] O. Arjona, A. M. Gomez, J. C. Lopez, J. Plumet, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1919-2036.
- [86] F. M. D. Ismail, *J. Fluorine Chem.* **2002**, *118*, 27-33.
- [87] W. R. Dolbier, *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 157-163.
- [88] K. Dax, M. Albert, D. Hammond, C. Illaszewicz, T. Purkarthofer, M. Tscherner, H. Weber, *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 427-448.
- [89] J. D. Mc Carter, M. J. Adam, C. Braun, M. Namchuk, D. Tull, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 77-90.
- [90] C.-L. Schengrund, P. Kováč, *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 24-28.
- [91] M. D. Burkart, S. P. Vincent, A. Duffels, B. W. Murray, S. V. Ley, C. H. Wong, *Biorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1937-1946.
- [92] T. Diercks, J. P. Ribeiro, F. J. Cañada, S. André, J. Jiménez-Barbero, H.-J. Gabius, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 5666-5668.
- [93] J. Xia, J. Xue, R. D. Locke, E. V. Chandrasekaran, T. Srikrishnan, K. L. Matta, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3696-3706.
- [94] D. D. Marathe, A. Buffone, E. V. Chandrasekaran, J. Xue, R. D. Locke, M. Nasirikenari, J. T. Y. Lau, K. L. Matta, S. Neelamegham, *Blood* **2010**, *115*, 1303-1312.
- [95] T. W. Miller, B. H. Arison, Alberssc.G, *Biotechnol. Bioeng.* **1973**, *15*, 1075-1080.
- [96] T. Mahmud, *Nat Prod Rep* **2003**, *20*, 137-166.
- [97] J. Plumet, A. M. Gomez, J. C. Lopez, *Mini-Rev Org Chem* **2007**, *4*, 201-216.
- [98] B. Junge, F. R. Heiker, J. Kurz, L. Muller, D. D. Schmidt, C. Wunsche, *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 235-268.
- [99] I. Cumpstey, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6257-6259.
- [100] T. Tashiro, R. Nakagawa, T. Hirokawa, S. Inoue, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *Biorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6360-6373.
- [101] T. Tashiro, R. Nakagawa, T. Hirokawa, S. Inoue, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3343-3347.
- [102] S. Wagner, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg Universität **2008**.
- [103] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 47-86.
- [104] T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate Chemistry and Biochemistry 3rd Edition*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [105] H. Paulsen, A. Richter, V. Sinnwell, W. Stenzel, *Carbohydr. Res.* **1978**, *64*, 339-362.
- [106] H. Paulsen, W. Stenzel, *Angew Chem Int Edit* **1975**, *14*, 558-559.
- [107] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [108] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [109] M. Liu, V. G. Young, S. Lohani, D. Live, G. Barany, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1273-1285.
- [110] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.

- [111] H. Kunz, M. Schultz, *Glycopeptides and Related Compounds*, M. Dekker, Inc., New York, **1997**.
- [112] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron-Asymmetr* **1993**, *4*, 1205-1220.
- [113] G. Braun, Johannes Gutenberg Universität Mainz **1991**.
- [114] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525-542.
- [115] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89-107.
- [116] W. Koenigs, E. Knorr, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 957-981.
- [117] J. Banoub, P. Boullanger, D. Lafont, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1167-1195.
- [118] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 985-993.
- [119] G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, *56*, 1705-1710.
- [120] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.
- [121] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *563*, 139-145.
- [122] T. Nukada, A. Berces, M. Z. Zgierski, D. M. Whitfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13291-13295.
- [123] R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv Carbohydr Chem Bi* **1994**, *50*, 21-123.
- [124] N. Bézay, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2000**.
- [125] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 880-885.
- [126] Y. H. Niu, N. Wang, X. P. Cao, X. S. Ye, *Synlett* **2007**, 2116-2120.
- [127] W. A. Szarek, A. Zamojski, K. N. Tiwari, E. R. Ison, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3827-3830.
- [128] U. Gambert, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* **1997**, *299*, 85-89.
- [129] U. Gambert, R. G. Lio, E. Farkas, J. Thiem, V. V. Bencomo, A. Liptak, *Biorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1285-1291.
- [130] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1763-1765.
- [131] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität **2005**.
- [132] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.
- [133] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. I. Lee, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 480-483.
- [134] K. Furuhashi, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chem Pharm Bull* **1991**, *39*, 255-259.
- [135] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17.
- [136] V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1702-1706.
- [137] P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- [138] G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- [139] P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.
- [140] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115-116.
- [141] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, *1990*, 694,696.
- [142] H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, *125*, 47-64.
- [143] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5233-5236.
- [144] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5229-5232.
- [145] S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 1623-1626.
- [146] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4150-4162.
- [147] T. Iimori, H. Takahashi, S. Ikegami, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 649-652.
- [148] O. Moradei, C. Dumortier, A. F. Cirelli, J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 525-532.
- [149] M. Nuchter, B. Ondruschka, W. Lautenschlager, *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 1277-1283.
- [150] J. Kihlberg, T. Frejd, K. Jansson, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1986**, *152*, 113-130.
- [151] T. Ogawa, K. Katano, M. Matsui, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2727-2733.
- [152] S. Marcotte, F. D'Hooge, S. Ramadas, C. Feasson, X. Pannecoucke, J.-C. Quirion, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5879-5882.
- [153] P. Fügedi, A. Lipták, P. Nánási, J. Szejtli, *Carbohydr. Res.* **1982**, *104*, 55-67.
- [154] C.-R. Shie, Z.-H. Tzeng, S. S. Kulkarni, B.-J. Uang, C.-Y. Hsu, S.-C. Hung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1665-1668.

- [155] B. Helferich, *Angew. Chem.* **1928**, *41*, 871-875.
- [156] J.-F. Valdor, W. Mackie, *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 429-440.
- [157] H. Imagawa, T. Tsuchihashi, R. K. Singh, H. Yamamoto, T. Sugihara, M. Nishizawa, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 153-155.
- [158] K. Dax, W. Wolflehner, H. Weidmann, *Carbohydr. Res.* **1978**, *65*, 132-138.
- [159] M. Sharma, C. R. Petrie Iiird, W. Korytnyk, *Carbohydr. Res.* **1988**, *175*, 25-34.
- [160] P. J. Garegg, *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 845-858.
- [161] P. R. Skaanderup, C. S. Poulsen, L. Hyltdoft, M. R. Jorgensen, R. Madsen, *Synthesis* **2002**, 1721-1727.
- [162] K.-S. Ko, C. J. Zea, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13188-13189.
- [163] S. K. Das, J.-M. Mallet, P. Sinay, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 493-496.
- [164] D. Semeria, M. Philippe, J. M. Delaumeny, A. M. Sepulchre, S. D. Gero, *Synthesis* **1983**, 710-713.
- [165] H. Yuasa, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 2190-2195.
- [166] S. Adam, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6589-6592.
- [167] N. G. J. Clayden, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2009**.
- [168] A. S. Machado, D. Dubreuil, J. Cleophax, S. D. Gero, N. F. Thomas, *Carbohydr. Res.* **1992**, *233*, C5-C8.
- [169] H. Takahashi, H. Kittaka, S. Ikegami, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2705-2716.
- [170] M. Sollogoub, J. M. Mallet, P. Sinay, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3471-3472.
- [171] R. C. Hartley, G. J. McKiernan, *J Chem Soc Perk T 1* **2002**, 2763-2793.
- [172] R. C. Hartley, J. F. Li, C. A. Main, G. J. McKiernan, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 4825-4864.
- [173] S. Koch, H. Lowe, H. Kunz, *Synlett* **2011**, 1978-1982.
- [174] H. C. Hansen, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 233-242.
- [175] B. Lüning, T. Norberg, J. Tejbrant, *Glycoconjugate J.* **1989**, *6*, 5-19.
- [176] J. M. Vatele, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10557-10568.
- [177] L. E. Overman, D. J. Ricca, V. D. Tran, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2042-2044.
- [178] A. M. Belostotskii, A. Hassner, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5075-5076.
- [179] H. Paulsen, B. Mielke, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 169-180.
- [180] N. Kornblum, L. Cheng, R. C. Kerber, M. M. Kestner, B. N. Newton, H. W. Pinnick, R. G. Smith, P. A. Wade, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1560-1564.
- [181] K. Baumann, Johannes Gutenberg Universität Mainz **2007**.
- [182] S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 643-663.
- [183] J. Kalikanda, Z. Li, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5207-5218.
- [184] J. C. Lee, Y. S. Jin, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 2769-2774.
- [185] S. K. George, T. Schwientek, B. Holm, C. A. Reis, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11117-11125.
- [186] B. du Roizel, M. Sollogoub, A. J. Pearce, P. Sinay, *Chem. Commun.* **2000**, 1507-1508.
- [187] M. Sollogoub, P. Sinay, *Molecules* **2005**, *10*, 843-858.
- [188] M. Johannes, T. Oberbillig, A. Hoffmann-Roder, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5541-5546.
- [189] R. E. Meléndez, W. D. Lubell, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2581-2616.
- [190] B. Aguilera, A. Fernández-Mayoralas, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2719-2723.
- [191] S. B. Cohen, R. L. Halcomb, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2534-2543.
- [192] C. D. Sun, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7694-7699.
- [193] R. B. Merrifield, *Angew Chem Int Edit* **1985**, *24*, 799-810.
- [194] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [195] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [196] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
- [197] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249.
- [198] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35-42.
- [199] A. J. Mort, D. T. A. Lamport, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
- [200] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64-64.
- [201] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451-454.
- [202] W. F. Degrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295-1300.
- [203] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.

- [204] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4005-4008.
- [205] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [206] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3787-3790.
- [207] J. M. J. Frechet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 3055-3056.
- [208] H. G. Chao, M. S. Bernatowicz, P. D. Reiss, C. E. Klimas, G. R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1746-1752.
- [209] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 315-319.
- [210] F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 355-359.
- [211] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J Chem Soc Chem Comm* **1973**, 610-611.
- [212] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.
- [213] J. Sheehan, P. Cruickshank, G. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525-2528.
- [214] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
- [215] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- [216] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [217] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2279-2282.
- [218] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
- [219] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- [220] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572-574.
- [221] Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thörnqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9689-9692.
- [222] J. Green, O. M. Ogunjobi, R. Ramage, A. S. J. Stewart, S. McCurdy, R. Noble, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4341-4344.
- [223] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2287-2290.
- [224] K. M. Murphy, A. B. Heimberger, D. Y. Loh, *Science* **1990**, 250, 1720-1723.
- [225] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813-826.
- [226] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, *J Paediatr Child H* **2007**, 43, 587-592.
- [227] T. Peters, *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161-245.
- [228] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, 25, 8487-8499.
- [229] S. Kurikka, H. Kayhty, H. Peltola, L. Saarinen, J. Eskola, P. H. Makela, *Pediatrics* **1995**, 95, 815-&.
- [230] R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Kayhty, N. Mbelle, E. Khomo, K. P. Klugman, *Vaccine* **2004**, 23, 802-806.
- [231] D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thipphawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, 13, 104-108.
- [232] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques, Vol. 1. Auflage*, Academic Press, San Diego, **1996**.
- [233] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Biochem. J* **1978**, 173, 723-737.
- [234] T. Buskas, Y. H. Li, G. J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3517-3524.
- [235] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K. H. Glusenka, E. Jahde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1215-1221.
- [236] L. F. Tietze, C. Schroter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlachgraw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 148-153.
- [237] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7624-7630.
- [238] A. Barra, C. Cordonnier, M. P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J. L. Predhomme, *J Infect Dis* **1992**, 166, 1021-1028.
- [239] A. Kaiser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2009**.
- [240] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, 43, 1072-1076.
- [241] N. Gaidzik, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2011**.
- [242] C. Mersch, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität **2011**.
- [243] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals, Vol. 4th*, Elsevier **1996**.
- [244] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.
- [245] G. Szepesi, *Reverse-Phase HPLC*, VCH Weinheim, **1992**.

- [246] Hergestellt von Prof. Dr. E. Schmitt, Institut für Immunologie Johannes Gutenberg Universität Mainz
- [247] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer I.* **1973**, *51*, 1409-1416.
- [248] C. Filser, *Dissertation*, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [249] H. B. M. Brackhagen, C. Vogel, *J. Carbohydrate Chem.* **2001**, *20*, 31-43.
- [250] O. T. Schmitt, *Meth. Carbohydr. Chem.*, **1963**.
- [251] C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Roder, *Synlett* **2009**, 2167-2171.
- [252] B. Doboszewski, G. W. Hay, W. A. Szarek, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 412-419.
- [253] B. Doboszewski, G. W. Hay, W. A. Szarek, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 412-419.
- [254] R. U. Lemieux, R. Cromer, U. Spohr, *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 3083-3098.
- [255] P. W. Kent, J. R. Wright, *Carbohydr. Res.* **1972**, *22*, 193-200.
- [256] S. Wagner, C. Mersch, A. Hoffmann-Roder, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7319-7330.
- [257] L. Kisfaludy, I. Schon, *Synthesis* **1983**, 325-327.
- [258] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751-769.
- [259] D. M. Rothman, M. E. Vazquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6795-6798.
- [260] G. Braum, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität **1991**.
- [261] R. Kumar, P. Tiwari, P. R. Maulik, A. K. Misra, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2335-2339.
- [262] J. Habermann, Johannes-Gutenberg-Universität **1998**.
- [263] R. Pfau, *Dissertation*, Johannes-Gutenberg-Universität **2001**.
- [264] Z. Zhang, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, *295*, 41-55.
- [265] G. J. L. Bernardes, E. J. Grayson, S. Thompson, J. M. Chalker, J. C. Errey, F. El Oualid, T. D. W. Claridge, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2244-2247.
- [266] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129 - 132.
- [267] O. Varela, G. M. de Fina, R. M. de Lederkremer, *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 187-196.
- [268] Y. Saito, T. Watanabe, H. Hashimoto, J. Yoshimura, *Carbohydr. Res.* **1987**, *169*, 171-188.
- [269] S. Dziadek, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2005**.
- [270] T. Becker, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2006**.
- [271] N. Sugiyama, K. Sugai, N. Yamada, M. Goto, C. Ban, K. Furuhata, H. Takayanagi, H. Ogura, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1147-1152.
- [272] C. Shimizu, K. Ikeda, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1772-1778.
- [273] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35-42.
- [274] S. Keil, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2000**.
- [275] V. Smirnyagin, C. T. Bishop, *Can. J. Chem.* **1968**, *46*, 3085-3090.
- [276] M. M. Abdel-Malik, Q.-J. Peng, A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.* **1987**, *159*, 11-23.
- [277] A. Sadeghi-Khomami, T. J. Forcada, C. Wilson, D. A. R. Sanders, N. R. Thomas, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1596-1602.
- [278] D. J. Chambers, G. R. Evans, A. J. Fairbanks, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7184-7192.
- [279] K. Yamamoto, Y. Sato, A. Ishimori, K. Miyairi, T. Okuno, N. Nemoto, H. Shimizu, S. Kidokoro, M. Hashimoto, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2008**, *72*, 2039-2048.
- [280] G. Barone, E. Bedini, A. Iadonisi, E. Manzo, M. Parrilli, *Synlett* **2002**, 1645-1648.
- [281] R. Gigg, C. D. Warren, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1965**, 2205-2210.
- [282] K. Dax, W. Wolflehner, H. Weidmann, *Carbohydr. Res.* **1978**, *65*, 132-138.
- [283] J. Desire, J. Prandi, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3075-3084.
- [284] Z. Wang, L. Y. Zhou, K. El-Boubbou, X. S. Ye, X. F. Huang, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6409-6420.
- [285] T. Ooi, M. Kameda, M. Taniguchi, K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9685-9694.
- [286] S. Dziadek, S. Jacques, D. R. Bundle, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5908-5917.
- [287] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 1355-1369.

Spektrenanhang

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactosylbromid (**6**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluoralactal (**7**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy 6-fluor- α -D-galactopyranosyl)-L-Threonin-*tert*butylester (**14**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-Threonin-*tert*-butylester (**21**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-desoxy-6-fluor-3-*O*-[6-desoxy-6-fluor,2,3,4,-tri-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-Threonin-*tert*-butylester (**17**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-6-desoxy-6-fluoralacto-pyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**34**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy -6-fluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-Threonin-*tert*-butylester (**44**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl]-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-

4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-Threonin-*tert*-butylester (**48**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

2,3,4-Tri-*O*-benzyl-5-hydroxy-cyclohexanone (**63**)

^1H , ^{13}C

tert-Butyldimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**68**)

^1H , ^{13}C

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**71**)

^1H , ^{13}C

6-Desoxy-6-fluor-2,3,4-tri-*O*-benzyl-carba- α -D-galactopyranose (**73**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F

4-Methylphenyl-2-azido-2-desoxy-4,6-benzyliden-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-carba- β -D-galactopyranosyl)-1-thio- α -D-galactopyranose (**77**)

^1H , ^{13}C

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-6-deoxy-6-fluorgalactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**106**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HMQC

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**107**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HMQC

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**108**)

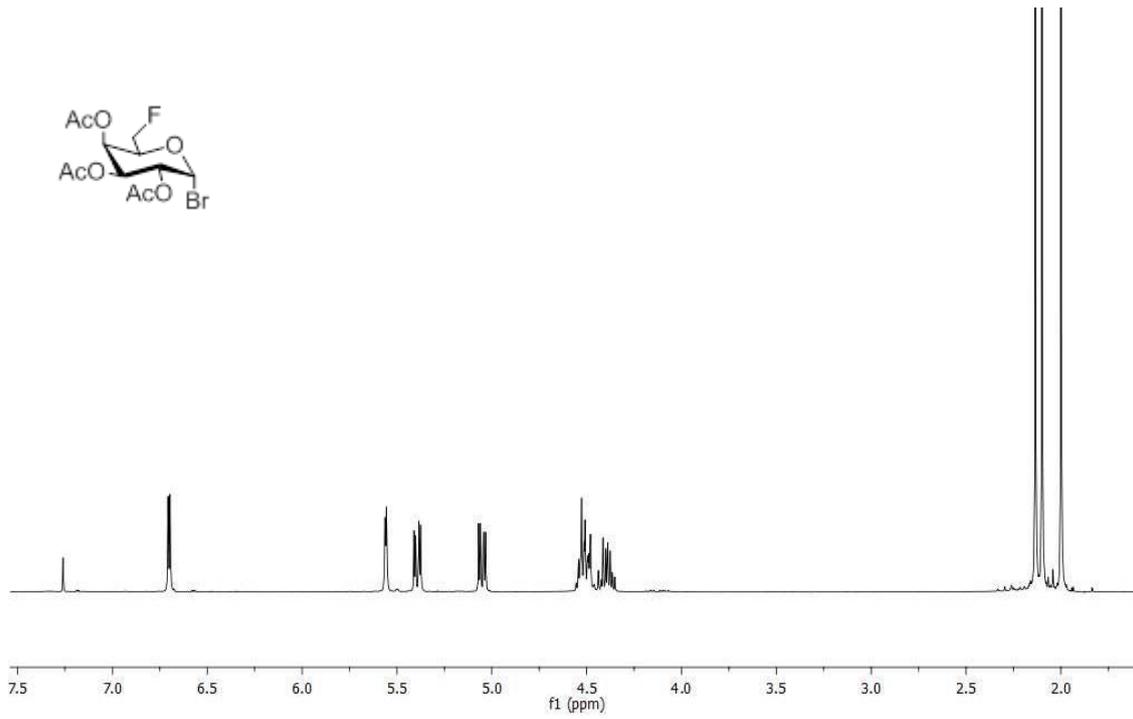
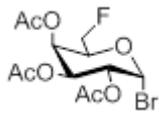
¹H, ¹³C, ¹⁹F, COSY, HMQC

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2,6-deoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**109**)

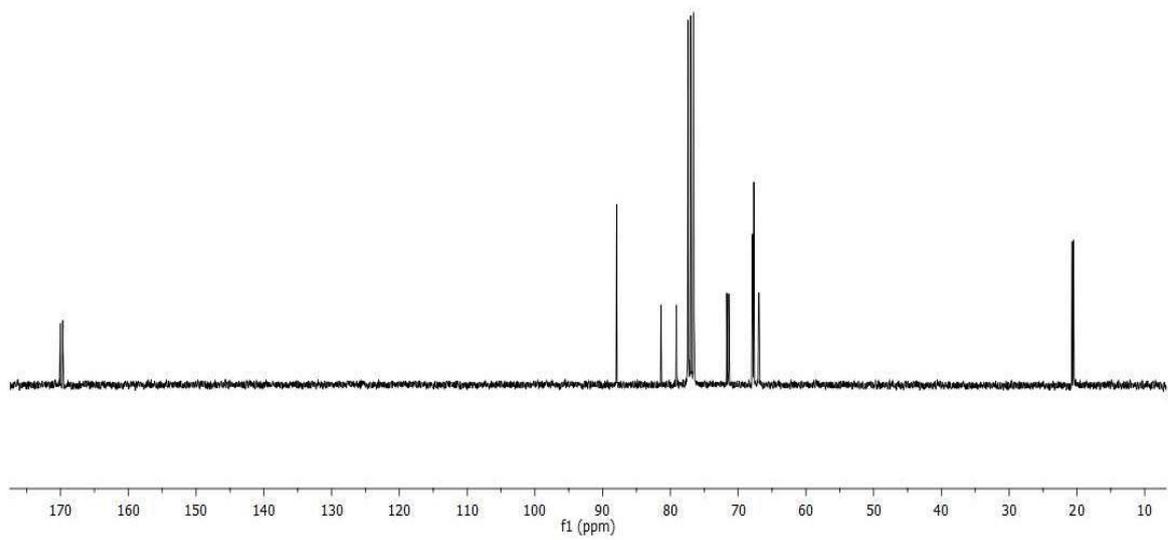
¹H, ¹³C, ¹⁹F, COSY, HMQC

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-deoxy-3-*O*-[6-deoxy-6-fluoro- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[(5-acetamido--3,5-dideoxy- α -Dglycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**112**)

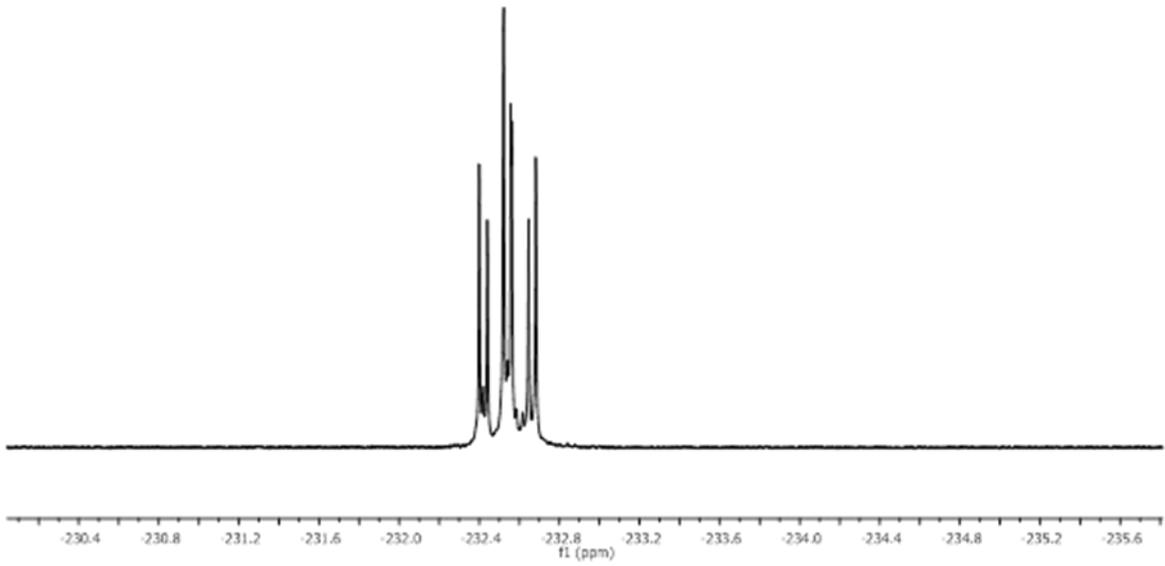
¹H, ¹³C, ¹⁹F, COSY, HMQC



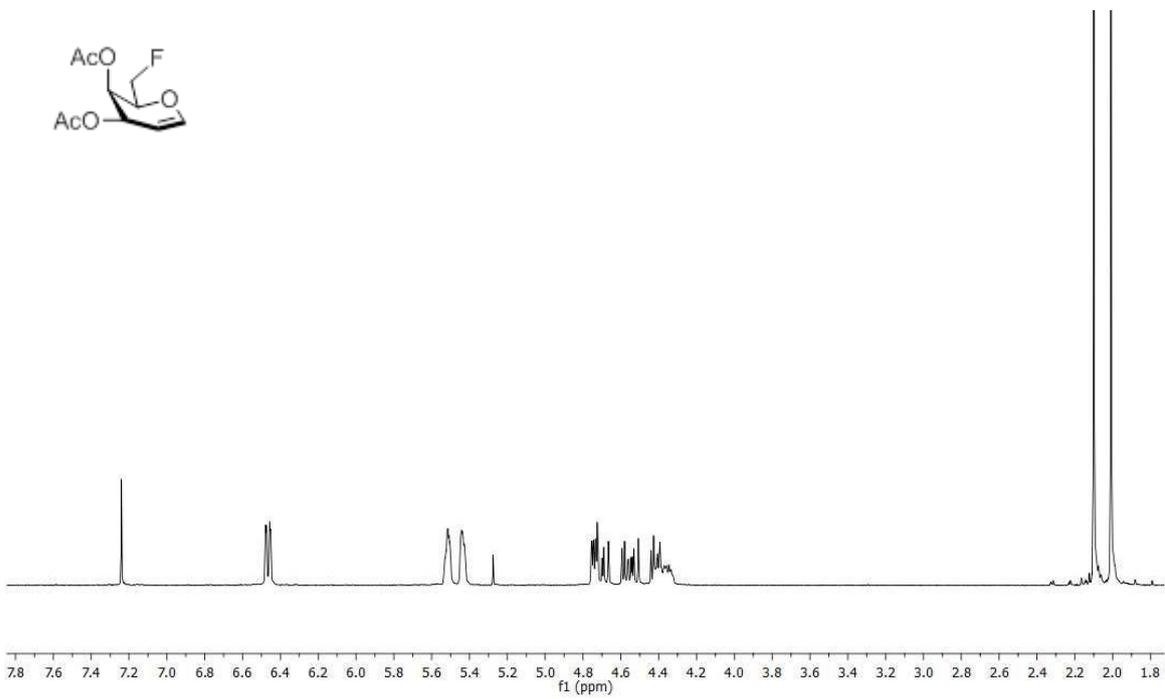
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



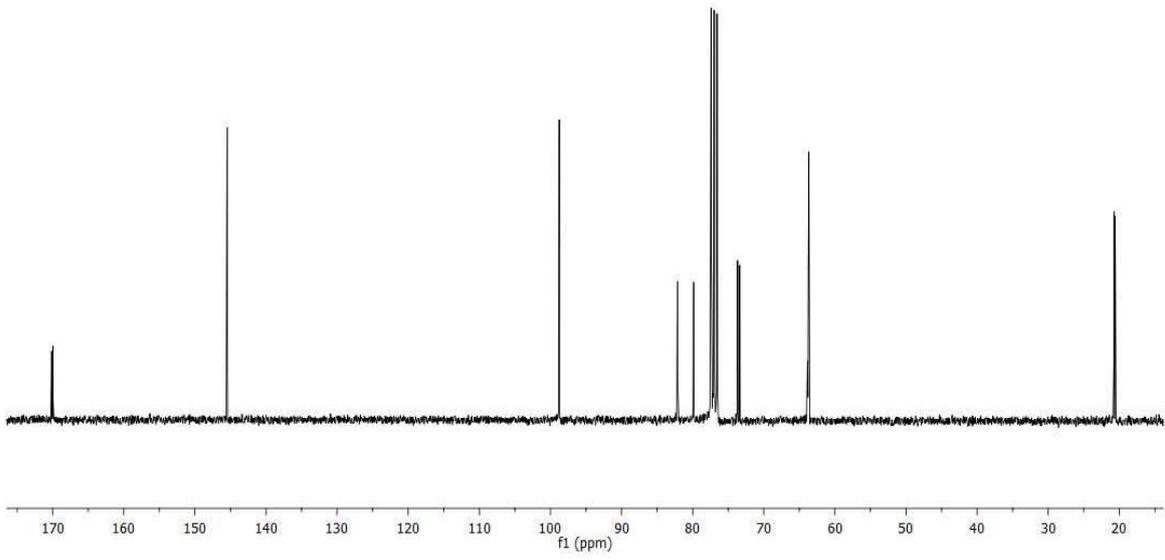
$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



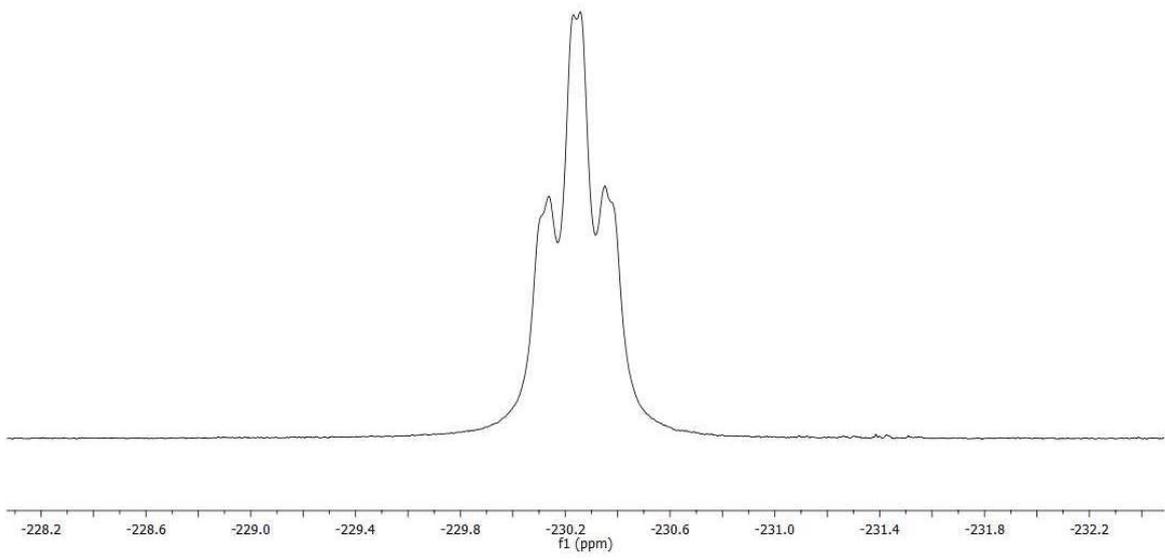
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



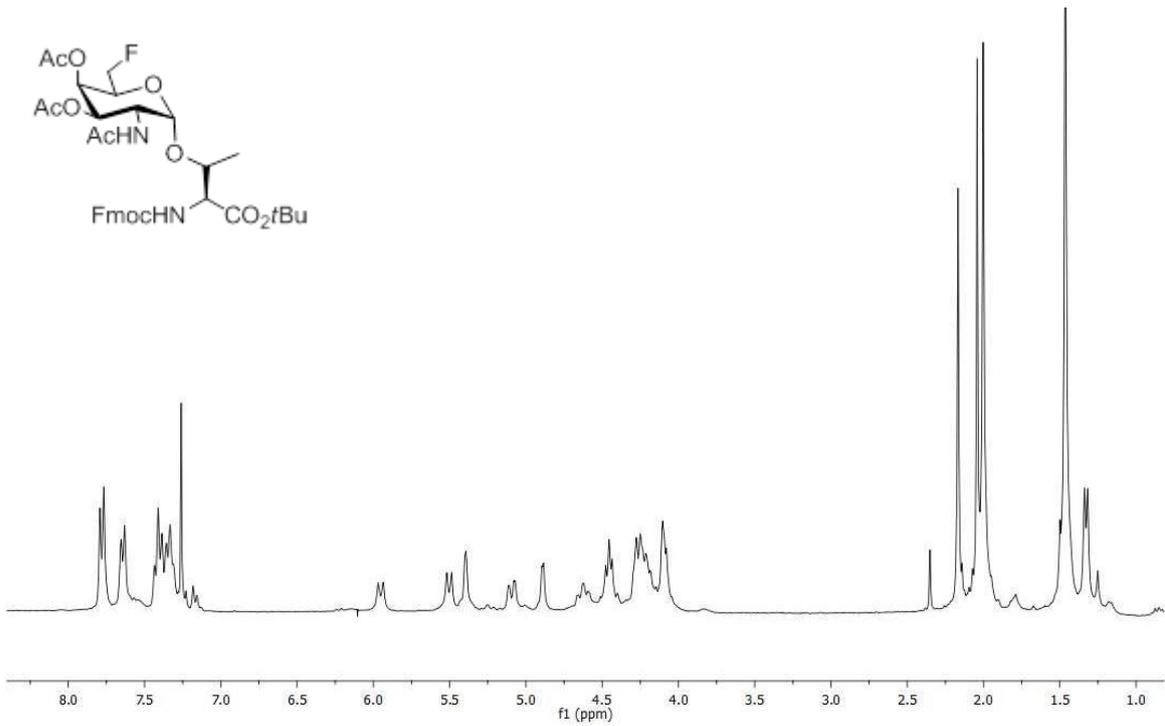
^1H -NMR- Spektrum (300 MHz, CDCl_3)



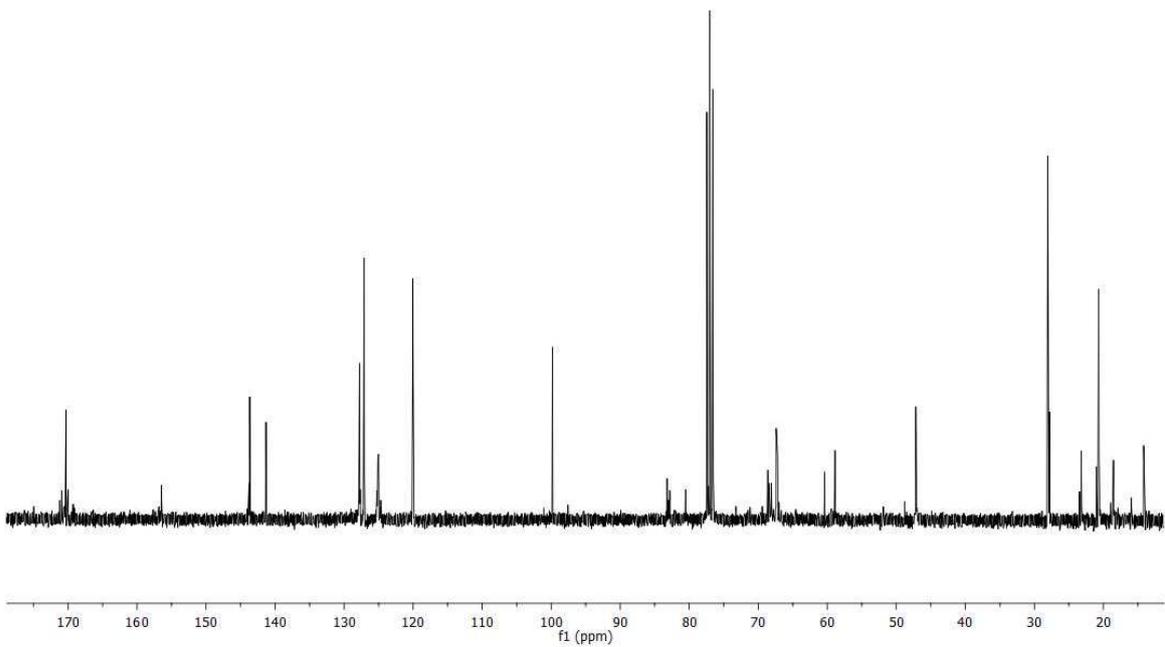
^{13}C -NMR- Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



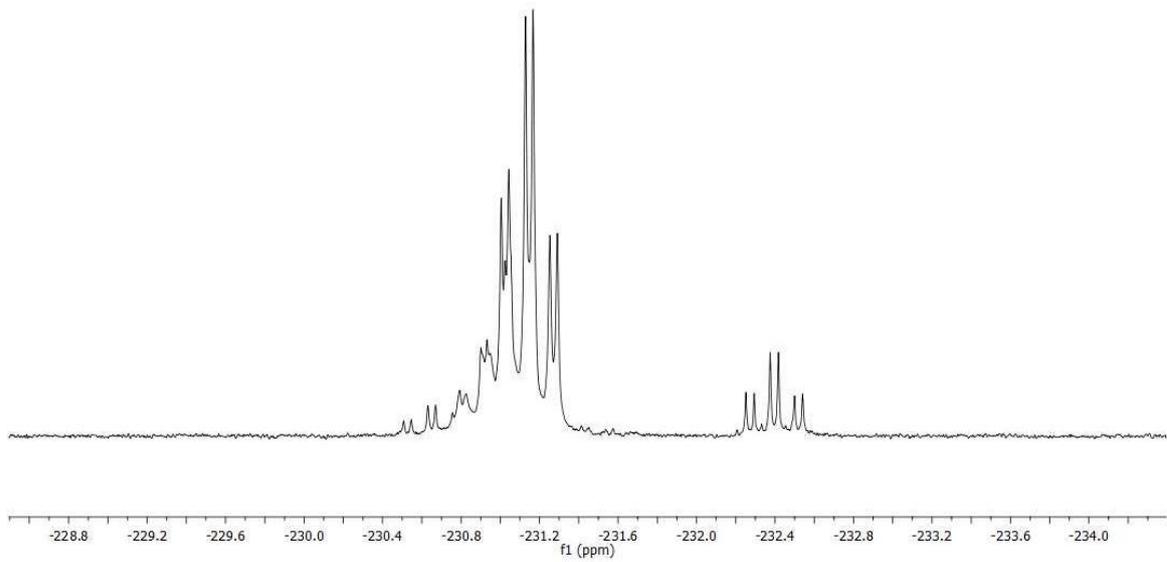
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



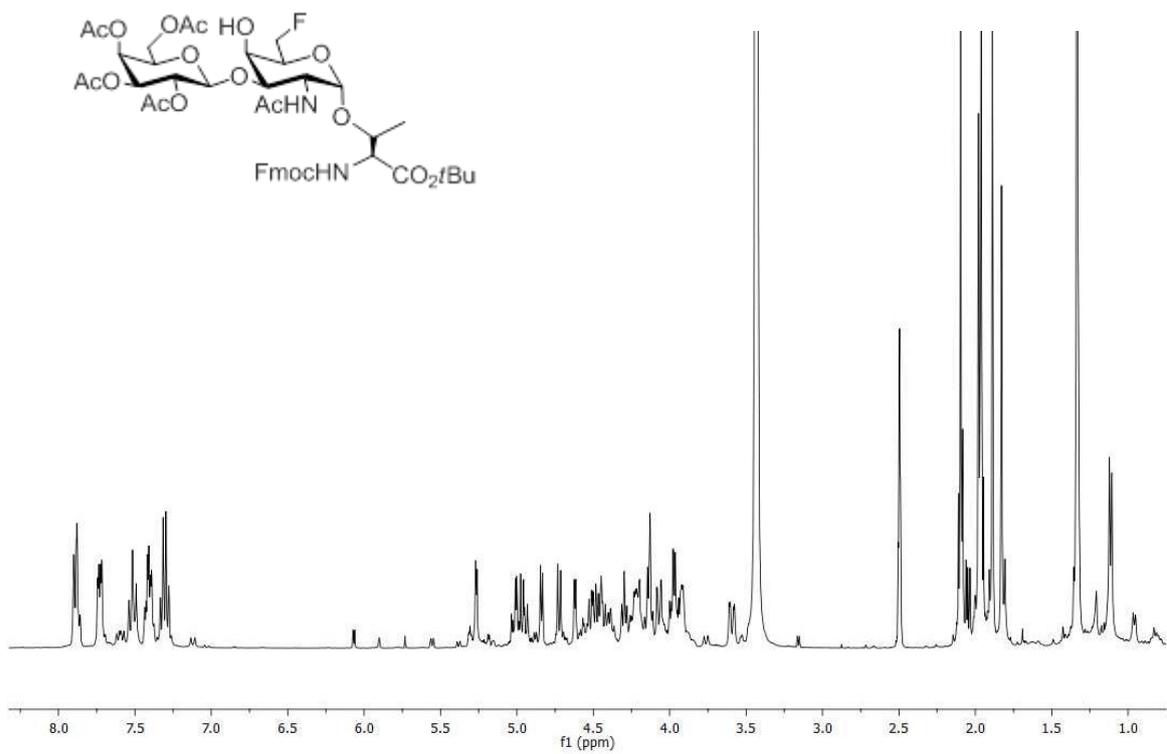
¹H-NMR- Spektrum (300 MHz, CDCl₃)



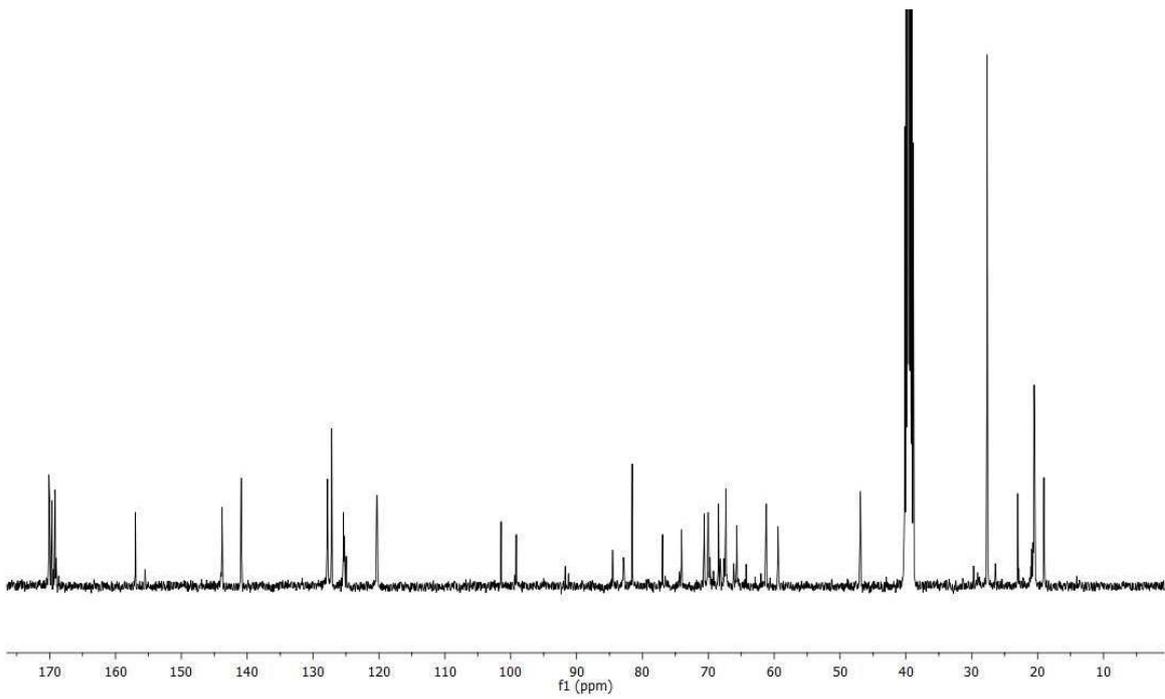
¹³C-NMR- Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)



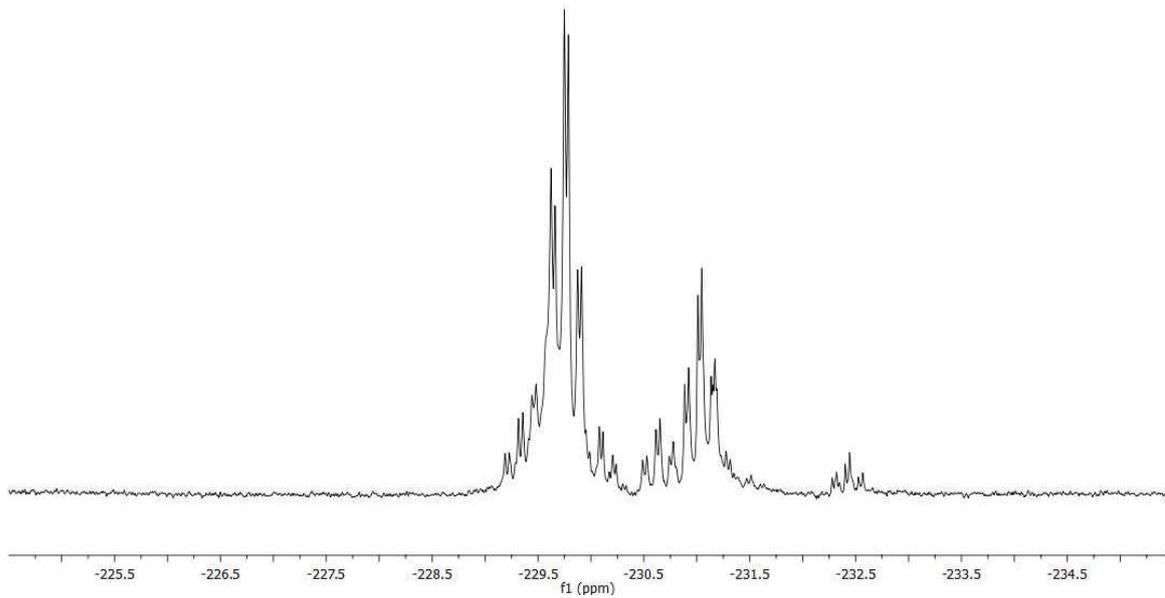
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



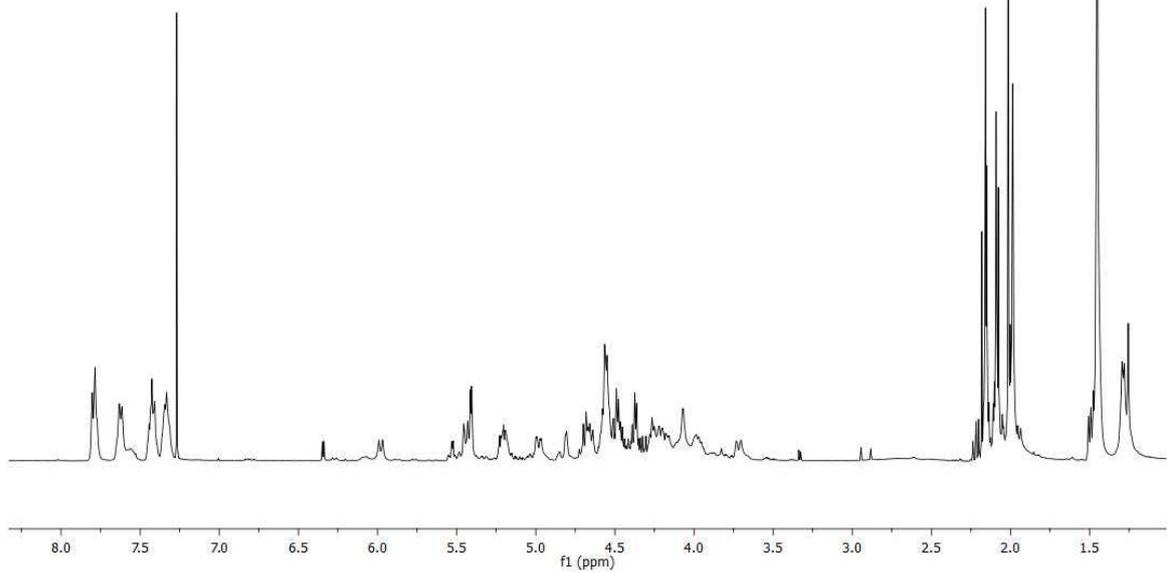
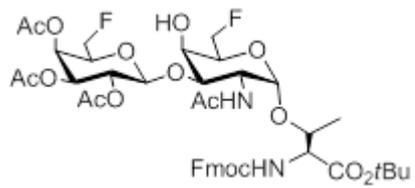
^1H -NMR- Spektrum (400 MHz, $d\text{-DMSO}$)



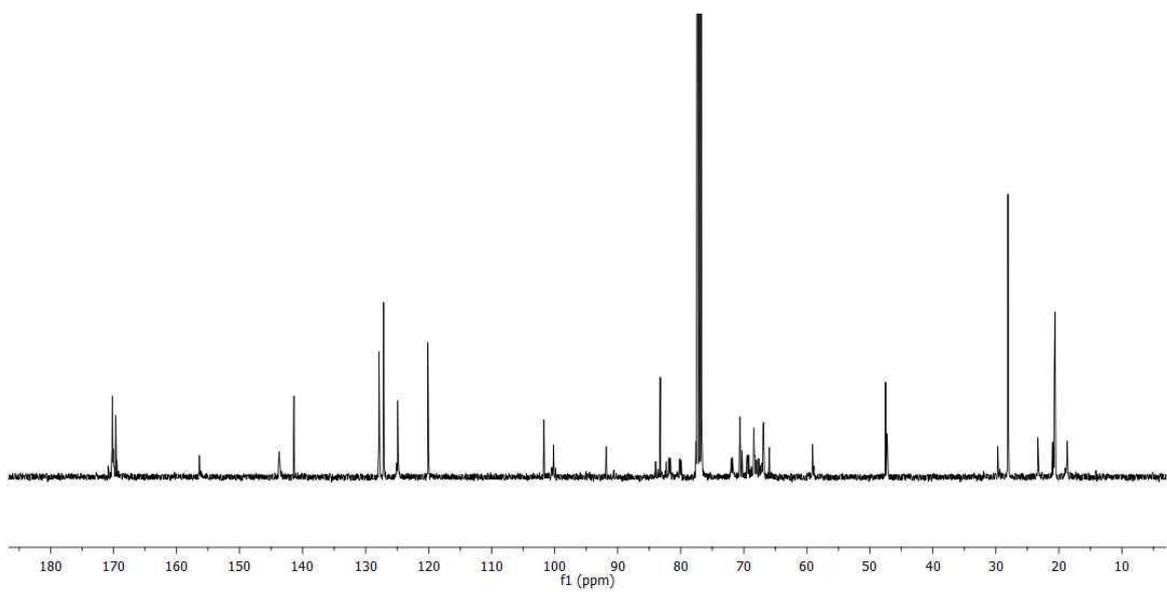
^{13}C -NMR- Spektrum (100.6 MHz, *d*-DMSO)



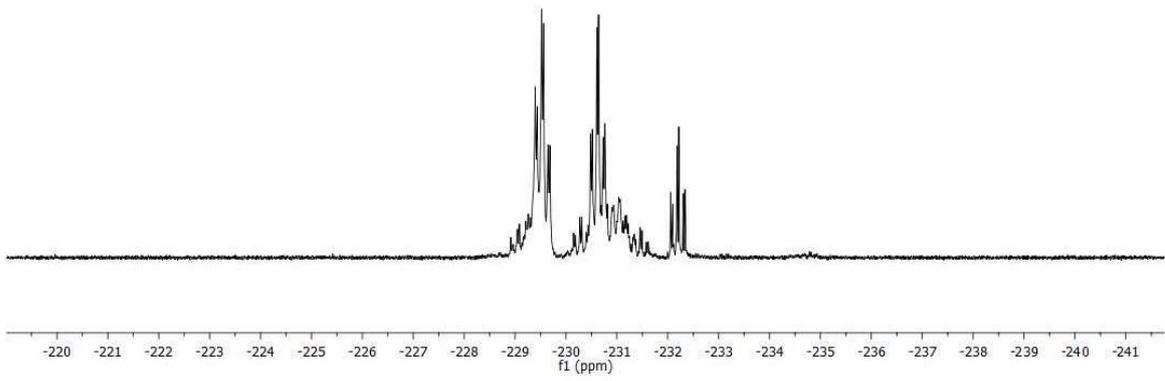
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



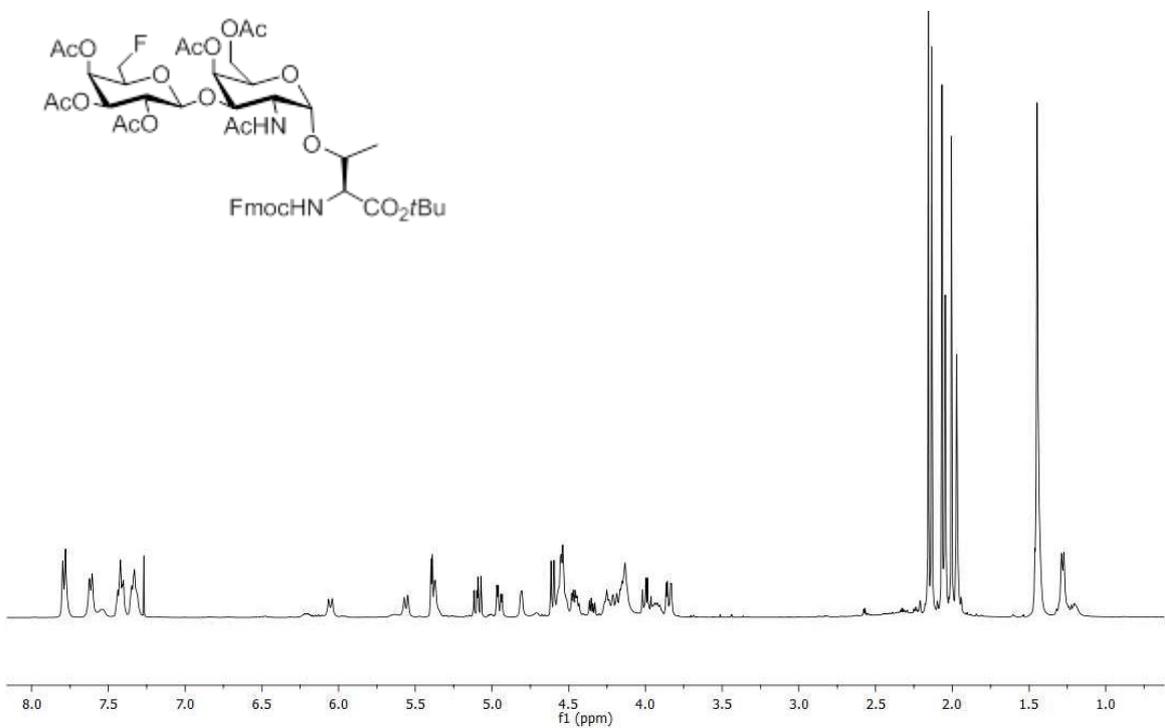
¹H-NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



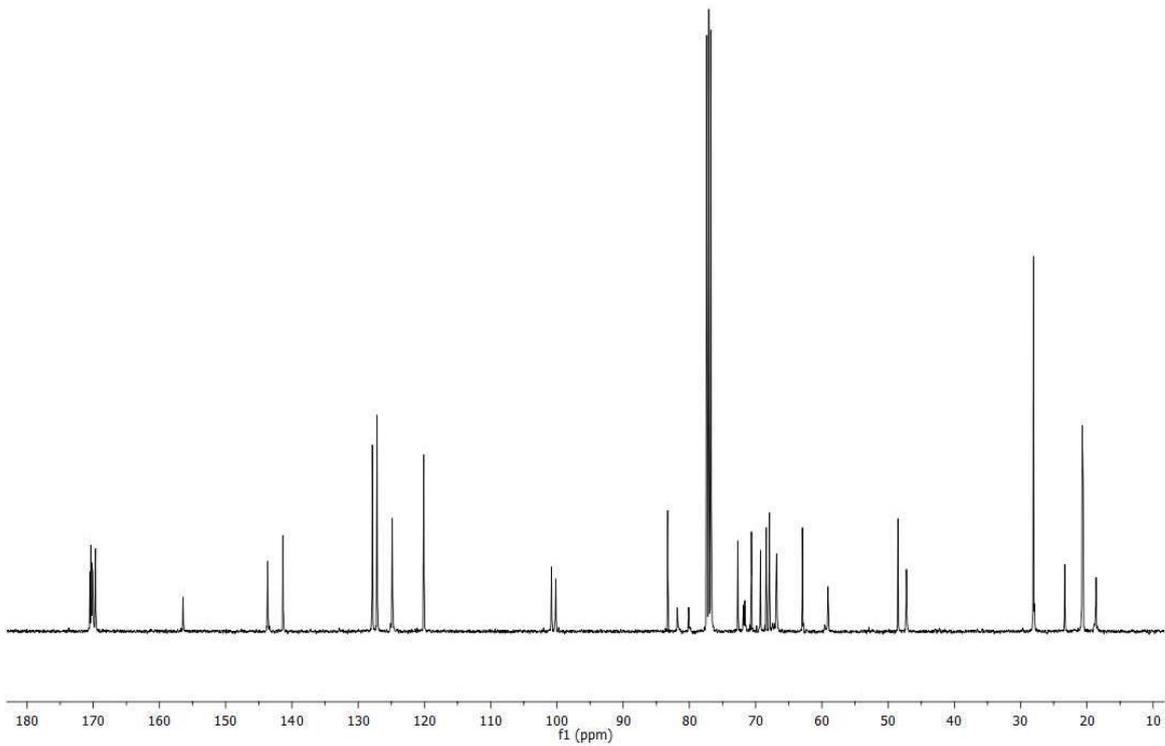
¹³C-NMR- Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)



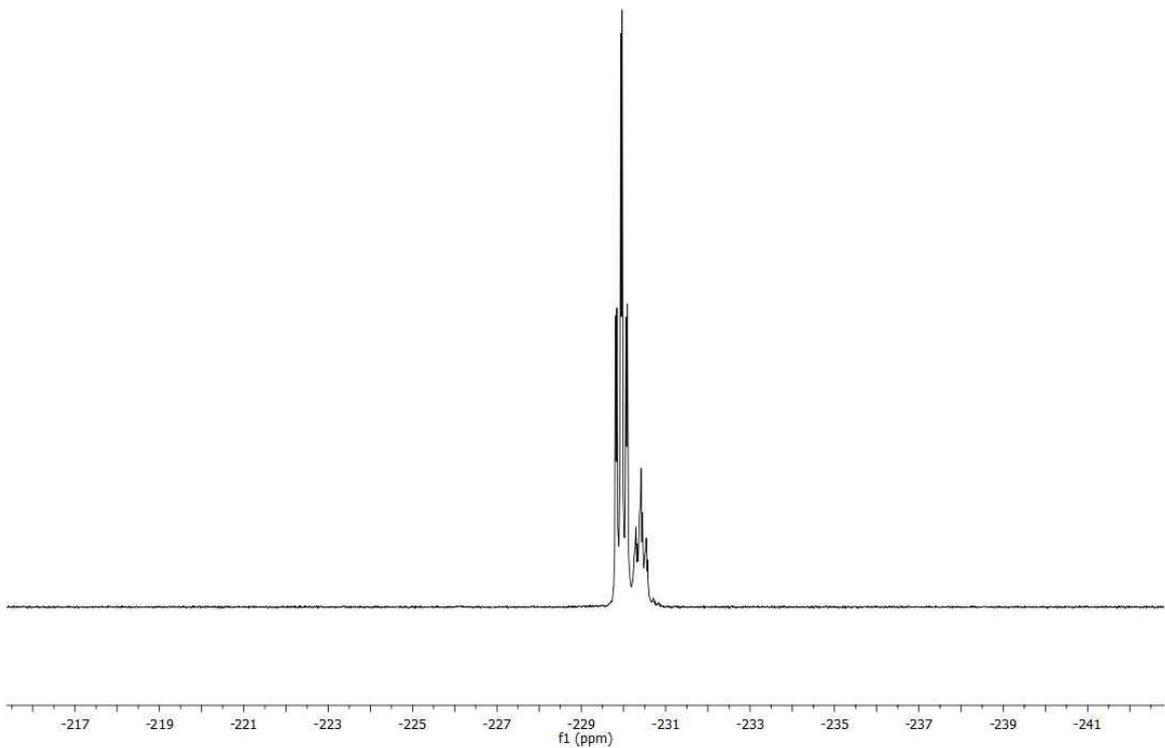
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



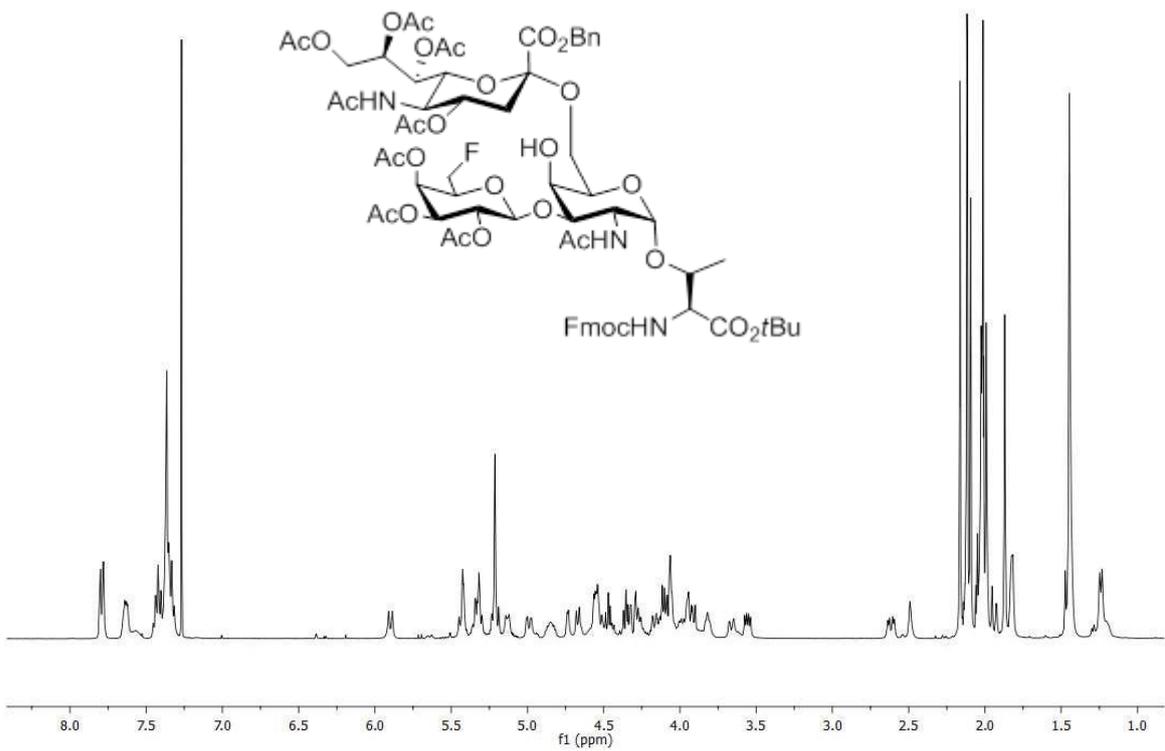
^1H -NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



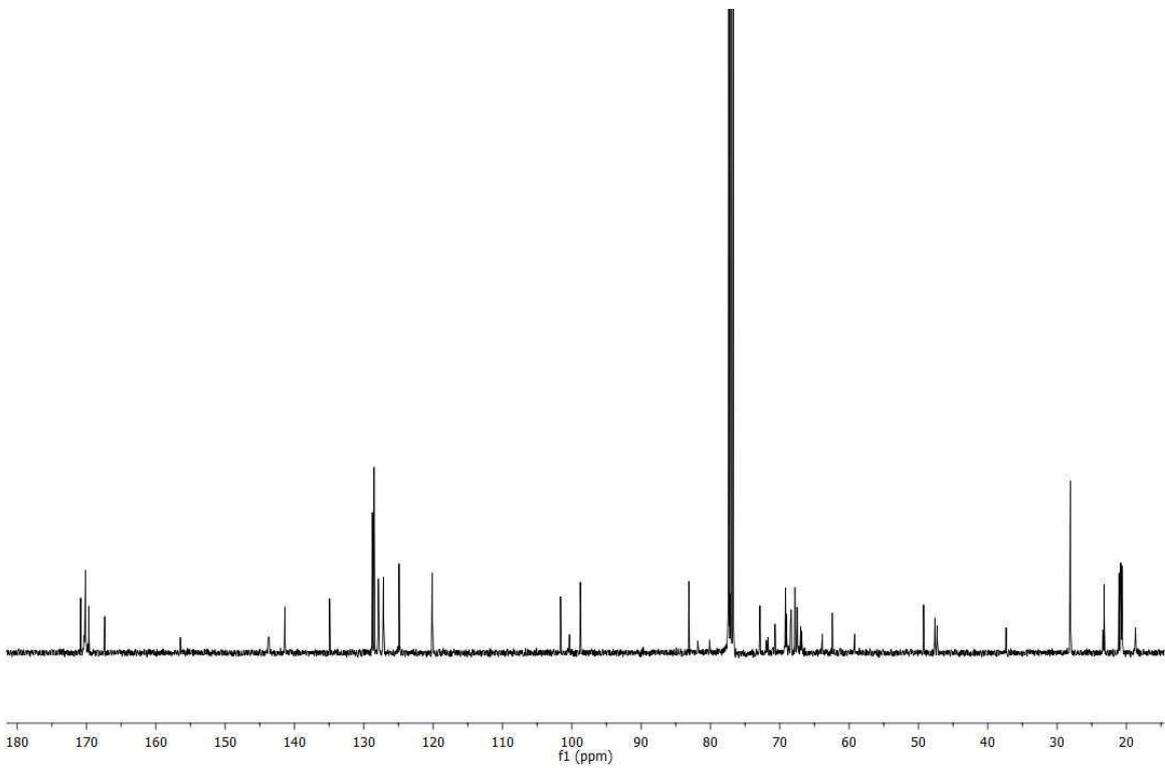
$^{13}\text{C-NMR}$ - Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



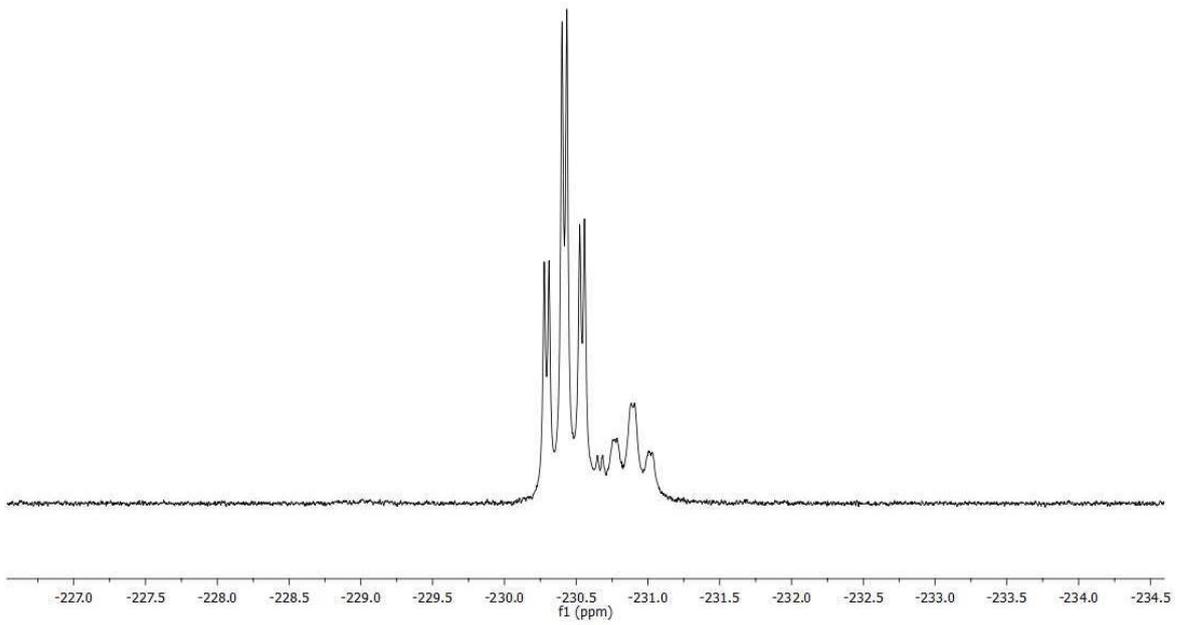
$^{13}\text{F-NMR}$ - Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



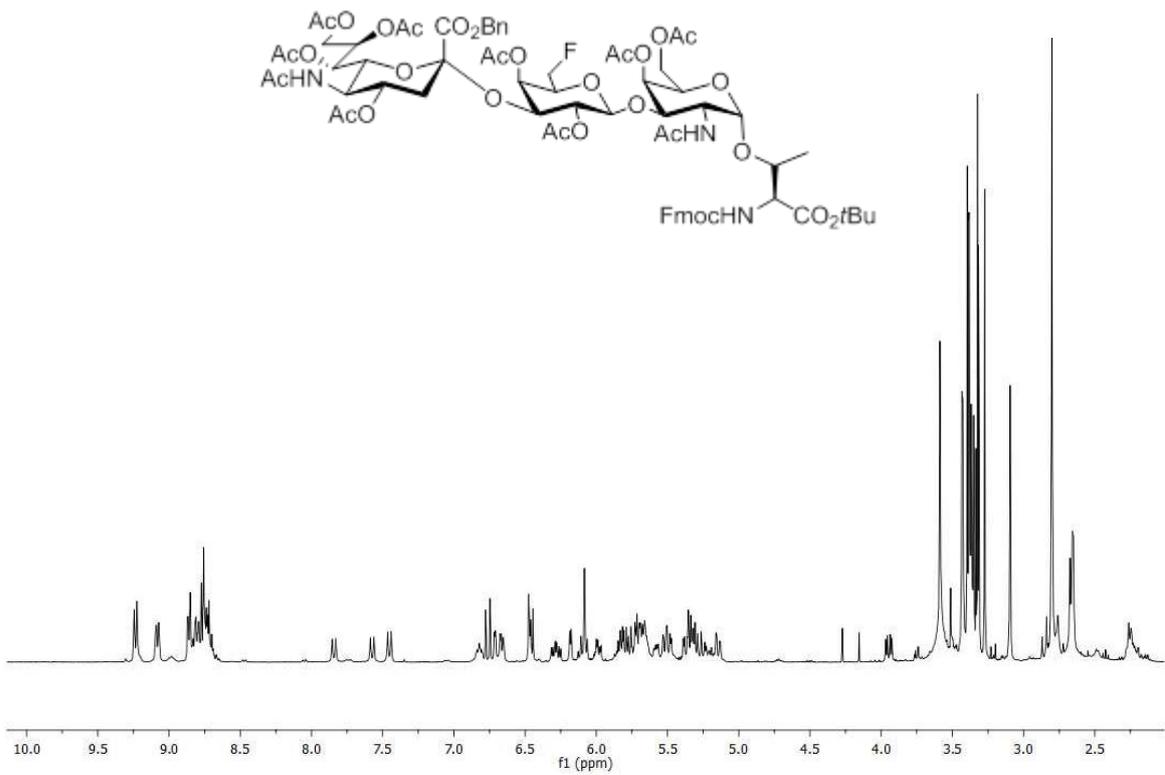
¹H-NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



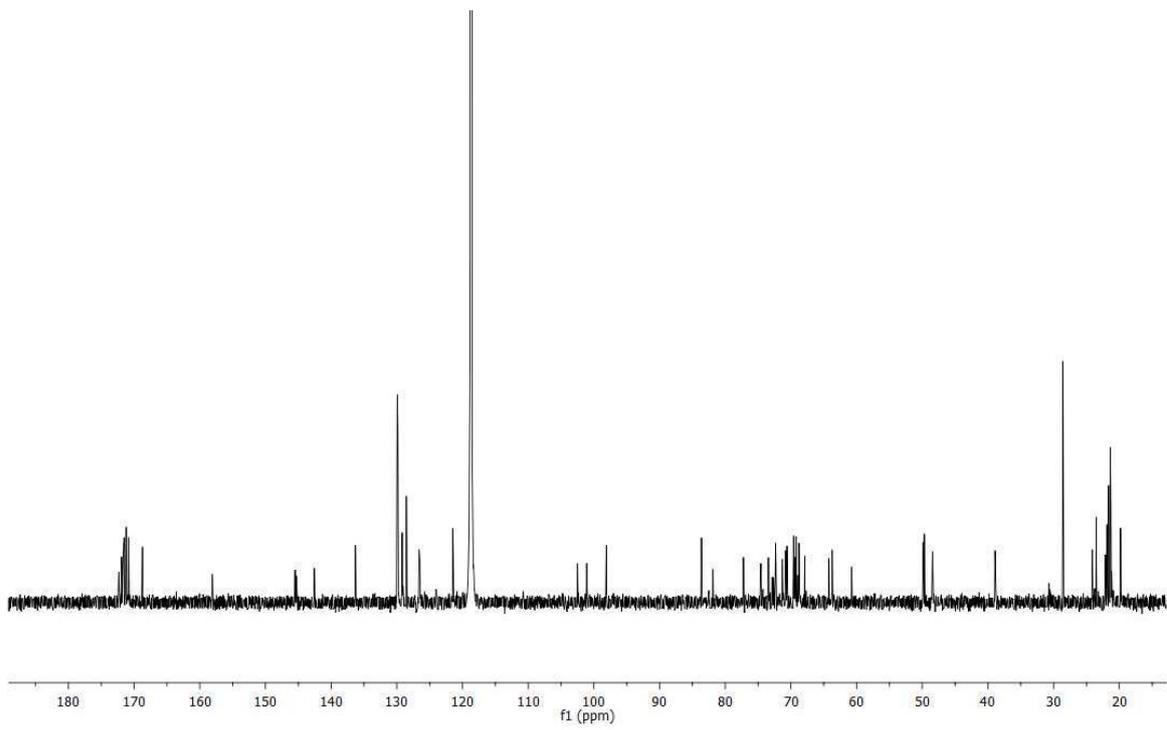
¹³C-NMR- Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)



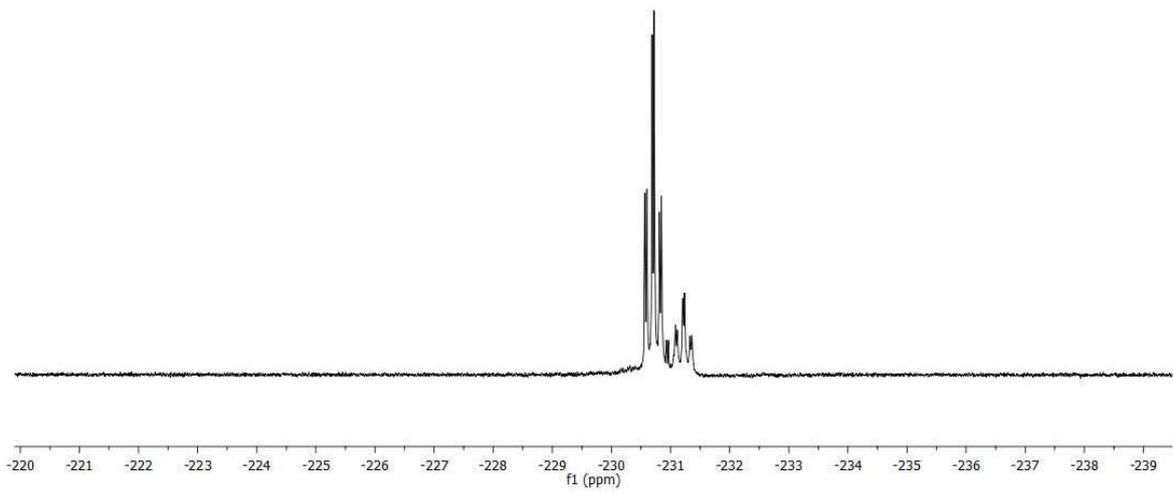
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



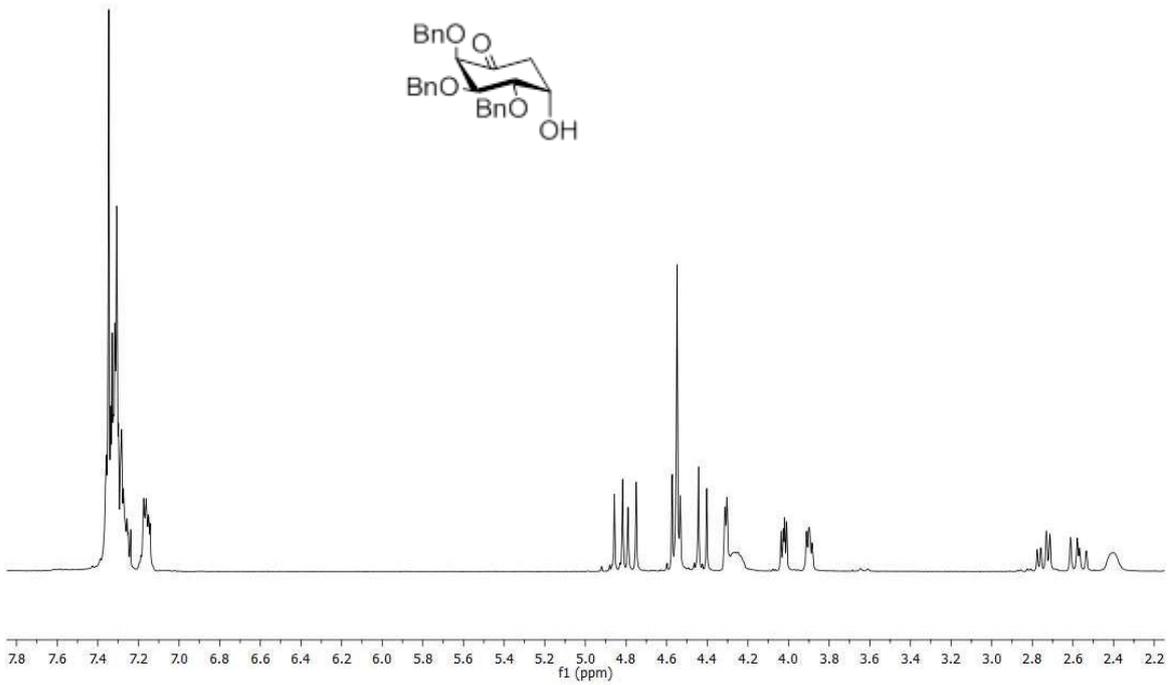
^1H -NMR- Spektrum (400 MHz, *d*-MeCN)



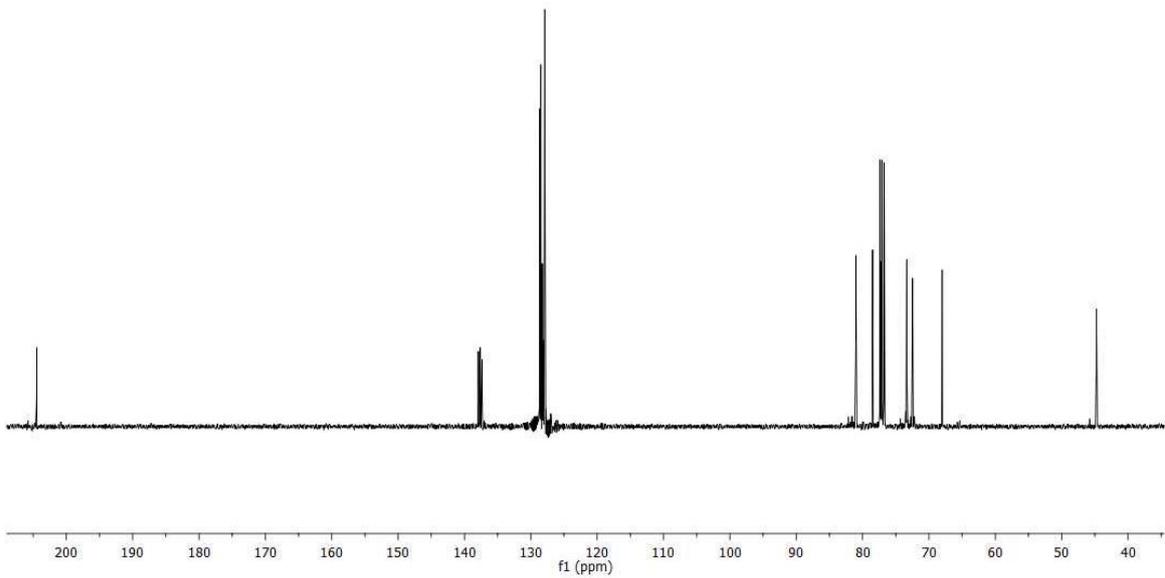
^{13}C -NMR- Spektrum (100.6 MHz, d-MeCN)



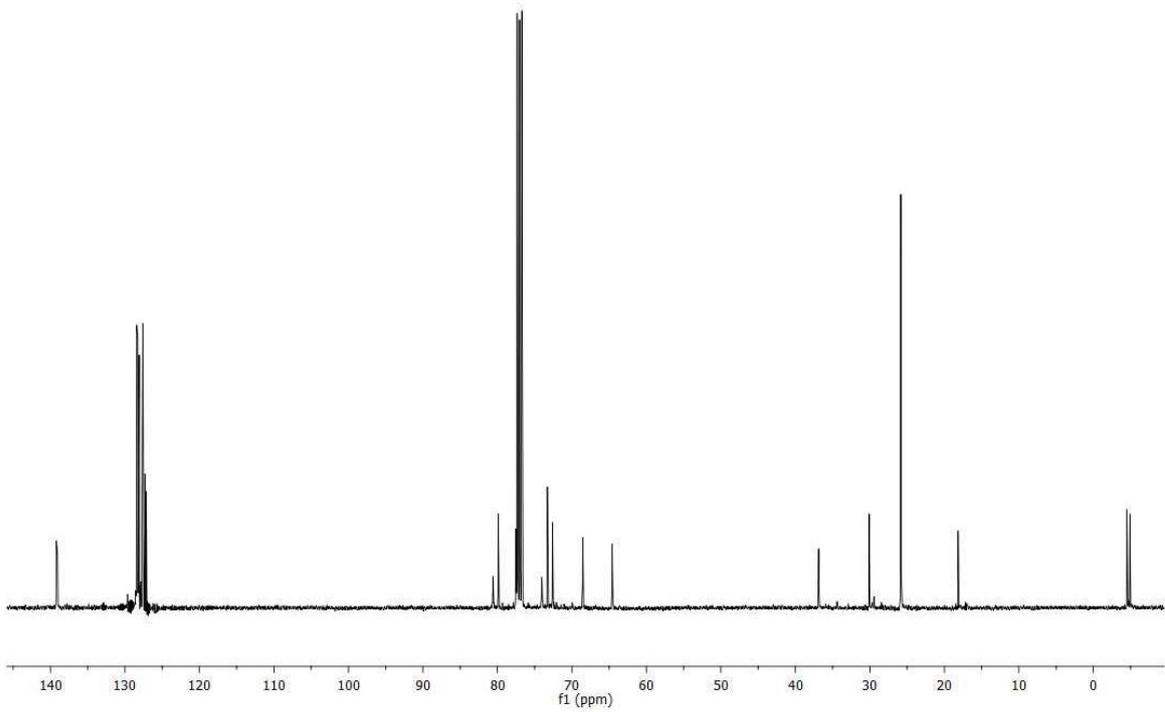
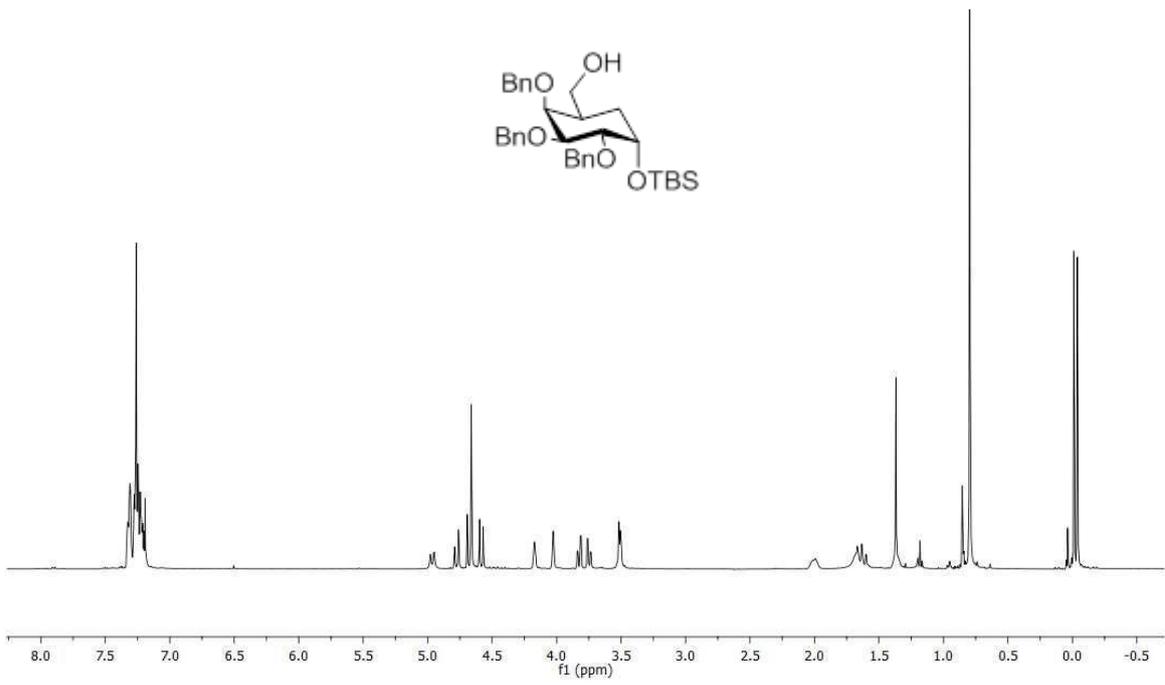
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, d-MeCN)



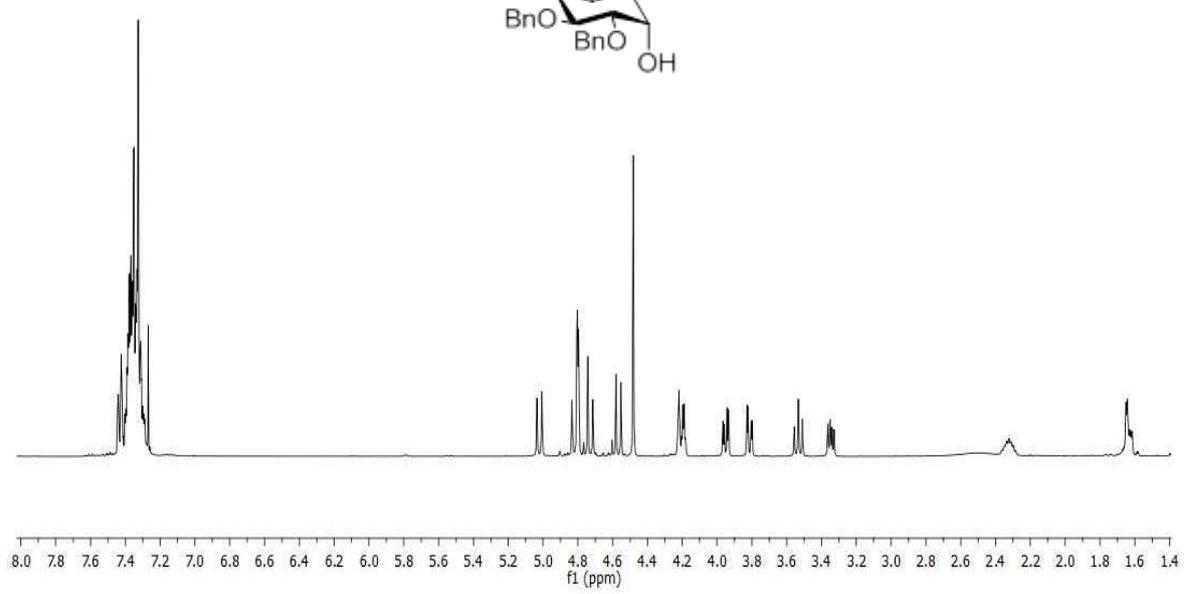
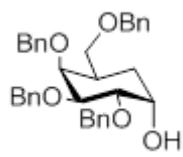
¹H-NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



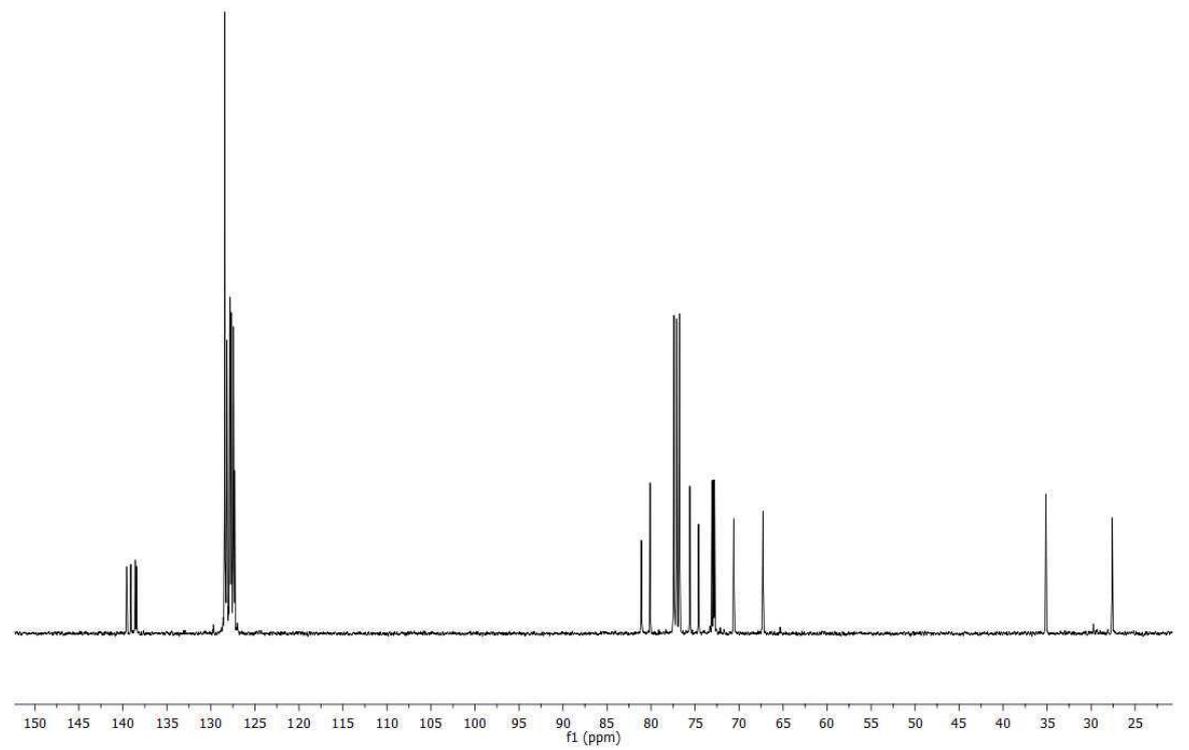
¹³C-NMR- Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)



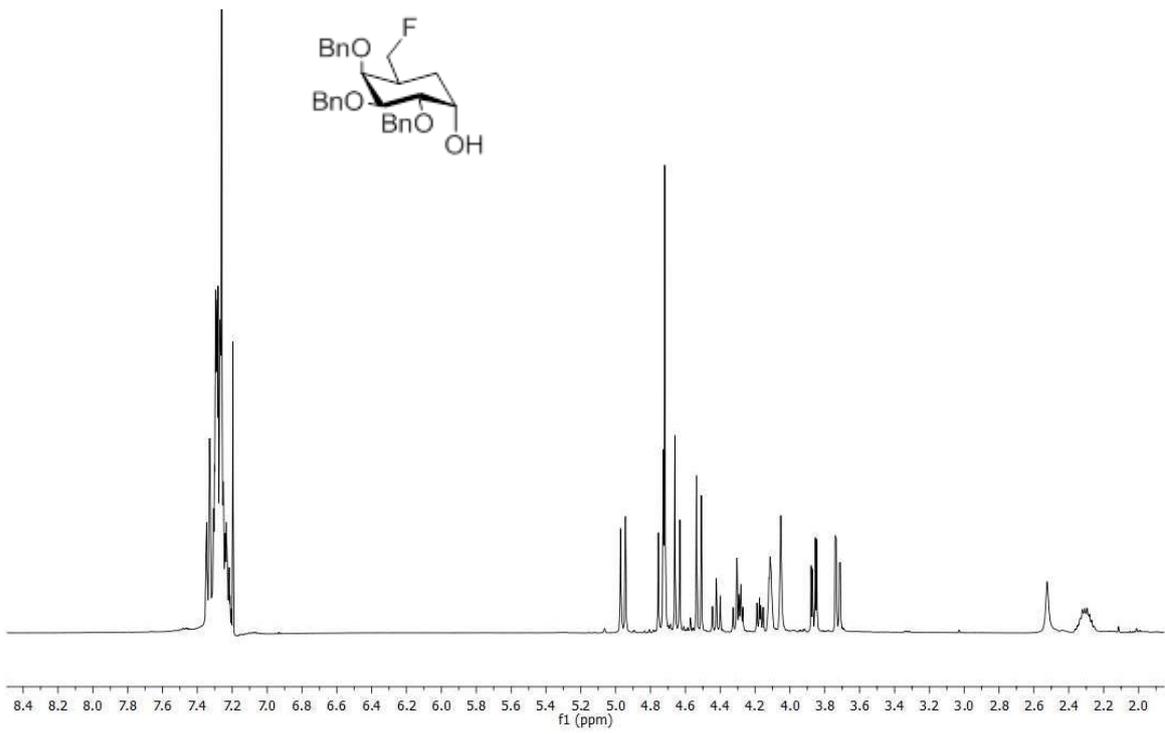
$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



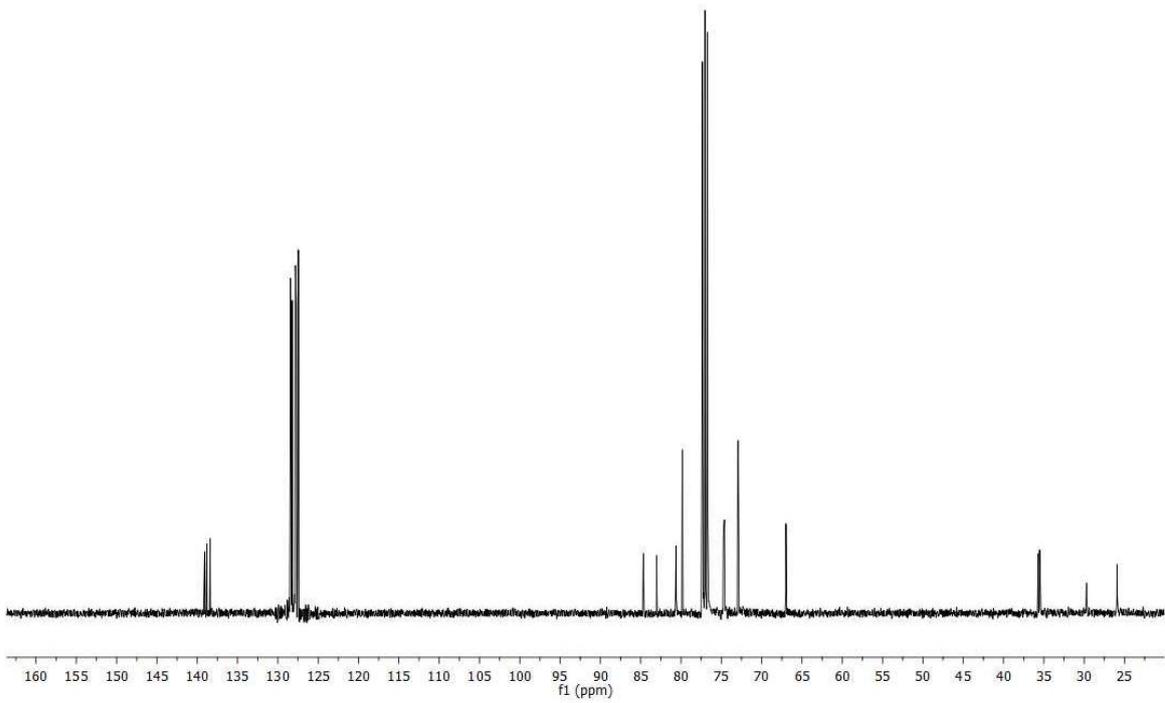
¹H-NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



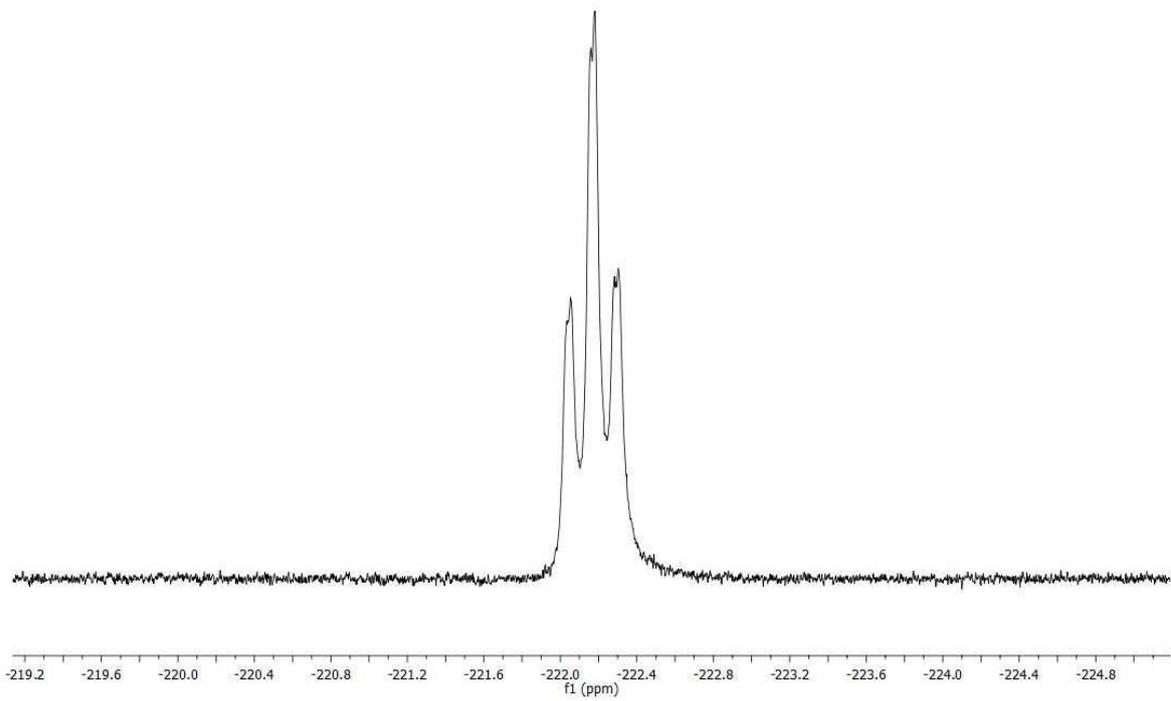
¹³C-NMR- Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)



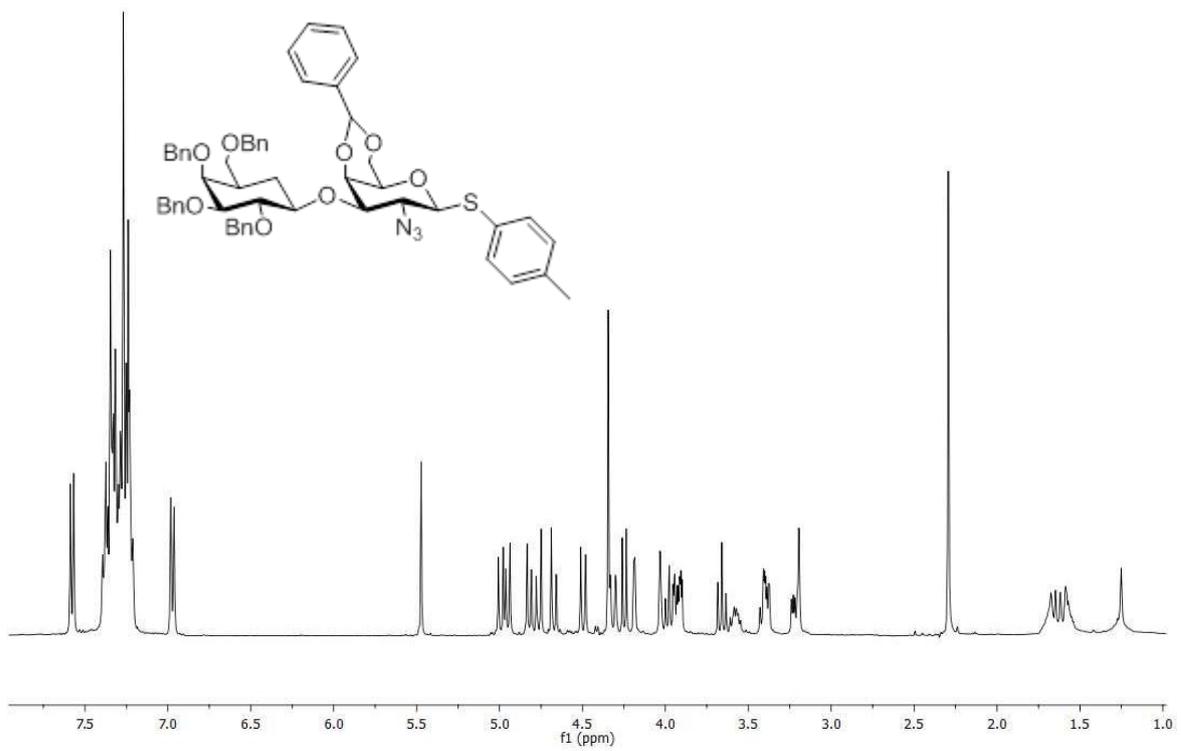
$^1\text{H-NMR}$ - Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



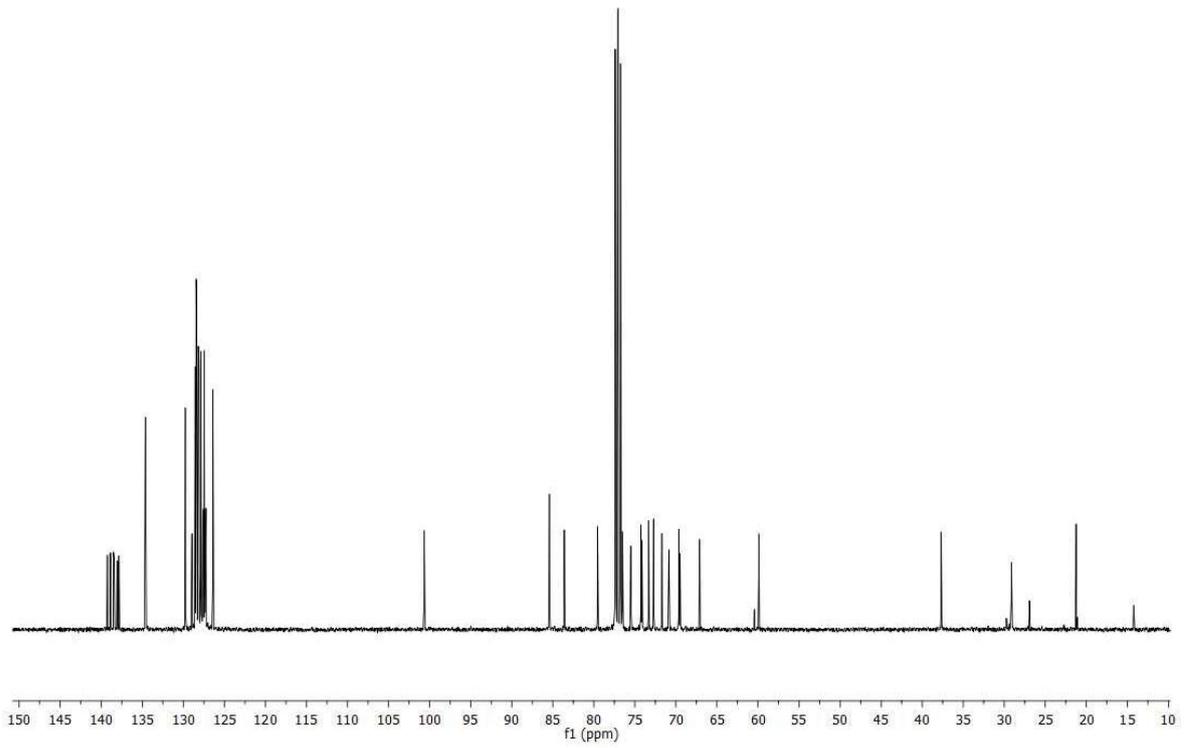
$^{13}\text{C-NMR}$ - Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



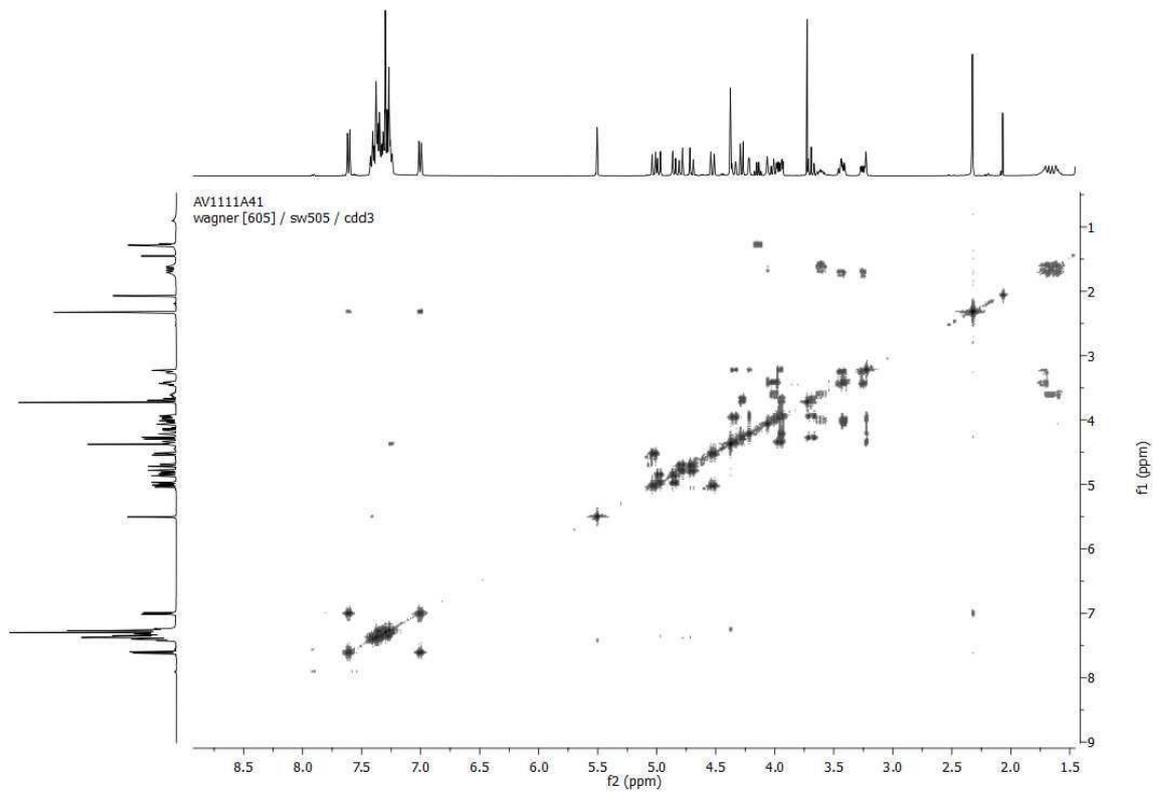
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)



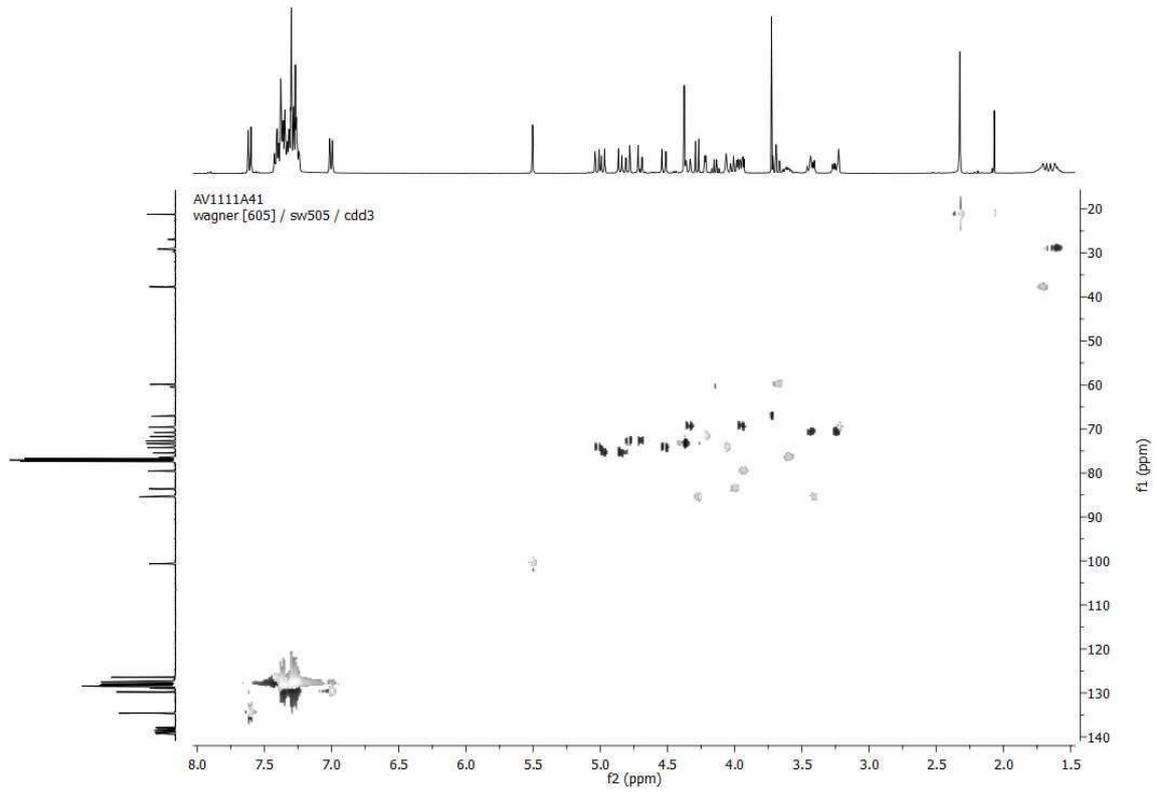
^1H -NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



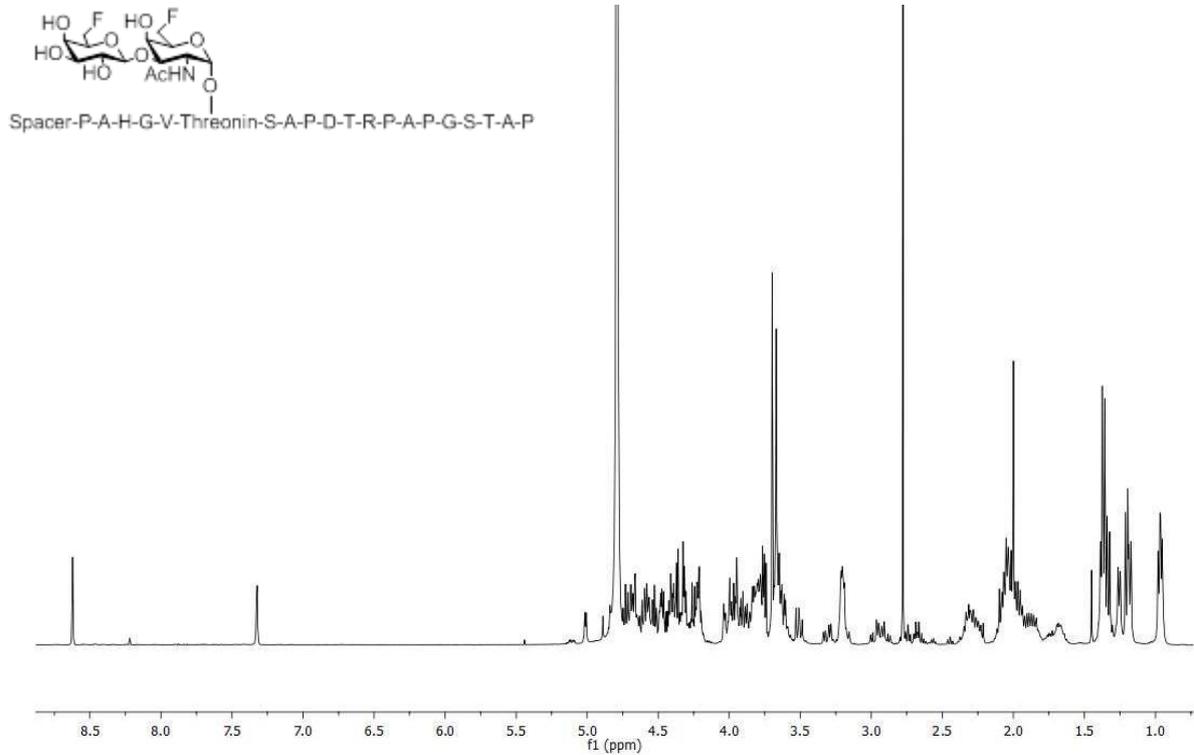
^{13}C -NMR- Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



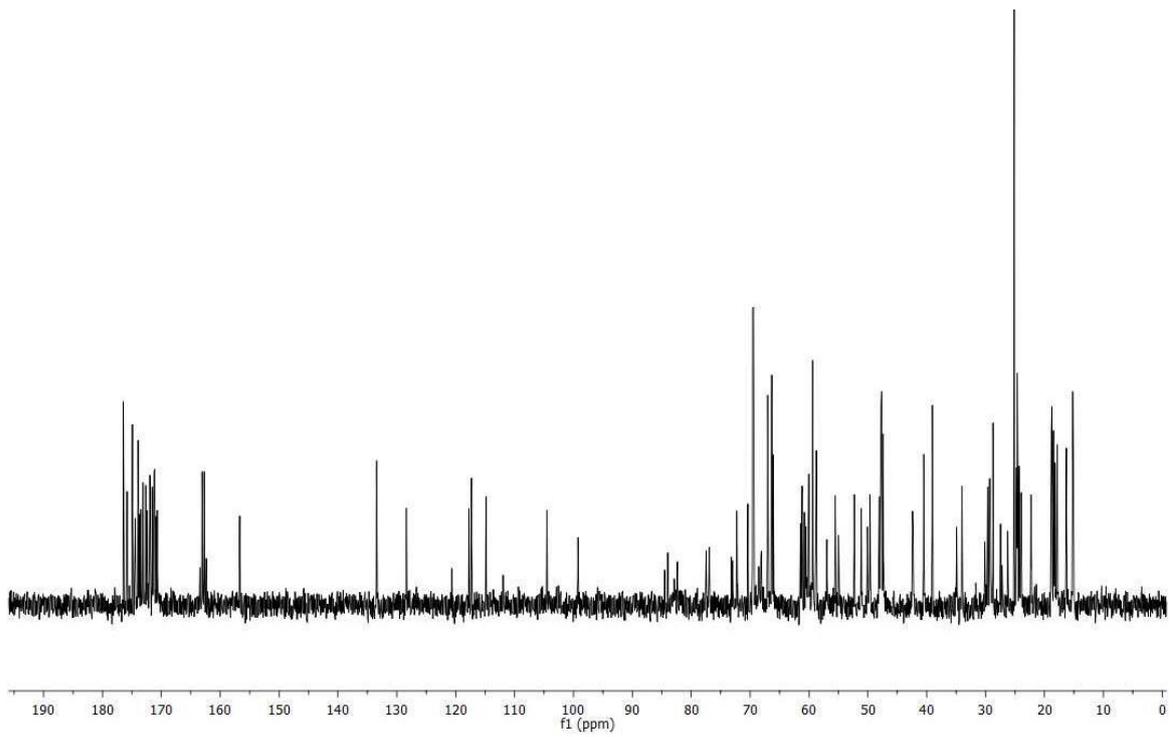
^1H ^1H COSY-NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



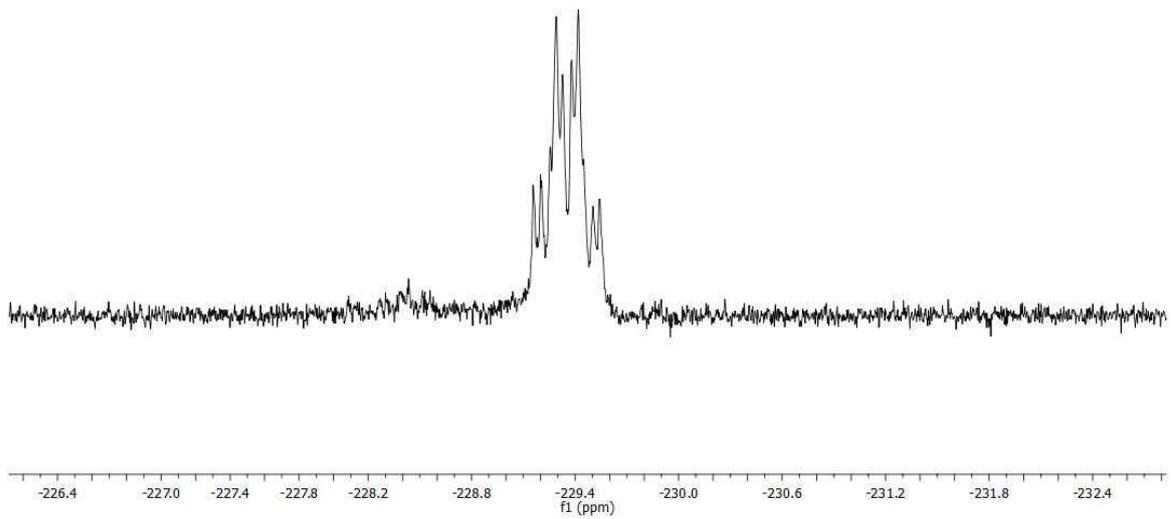
$^1\text{H} \ ^{13}\text{C}$ HMQC-NMR- Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



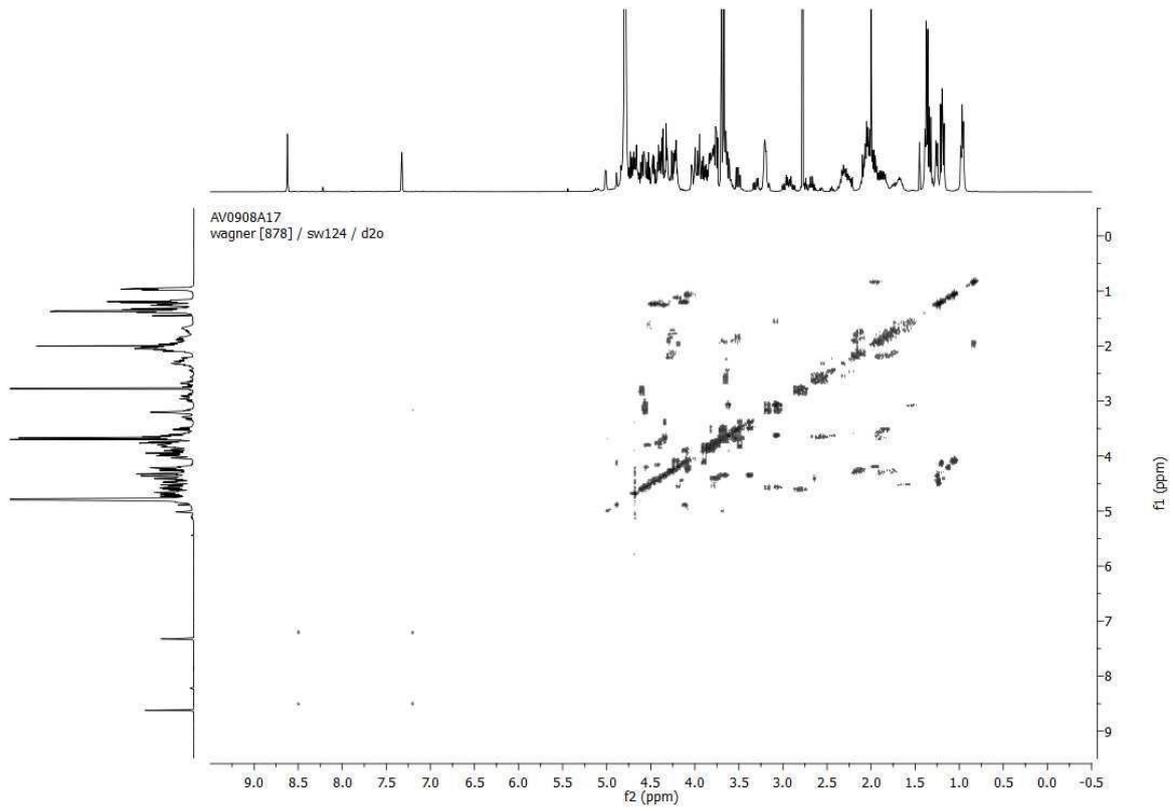
^1H -NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



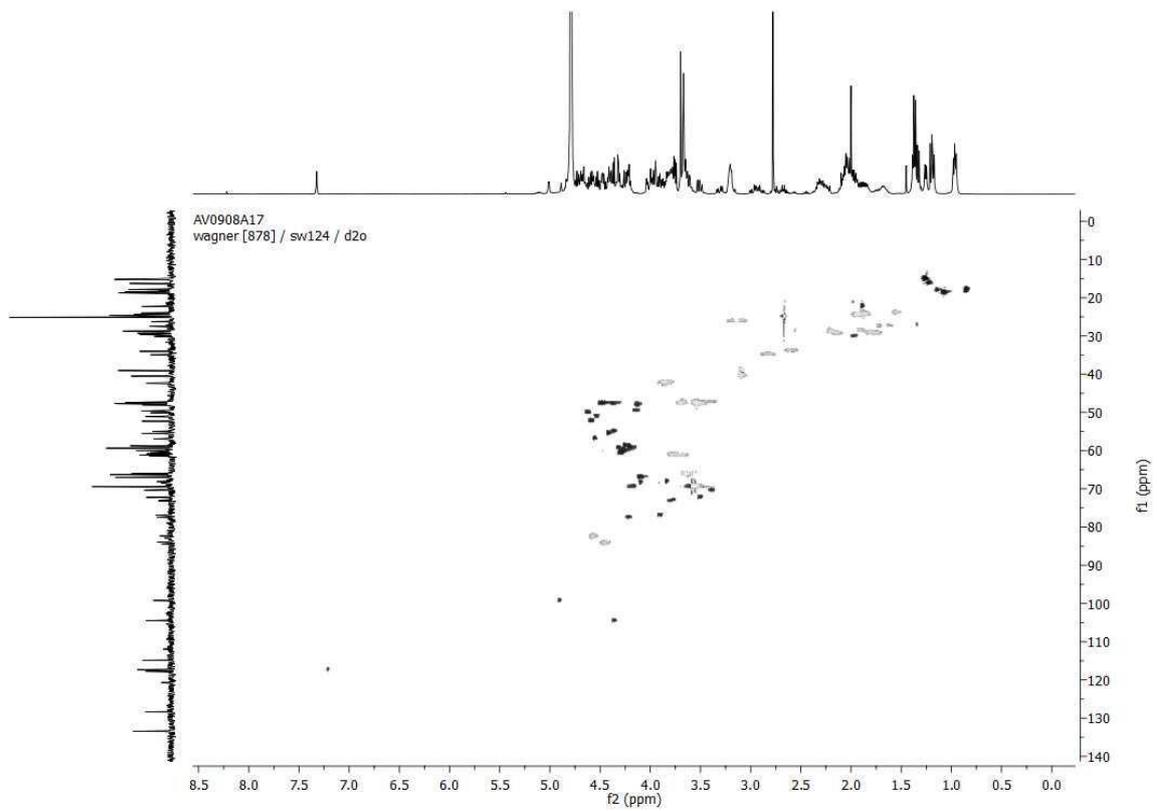
^{13}C -NMR- Spektrum (100.6 MHz, D_2O)



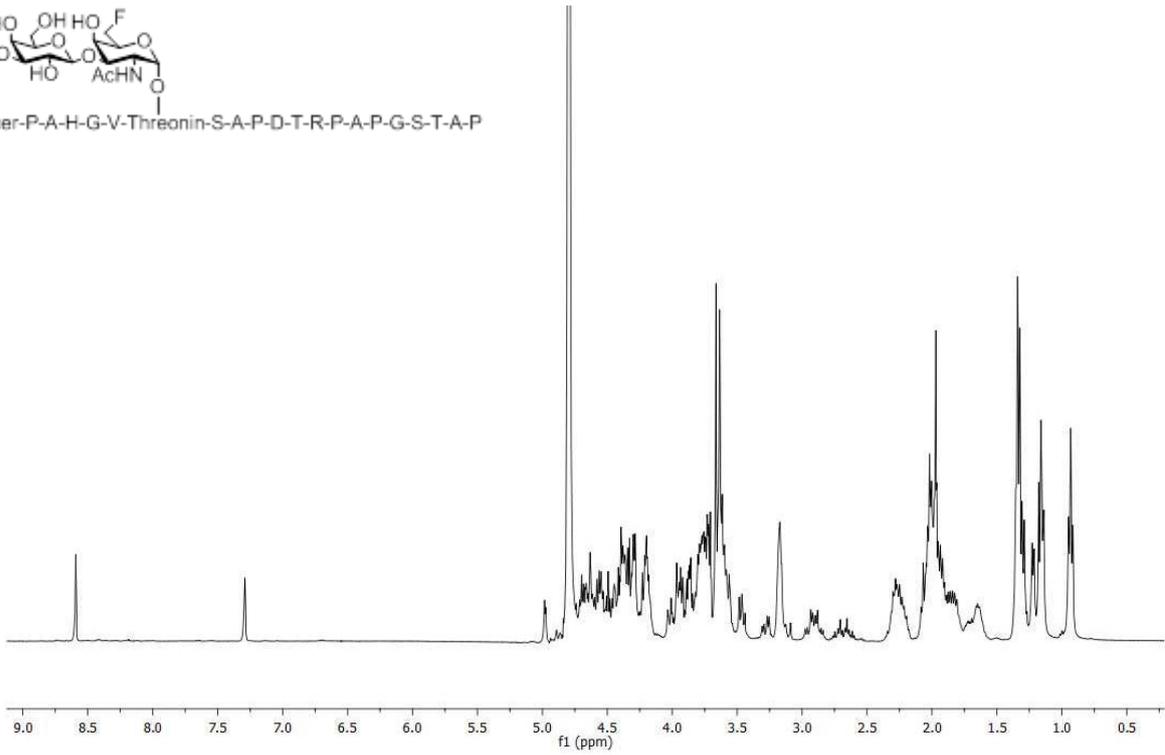
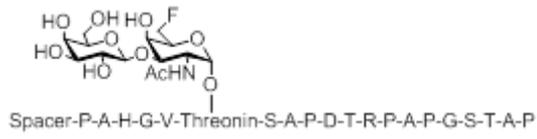
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, D_2O)



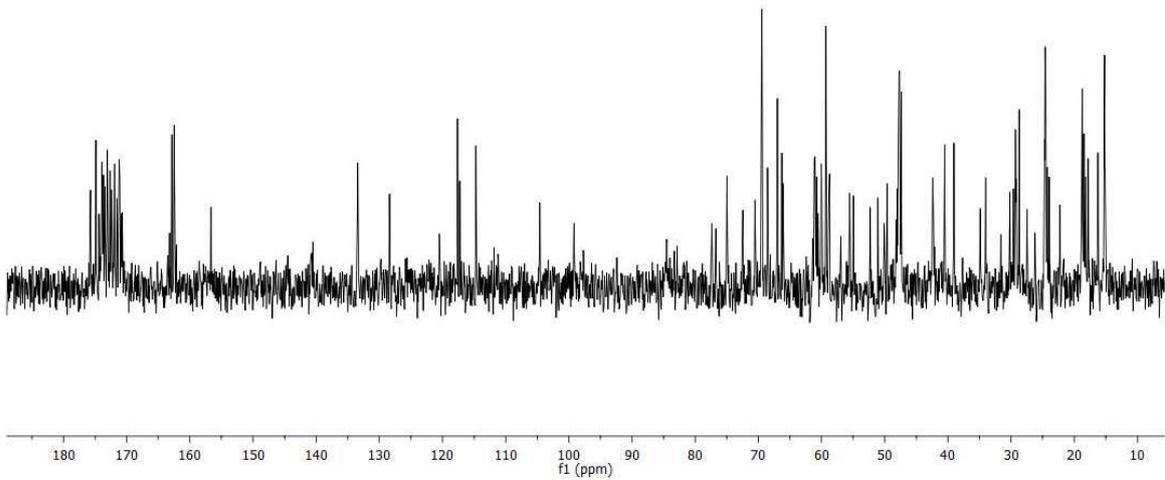
^1H ^1H COSY-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



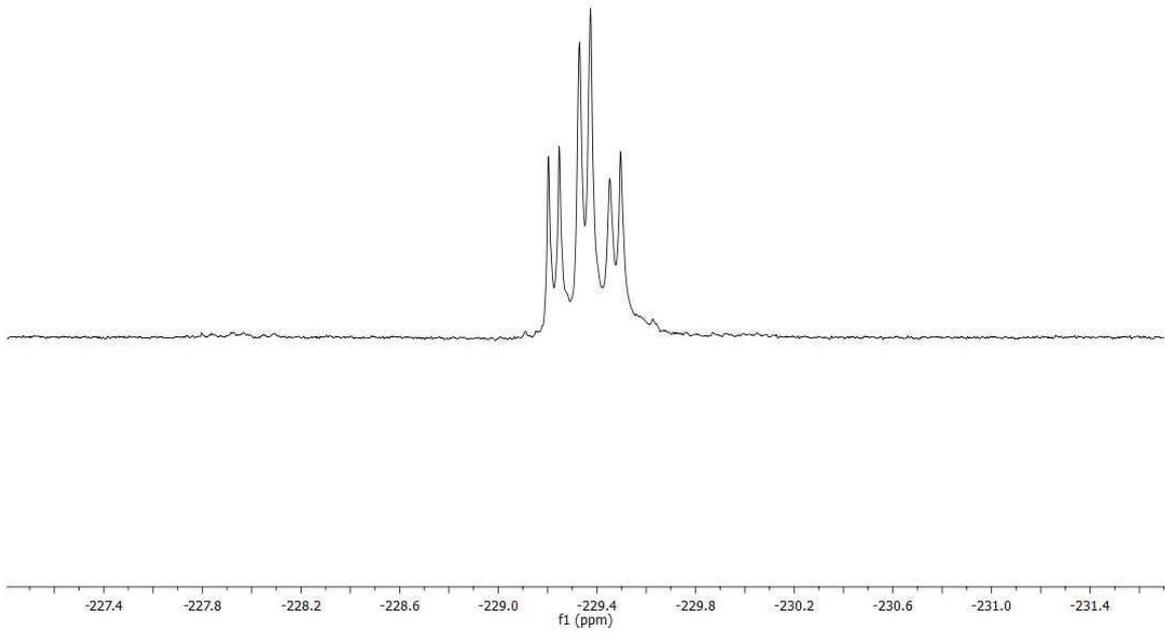
^1H ^{13}C HMQC-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



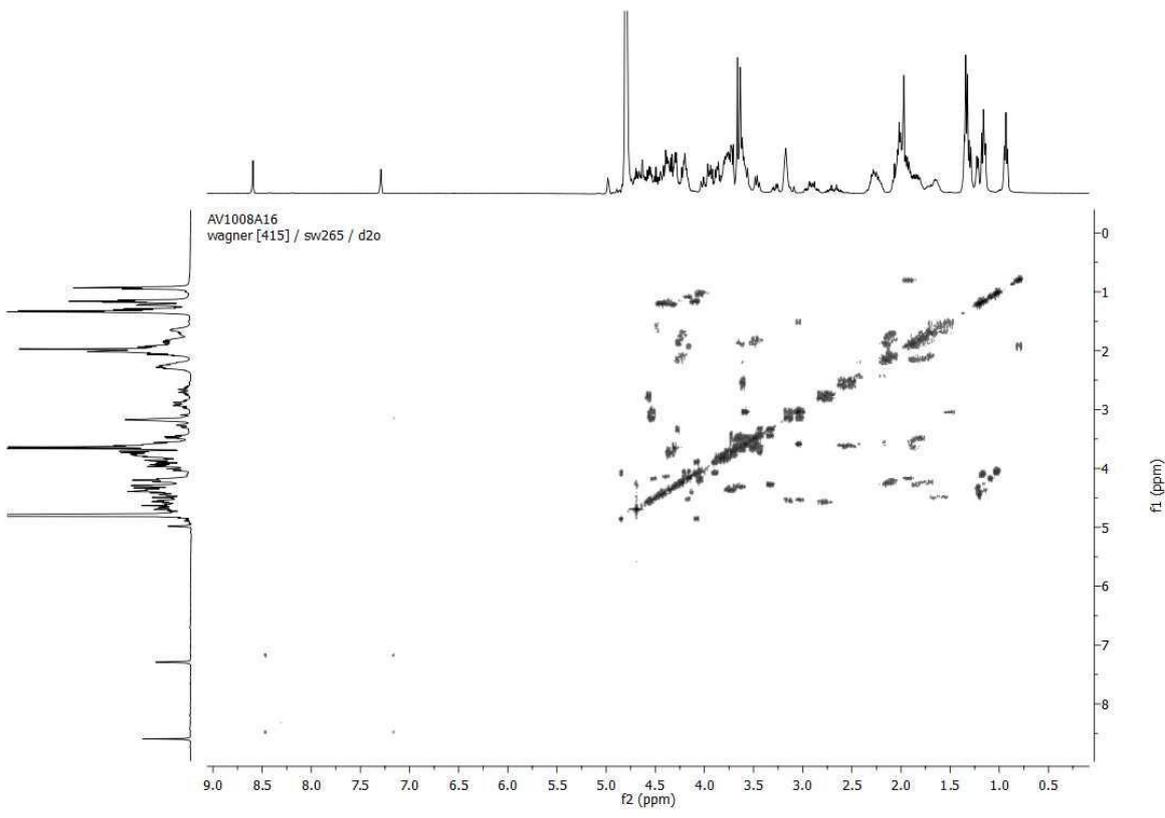
¹H-NMR- Spektrum (400 MHz, D₂O)



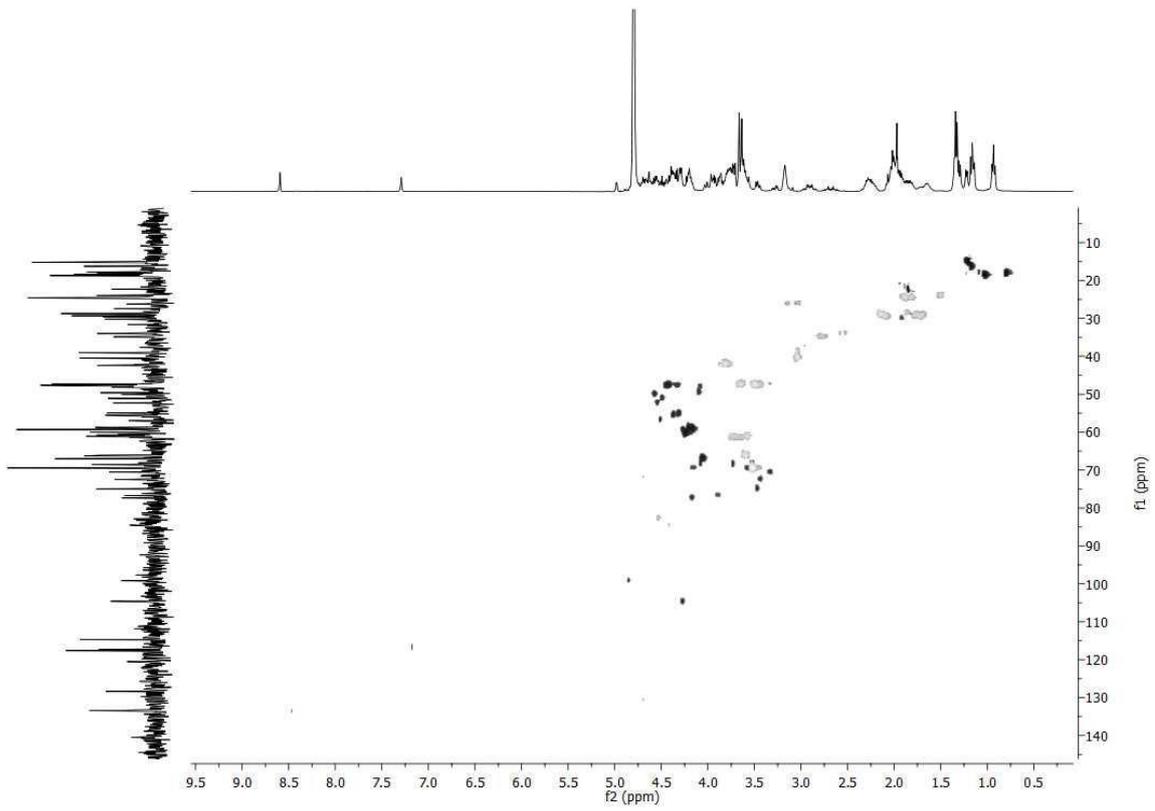
¹³C-NMR- Spektrum (100.6 MHz, D₂O)



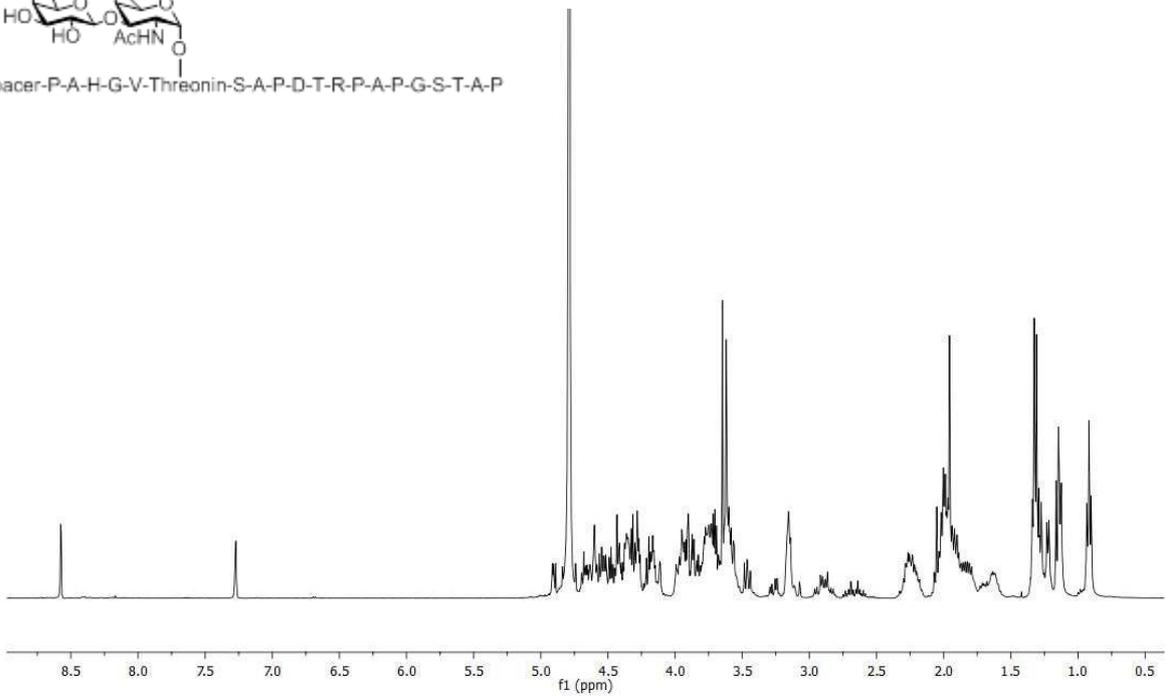
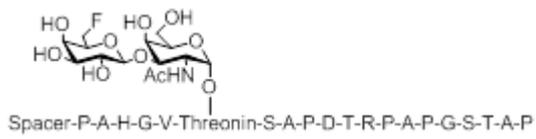
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, D_2O)



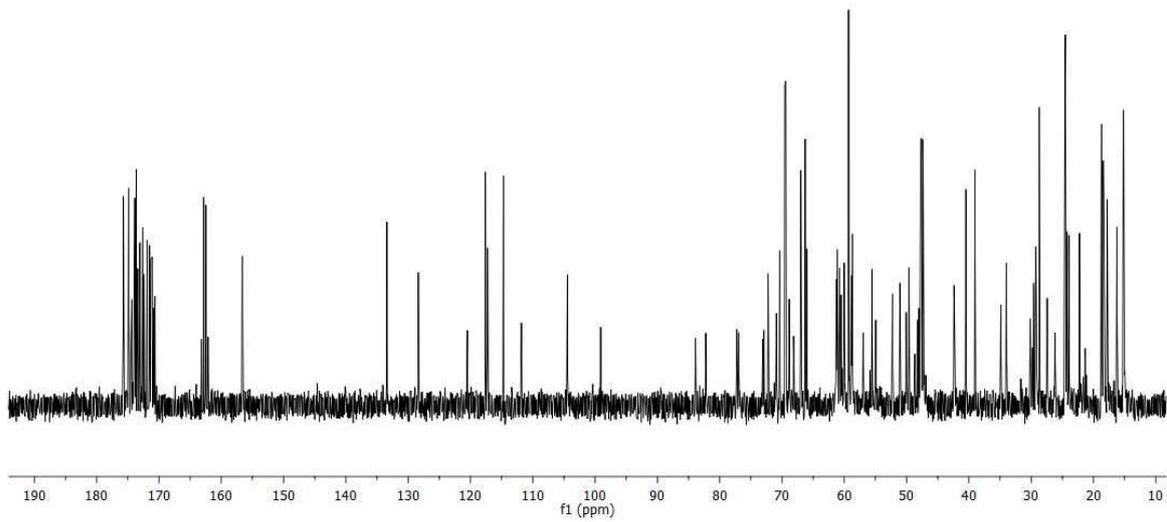
^1H ^1H COSY-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



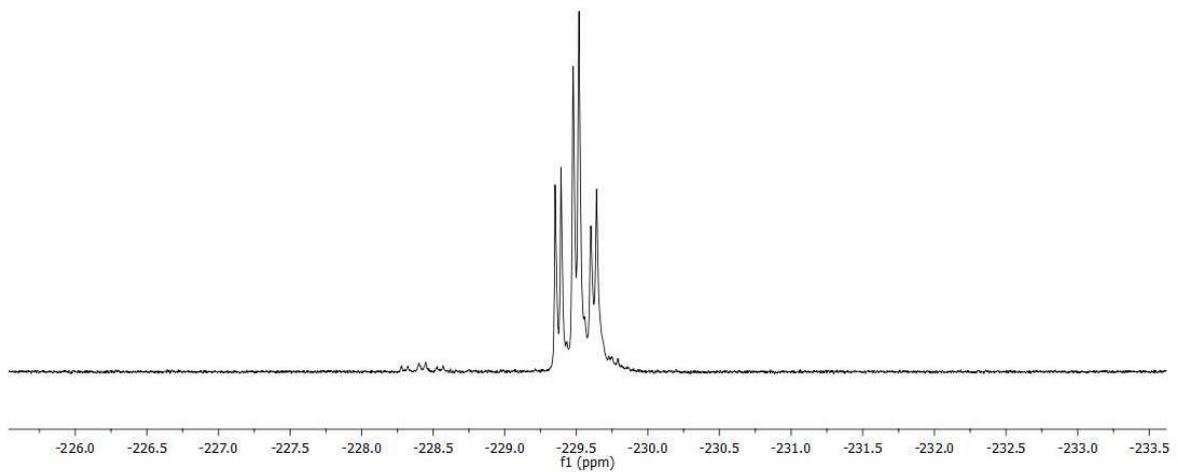
$^1\text{H} \ ^{13}\text{C}$ HMQC-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



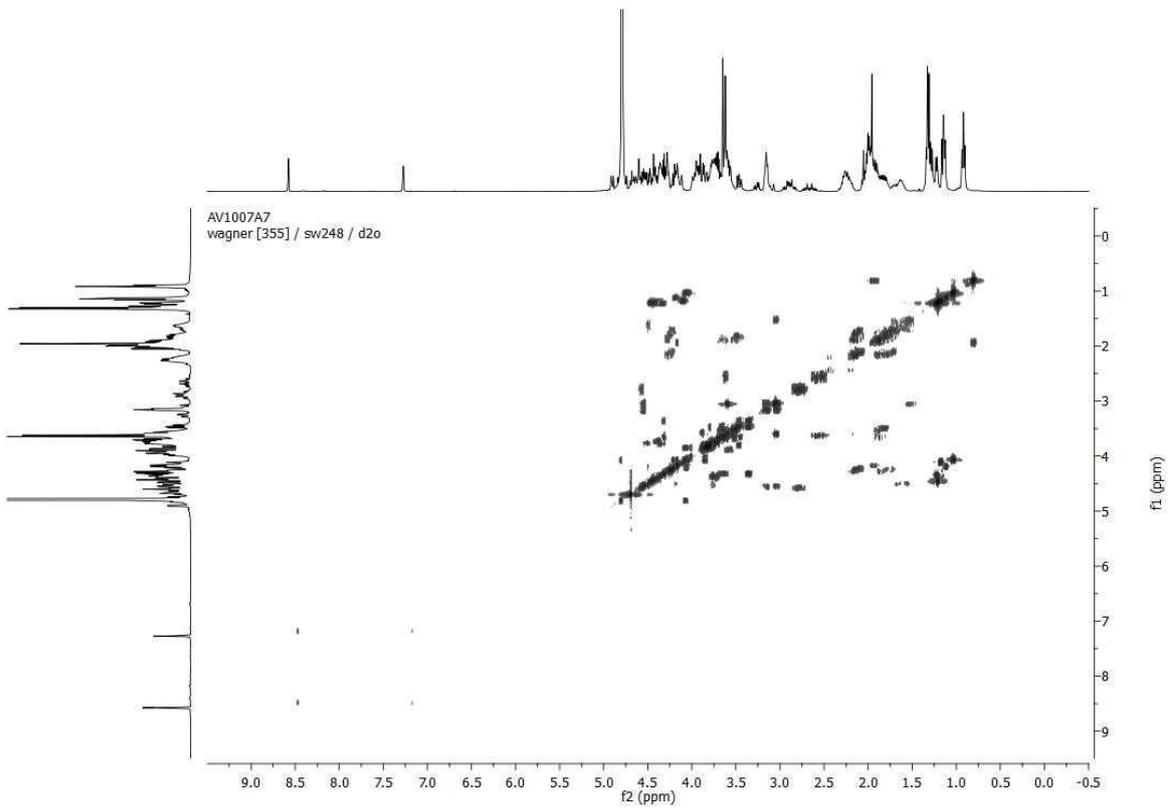
^1H -NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



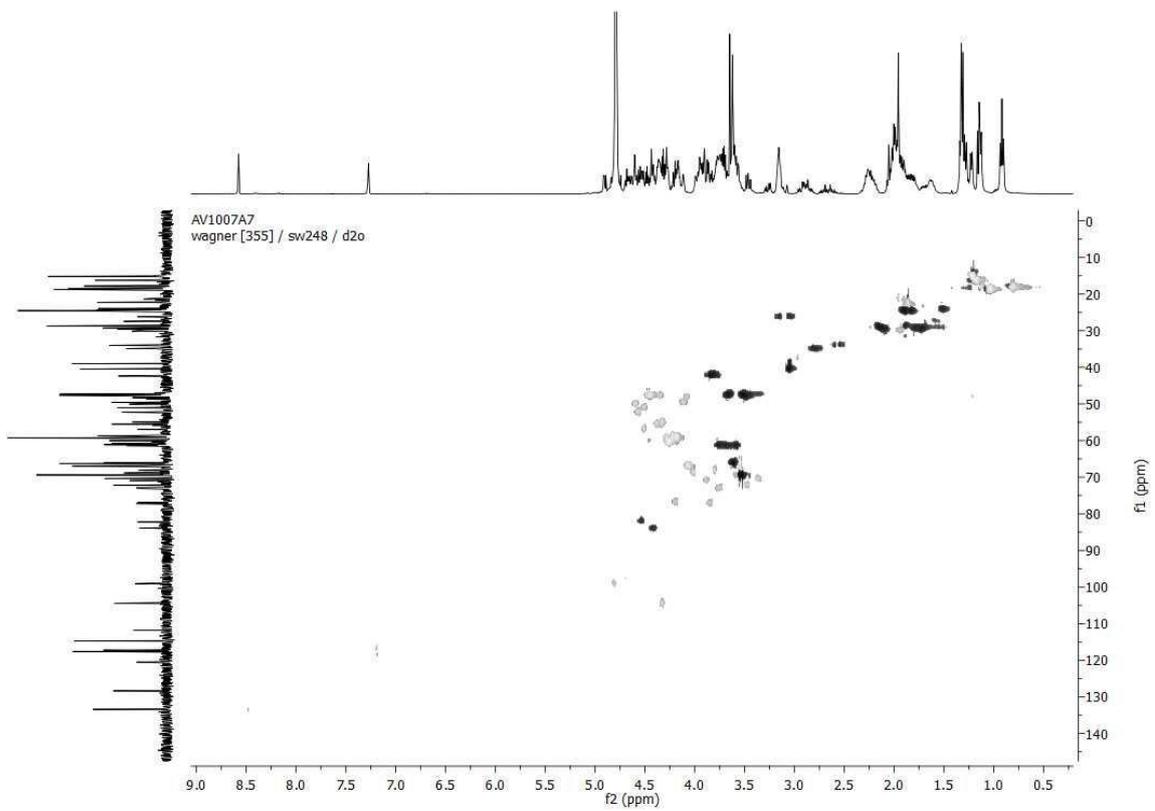
^{13}C -NMR- Spektrum (100.6 MHz, D_2O)



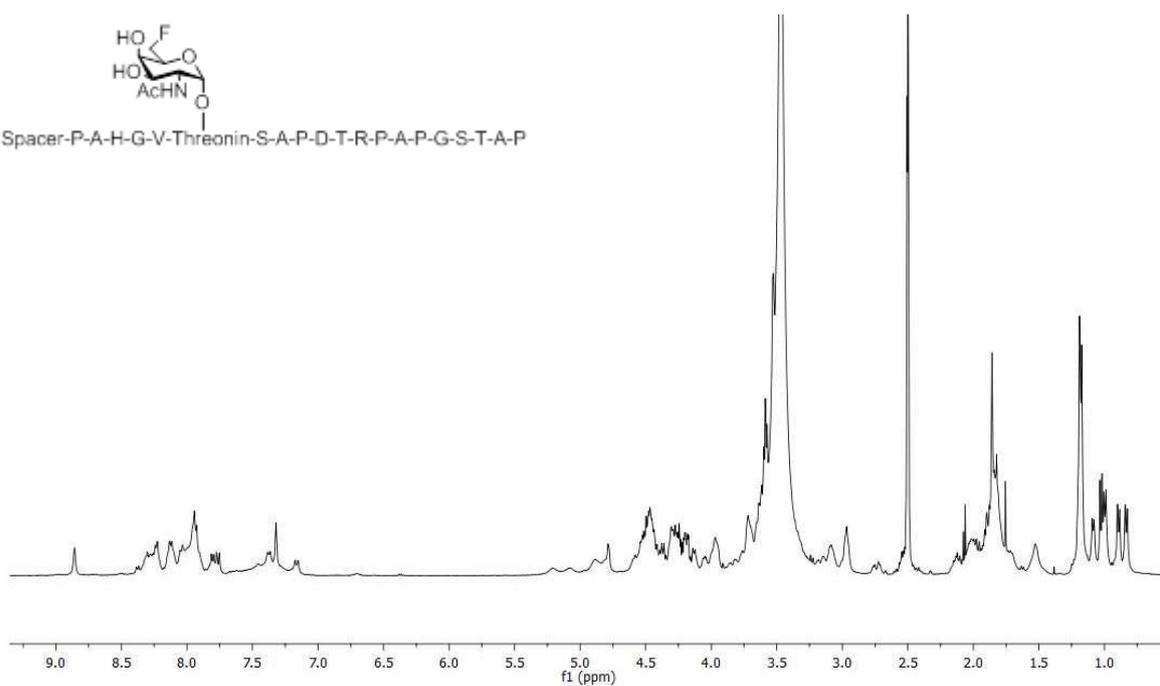
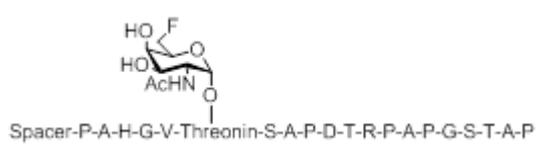
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, D_2O)



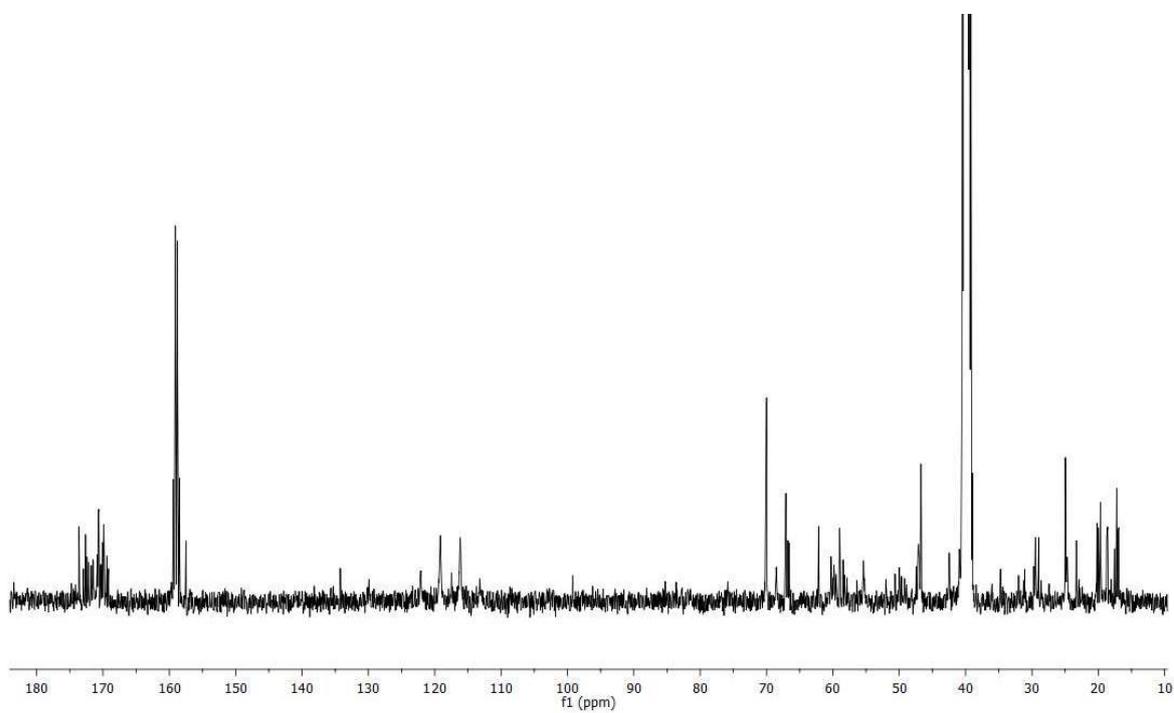
^1H ^1H COSY-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



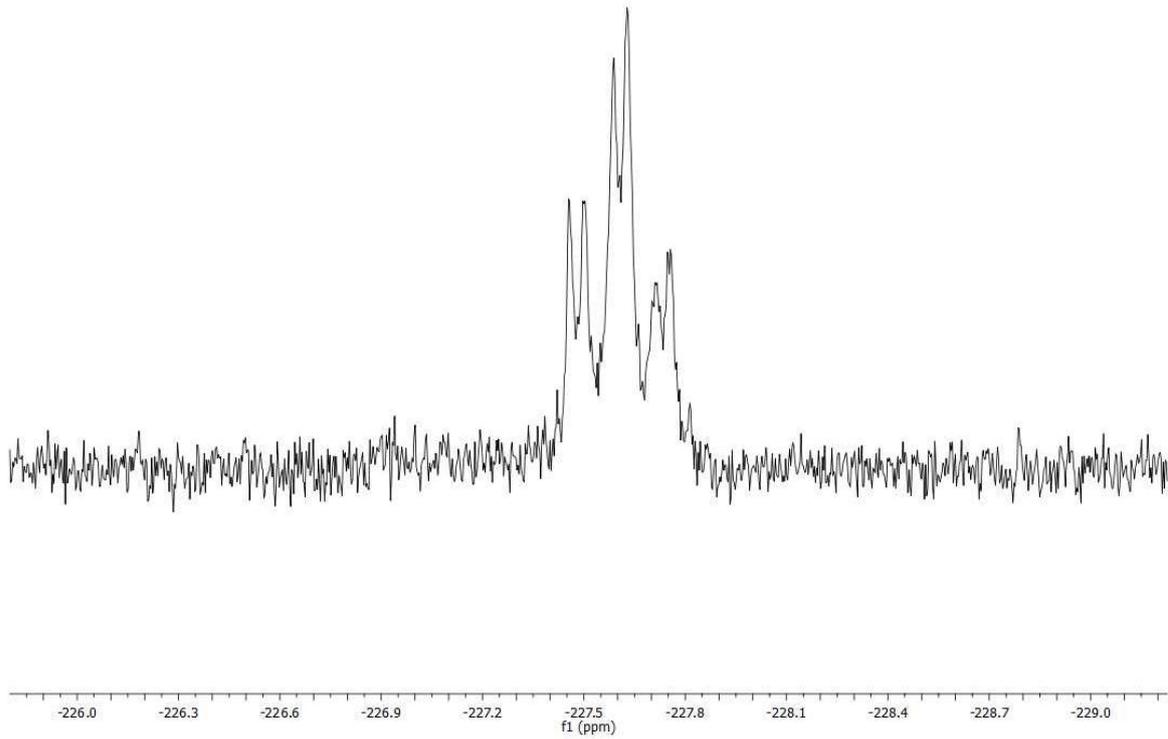
^1H ^{13}C HMQC-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



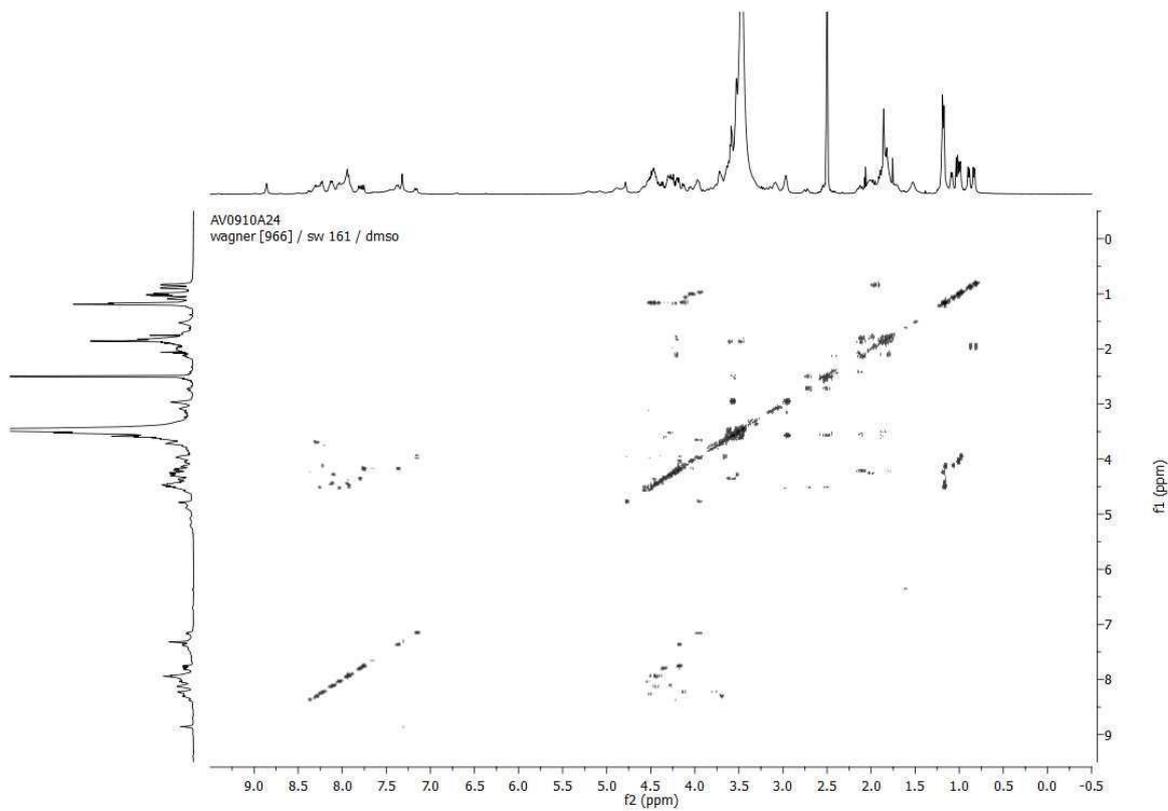
¹H-NMR- Spektrum (400 MHz, d-DMSO)



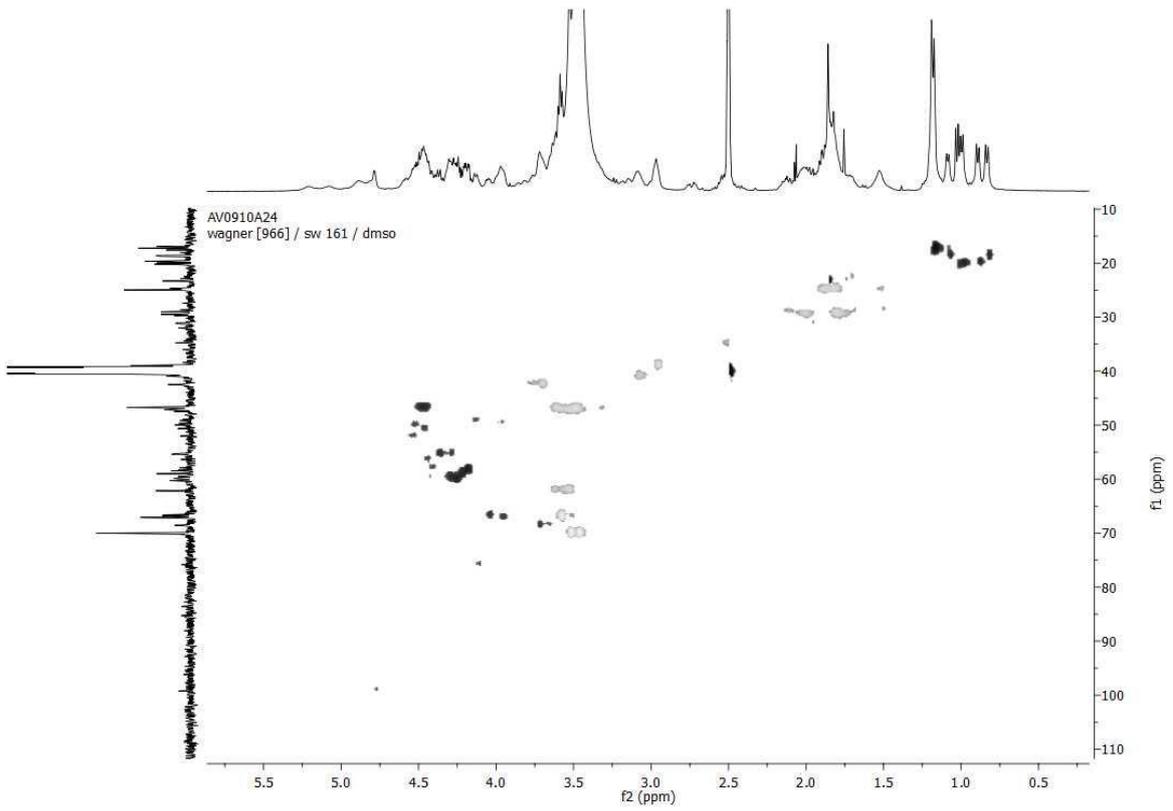
¹³C-NMR- Spektrum (100.6 MHz, d-DMSO)



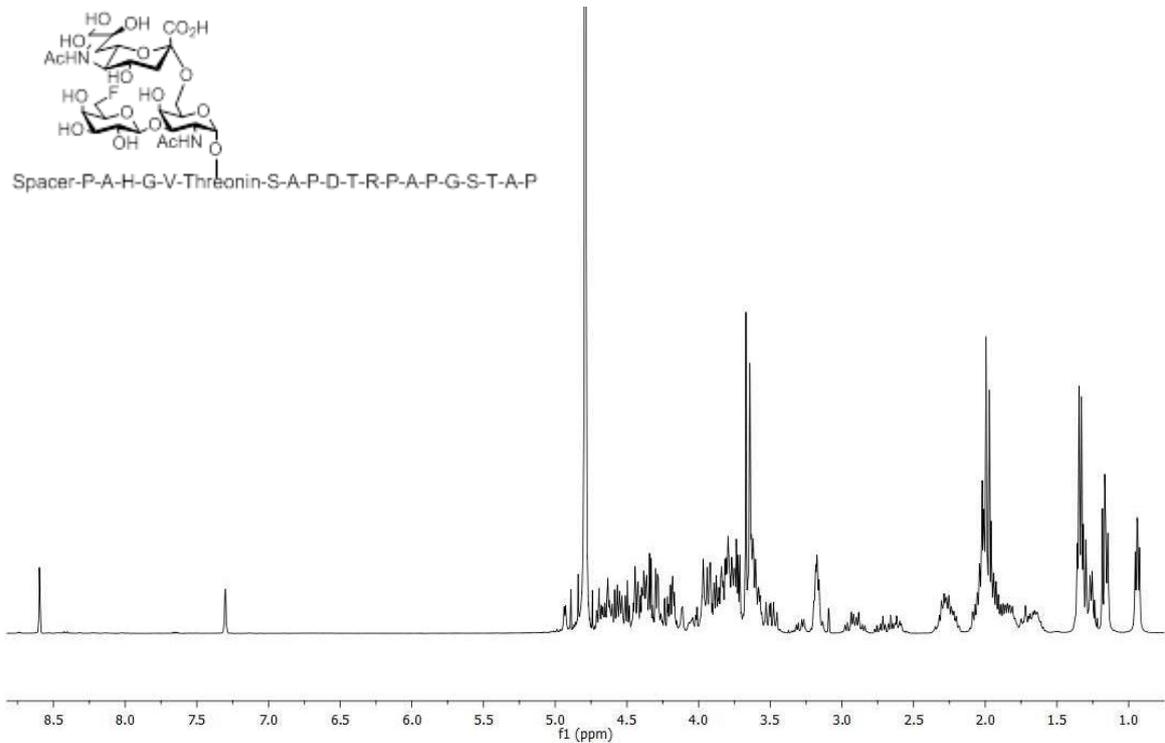
^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, *d*-DMSO)



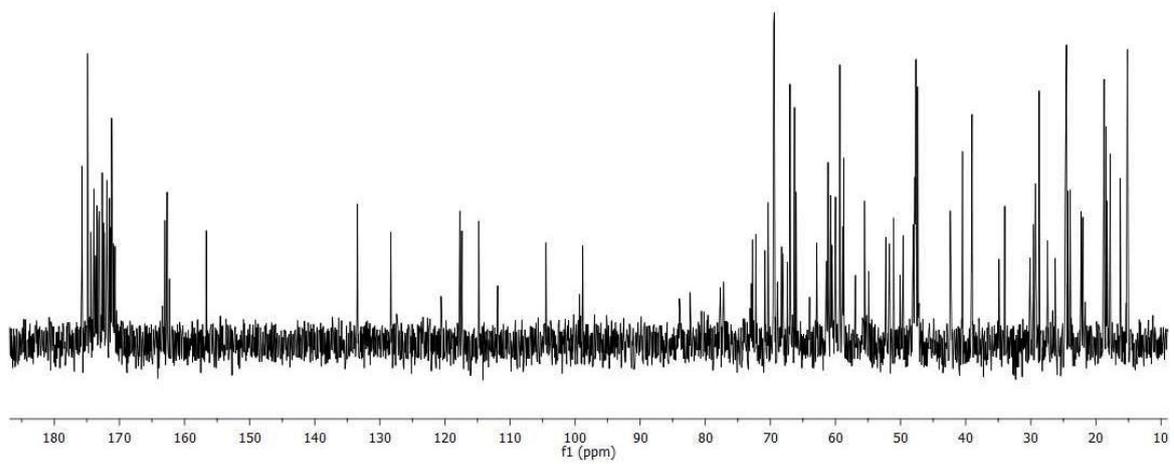
^1H ^1H COSY-NMR- Spektrum (400 MHz, *d*-DMSO)



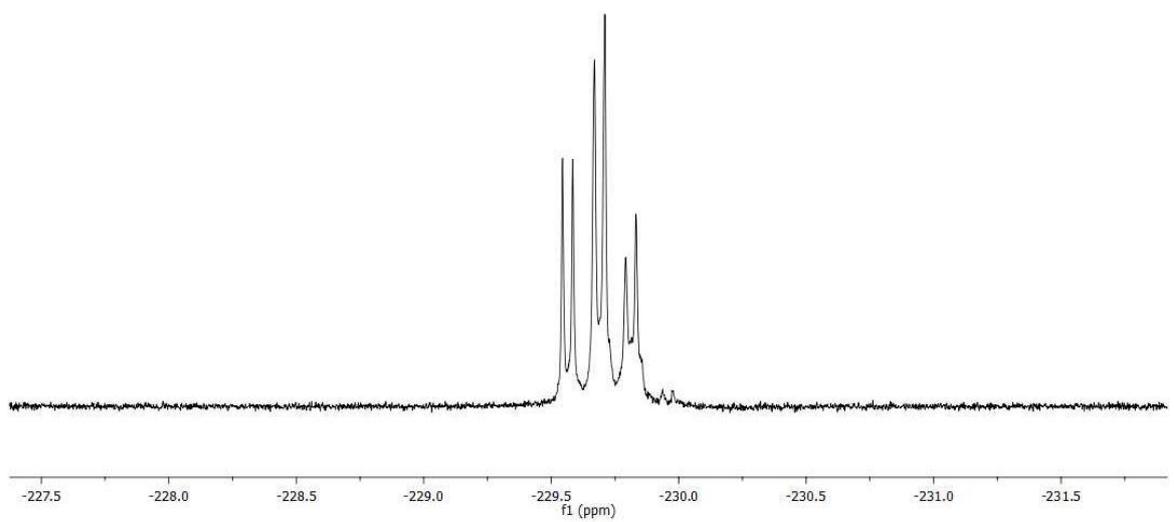
$^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMQC-NMR- Spektrum (400 MHz, d-DMSO)



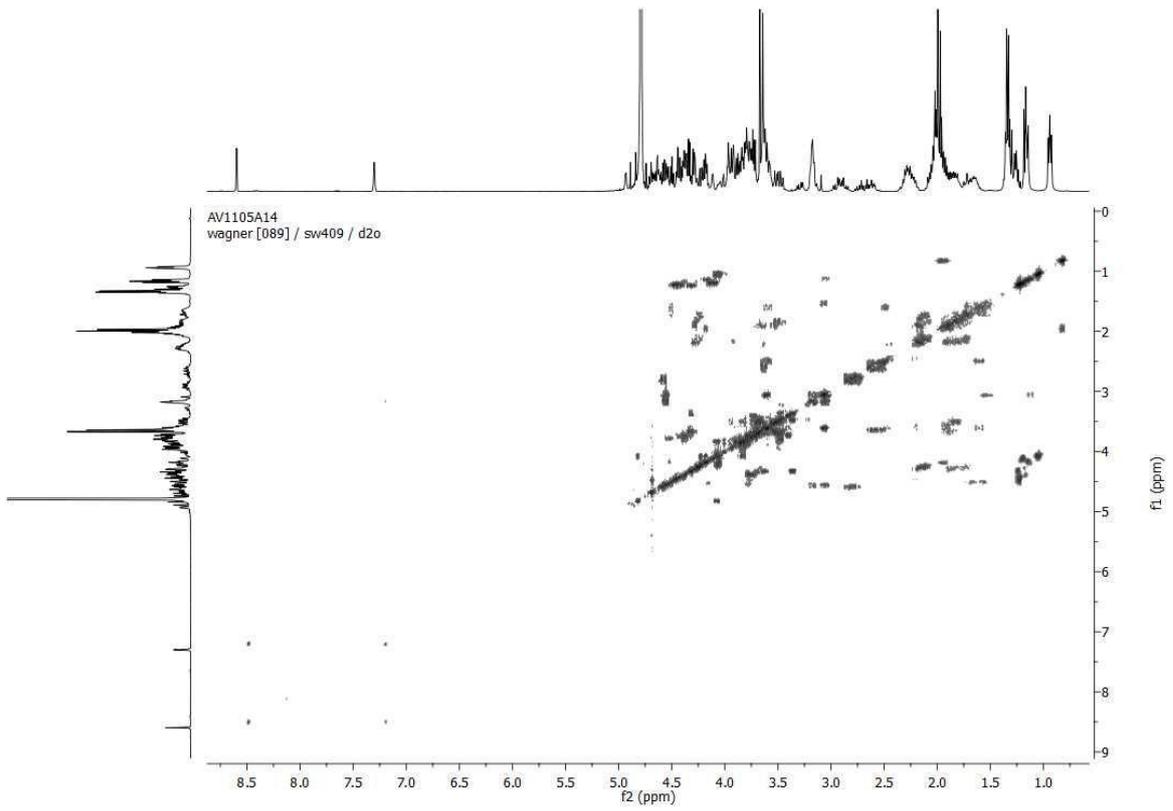
^1H -NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



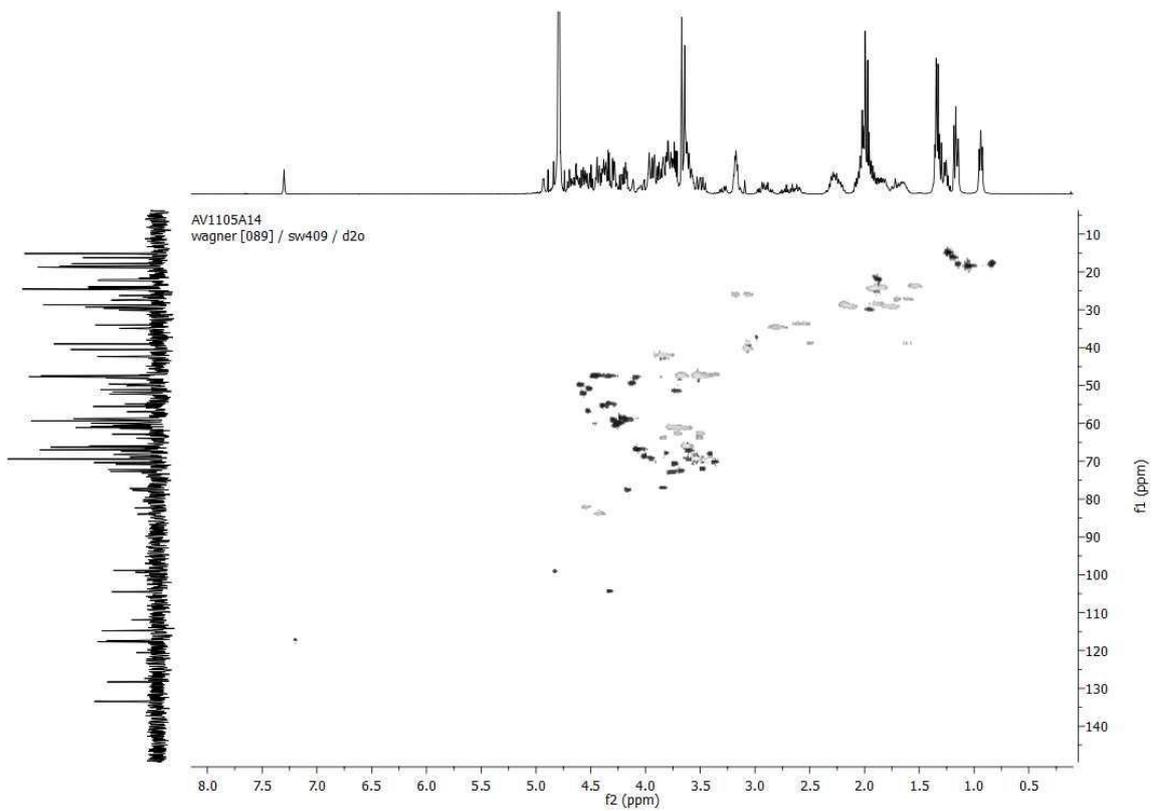
^{13}C -NMR- Spektrum (100.6 MHz, D_2O)



^{13}F -NMR- Spektrum (376.6 MHz, D_2O)



$^1\text{H}^1\text{H}$ COSY-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)



$^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMQC-NMR- Spektrum (400 MHz, D_2O)