

Synthese von selbstaggregierenden Glycopeptidkonjugaten mit (per)fluorierten Membranankern

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

Tobias Platen

geboren in Georgsmarienhütte

Mainz, im März 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von Mai 2007 bis März 2011
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
unter Anleitung von Frau Jr. Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder
angefertigt.

FÜR MEINE ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	i
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	iii
1 EINLEITUNG	1
1.1 Krebs – Inzidenz und Behandlungsmethoden.....	1
1.2 Das Mucin MUC1	3
1.3 Immuntherapie durch tumorassoziierte Antigene (TAA)	6
1.4 Die Organisation der Plasmamembran.....	8
1.5 Physikalische Eigenschaften fluororganischer Verbindungen	9
1.6 Fluorierte Microarrays	12
2 ZIELSETZUNG	15
3 SYNTHESEPLANUNG	19
4 ALLGEMEINER TEIL	21
4.1 Synthese des Glycerolankersystems.....	21
4.1.1 Synthese des Glycerolkerns	21
4.1.2 Einführung fluorierte Alkylketten am Glycerolkern.....	24
4.2 Synthese unterschiedlich blockierter Triethylenglycolspacer	31
4.3 Synthese des zentralen N-Acetylgalactosamin-Threonin Konjugats (T _N -Antigen)	32
4.4 Synthese der von Glycerin abgeleiteten Konjugate	39
4.4.1 Kupplungsreaktionen in der Peptidchemie	39
4.4.2 Konjugation mit dem Triethylenglycolspacer	42
4.4.3 Anbindungsversuche an ein T _N -Dipeptid.....	45
4.4.4 Darstellung der Konjugate mit dipeptidischer Kopfgruppe	48
4.4.5 Die Langmuir-Blodgett-Technik.....	51
4.4.6 Schub-Flächen-Diagramme der Glycerin-Amphiphile	53
4.5 Synthese des Lysinankersystems	54
4.6 Synthese der von Lysin abgeleiteten Konjugate	59
4.6.1 Darstellung eines fluoreszierenden Perfluoralkyl-Lysinkonjugats.....	59
4.6.2 Anbindung des Triethylenglycolspacers	61
4.6.3 Synthese von Lysinkonjugaten mit T _N -dipeptidischer Kopfgruppe	62
4.6.4 Ergebnisse der Langmuir-Blodgett-Experimente.....	64
4.7 Synthese der Glutaminsäureanker	69
4.8 Synthese komplexer tumorassoziiierter Kohlenhydratantigene	71
4.8.1 Synthese des Thomsen-Friedenreich-Antigen-Bausteins.....	71
4.8.2 Synthese des Sialyl-T _N -Antigen-Bausteins	73

4.9	Synthese von MUC1-Glycolipopeptid-Konjugaten.....	78
4.9.1	Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese.....	78
4.9.2	Allgemeines Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese	82
4.9.3	Synthese von MUC1-Eicosapeptiden mit perfluoralkylierten Membranankern.....	84
4.9.4	Immunologische Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	EXPERIMENTELLER TEIL	105
6.1	Messgeräte und allgemeine Anmerkungen zur Durchführung der organischen Synthese.....	105
6.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	109
6.3	Synthese des Glycerolankersystems	110
6.4	Synthese der Triethylenglycolspacer	118
6.5	Synthese des Galactosamin-Threonin-Konjugats	124
6.6	Synthese der T _N -dipeptidischen Kopfgruppe.....	134
6.7	Synthese der auf Glycerin basierenden Konjugate	139
6.8	Synthese des Lysinankersystems	149
6.9	Synthese der Lysin-basierenden Konjugate.....	161
6.10	Synthese des Glutaminsäureankersystems	172
6.11	Synthese des T-Antigen-Threonin-Konjugats	176
6.12	Synthese des Sialyl-T _N -Antigens.....	181
6.13	Synthese der MUC1-Glycolipopeptide.....	189
7	LITERATURVERZEICHNIS	197
8	SPEKTROSKOPISCHER ANHANG.....	I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[α]	Spezifischer Drehwert		<i>Polarisation Transfer</i>
absol.	absolut	dest.	destilliert
Ac	Acetyl	dhb	2,5-Dihydroxybenzoesäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid	DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
AcOH	Essigsäure	DODAMA	2-(2-(2-(Dioctadecylamino)-2-oxoethoxy)acetoxy)methacrylsäureethylester
AFM	Rasterkraftmikroskopie	DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)	DMAP	4-Dimethylaminopyridin
Ala, A	Alanin	DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
äq.	äquatorial	EE/EtOAc	Essigsäureethylester
Äquiv.	Äquivalente	ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Ar	Aryl-	ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
Arg, R	Arginin	Et	Ethyl-
Asp, D	Asparaginsäure	et al.	et alii
AS	Aminosäure	EtOH	Ethanol
ax.	axial	FD	Feld-Desorption
BAM	Brewsterwinkel-Mikroskopie	FITS	Perfluoralkylphenyliodoniumtrifluormethansulfonsäure
ber.	berechnet	Fmoc	<i>N</i> -9- <i>H</i> -Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl
Bn	Benzyl	Gal	D-Galactose
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)	Glu, E	Glutaminsäure
Bzn	Benzylidenacetal	Gly, G	Glycin
c	Konzentration	Glyc	Glycerol-
CAB	Chlorameisensäurebenzylester	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Cbz	Benzylloxycarbonyl		
CH	Cyclohexan		
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>		
δ	chemische Verschiebung		
d	Tag		
DC	Dünnschichtchromatographie		
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid		
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by</i>		

HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- hexafluorophosphat	NBD-Cl	4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa- 1,3-diazol
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlor-1 <i>H</i> -Benzotriazol-1- yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- uroniumhexafluorophosphat	NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
His, H	Histidin	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>	NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol	NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol	OD	Optische Dichte
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	OEG	Oligoethylenglycol
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>	OMs	Methansulfonat
Hz	Hertz	OTf	Trifluormethansulfonat
i. Hochvak.	im Hochvakuum	OTs	<i>para</i> -Toluolsulfonat
i. Vak.	im Vakuum	p	<i>para</i>
<i>i</i> PrOH	Isopropanol	p. a.	pro analysi
J	Kopplungskonstante	Ph	Phenyl-
kat.	katalytisch	Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman- 6-sulfonyl
konz.	konzentriert	Pro, P	Prolin
λ	Wellenlänge	ppm	<i>parts per million</i>
Lys, K	Lysin	PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -Toluolsulfon- säure
M	Molarität Molare Masse	PyBOP	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-tri- pyrrolidinphosphonium-hexa- fluorophosphat
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>	quant.	quantitativ
mbar	Millibar	Raumtemp.	Raumtemperatur
Me	Methyl-	R _f	Retentionsfaktor
MeCN	Acetonitril	R _t	Retentionszeit
MeOH	Methanol	RP	<i>Reversed Phase</i>
min	Minuten	Ser, S	Serin
MHz	Megahertz	SG	Schutzgruppe
MS	Massenspektrometrie	SPPS	Festphasenpeptidsynthese
NaOMe	Natriummethanolat	Su	Succinimidyl
		TAA	tumorassoziertes Antigen
		TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
		TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
		TBAI	Tetrabutylammoniumiodid

TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- tetrafluorborat	Thr	Threonin
		TIS	Triisopropylsilan
		TOF	<i>Time of Flight</i>
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl-	Trt	Trityl-
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol	<i>p</i> -TsOH	para-Toluolsulfonsäure
TTox	Tetanus-Toxin	UV	Ultraviolett
TFA	Trifluoressigsäure	Val, V	Valin
THF	Tetrahydrofuran		

1 EINLEITUNG

1.1 Krebs – Inzidenz und Behandlungsmethoden

Krebs bezeichnet eine maligne Neoplasie (bösartige Neubildung von Gewebe), die durch unkontrolliertes Wachstum und zerstörendes Eindringen in umliegendes, gesundes Gewebe gekennzeichnet ist. Obwohl Krebs durch eine Vielzahl von Ursachen und Einflüssen, wie z. B. radioaktive Strahlung, UV-Strahlung und chemischen Mutagene, sowie Viren, Bakterien und Parasiten, ausgelöst werden kann, besteht stets eine genetische Grundlage, da in der Karzinogenese zu einem bestimmten Zeitpunkt, sei es direkt oder indirekt, immer die DNA betroffen ist.^[1] Betrachtet man Krebs auf der Zellebene, lässt sich feststellen, dass es sich um eine Deregulierung von Zellteilung und Zelltod handelt. Während im gesunden Gewebe noch eine strenge Regulierung und hohe Interdependenz beider Prozesse vorliegt, ist dieses Gleichgewicht in Tumoren gestört. Dabei werden die Signalwege, die den Zellzyklus und die Apoptose steuern, von den Krebszellen so beeinflusst, dass ein invasives Wachstum resultiert, durch welches sie in der Lage sind, gesundes Gewebe zu verdrängen und zu zerstören oder Metastasen zu bilden, die über die Lymphe oder den Blutkreislauf in andere Gewebe vordringen und dort wiederum neue Tumore bilden können.

Nach den aktuellen Zahlen des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. wurden alleine in Deutschland für das Jahr 2006^[2] etwa 426 800 Krebsneuerkrankungen erfasst. Dem gegenüber standen 210 930 krebsbedingte Sterbefälle im selben Jahr, so dass Krebs aktuell die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland darstellt.^[3] Dabei treten Brust-, Lungen-, Darm- und Prostatakrebs am häufigsten auf und sind gleichzeitig auch für die meisten Todesfälle verantwortlich. Betrachtet man das Erkrankungs- und Sterberisiko genauer, stellt man fest, dass es abhängig vom Geschlecht unterschiedlich ausfällt. So beträgt das Lebenszeitrisko bei Männern an Krebs zu erkranken 47.3%, was bei den aktuellen relativen 5-Jahres-Überlebensraten zu einem Sterberisiko von 25.8% führt. Diese Werte fallen bei Frauen geringer aus. Ihr Lebenszeitrisko beträgt 38.2%, woraus noch ein allgemeines Sterberisiko von 20.3% resultiert. Generell haben sich die Heilungschancen in den letzten Jahrzehnten stark verbessert und liegen in Deutschland im Durchschnitt zurzeit bei etwa 50%, variieren jedoch je nach Lokalisation des Tumors stark. Während, wie der Abbildung 1.1 zu entnehmen ist, bei Prostata-, Brust- und Darmkrebs die

Erfolgsraten relativ hoch sind, liegen die Chancen bei Lungen-, Speiseröhren- und Bauchspeicheldrüsenkrebs deutlich niedriger.

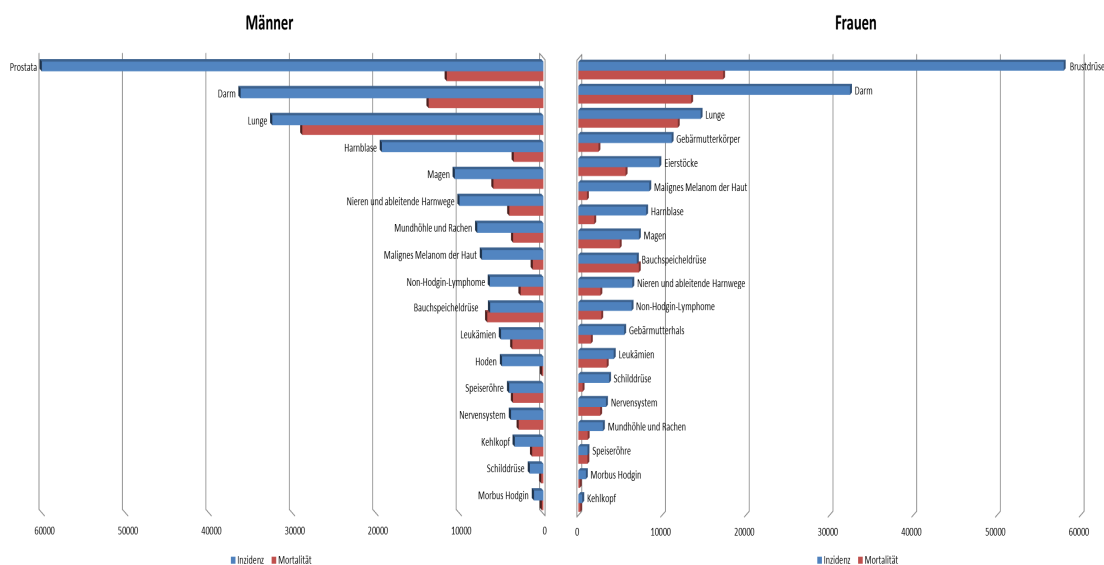


Abbildung 1.1: Krebsinzidenzen und deren Mortalität in Deutschland für das Jahr 2006.

Für eine möglichst effiziente Behandlung wäre es nötig, das maligne Gewebe selektiv zu entfernen, wobei alles gesunde Gewebe nicht in Mitleidenschaft gezogen werden darf. Bei den gegenwärtigen Therapieansätzen, die vornehmlich in die drei Bereiche der Resektion, der Strahlen- und der Chemotherapie unterteilt werden können, ist diese Vorgabe nur bedingt erfüllt.

Wird bei einem chirurgischen Eingriff das komplette Tumorgewebe, bei möglichst geringer Beschädigung von gesundem Gewebe, entfernt spricht man von einer kurativen Operation. Ist hingegen eine vollständige Entfernung des Tumors nicht mehr möglich, wird das Tumorgewebe größtmöglich reduziert, um so die Beschwerden des Patienten zu verringern und seine Lebenszeit zu verlängern, was als palliative Operation bezeichnet wird. Die Strahlentherapie nutzt die Gegebenheit aus, dass Tumorzellen in der Regel deutlich strahlungsempfindlicher sind als das intakte Gewebe. Durch lokale Bestrahlung ist es nun möglich, Tumorzellen gezielt abzutöten bzw. sie an der Mitose zu hindern. Bei der dritten Methode, der Chemotherapie, werden mittels Zytostatika besonders teilungsaktive Zellen zerstört. Neben Krebszellen sind dabei aber auch Haar-, Haut und blutbildende Zellen des Knochenmarks betroffen. Dies führt zu gravierenden Nebenwirkungen wie Übelkeit, Haarausfall und einer Anfälligkeit für Infektionen. Ein großer Vorteil dieser Therapie besteht allerdings in der Bekämpfung von Metastasen aufgrund der systemischen Wirkung der Zytostatika.

Durch Kombination dieser drei Therapieansätze werden inzwischen gute Erfolge erzielt, wobei aber, wie aus der obigen Beschreibung der drei Methoden ersichtlich ist, die notwendige Selektivität noch nicht gewährleistet ist. So kommt es in der Behandlung stets zu einer

Schwächung des Immunsystems, was den Heilungsverlauf negativ beeinflusst. Im Gegensatz hierzu würde die Aktivierung der körpereigenen Immunabwehr eine interessante Alternative^[4,5,6,7,8] zur selektiven Behandlung von Krebserkrankungen darstellen. In einer Krebsimmuntherapie^[9,10,11,12] bestünde die Möglichkeit, mit vollsynthetischen Anti-Tumorvakzinen maligne Zellen gezielt zu bekämpfen. Durch die Induktion einer selektiven, permanenten Immunantwort wäre nun erstmals auch die Möglichkeit gegeben, sich frei im Blutstrom befindliche, metastasierende Zellen gezielt anzugreifen. Darüber hinaus sollte auch über das immunologische Gedächtnis des adaptiven Immunsystems ein Langzeitschutz gegen eine erneute Erkrankung aufgebaut werden können.

Grundlage eines solchen Therapieansatzes ist die gezielte Unterscheidung von malignem und benignem Gewebe, um nicht durch eine mangelnde Differenzierung Autoimmunreaktionen hervorzurufen. Als vielversprechende Zielstrukturen lassen sich auf der Zelloberfläche exprimierte Glycoproteine heranziehen, deren Glycosylierungsmuster bei malignen Zellen deutlich verändert ist. Dieses charakteristische Unterscheidungsmerkmal erlaubt damit eine spezifische Adressierung von Tumorzellen, ohne dass gesunde Zellen beeinträchtigt werden. Als eine derartige Erkennungsstruktur wird das Glycoprotein MUC1^[13,14,15,16,17] angesehen.

1.2 Das Mucin MUC1

Das MUC1 gehört zur Klasse der membrangebundenen Mucine und kommt vor allem auf Epithelzellen im Mammagewebe, der Prostata, des Pankreas, der Leber, der Nieren und des Darmtraktes vor,^[18,19] wobei es auf Karzinomen dieser Zelltypen zudem stark überexprimiert vorliegt.^[20] Dieses 300 bis 400 kDa große Glycoprotein befindet sich in seiner natürlichen Form hauptsächlich in einer langgestreckten, starren Konformation auf der apicalen Seite dem Lumen zugewandt und erstreckt sich dabei etwa 200 bis 800 nm in dieses hinein.^[21] Mucine dienen vornehmlich zum Schutz der Zelloberfläche vor Einwirkung von Pathogenen und Enzymen, sowie hoher Ionenkonzentrationen und Säuren.^[22] Die Mucin-Sequenz lässt sich grob in einen kurzen cytoplasmatischen Bereich, einer hydrophoben Transmembranregion und eine lange extrazelluläre Einheit unterteilen. Allen 17 bislang bekannten Mucinen ist im Extrazellulärbereich eine variable Anzahl (ca. 20 bis 150) repetitiver Sequenzeinheiten (*variable number of tandem repeats*, VNTR) gemein, die aus einer Folge von 12 bis 20 Aminosäuren bestehen. Generell besitzen diese Mucinsequenzen einen hohen Prolinanteil und sind reich an den Aminosäuren Threonin und Serin, die mit ihren potentiellen *O*-Glycosylierungsstellen verantwortlich für den hohen extrazellulären Saccharidanteil von 50 bis 90 Gewichtsprozent^[23] sind. Im Fall des MUC1 umfasst die Wiederholungseinheit 20 Aminosäuren bestehend aus der Sequenz

PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP, die folglich mit fünf potentiellen O-Glycosylierungsstellen ausgestattet ist. Aufgrund eines vererbten Polymorphismus des MUC1-codierten Genabschnitts schwankt die Anzahl der kumulierten *tandem repeat*-Segmente zwischen 25 und 125.^[24]

Die komplexen Oligosaccharidseitenketten werden in den Kompartimenten des *Golgi*-Apparates im Anschluss an die ribosomale Proteinbiosynthese aufgebaut,^[23] wobei zunächst im *cis-Golgi* enzymatische Glycosylierungen der Seitenkettenfunktionen des Serins und des Threonins erfolgen. Über eine *N*-Acetylgalactosamintransferase (GalNAcT) wird die sogenannte T_N-Antigen-Struktur^[25,26] aufgebaut, woraufhin in normalen Zellen beim Durchlaufen des *Golgi*-Apparates eine Galactosylierung (β 1,3GalT) der *N*-Acetylgalactosamineinheiten zur sogenannten *Core1*-Struktur (β Gal(1 \rightarrow 3)- α GalNAc; T-Antigen) erfolgt, die schließlich über β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferasen (C2GnT-1) in die *Core2*-Struktur überführt wird.^[27,28] Durch weitere Glycosyltransferasen werden daraus die komplexen, auf der *Core2*-Struktur basierenden Oligosaccharide synthetisiert.

Die Terminierung der Ketten erfolgt im *trans-Golgi* durch Anbindung von Fucose und Neuraminsäure oder durch Sulfatierung.^[29] Diesen Biosyntheseweg entsprechend tragen benigne Epithelzellen hochkomplexe Oligosaccharidketten mit zugrunde liegender *Core2*-Struktur, die, wie bereits erwähnt, den hohen Kohlenhydratanteil von 50-90% ausmachen.

Aus dem strukturellen Unterschied von Normalzellen zu den meist runden bis ovalen Krebszellen lässt sich schließen, dass die auf der Oberfläche exprimierten Glycoproteine in veränderter Weise vorliegen müssen (Abbildung 1.2). Der Ursache dieses Polaritätsverlustes liegt eine fehlerhafte Enzymaktivität im *trans-Golgi* zugrunde, die zu vorzeitig terminierten Kohlenhydratseitenketten führt.^[28]

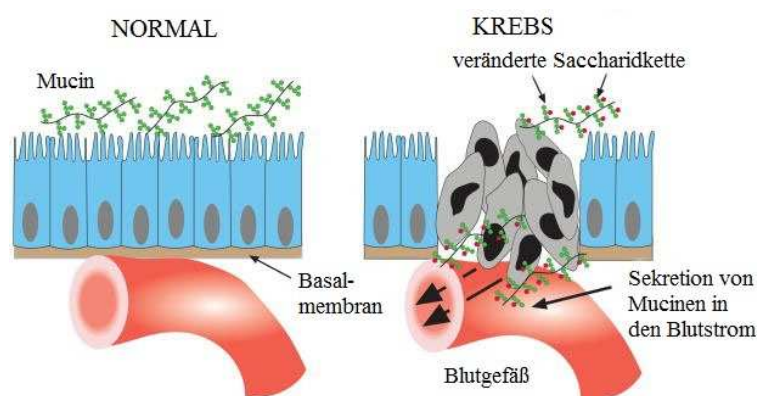


Abbildung 1.2: Auswirkungen der veränderten Oberflächenstruktur in Krebszellen.

Bei vielen Krebszelllinien (z. B. der Brustkrebszelllinie T47D^[30,31]) ist zu beobachten, dass die β 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase (C2GnT-1) stark herunterreguliert ist, so dass die *Core2*-Strukturen nicht mehr ausgebildet werden.^[32] Auch sind bei solchen Zelllinien erhöhte

Sialinsäuregehalte festgestellt worden, was auf eine verstärkte Sialyltransferase-Aktivität (ST6GalNAc-I; ST6GalNAc-II; ST3Gal-I) hindeutet. Hierdurch kommt es zu einem verfrühten Abbruch des Kettenwachstums und daher zu einer erhöhten Expression des *Thomsen-Friedenreich*-Antigens (*Core1*-Struktur; T-Antigen) bzw. dessen beiden regioisomeren sialylierten Vertretern, dem (2,3)-Sialyl-T- und dem (2,6)-Sialyl-T-Antigen.^[33] Die veränderten Enzymaktivitäten, die in Tumorgewebe zur Ausbildung dieser charakteristischen, tumorassoziierten Antigenstrukturen (TAA) führen, sind in Abbildung 1.3 nochmals schematisch zusammengefasst.

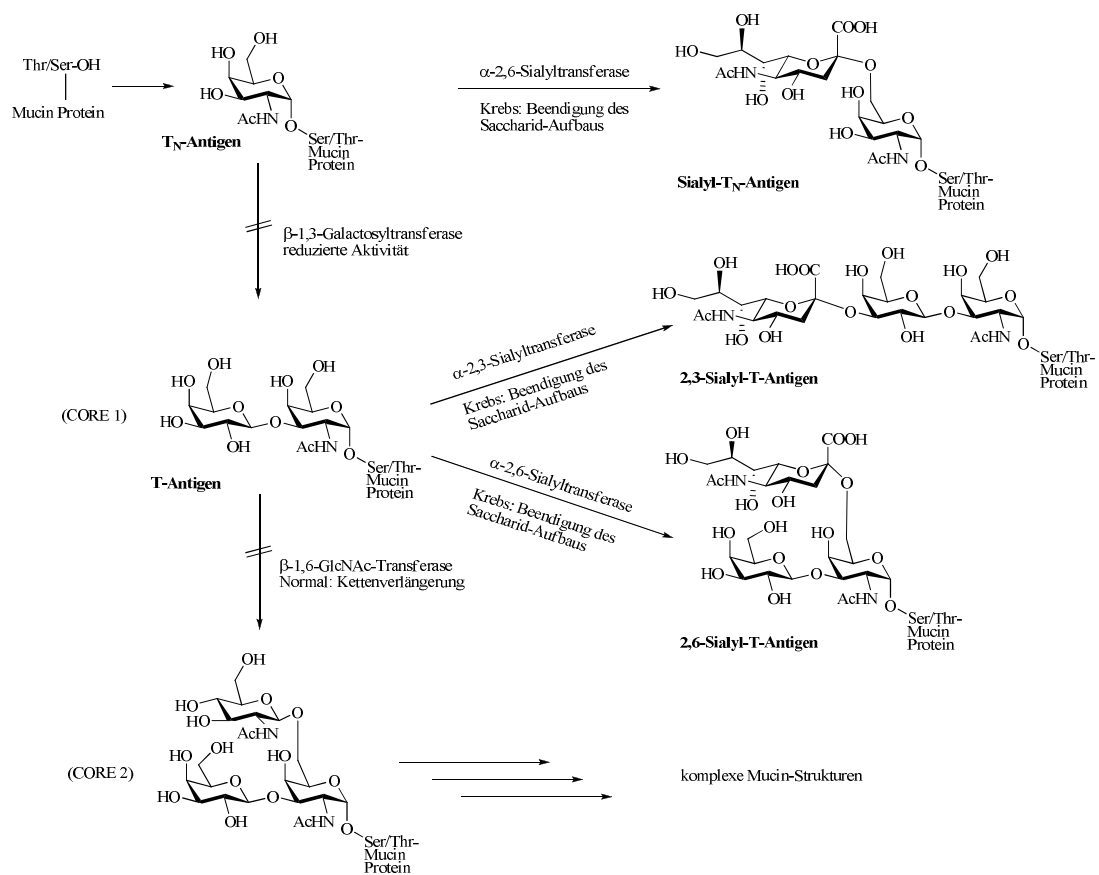


Abbildung 1.3: Tumorassoziierte O-Glycosylierung des Mucins MUC1.

Die weniger verzweigten, jedoch stärker sialylierten Saccharidmuster des tumorassoziierten MUC1 führen zu einer partiellen Freilegung des im Normalfall von den Glycanketten vollständig umhüllten Peptidrückgrats, das dadurch erst vom Immunsystem erkannt werden kann. Als immunologisch besonders wirksam wird dabei das Sequenzmotiv APDTRPAPG^[34] angesehen, welches bereits erfolgreich von mehreren aus Tumorzellisolaten erhaltenen Antikörpern gebunden wurde. Diese Peptidsequenz ist offenbar in der Lage eine *turn*-Konformation^[35] einzunehmen, die abhängig vom jeweiligen Glycosylierungsmuster der MUC1-Sequenz induziert wird.^[36] Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine Glycosylierung des Threonins in der PDTRP-Domäne zu einer

Verringerung der Immunogenität führt.^[37] Ein weiteres immundominantes Epitop stellt die GSTA-Sequenz dar, die allerdings infolge einer Glycosylierung immunogener wirkt.^[38]

Die gerade dargestellten spezifischen Unterschiede in der MUC1-Oberflächenstruktur von benignem und malignem Gewebe sollten es ermöglichen eine selektive, gegen Tumorgewebe gerichtete Antikörperreaktion durch Immunisierung zu induzieren.

1.3 Immuntherapie durch tumorassoziierte Antigene (TAA)

Aufgrund verschiedener immunsuppressiver Mechanismen eines Tumors ist ein eigenständiges Vorgehen des menschlichen Immunsystems gegen Tumorzellen nicht möglich.^[39] So können Tumorzellen neben anderen Mechanismen beispielsweise durch Sekretion immunsuppressiver Zytokine eine Toleranzschwelle aufbauen.

Um trotz dieser Hindernisse eine Immunantwort zu induzieren, muss die Toleranz des Immunsystems gegenüber tumorösen Zellen selektiv gebrochen werden.

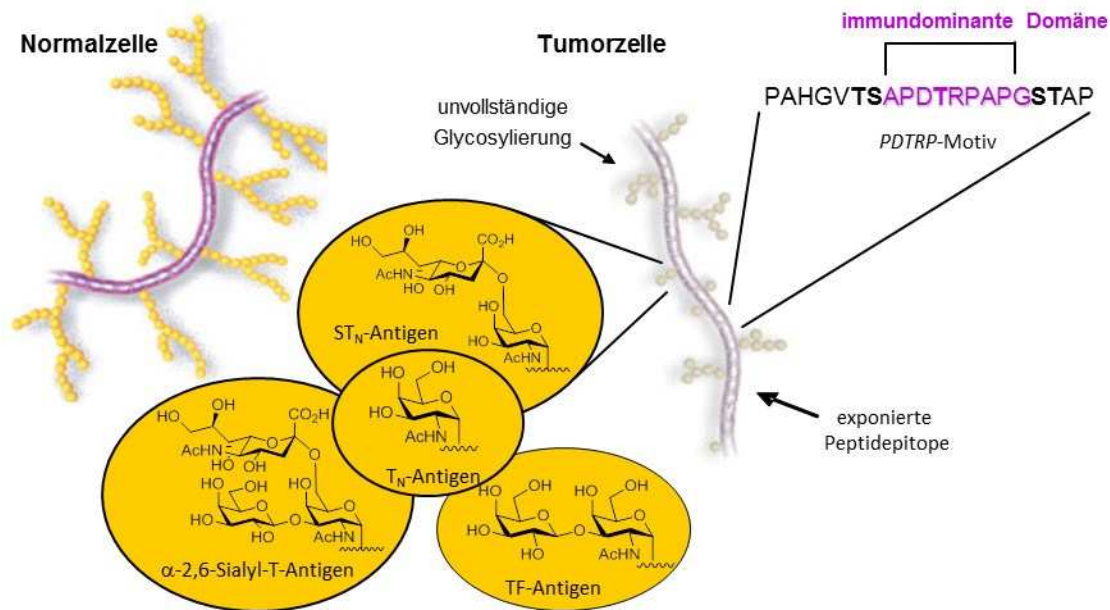


Abbildung 1.4: Unterschiede der Oberflächenglycoproteine von benignen und malignen Zellen.

Dabei gilt es die in Abbildung 1.4 zusammengefassten Unterschiede zwischen normaler und Tumorzelle möglichst effektiv für eine Immunisierung auszunutzen. Ein vollsynthetisches Vakzin müsste demnach neben den tumorassoziierten Kohlenhydratepitopen, T_N, T, Sialyl-T_N oder Sialyl-T, auch die *tandem-repeat*-Sequenz des MUC1 enthalten,^[40,41] um neben einer gezielten Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen auch die von T-Helferzellen vermittelte Produktion von

Antikörpern durch B-Lymphozyten herbeizuführen. Allerdings zeichnen sich Kohlenhydrat- bzw. Glycopeptid-Antigene durch ihre geringe Immunogenität aus, so dass eine Anbindung dieser Haptene an ein stark immunogenes Carrier-Protein oder einer entsprechenden Peptidsequenz notwendig wird, um T-Zellen zu stimulieren.^[8] In jüngster Zeit konnte nun auch in immunologischen Studien gezeigt werden, dass dieser Ansatz zur Verwendung vollsynthetischer Vakzine ein vielversprechender ist. So konnte die Arbeitsgruppe KUNZ nachweisen,^[42] dass eine Induktion spezifischer Antikörper in transgenen Mäusen auf Basis von MUC1-Glycopeptiden erzielt werden kann. Unabdingbar für solche Immunsierungen ist aber eine hohe Strukturhomogenität, wie sie nur durch Glycopeptidtotalsynthesen erreicht werden kann.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz die humorale Immunantwort zu verstärken geht von einer multivalenten Präsentation der Haptene aus. Hierzu finden sich verschiedenste Herangehensweisen in der Literatur. Während in der Arbeitsgruppe DUMY zyklische Decapeptide^[43,44] hergestellt wurden, die tetravalent über Lysinseitenketten mit verschiedenen Kohlenhydrat-Antigenen verbunden sind, erreichte die Arbeitsgruppe um KUNZ starke Immunantworten in Abwesenheit eines Carrier-Proteins durch Einsatz eines MUC1-antigenpräsentierenden Dendrimers^[45] mit einer Di-Lysyl-Lysin-Kernstruktur. Eine andere Variante, um eine multivalente Präsentation zu erreichen und somit die Fusion an ein Carrier-Protein zu umgehen, stellt die kovalente Anbindung der Haptene an Nanopartikel dar. BAEK et al. beschrieben das kovalente Anbringen von T-Antigenen an Polystyrol-Partikel^[46] und erreichten mit diesem Konzept in ersten Impfstudien hohe Antikörpertiter in Mäusen. Daneben ist aber auch das Anbringen tumorassoziierter Antigene an Metallnanopartikel,^[47] wobei vor allem Goldnanopartikel zum Einsatz kommen, möglich. Von SUNDGREN et al. ist eine Weiterentwicklung, die Anbindung immunogen wirkender MUC4-Glycopeptidsequenzen an Goldnanopartikeln mit Durchmessern von 4.5 bis 9 nm, beschrieben worden.^[48] Ein Vorteil in der Verwendung von Gold liegt darin, dass auf relativ einfachem Weg engdefinierte Nanopartikelgrößen herzustellen sind, die mit organischen Liganden funktionalisiert sind.^[49] Dabei verfügen die funktionalisierten Partikel über die physikalischen Eigenschaften ihrer nanoskaligen Kerne, während die chemischen Eigenschaften nur durch ihre organische Hülle bestimmt werden. Jedoch ist die Verteilung der Antigene auf der Oberfläche der Nanopartikel rein statistischer Natur und eine dynamische Anordnung in Domänen, wie bei natürlichen Zellen, ist nicht möglich.

Biologisch aktive Glycopeptide können aber auch, wie INGALE et al.^[50,51] zeigten, in modularen Synthesen an Lipopeptide gebunden werden, die in wässrigen Lösungen liposomale Anordnungen liefern. Die Induktion von Antikörpern beruht in dieser Vakzinklasse auf die Aktivierung des Toll-like Rezeptor 2 (TLR2). Ohne zusätzliches T-Zell-Epitop kommt es daher im Gegensatz zu den Carrier-Protein-Vakzinen zur Ausbildung von IgM- und nicht von IgG-Antikörpern.^[52] Weiterhin zeigt sich in der Kombination von TLR2-Ligand und MUC1-Glycopeptidantigen, dass

die Antikörpertiter im Vergleich zu den MUC1-Tetanustoxoid-Vakzinen geringer ausfallen, dafür aber die Erkennung der Peptidkette und deren Konformation eine dominantere Rolle spielen.^[53]

Die räumliche Konzentration von tumorassoziierten Antigenen in liposomalen Anordnungen kann über das Entmischungsbestreben entsprechender Konjugate mit Perfluoralkyl-Membranankern in einer Lipidmatrix verstärkt werden. Außerdem wird dadurch die unspezifische Aggregation der Liposome an Membranen minimiert. Die Arbeitsgruppen um GEGER und SCHMIDT^[54] wiesen bereits in einer Lipidmatrix nach, dass sich Sialyl-Lewis^X-Antigen tragende Glycolipide mit fluorierten Alkylankern entmischen. Durch Variationen in diesem System, in erster Linie durch veränderten Zusatz von fluorierten und nicht-fluorierten Matrixlipiden, waren sie in der Lage, Größe und Verteilung der Mikrodomänen zu beeinflussen.^[55] Die theoretische Grundlage dieser Überlegungen finden sich in der Organisation von Plasmamembranen wieder, welche im Folgenden näher betrachtet werden sollen.

1.4 Die Organisation der Plasmamembran

Das von SINGER und NICOLSON publizierte klassische *fluid mosaic*-Modell^[56] der Plasmamembran, nach welchem eine Membran aus einer homogenen, zweidimensionalen Doppelschicht aus Lipiden besteht, in der sich Membranproteine frei bewegen können, wurde in den letzten Jahren stark verfeinert. So stellte man fest, dass Membranen keine homogenen Schichten aus Proteinen und Lipiden ausbilden, sondern in diskreten Regionen vorliegen, die durch unterschiedliche Protein-Lipid-Zusammensetzungen gekennzeichnet sind (vgl. Abbildung 1.5).

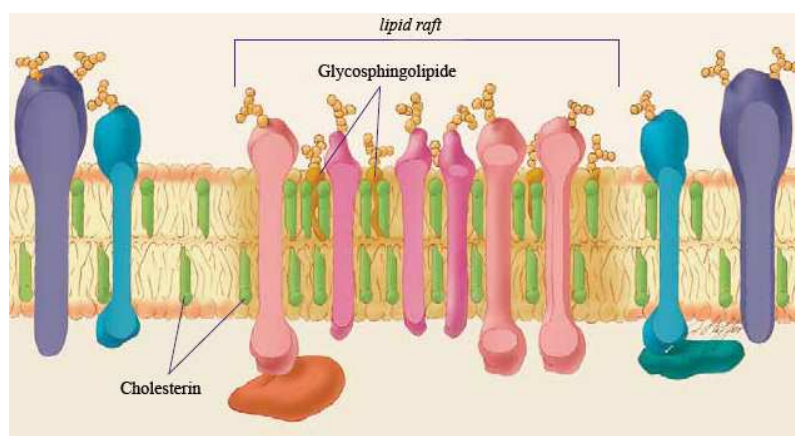


Abbildung 1.5: Struktur einer Plasmamembran mit raft-Domäne.^[57]

Die mit Glycosphingolipiden, Gangliosiden und Cholesterin angereicherten Bereiche werden *lipid rafts* genannt und bilden heterogene sehr mobile Mikrodomänen.^[58] Durch eine stärkere

Ausrichtung der gesättigten Alkylketten der Phospholipide innerhalb der *rafts* können diese eine dichtere Packung zu den Fettsäureseitenketten der Sphingolipide eingehen. Der resultierende punktuelle Dichteanstieg im Vergleich zur umgebenden Membran führt zu einer lateralen Phasenseparation. Intern sind die *rafts* aufgrund eines höheren Cholesterin-Anteils weniger beweglich, besitzen aber insgesamt trotzdem eine hohe laterale Dynamik.^[59]

Aufgrund der Tatsache, dass viele für eine Signalauslösung verantwortlichen Moleküle permanent innerhalb der *rafts* lokalisiert sind, sich in diesen anreichern und dort eine komplexe Signalauslösung verursachen, gelten *raft*-Domänen als Schlüsselbereiche für eine Vielzahl zellulärer Prozesse innerhalb der Signaltransduktion,^[60,61] der pathogenen Invasion,^[62] der zellulären Sekretion^[63] oder der Immunantwort.^[64] So wird die extrazelluläre Stimulation durch einen lokalen Konzentrationsanstieg vereinfacht und beschleunigt. Die Steuerung von Größe und Ausdehnung der *raft*-Domänen dürfte eine wichtige Rolle in der Kontrolle ihrer Funktionen spielen. So besitzen *rafts* im Ruhezustand einen geringen lateralen Flächenanspruch, der aber nach externer Aktivierung durch Clusterung anwächst und dadurch eine Interaktion gleichartiger Proteine ermöglicht.^[59,65]

Somit besteht ein großes Interesse, natürliche Membranen mit ihren hochfunktionellen Kompartimenten besser zu ergründen, um so z. B. die Prozesse der Autoimmunantwort^[66] zu untersuchen. Mit Hilfe von Membranmodellen bzw. synthetischen Membranen wird daher versucht, die erhöhte Aktivität von Membranproteinen in den *raft*-Domänen durch lokale Konzentration zu imitieren, wobei ein vielversprechender Ansatz auf der Verwendung von perfluorierten Membranankern und deren Phasenseparationstendenz beruht^[67] (vgl. Kapitel 1.3).

In einer künstlichen Strukturierung solcher zweidimensionaler Schichten könnten somit gezielt immunogene Glykokonjugate eingebaut und deren Immunantwort untersucht werden. Als mögliche funktionelle Kopfgruppen kämen Mucin-analoge Glycopeptide (vgl. Abbildung 1.3) in Frage, die sich, mit perfluorierten Membranankern ausgestattet, in ähnlichen *raft*-Bereichen konzentrieren würden. Eine solche Aggregation hätte eine multivalente Präsentation der angebundenen Antigenstrukturen zur Folge, welche sich als essentiell für die Aktivierung des Immunsystems herausgestellt hat.

1.5 Physikalische Eigenschaften fluororganischer Verbindungen

Die hohe Elektronegativität bei gleichzeitiger moderater Größe und einer damit verbundenen geringen Polarisierbarkeit des Fluors sind die Haupteigenschaften, aus denen die besonderen physikalischen Eigenheiten des Fluoratoms resultieren.^[68] Bei einem van der Waals-Radius von

1.47 Å ist der Unterschied zwischen einem Fluoratom und einem Wasserstoffatom mit 1.20 Å sowie einer Hydroxylgruppe mit 1.40 Å nicht besonders groß, so dass keine sterischen, repulsiven Wechselwirkungen vorliegen und ein bioisosteres Verhalten beobachtet wird. Aufgrund dessen ist die Einbringung eines stabilisierend wirkenden Fluoratoms in biologisch aktive Moleküle ohne sterische Beeinflussung der zugrunde liegenden Struktur möglich.

Trotz einer sehr polaren C-F-Bindung sind Perfluoralkylderivate wenig polare Lösungsmittel. Die partielle Auslöschung der Dipolmomente in der Fluorkette sorgt für eine Abnahme der Polarität, weshalb sich auch eine sukzessive Veränderung der physikalischen Eigenschaften vom Perfluoralkan, über das semifluorierte Alkan hin zum reinen Kohlenwasserstoff feststellen lässt. In fluorierten aromatischen Ringen kommt ein weiterer Effekt hinzu, der in einer umgekehrten Ladungsverteilung im Vergleich zu den unsubstituierten Derivaten mündet. Die höchste Elektronendichte befindet sich jetzt in der σ -Ebene, die den Ring umgibt, und nicht mehr in der π -Ebene ober- und unterhalb des Ringes.

Hinweise auf geringe intermolekulare Wechselwirkungen bei gleichzeitig starken intramolekularen Kräften in Perfluoralkylverbindungen finden sich in Tabelle 1.1. So weist Perfluorhexan einen wesentlich niedrigeren Siedepunkt und eine erhöhte Flüchtigkeit gegenüber den teil- oder nicht-fluorierten Kohlenwasserstoffen auf. Auch die niedrige Oberflächenspannung, die im Vergleich zu anderen organischen Flüssigkeiten den geringsten Wert aufweist, spricht für schwache intermolekulare Wechselwirkungen. Die Ausbildung einer fluorigen Phase, die weder in organischen noch in wässrigen Medien löslich sind, ergibt sich schließlich ebenfalls als Konsequenz aus der geringen Polarisierbarkeit.

Tabelle 1.1: Vergleich physikalischer Eigenschaften von Fluoralkylen.^[68]

Eigenschaft		C ₆ F ₁₄	F ₃ C(CF ₂) ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	C ₆ H ₁₄
Siedepunkt	K _p [°C]	57	64	69
Verdampfungsenthalpie	ΔH_v [kcal mol ⁻¹]	6.7	7.9	6.9
kritische Temperatur	T _c [°C]	174	200	235
Dichte	d ²⁵ [g m ⁻³]	1.672	1.265	0.655
Viskosität	η^{25} [cP]	0.66	0.48	0.29
Oberflächenspannung	γ^{25} [dyn cm ⁻¹]	11.4	14.3	17.9
Dielektrizitätskonstante	ϵ	1.69	5.99	1.89

Vergleicht man die Struktur von Perfluoralkylverbindungen mit der reiner Kohlenwasserstoffe, lassen sich erstaunliche Unterschiede feststellen. Während Alkylketten in einer Zickzack-Konformation vorliegen (antiperiplanare Anordnung der CH₂-Gruppen) und die Kohlenstoffkette

relativ beweglich ist, liegen Fluoralkyle in einer helicalen, starren, stabförmigen Struktur vor. Dieses wird durch sterische Repulsion der harten Fluoratome, der in 1,3-Position zueinander befindlichen CF_2 -Gruppen hervorgerufen^[69] (vgl. Abbildung 1.6).

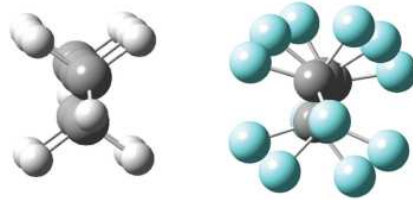


Abbildung 1.6: Gegenüberstellung der gestaffelten Konformation von Pentan (links) mit der helicalen, um 17° verdrehten Struktur des Perfluorpentans (rechts).^[70]

Diesem Effekt liegt die in Tabelle 1.2 aufgeführte unterschiedliche *gauche/trans*-Energie einer F-Kette von 4.6 kJ mol^{-1} gegenüber der eines reinen Kohlenwasserstoffs von 2.0 kJ mol^{-1} zugrunde.^[71] Eine weitere direkte Konsequenz ist der erhöhte Raumanpruch der Perfluoralkylketten im Vergleich zu ihren wasserstoffhaltigen Analoga, ersichtlich aus den Zahlen für Querschnitt und Volumen. Als Faustregel lässt sich ableiten, dass der Raumanpruch der Perfluoralkylkette ungefähr das Anderthalbfache der entsprechenden Alkylkette ausmacht.^[72]

Tabelle 1.2: Vergleich des Raumanpruchs von H- und F-Alkylen.

Strukturelement	Querschnitt [Å ²]	Volumen [Å ³]	<i>gauche/trans</i> -Energie [kJ mol ⁻¹]
F-Alkyl	30	$\text{CF}_2 = 38, \text{CF}_3 = 92$	4.6
H-Alkyl	20	$\text{CH}_2 = 27, \text{CH}_3 = 54$	2.0

Die im oberen Abschnitt beschriebenen nicht-kovalenten, reversiblen hydrophoben Wechselwirkungen, bei gleichzeitig nicht zu vernachlässigenden Lipophobie der Perfluoralkylketten, stellen eine hohe Triebkraft zur Selbstaggregation von Fluor-Amphiphilen in Filme, Membranen, Mizellen, Vesikeln und anderen stabilen, oft nanostrukturierten supramolekularen Konstrukten dar.^[73,74] Bedingt durch die Hydrophobizität haben Fluorketten eine starke Neigung sich an der Wasser-Luft-Grenzfläche rechtwinklig zur Wasseroberfläche auszurichten. Dies wird bei der Auftragung von Langmuir-Blodgett-Filmen verwendet, um entsprechende Monoschichten zu untersuchen.^[75] Ihre wesentliche Anwendung im medizinischen Bereich erfahren die fluorierten Amphiphile derzeit vor allem als Wirkstoff-Carrier.^[76]

Die physiologischen Eigenschaften dieser Verbindungen sind weitgehend unbedenklich. Der Grund liegt in den starken intramolekularen Kräften, einer um ungefähr 75 kJ mol^{-1} stärkeren Kohlenstoff-Fluor-Bindung im Vergleich zur Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindung, und der damit einhergehenden thermischen und chemischen Stabilität. Ihre Reaktivität ist vergleichbar mit der von Edelgasen, so dass sie vom Körper nicht metabolisiert werden.^[68] In einer Studie zeigte sich darüber hinaus, dass Perfluoralkylketten bis zu einer Kettenlänge von C_{13} zytotoxisch unbedenklich sind, da es zu keiner Einlagerung in die Membranen kommt. Erst ab Kettenlängen zwischen C_{14} und C_{17} findet eine deutlichere Wechselwirkung mit den Membranlipiden statt, woraus eine erhöhte Toxizität dieser Verbindungen hervorgeht.^[77]

1.6 Fluorierte Microarrays

Microarray basierende Technologien sind in der Genomik, Proteomik und inzwischen auch in der Glycomik weit verbreitet, um die Funktion von Nukleinsäuren, Proteinen und Kohlenhydraten zu untersuchen. Sie erlauben das schnelle Auffinden möglicher Bindungspartner für diese Biomoleküle mit geringen Mengen von Analyt und Liganden bei gleichzeitig geringen Kosten, so dass sie herkömmlichen Screening-Methoden mit Mehrkavitätenplatten überlegen sind. Gerade im Bereich der Kohlenhydrate ermöglicht die multivalente Darstellung der Liganden auf einer Oberfläche den Nachweis der relativ schwachen Wechselwirkungen dieser Verbindungen durch Nachahmen einer Zell-Zell-Schnittstelle. Darüber hinaus bieten sie noch weitere Anwendungsmöglichkeiten wie das schnelle Bestimmen der Bindungsprofile von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, der Charakterisierung von Kohlenhydrat-Zell-Erkennungsprozessen, dem Hochdurchsatz-Screening von Inhibitoren, um Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zu unterbinden oder dem Auffinden von spezifischen Antikörpern für die Diagnose von Krankheiten.^[78]

Die Immobilisierung an Oberflächen kann über eine kovalente oder eine nicht-kovalente Anbindung erfolgen. Das kovalente Anbringen auf einen Glaträger kann z. B. durch Bindungsbildung zwischen einer Maleinimid-funktionalisierten Platte und einem Thiol-tragenden Molekül,^[79] zwischen einem Amin-funktionalisierten Molekül und einer *N*-Acylloxysuccinimid-aktivierten Glasplatte^[80] oder mithilfe einer Cu(I)-vermittelten 1,3-dipolaren Huisgen Cycloaddition^[81] erfolgen. Von Nachteil ist bei dieser Immobilisierungsart die Tatsache, dass die Bedingungen für die kovalente Bindungsbildung jeweils neu optimiert werden müssen und anschließend die Ausbeute quantifiziert werden muss, um die Konzentration der zu untersuchenden Moleküle zu ermitteln. Außerdem muss stets eine geeignete reaktive Gruppe in das zu untersuchende Molekül eingeführt werden.

Im Gegensatz dazu sollten bei der nicht-kovalenten Technik die auf der Plattenoberfläche gebundenen Moleküle flexibler sein und im Hinblick auf kooperative Effekte bzw. gegenseitige Wechselwirkungsphänomene eine optimale Bindung mit Protein, Antikörper oder Enzym ermöglichen. Auch in diesem Fall existieren verschiedene Techniken zur Immobilisierung, wobei vor allem die Anhaftung von Lipid-enthaltenen Molekülen auf Nitrocellulose,^[82] die Immobilisierung über einen komplementären DNA-Strang^[83] und eben die Ausnutzung der hydrophoben Wechselwirkungen fluoriertes Glasoberflächen und Fluoralkylketten-tragender Verbindungen^[84,85,86,87] zu nennen sind. Die wesentlichen Vorteile dieser letztgenannten Methodik bestehen darin, dass nach der Immobilisierung kein zusätzlicher Schritt für die Blockierung der Oberfläche notwendig ist, dass hohe Signal-zu-Rausch-Verhältnisse erreicht werden können und dass die Möglichkeit besteht, durch Waschen mit organischen Lösungsmitteln die verwendeten Platten zu recyceln. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass sogar der Einsatz von Detergentien in den Pufferlösungen des Screenings diese nicht-kovalenten Wechselwirkungen nicht vollständig aufhebt.^[85]

Von besonderem Interesse in der Krebsforschung ist der Einsatz dieser Microarray-Systeme als diagnostisches Instrument für die Erkennung und Untersuchung spezifischer Antikörper-Antworten. Dies ist schematisch in Abbildung 1.7 dargestellt. Die mit dem Auftreten der Krankheit assoziierten Kohlenhydrat-Antigene können nicht-kovalent auf fluorierten Glasträgern immobilisiert und mit entsprechenden Seren von Patienten inkubiert werden. Die Visualisierung erfolgt anschließend über Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper und ermöglicht neben dem Nachweis der Antikörper auch Einblick in die Struktur der gebundenen Haptene.^[88]

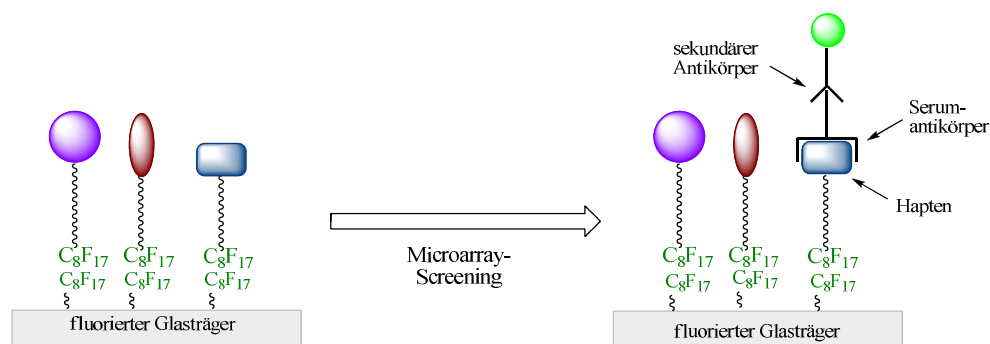


Abbildung 1.7: Anwendung von Fluor-basierenden Microarrays zur Detektion spezifischer Antikörper.

Darüber hinaus sollte das bereits erwähnte sehr gute Signal zu Rausch-Verhältnis, hervorgerufen durch die relativ unreaktive Fluoroberfläche, die Entwicklung neuer, massenspektroskopisch abhängiger Methoden für die Charakterisierung von Protein- und Antikörperbindungen ohne Fluoreszenzmarker ermöglichen.^[89]

2 ZIELSETZUNG

Eine Vielzahl essentieller Erkennungsprozesse, z. B. der Immunantwort oder der Signaltransduktion, finden in segregierten Mikrodomänen innerhalb der natürlichen Membran statt. Die gleichzeitige Verstärkung und Beschleunigung dieser natürlichen Erkennungsprozesse wird über eine multiple Präsentation in genau diesen Bereichen erreicht. Daher ist es von großem Interesse, die zu Grunde liegenden Mechanismen zu verstehen, um sie für medizinische Anwendungen nutzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb zunächst eine kleine Substanzbibliothek von perfluoralkylfunktionalisierten Glycopeptidantigenen synthetisiert werden, um diese in multivalenter Form für die Entwicklung einer aktiven Immuntherapie von Krebs einzusetzen. Für ein clusterfähiges Ankersystem mit einer 20er-Peptidsequenz wird die Hydrophobizität der bei relativ kleinen Kopfgruppen verwendeten einkettigen Perfluoralkyle nicht ausreichen, so dass Systeme entwickelt werden sollen, die eine Anbringung von zwei Perfluoralkylketten ermöglichen. Als Grundstrukturen für solche Systeme eignen sich die Aminosäure Lysin bzw. das Glycerin. Durch Variation in der Kettenlänge der Fluoralkyle, wie sie für die Verbindungen basierend auf Glycerin vorgenommen werden soll, und durch den Einbau einer unterschiedlichen Anzahl fluorierter Ketten, was bei der Synthese der Lysinstrukturen realisierbar ist, lässt sich deren Entmischungstendenz in Matrixlipiden beeinflussen. Die Auswirkungen in der Änderung des Fluorierungsgrades auf ihr Phasenverhalten sollen zunächst für kleinere Strukturen unter Auslassung der Peptidsequenz untersucht werden (Abbildung 2.1).

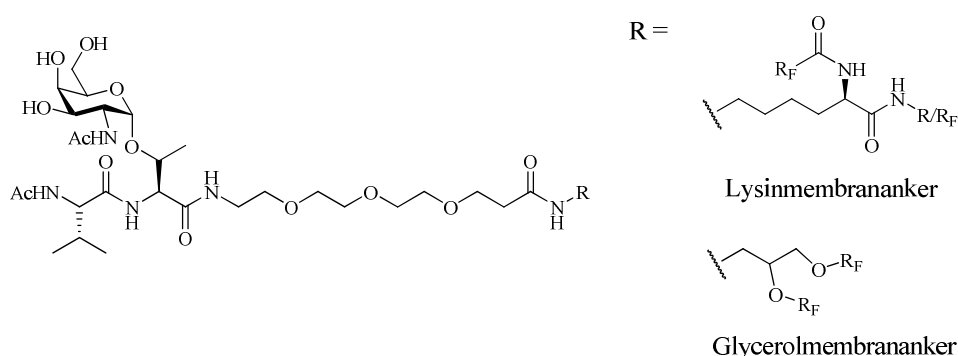


Abbildung 2.1: Dipeptidisches T_N -Konjugat mit verschiedenen Membranankersystemen.

Dabei soll es sich zum einen um Verbindungen handeln, die sich aus den zweikettigen perfluoralkylierten Membranankern und einem hydrophilen Triethylenglycolamin als Kopfgruppe zusammensetzen, zum anderen sollen diese Strukturen um ein tumorassoziiertes T_N -

Kohlenhydratantigen an der hydrophilen Kopfgruppe erweitert sein, um bereits eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zum späteren Peptid zu erhalten. Der hydrophile Triethylglycolspacer erfüllt in diesen Konjugaten eine weitere Aufgabe und dient nun auch zur Vermeidung einer konformellen Inhibition im Bereich der Mikrodomänen, indem er eine räumliche Distanz zwischen der phasenseparierten Membran und dem tumorassoziierten Kohlenhydratantigen aufbaut.

Diese amphiphilen antigenen Zielstrukturen sollen zunächst in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. ZENTEL am Institut für Organische Chemie der Universität Mainz im Hinblick auf die Ausbildung mikroseparierter Bereiche in lateral ausgedehnten Lipidmembranen untersucht werden (vgl. Abbildung 2.2). In späteren Arbeiten sollen zudem entsprechende vesikuläre Vakzinvorläufer, die eine Mehrfachpräsentation der immunogenen Erkennungsstrukturen in solchen entmischten Bereichen (Cluster/Patch) tragen, hergestellt und immunologischen Untersuchungen unterworfen werden.

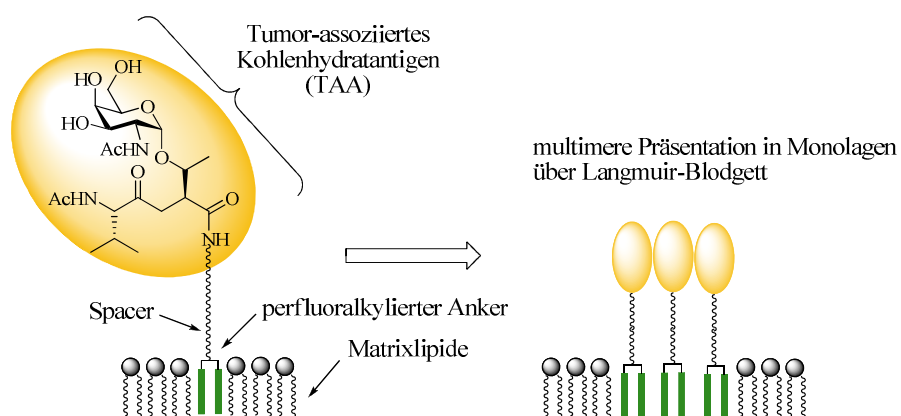


Abbildung 2.2: Multivalente Aggregation zu entmischten Domänen der tumorassoziierten Kohlenhydratantigene (TAA) in der Lipidmembran.

Um die genannten Strukturen für die Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen oder Microarrays nutzen zu können, müssen für Tumorzellen typische Zelloberflächenstrukturen als Haptene präsentiert werden. Die Isolierung von Kohlenhydratantigenen aus Tumorzellisolaten führt aufgrund der Mikroheterogenität der Zelloberflächenglycoproteine lediglich zu strukturell uneinheitlichen Verbindungen, weshalb nur ein totalsynthetisch hergestelltes Oberflächenglycopeptid die für Immunisierungsstudien notwendigen Anforderungen an Reinheit und strukturelle Eindeutigkeit erfüllt. Als Zielstrukturen sollen dabei exakt definierte, tumorassoziierte Glycopeptidantigene aus der extrazellulären, repetitiven Sequenz des epithelialen Mucins MUC1 herangezogen werden. Die Verknüpfung der Antigene mit den zuvor synthetisierten perfluorierten Membranankern soll durch eine Anordnung der Haptene in Form von funktionellen Domänen zu einer Imitation von Tumorzelloberflächen führen. Im Idealfall wären diese Konstrukte

immunogen genug, um eine geeignete Vakzine darzustellen und somit eine Konjugation an Carrier-Proteine überflüssig zu machen. Darüber hinaus könnten die synthetisierten Moleküle in weiteren Arbeiten als Grundlage für die Entwicklung diagnostischer Microarrays basierend auf nicht-kovalenten Fluor-Fluor-Wechselwirkungen dienen.

Die zu synthetisierenden Peptidsequenzen bestehen aus den 20 Aminosäuren der vollständigen Konsensussequenz der *tandem repeat*-Einheiten des MUC1, in welcher das dem *N*-Terminus nächstgelegene Threonin glycosyliert vorliegt, während die immundominante Domäne *PDTRP* keine Kohlenhydratseitenkette trägt.

In die Peptidsequenzen sollen die in der Einleitung beschriebenen tumorassoziierten Kohlenhydratantigene T_N -Antigen, T-Antigen und Sialyl- T_N -Antigen eingebaut werden. In Abbildung 2.3 sind die Strukturen zur Verdeutlichung dargestellt.

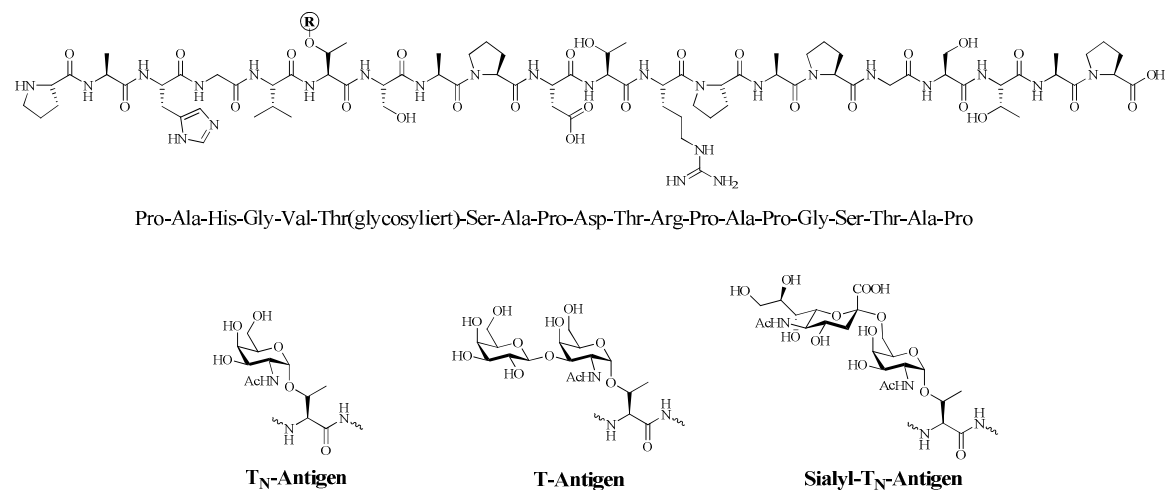


Abbildung 2.3: Darstellung der extrazellulären Wiederholungseinheit des MUC1 und Übersicht über die zu synthetisierenden tumorassoziierten Antigenstrukturen.

Der abschließende Schritt beinhaltet eine Verknüpfung der synthetisierten Glycopeptide in geeigneter Weise mit denjenigen Membranankersystemen, für die ein günstiges Entmischungsverhalten in den vorangehenden Modellstudien nachgewiesen werden konnte, um die bereits beschriebene Imitation von Tumorzelloberflächen durch eine multivalente Anordnung dieser Glycolipopeptide zu erreichen.

3 SYNTHESEPLANUNG

Die Syntheseplanung der zweikettigen perfluorierten Amphiphile erfolgte nach einem modularen Konzept, nach dem ein zur Selbstorganisation unter Ausbildung von Mizellen, Vesikeln, Röhren oder weiterer komplexerer Strukturen neigendes Amphiphil aus Schwanz, Verbindungsstück, Abstandshalter und Kopf besteht.^[90,91] Das Verbindungsstück muss in diesen Strukturen eine parallele Ausrichtung der Perfluoralkylketten ermöglichen.

Daher wurde in Anlehnung an natürliche Fettsäuren ein Grundgerüst, basierend auf Glycerin, gewählt. Weil in der weiteren Synthesestrategie eine Anbindung über den C-Terminus des Peptidteils erfolgen soll, muss selektiv eine der Hydroxyfunktionen in ein Amin überführt werden. Anschließend stehen die beiden übrigen Hydroxygruppen für die Anbindung verschieden langer Perfluoralkylketten zur Verfügung (vgl. Abbildung 3.1).

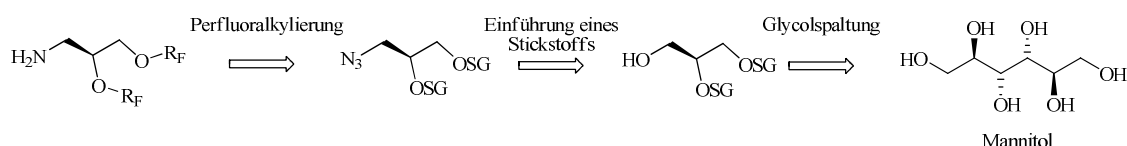


Abbildung 3.1: Retrosynthese des Glycerolsystems.

Das zweite Ankersystem basiert auf einem Lysin Kern, da in diesem bereits das ϵ -Amin zur späteren Anbindung an ein Peptid zur Verfügung steht. Ausgehend von einem orthogonal geschützten Lysin können selektiv sowohl Alkyl- als auch Perfluoralkylketten eingeführt werden. Die Verknüpfung erfolgt in diesem Fall anhand von Amidbindungen, wozu eine Reihe von Kupplungsbedingungen zur Verfügung stehen (vgl. Abbildung 3.2).

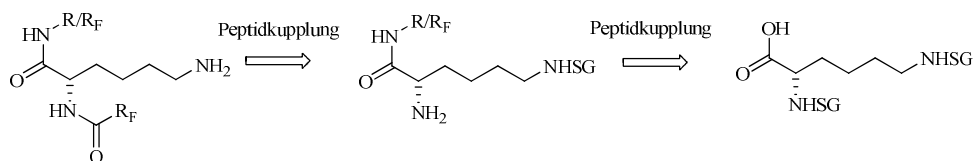


Abbildung 3.2: Retrosynthese des Lysinsystems.

Im weiteren Syntheseverlauf sollen die dargestellten Membranankersysteme über die vorhandene freie Aminfunktion in einer Peptidkupplung an einen flexiblen Triethylglycolspacer geknüpft werden. Die dabei erhaltenen Konstrukte sollen als Bausteine für alle folgenden Umsetzungen dienen.

So ist zum einen die Anbindung über den C-Terminus an ein in Lösung hergestelltes Dipeptid, bestehend aus einem acetylierten Valin und einem mit *N*-Acetylgalactosamin glycosylierten Threonin, geplant. Die dabei resultierenden, in Abbildung 2.1 gezeigten, Verbindungen sollen in Langmuir-Blodgett-Studien hinsichtlich ihrer Segregationseigenschaften untersucht werden. Darüber hinaus besteht aber auch die Möglichkeit, durch Fragmentkondensation der an fester Phase synthetisierten kompletten *tandem-repeat*-Einheit aus der MUC1-Sequenz mit den entsprechenden Membranankersystemen, Glycopeptid-Konjugate aufzubauen (Abbildung 3.3).

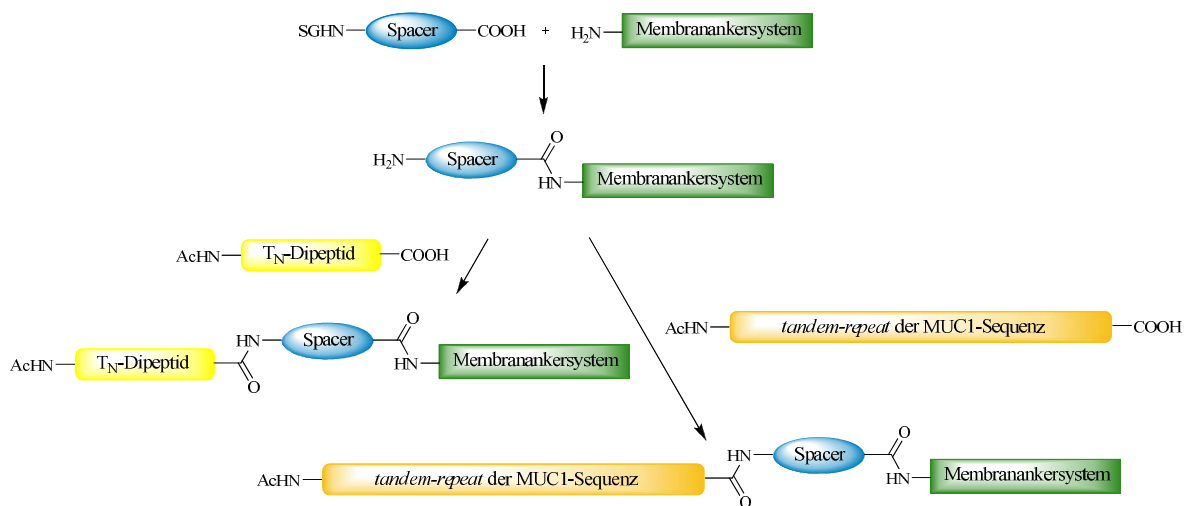


Abbildung 3.3: Vereinfachtes Schema zur Darstellung der Glycolipopeptide.

Um eine Fragmentkondensation der noch vollständig blockierten *tandem-repeat*-Sequenz mit dem um eine Triethylenglycoleinheit verlängerten Membranankersystem zu ermöglichen, muss in der Festphasensynthese der fluoridlabile PTMSEL ((Phenyl-2-trimethylsilyl)ethyl)-Linker eingesetzt werden, da sich dieser mild durch die Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat in Dichlormethan eliminieren lässt und so alle üblicherweise in der Peptidchemie eingesetzten Schutzgruppen intakt bleiben.

4 ALLGEMEINER TEIL

Entsprechend der Zielsetzung werden alle für den Aufbau der Glycopeptidstrukturen benötigten Bausteine, einschließlich der fluorierten Membranankersysteme, der Spacermoleküle und der Glycosylaminosäuren, zunächst einzeln in mehrstufigen Synthesen hergestellt. Anschließend werden diese Bausteine entweder in Lösung oder mithilfe der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zu den entsprechenden Konjugaten zusammengefügt.

4.1 Synthese des Glycerolankersystems

4.1.1 Synthese des Glycerolkerns

In Anlehnung an natürlich vorkommende Triacylglycerin-Fette wurde als Kernstruktur des ersten Ankersystems das Propan-1,2,3-triol gewählt. Die Synthese des *S*-konfigurierten Isopropylidengeschützten Derivates **3** geht unter Ausnutzung des *chiral pools* von D-Mannitol **1** aus (Abbildung 4.1).

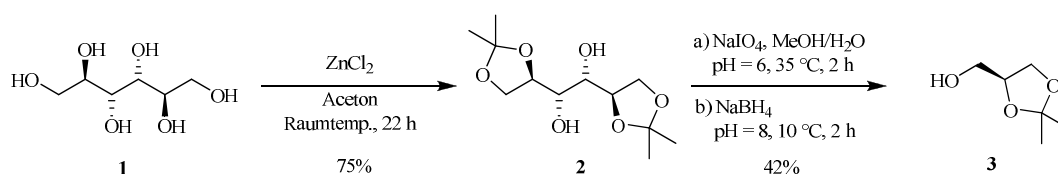


Abbildung 4.1: Synthese des (*S*)-2,3-O-Isopropylidenglycerols ausgehend von D-Mannitol.

Im ersten Schritt erfolgt eine von Zinkchlorid vermittelte selektive Acetalisierung zum 1,2:5,6-Diisopropylidenglycerol **2**.^[92] Dabei wird unter den relativ milden Bedingungen zunächst das 1,2-Acetal gebildet, wobei dessen Bildung aufgrund der begrenzten Löslichkeit von D-Mannitol **1** in Aceton der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein scheint. In einer darauffolgenden schnellen Reaktion erfolgt die Bildung des Diacetals bevorzugt zum gewünschten Produkt **2**. Die ebenfalls denkbaren relativ leicht entstehenden 1,3-Dioxepan-Ringe spielen nur eine untergeordnete Rolle, da sie durch ihre hohe Säurelabilität unter den stark sauren Reaktionsbedingungen direkt wieder geöffnet werden. Und auch die langsame Weiterreaktion zu den Triacetalen kann durch rechtzeitigen Abbruch der Reaktion nach 22 h beschränkt werden, so dass nach Umkristallisation **2** mit 75% Ausbeute isoliert werden konnte.^[93]

Die Glycolspaltung wird bei einem pH-Wert von 6 mit Natriumperiodat durchgeführt, da der entstehende Aldehyd unter diesen Bedingungen stabil ist. Die Verwendung von Bleitetraacetat würde dagegen zur Freisetzung von Essigsäure führen, welche wiederum in der direkt nachfolgenden Reduktion zu einer teilweisen Racemisierung von **3** führen würde. Daher wird vor der Reduktion des Aldehyds mit Natriumborhydrid die Reaktionslösung mit Kaliumhydroxid auf einen pH-Wert von 8 gestellt. Der gebildete Alkohol **3** ist unter den basischen Bedingungen stabil, und eine Isomerisierung der Isopropyliden-Schutzgruppe unter Racemisierung wird verhindert.^[94]

Um die spätere Anbindung dieser Verbindung an den C-Terminus eines Peptides zu ermöglichen, muss die freie Hydroxygruppe in ein Amin überführt werden. Dies lässt sich gut durch nucleophile Einführung eines Azidrestes bewerkstelligen (Abbildung 4.2).^[95] Dabei wird **3** zunächst in das Mesylat **4** überführt, bevor diese Abgangsgruppe in einer weiteren S_N2-Reaktion durch ein Azidanion ersetzt wird. Zur Anwendung kommt hierbei ein Lösungsmittelgemisch aus *N,N'*-Dimethylformamid und Wasser, da in diesem die Löslichkeit des Natriumazids verbessert ist und somit eine höhere Reaktivität als bei der Verwendung von reinem *N,N'*-Dimethylformamid resultiert.

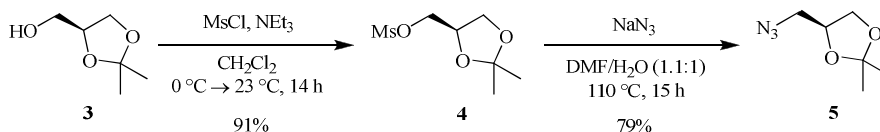


Abbildung 4.2: Synthese des Azidoglycerols **3**.

Verbindung **5** sollte nun reduziert und mit einer Cbz-Schutzgruppe versehen werden. Zu diesem Zweck wurde **5** mit Natriumsulfid-Nonahydrat in einem warmen Methanol/Wasser-Gemisch innerhalb von 21 h zum freien Amin **6** umgesetzt. Aufgrund der relativ geringen Reaktionszeiten erhielt dieses System den Vorzug gegenüber der deutlich langsamer ablaufenden katalytischen Hydrierung mit Pd/C in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre.^[95] Die nachfolgenden Reaktionen mit Chlorameisensäurebenzylester zum geschützten Amin^[96] verliefen ebenso wie das Entfernen der Isopropyliden-Schutzgruppe mit *para*-Toluolsulfonsäure^[97] zum Diol **7** glatt und in guten Ausbeuten (Abbildung 4.3).

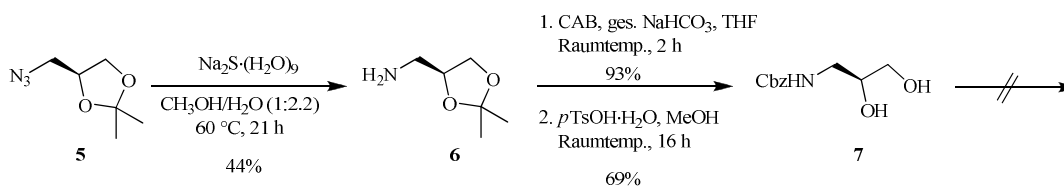


Abbildung 4.3: Schutzgruppenmanipulationen zu Verbindung **7**.

Allerdings führte die nun anstehende selektive Alkylierung der beiden Hydroxyfunktionen zu Problemen. Sowohl die Verwendung von Kalium-*tert*-butylat^[98] als Base, als auch der Gebrauch katalytischer Mengen von oxophilem Silberoxid^[99] führte jeweils zu komplexen Produktgemischen, die nur schwer flashchromatographisch zu reinigen waren. Die erhaltenen geringen Ausbeuten führten daher zu einem Umdenken in der Synthesestrategie.

So sollte nun die Azidgruppe in **5** aufgrund ihrer relativ hohen Stabilität als Schutzgruppe für die Aminfunktion fungieren. Folglich mussten für die in Abbildung 4.4 gezeigte Deblockierung der säurelabilen Acetonid-Schutzgruppe geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden.

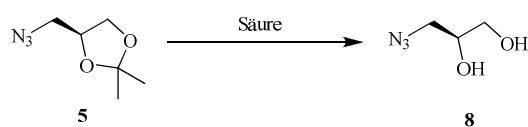


Abbildung 4.4: Isopropyliden-Deblockierung von **5**.

Für die direkte Isopropyliden-Deblockierung, die aufgrund der Azidfunktion nicht in zu saurem Milieu stattfinden darf, wurden neben der bereits in der Synthese von **7** verwendeten *para*-Toluolsulfonsäure auch die in Tabelle 4.1 aufgeführten Reagenzien untersucht.

Tabelle 4.1: Verschiedene getestete Reagenzien zur Isopropyliden-Deblockierung.

Nr.	Reagenzien	Lösungsmittel	Temp.	Dauer	Ausbeute
8	I ₂ , kat.	MeOH	Raumtemp.	24 h	–
8	1,3-Propandithiol, BF ₃ ·OEt ₂ ^{a)}	CH ₂ Cl ₂	0 °C	100 min	–
8	1,3-Propandithiol, BF ₃ ·OEt ₂ ^{b)}	CH ₂ Cl ₂	0 °C → 23 °C	15 h	94%
8	<i>p</i> -TsOH	MeOH	Raumtemp.	16 h	89%
8	PPTS	MeOH	60 °C	3 d	94%
8	NaHSO ₄ ·SiO ₂	CH ₂ Cl ₂ / <i>i</i> PrOH	Raumtemp.	4 d	28%

^{a)} wässrige Aufarbeitung

^{b)} Lyophilisation

Weder die Verwendung katalytischer Mengen an Iod^[100] noch die Lewis-Säure katalysierte Umacetalisierung mit 1,3-Propandithiol^[101] lieferten zunächst das Produkt. Dies lag vornehmlich jedoch nicht an der mangelnden Umsetzung von **5**, sondern vielmehr an der verwendeten Aufarbeitungsmethode. Da das Diol **8** sehr gut wasserlöslich ist, lässt es sich selbst bei mehrmaliger Extraktion kaum wieder in die organische Phase überführen. So konnte in einem optimierten Ansatz unter Verwendung von 1,3-Propandithiol und Bortrifluorid-Etherat als Lewis-Säure nach Ausschütteln mit Reinstwasser und anschließender Lyophilisation **8** mit 94%iger

Ausbeute erhalten werden. Für eine weniger geruchsintensive Deblockierung wurde auch wieder die klassische Methode über *para*-Toluolsulfonsäure^[97] versucht, die in einem ersten kleineren Ansatz ebenfalls eine sehr gute Ausbeute von 89% lieferte. Eine Vergrößerung des Reaktionsansatzes führte jedoch zu einer Verringerung der Ausbeute auf nur noch 39%. In einer milderen Variante dieser Deblockierungsmethode findet das Pyridiniumsalz der *para*-Toluolsulfonsäure (PPTS) als schwache Säure zur Acetalspaltung Verwendung,^[102] wodurch aber eine Erhöhung der Reaktionstemperatur und eine Verlängerung der Reaktionszeit notwendig wurde. Dennoch war es auch unter diesen Bedingungen möglich, **8** in sehr guter Ausbeute von 94% zu isolieren. Alternativ dazu wurde noch ein heterogenes Katalysatorsystem untersucht.^[103,104] Zu diesem Zweck wurde Natriumhydrogensulfat auf Kieselgel aufgezogen, welches anschließend in der Reaktion verwendet und nach Beendigung derselben einfach abfiltriert werden konnte. Jedoch zeigte sich, dass nach dieser Methode Verbindung **8** nur in 28% Ausbeute isolierbar war. Mittel der Wahl ist somit PPTS, mit welcher das Diol **8** in sehr guten Ausbeuten für den nachfolgenden Schlüsselschritt, der Einführung der fluorierten Alkylketten, erhalten werden konnte.

4.1.2 Einführung fluorierter Alkylketten am Glycerolkern

Für die Einführung fluorierter Alkylketten stehen radikalische, nucleophile und elektrophile Methoden zur Verfügung.^[68] Da es sich bei der umzusetzenden Verbindung um ein Diol handelt, würde eine elektrophile Perfluoralkylierung direkt zu den gewünschten Produkten führen. Häufigstes Reagenz für solche elektrophile Perfluoralkylierungen ist die von T. UMEMOTO eingeführte Perfluoralkylphenyliodoniumtrifluormethansulfonsäure (FITS),^[105] die eine Umsetzung von Kohlenstoffnucleophilen, Thiolaten und auch Natriumnitrit, jedoch nicht von Sauerstoffnucleophilen erlaubt.

Eine direkte Verwendung von Perfluoralkylhalogenen analog der Williamson-Ethersynthese führt ebenso wenig zu Perfluoralkylethern, sondern verläuft unter Reduktion des Halogens zum Fluorkohlenwasserstoff.^[106] Im Gegensatz dazu können Perfluoralkyliodide und -bromide sogar präparativ als elektrophile Iodierungs- und Bromierungsreagenzien eingesetzt werden,^[107] obgleich sich in der Literatur auch vereinzelt Beispiele für die elektrophile Einführung teilfluorierter Alkylketten an Sauerstoffnucleophile finden. Beispielsweise gelang der Arbeitsgruppe um N. L. POHL^[84] eine entsprechende Veretherung, wobei als Elektrophil 1-Iod-1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluordecan **14** zum Einsatz kam, während die Gruppe um M. MIZUNO^[108,109] für diesen Reaktionstyp auf ein teilfluoriertes Tosylat **13** unter Verwendung von Kronenethern zurückgriff.

Vor diesem Hintergrund sollten zur Herstellung von **15** neben den iodierten und tosylierten Fluoralkylketten auch das reaktivere Triflat eingesetzt werden. Während das teilfluorierte Iodid **14** kommerziell erhältlich ist, müssen sowohl Tosylat als auch Triflat nach literaturbekannten Vorschriften^[110,111] aus dem *1H,1H,2H,2H*-Perfluordecan-1-ol **9** hergestellt werden. Verbindung **11** lässt sich aus dem Trifluormethansulfonsäureanhydrid **10** mit Pyridin als Base in absolutem Dichlormethan mit 77% Ausbeute synthetisieren. Für die Darstellung des Tosylats **13** wird als aktivierte Spezies *p*-Toluolsulfonsäurechlorid **12** verwendet. Mit Triethylamin in absolutem Tetrahydrofuran werden 64% des gewünschten Produktes **13** erhalten (**Abbildung 4.5**).

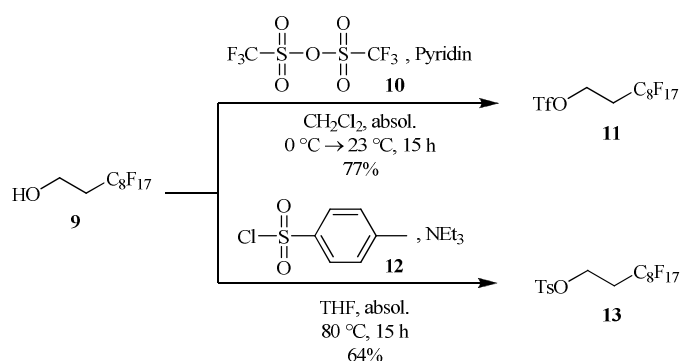


Abbildung 4.5: Darstellung des fluorierten Triflats **11** und des fluorierten Tosylats **13**.

Damit stehen die drei zu testenden Verbindungen **11**, **13**, und **14** für eine elektrophile Einführung von teilfluorierten Alkylketten analog zur Williamson-Ethersynthese nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus zur Verfügung (**Abbildung 4.6**).

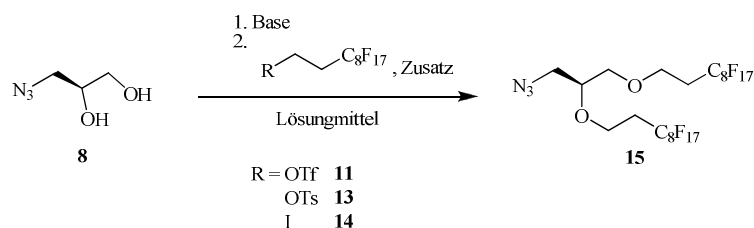


Abbildung 4.6: Elektrophile Einführung teilfluorierter Perfluoralkylketten.

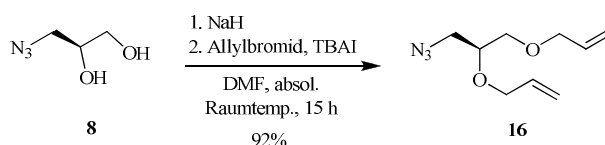
Eine genaue Aufstellung der verschiedenen getesteten Basen, Elektrophile und Zusätze für diese Umsetzungen, sowie die jeweils verwendeten Lösungsmittel, die Temperatur und die Reaktionsdauer sind in Tabelle 4.2 wiedergegeben, wobei jedoch alle diese Umsetzungen stets zum gleichen negativen Ergebnis führten.

Tabelle 4.2: Getestete Reaktionsbedingungen.

Nr.	Base	Elektrophil	Zusatz	Lösungsmittel	Temp.	Dauer	Ausbeute
15	KOH	14	TBAB	DMF, absol.	70 °C	4 h	–
15	NaH	14	–	DMF, absol.	70 °C	15 h	–
15	NaH	14	15-Krone-5	DMF, absol.	Raumtemp.	15 h	–
15	NaH	11	15-Krone-5	THF, absol.	Raumtemp.	15 h	–
15	NaH	13	15-Krone-5	THF, absol.	60 °C	5 h	–
15	NaH	13	15-Krone-5	THF, absol.	65 °C	15 h	–

Weder unter den Originalbedingungen aus der Arbeitsgruppe POHL (**14**, Kaliumhydroxid und Tetrabutylammoniumbromid), noch mit denen aus der Arbeitsgruppe MINZUNO (**13**, Natriumhydrid und 15-Krone-5) konnte die Bildung des Produktes **15** beobachtet werden. Auch die Kombination beider Verfahren unter Verwendung von 15-Krone-5 mit **14** als Elektrophil, bzw. eine Erhöhung der Reaktionstemperatur und –zeit brachten nicht den erhofften Erfolg. Bei der Verwendung des Triflats **11** wurde aus Stabilitätsgründen auf ein Erhitzen der Reaktionslösung verzichtet, obwohl bei Raumtemp. keine Produktbildung in nennenswertem Maßstab beobachtet wurde.

Infolgedessen wurde nach einer alternativen Strategie zur Einführung der Perfluoralkylketten gesucht. Eine robuste Methode hierfür stellt die radikalische Perfluoralkylierung von Doppelbindungssystemen dar. Die dazu erforderlichen Doppelbindungen lassen sich im Fall des Diols **8** durch Allylierung der beiden Hydroxyfunktionen leicht einführen. Nach Abbildung 4.7 erfolgte zunächst eine irreversible Deprotonierung beider Hydroxyfunktionen zum Dianion durch Natriumhydrid. Anschließend wurde mittels einer Finkelstein-Reaktion das Allylbromid durch Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) *in situ* ins reaktivere Allyliodid überführt, welches als Elektrophil fungierte und zur Bildung der diallylierten Verbindung **16** in einer hervorragenden Ausbeute von 92% führte.

**Abbildung 4.7:** Allylierung zur Vorstufe der radikalische Perfluoralkylierung.

Perfluoralkylhalogene, im speziellen die Iodide, sind in der Lage sich über eine Radikalreaktion an Verbindungen des Typs **16** zu addieren.^[112,113,114,115] Obwohl die Perfluoralkylradikale thermodynamisch nicht stabiler als Alkylradikale sind, zeigen sie doch eine höhere kinetische

Stabilität. So lässt sich in den meisten Fällen als einziger Terminierungsschritt eine Dimerisierung beobachten. Ein weiterer denkbarer Mechanismus zur Terminierung ist eine Radikaltransferreaktion, die mit einer Spaltung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff- oder einer Fluor-Kohlenstoff-Bindung verbunden wäre. Letztere besitzt jedoch eine hohe Aktivierungsenergie, weshalb dieser Reaktionspfad nur selten eingeschlagen wird. Darüber hinaus schirmen die sterisch anspruchsvolleren Fluoratome das Kohlenstoff-zentrierte Radikal ab und erhöhen so dessen Lebensdauer. Verantwortlich für Struktur und Reaktivität der Perfluoralkylradikale ist das Wechselspiel zwischen dem starkem σ -Akzeptor-Effekt und dem π -Donor-Effekt des Fluors. Aufgrund der Umkehr der elektrostatischen Teilladungen beim Wechsel von Wasserstoff- auf Fluorsubstituenten sind die Perfluoralkylradikale im Gegensatz zu ihren nicht-fluorierten Analoga keine nucleophilen Radikale, sondern elektrophile Radikale, wobei ihre Elektrophilie vom primären zum tertiären Radikal steigt.

Als Reaktionspartner dieser vornehmlich elektrophilen Spezies kommen entweder leicht polarisierbare, weiche σ -Elektronensysteme wie Thiolate, Selenide oder Phophite in Frage, oder elektronenreiche π -Systeme wie eben Olefine und einige aromatische Verbindungen. Die Initiierung der Radikale aus Perfluoralkyliodiden ist prinzipiell auf drei unterschiedliche Weisen möglich. Neben der thermischen oder photochemischen Aktivierung und der reduktiven Generierung von Radikalen, die elektrochemisch oder mittels chemischer Reduktionsmittel erfolgen kann, ist auch die Aktivierung durch Radikalinitiatoren wie Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN) möglich. Im Propagationsschritt kommt es dann zur anti-Markovnikov-Addition an das Olefin, so dass das stabilere Radikal entsteht. Dieses reagiert durch Abstraktion des Iods aus dem Perfluoralkyliodid zum Produkt und generiert gleichzeitig wieder ein Perfluoralkylradikal, welches von neuem in den Kreislauf der Radikalkettenreaktion eingreifen kann (Abbildung 4.8).

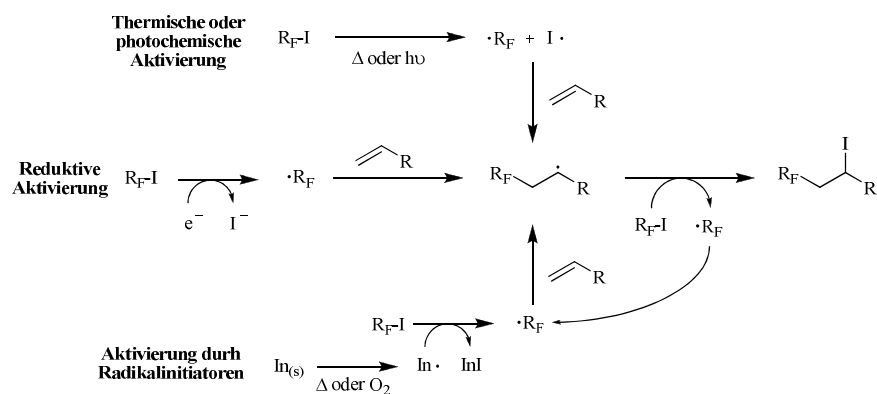


Abbildung 4.8: Aktivierungsmechanismen für Radikalkettenreaktionen ausgehend von Perfluoralkyliodiden.

In Abbildung 4.9 ist die durchzuführende radikalische Perfluoralkylierung für das umzusetzende Olefin **16** dargestellt. Dabei sollten geeignete Bedingungen für den Einbau einer perfluorierten Octylkette gefunden werden.

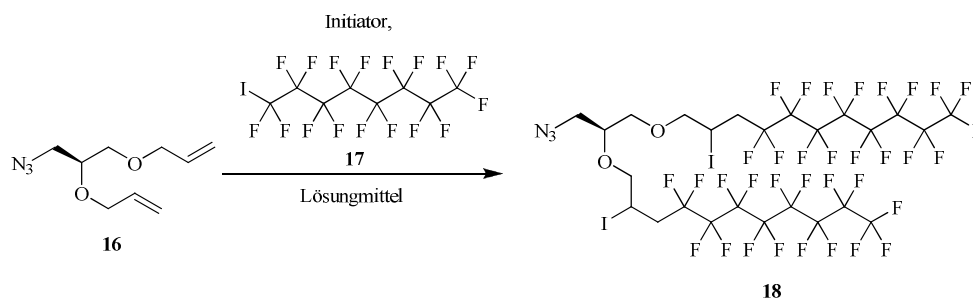


Abbildung 4.9: Zu optimierende radikalische Perfluoralkylierungsreaktion.

Die verschiedenen Initiatorsysteme zeigen sich hauptverantwortlich für das Gelingen der Reaktion, wobei sie unterschiedliche Bedingungen in Hinblick auf Lösungsmittel, Temperatur und Reaktionszeit erfordern. Die jeweiligen untersuchten Bedingungen sind in Tabelle 4.3 wiedergegeben.

Tabelle 4.3: Untersuchte Radikalstarter zur Initiierung der Perfluoralkylierung.

Nr.	Radikalstarter	Reagenz	Lösungsmittel	Temp.	Dauer	Ausbeute
18	AIBN, Spatelspitze 0 h	I-C ₈ F ₁₇	–	80 °C	3 h	13%
18	AIBN, Spatelspitze 0 h, 1 h	I-C ₈ F ₁₇	–	90 °C	4 h	30%
18	AIBN, Spatelspitze 0 h, 1 h, 2 h	I-C ₈ F ₁₇	–	90 °C	4 h	52%
18	AIBN/K ₂ S ₂ O ₅	I-C ₈ F ₁₇	H ₂ O	80°C	2 h	13%
18	BEt ₃ , O ₂	I-C ₈ F ₁₇	Hexan	Raumtemp.	4 h	82%
18	CuCl, Ethanolamin	I-C ₈ F ₁₇	<i>t</i> BuOH, absol.	100 °C	4 d	–
18	NaHCO ₃ /Na ₂ S ₂ O ₄	I-C ₈ F ₁₇	CH ₃ CN/H ₂ O	Raumtemp.	3 h	–

Wie sich herausstellte konnte nach reduktiver Generierung der Perfluoralkylradikale durch Kupferchlorid^[116] bzw. einem Natriumhydrogencarbonat/Natriumthiosulfat-System^[117,118,119] keine Produktbildung beobachtet werden und es wurde lediglich das Edukt zurückgewonnen. Erst der Einsatz von Radikalstartern führte zur Bildung von **18**. Die Verwendung einer Spatelspitze AIBN,^[120] welches direkt am Anfang der Reaktion hinzugegeben wurde, führte zu 13% Ausbeute, wobei der Zusatz von Kaliummetabisulfat^[121] als zusätzlichen Starter über eine zwischenzeitliche Bildung von Sulfinaten keine Verbesserung brachte. Weiterhin ließ sich beobachten, dass bei Zugabe einer weiteren Spatelspitze AIBN nach 1 h Reaktionszeit die Ausbeute auf 30% gesteigert werden konnte.^[122,123] Somit scheint eine Zugabe neuen Initiators für das Voranschreiten der

Reaktion von entscheidender Bedeutung zu sein. Wurde nach 2 h erneut eine Spatelspitze AIBN hinzugefügt, erhöhte sich die Ausbeute auf 52%. Darüber hinaus konnte jedoch keine weitere Steigerung erzielt werden.

Erst ein alternatives Radikalstartersystem führt zu einer höheren Ausbeute von **18**. Die Verwendung von Triethylboran,^[124,125,126] welches in Gegenwart von Sauerstoff zerfällt und so die Radikalkettenreaktion initiiert, lieferte schon bei Raumtemp. nach 4 h Reaktionszeit eine Ausbeute von 82% an **18**. Ein weiterer Vorteil dieser Methode beruht darauf, dass die Reaktion nicht mehr in Substanz, sondern in Lösung mit Hexan als Lösungsmittel abläuft, wodurch eine bessere Durchmischung der Reagenzien gegeben ist.

Mit dem aufgezeigten Zugang zu fluorierten, auf Glycerin basierenden Membranankern sollte nun die Länge der Perfluoralkylketten variiert werden. Wie Abbildung 4.10 zeigt sollten Verbindungen mit Perfluorhexyl-, Perfluoroctyl- und Perfluordecylketten synthetisiert werden.

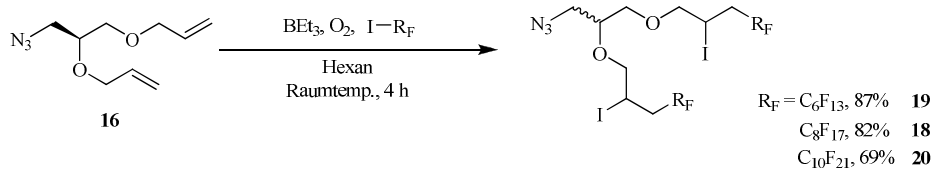


Abbildung 4.10: Synthese von Glycerolderivaten mit unterschiedlicher Kettenlänge.

Betrachtet man die hierbei erzielten Ausbeuten der Perfluoralkylierungsreaktion, so ist ein eindeutiger Trend erkennbar. Je kürzer die perfluorierte Kette ist, desto besser verläuft auch die Reaktion. So kommt bei der Synthese von **20** anstelle des flüssigen Perfluorhexyliodids bzw. Perfluoroctyliodids das feste Perfluordecyliodid zum Einsatz, welches bei der späteren Aufarbeitung nur schwer durch mehrmalige Kristallisation abzutrennen ist. Außerdem ist **20** im Gegensatz zu den beiden anderen Verbindungen in organischen Solventien deutlich schlechter löslich.

Ein genaueres Studium der ¹³C-NMR-Spektren von **18**, **19** und **20** zeigt, dass die Produkte aus mindestens vier Stereoisomeren bestehen. Dieser Umstand ist durch die im Kettenpropagations-schritt entstandene statistische Verteilung der Iodatome in beiden Fluorketten erklärbar.

Die spätere Messung von Drehwerten komplexerer, auf **18** und **19** basierender Produkte lieferte Werte von 0. Zwar ist bekannt, dass chirale Glycerinfettsäuren nicht immer optisch aktiv sind, für eine ähnliche Verbindung wurde aber ein Drehwert von $[\alpha]_D = -4.0$ ($c = 10.0$, CHCl_3)^[54] bestimmt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass während der radikalischen Perfluorierung eine

Racemisierung am Stereozentrum auftritt. Das dafür notwendige α -Alkoxyradikal ist wie Abbildung 4.11 zeigt resonanzstabilisiert und bildet sich daher besonders leicht.

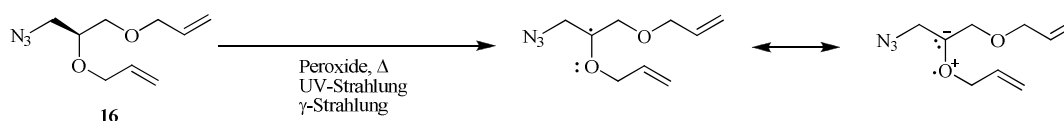


Abbildung 4.11: Resonanzstabilisierung von α -Alkoxyradikalen.

Das entstandene Radikal reagiert mit dem stark im Überschuss vorliegenden Hexan. Jedoch wird die weitere Radikalkettenpropagation durch die Anwesenheit von Luftsauerstoff im Reaktionsgefäß verhindert. Da es sich bei dem α -Alkoxyradikal um ein planares Radikal handelt, erfolgt die Wasserstoffabstraktion aus dem Hexan nicht stereospezifisch und die zuvor vorhandene Stereoinformation geht verloren.

Eine Reduktion des Azids zum Amin bei gleichzeitiger Dehalogenierung kann in einem Schritt durch Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle in Gegenwart von Natriumacetat erfolgen. Die Löslichkeit all dieser Komponenten ist in einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Essigsäureethylester gegeben (Abbildung 4.12).^[123]

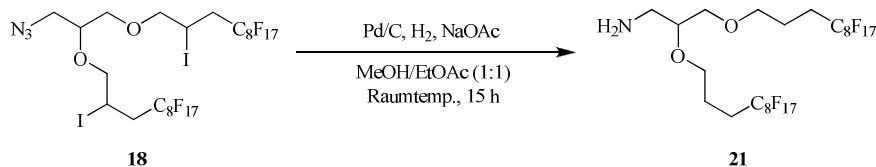


Abbildung 4.12: Gleichzeitige Reduktion des Azids und Dehalogenierung.

Laut DC-Kontrolle verlief die Reaktion mit vollständigem Umsatz, jedoch ließ sich **21** nicht in reiner Form isolieren. Ein Ausschütteln des in Diethylether gelösten Rohproduktes mit ges. Natriumthiosulfat-Lösung führte dazu, dass sich die Phasen nicht mehr trennten, und auch eine direkte Reinigung des Rohproduktes mittels Flash-Säulenchromatographie gelang nicht. Als weitere Alternative wurde die Reinigung über die sogenannte *Fluorous-Solid-Phase-Extraction* (FSPE) versucht.^[127] Bei dieser Methode kommt es zu einer Wechselwirkung des fluorhaltigen Produkts **21** mit einer stationären fluorierten Kieselgelphase. Zunächst können alle nicht-fluorierten Bestandteile der Reaktionsmischung mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (4:1) heruntergewaschen werden, während **21** retardiert wird. Durch einen Wechsel des Lösungsmittels zu reinem Methanol ließ sich schließlich **21** eluieren. Aber auch diese Methode führte nicht zum

erhofften Reinheitsgrad, so dass Verbindung **21** in den sich anschließenden Peptidkupplungen als Rohprodukt eingesetzt wurde.

Um diese Peptidkupplungen ausführen zu können, wurden weitere Bausteine benötigt, deren Synthesen im Folgenden beschrieben werden sollen.

4.2 Synthese unterschiedlich blockierter Triethylenglycolspacer

Der zu synthetisierende Triethylenglycolspacer soll zwei Aufgaben übernehmen. Einerseits dient er als polare Kopfgruppe und begründet damit die Amphiphilie der Membrananker, so dass bereits auf dieser Stufe erste Untersuchungen zu den Segregationseigenschaften dieser Verbindungsklasse durchgeführt werden konnten. Andererseits findet er in den komplexeren Verbindungen Verwendung als Platzhalter zwischen Glycopeptid und Membrananker, um eine gegenseitige konformationelle Beeinflussung zu verhindern. Das flexible, bifunktionalisierte Molekül lässt sich analog einer Aminosäure an beliebige Stellen in ein Peptid integrieren, ist dabei selbst nicht immunogen und ermöglicht in seiner Fmoc-geschützten Variante auch eine direkte Verwendung in der Festphasenpeptidsynthese. Zudem kann ein solcher hydrophiler Spacer die Löslichkeit des Amphiphils positiv beeinflussen. Die Synthese der Spaceraminosäure erfolgt ausgehend von Triethylenglycol durch Modifizierung einer bekannten Synthesestrategie.^[41,128,129]

In einer von Natrium ausgelösten Hetero-Michael-Reaktion reagierte **22** mit Acrylsäure-*tert*-butylester mit 80% Ausbeute zum entsprechend geschützten Säurederivat **23**. Im weiteren Syntheseverlauf wurde durch Mesylierung der Hydroxyfunktion deren Austrittstendenz erhöht, um im folgenden Reaktionsschritt in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit Natriumazid das primäre Azid **24** zu erzeugen. Nach chromatographischer Reinigung konnte die Azidofunktion mit Wasserstoff an Raney-Nickel zum Amin **25** reduziert werden (Abbildung 4.13).

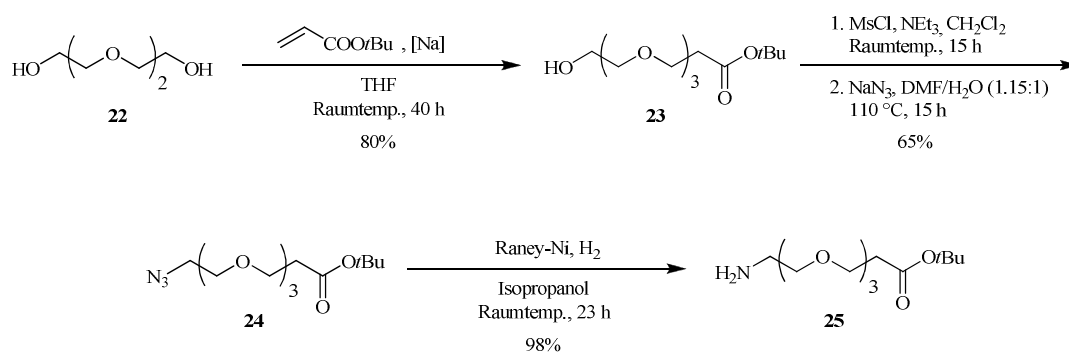


Abbildung 4.13: Synthese des aminofunktionalisierten Triethylenglycolspacers **25**.

Das erhaltene freie Amin wurde ohne weitere Reinigung durch Umsetzung mit *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) in einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) in den orthogonal geschützten Spacer **26** überführt. In diesem konnte acidolytisch durch Behandlung mit Trifluoressigsäure und Anisol (10:1) selektiv der *tert*-Butylester gespalten werden, so dass Verbindung **27** nun in Analogie zu einer Fmoc-geschützten Aminosäure im Peptidsynthesizer aktiviert und an eine *N*-terminal deblockierte Aminosäure gekuppelt werden konnte (Abbildung 4.14).

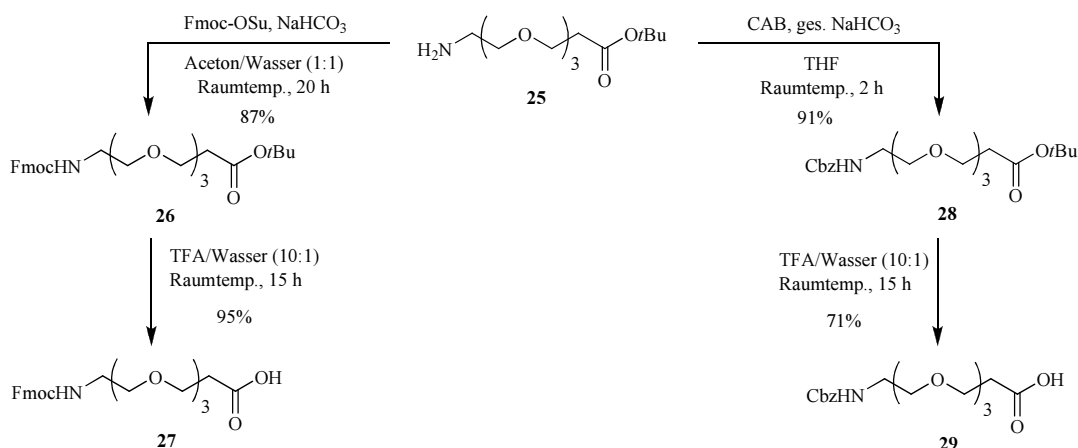


Abbildung 4.14: Darstellung des Fmoc- und Cbz-geschützten Triethylglycolspacers.

Darüber hinaus ist in Abbildung 4.14 die Synthese des hydrogenolytisch spaltbaren, *Cbz*-blockierten Triethylglycolspacers **29** dargestellt. Wie sich in späteren Synthesen herausstellte, eignet sich die Fmoc-Schutzgruppe nicht immer zum Aufbau der Amphiphile, weshalb die Synthese eines weiteren orthogonal blockierten Spacers entwickelt wurde, die ebenfalls an dieser Stelle beschrieben werden soll. Ausgangspunkt ist erneut das freie Amin **25**, welches mit Chlorameisensäurebenzylester in 91%iger Ausbeute in das vollständig geschützte Derivat **28** überführt wurde. Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe in **28** durch Zugabe einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (10:1) lieferte mit 71% Ausbeute das gewünschte Produkt **29**.

4.3 Synthese des zentralen N-Acetylgalactosamin-Threonin Konjugats (T_N -Antigen)

Für die Synthese des zentralen N-Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugats, welches auch als Grundstruktur für die Herstellung komplexerer Antigenstrukturen dient, muss ein geeigneter Glycosyldonor aus Galactose und ein aus der Aminosäure Threonin abgeleiteter Glycosylakzeptor

synthetisiert werden, die im entscheidenden Reaktionsschritt eine α -selektive Glycosylierung ermöglichen.

Um den späteren Anforderungen der Festphasenpeptidsynthese zu genügen, sollte das L-Threonin *N*-terminal eine Fmoc-Gruppe tragen. Eine dazu orthogonale Blockierung der Carboxyfunktion wird über einen säurelabilen *tert*-Butylester erreicht. Somit wurde zuerst die Aminfunktion des L-Threonins **30** durch Umsatz mit einer äquimolaren Menge an Fmoc-OSu in nahezu quantitativer Ausbeute in das Derivat **31** überführt (Abbildung 4.15).^[130,131]

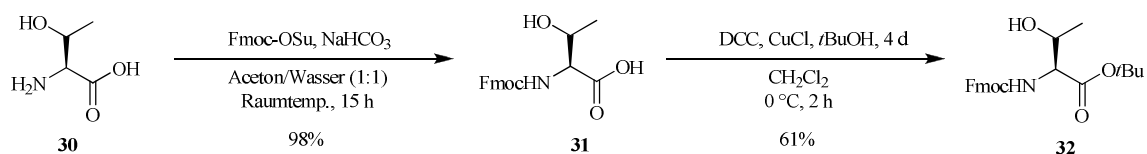


Abbildung 4.15: Blockierung des C- und N-Terminus des Galactosylakzeptors Fmoc-Thr(OH)-OtBu **32**.

In der darauffolgenden Blockierung des C-Terminus musste in einer vorgelagerten Reaktion zunächst der reaktive Schutzgruppenüberträger aus *tert*-Butylalkohol und dem durch das in katalytischen Mengen zugesetzte Kupfer(I)-chlorid aktivierte *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gebildet werden (Abbildung 4.16), bevor dann die Fmoc-Aminosäure **31** zugegeben wurde und sich der *tert*-Butylester **32** bildete.^[132,133]

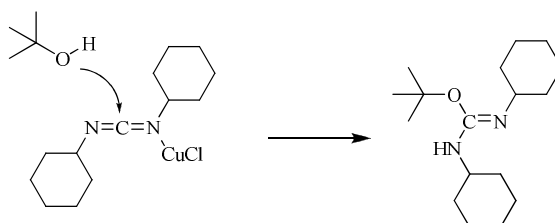


Abbildung 4.16: Als Schutzgruppenüberträger fugierende aktive Spezies des DCC.

Da sowohl das DCC als auch der Alkohol im Überschuss eingesetzt wurden, war auf eine sorgfältige Reaktionskontrolle zu achten, um selektiv nur **32** entstehen zu lassen und die Bildung eines *tert*-Butylethers zu vermeiden. Das auf diesem Weg in 60% Ausbeute erhaltene, orthogonal geschützte Threonin kann direkt als Glycosylakzeptor eingesetzt werden.

Bei der Synthese des Glycosyldonors **38** wird als Ausgangsverbindung die D-Galactose **33** herangezogen.^[134] In einer Eintopfreaktion zum peracetylierten α -Galactosylbromid **35** wurde im ersten Schritt durch Zugabe von Essigsäureanhydrid und Perchlorsäure die Acetylierung zu **34** induziert. Behandlung dieser Verbindung mit Bromwasserstofflösung in Eisessig lieferte in sehr guter

Ausbeute das gewünschte α -Galactosylbromid **35** (Abbildung 4.17),^[135] welches nur für die Verwendung als Glycosyldonor in der Synthese des T-Antigens gereinigt wurde.

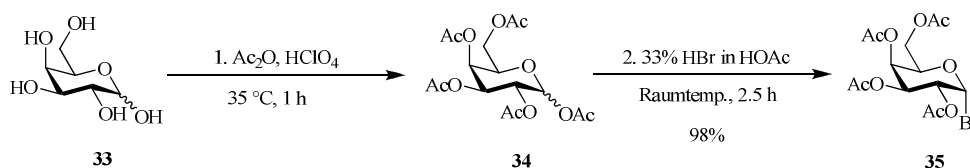


Abbildung 4.17: Darstellung des α -Galactosylbromids.

Die Selektivität dieser Reaktion, bei der ausschließlich das α -Anomer erhalten wird, beruht auf dem Anomeren Effekt. Im Verlauf der Reaktion wird die anomere Acetylgruppe durch Essigsäure protoniert und daraufhin abgespalten, wodurch ein stabilisiertes Oxocarbeniumion resultiert, welches schließlich von einem Bromidion nucleophil angegriffen wird.

Dieser Angriff wird in cyclischen Kohlenhydraten mit Sessel-Konformation aus sterischen Gründen normalerweise von der β -Seite erfolgen, da eine äquatoriale Substitution gegenüber der axialen begünstigt ist. Bei Pyranosen mit elektronegativen Gruppen in anomerer Stellung ist jedoch die α -Konfiguration mit dem Substituenten in axialer Position oftmals stabiler, als es die Hervorsage nur aus der Betrachtung der sterischen Faktoren vermuten lassen würde.

Ein Faktor, welcher diesem Effekt zugrunde liegt, sind die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der anomerenbenachbarten Gruppen. Die Interaktion der Dipolmomente der nicht-bindenden Elektronenpaare des Ring-Sauerstoffs mit dem Dipolmoment aus der polarisierten Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung führt in der β -Konfiguration zu einer ungünstigen intramolekularen Aufsummierung der partiellen Dipole. Im Fall des α -Anomers hingegen resultiert aus der Konfiguration eine partielle Neutralisation beider Dipole,^[136] was zu einer thermodynamischen Stabilisierung dieses Produktes führt (vgl. Abbildung 4.18).

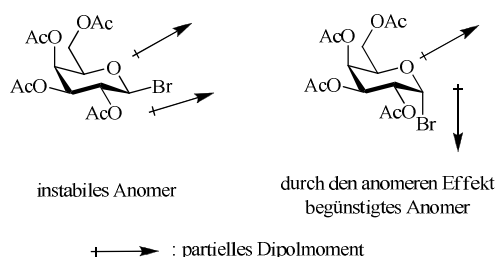


Abbildung 4.18: Ausrichtungen der am anomeren Effekt beteiligten Dipole.

Eine Beschreibung des Anomeren Effektes ist aber auch über eine Betrachtung der Molekülorbitale möglich. Nur bei einer axialen Stellung des Substituenten, d. h. einer antiperiplanaren Anordnung zum freien π -Orbital des Sauerstoffs, ist eine Überlappung dieses π -Orbitals mit dem nicht-bindenden σ^* -Orbital der Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung am anomeren Zentrum möglich. Die aus der Hyperkonjugation resultierende Delokalisation der Bindungselektronen führt somit zu einer Stabilisierung und bevorzugten Bildung des α -anomeren Produktes.^[137]

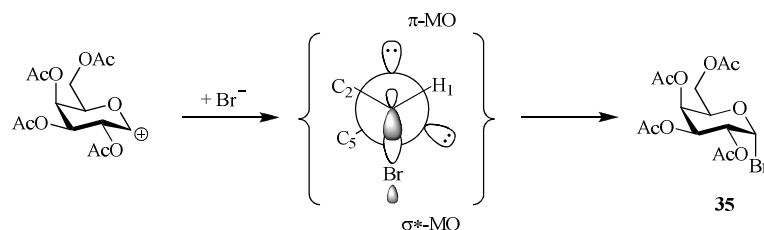


Abbildung 4.19: Hyperkonjugation durch antiperiplanare Anordnung der Orbitale.

Die Eliminierung des Bromsubstituenten und der Acetoxygruppe am C2 des α -Bromids **35** ließ sich mit Hilfe von Zink, welches durch eine Kupfersulfat-Lösung aktiviert wurde, erreichen.^[135] Das resultierende 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **36** wurde in der nächsten Stufe für die Einführung des Stickstoff-Substituenten an Position C2 benötigt (Abbildung 4.20).

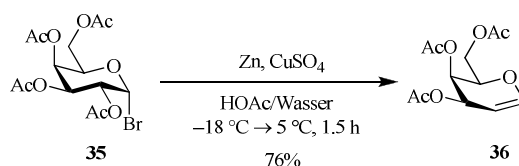


Abbildung 4.20: Eliminierung zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal.

Wie bereits erwähnt muss im Schlüsselschritt der Reaktionssequenz der Glycosyldonor **38** α -glycosidisch mit dem geschützten Threoninbaustein **32** verknüpft werden, da die Antigenstrukturen in ihrer natürlichen Form diese Konfiguration aufweisen. Um nun diese Reaktion mit der gewünschten Stereoselektivität durchführen zu können, sollte die an C2 einzuführende Gruppe keinen Nachbargruppeneffekt aufweisen und sich außerdem möglichst einfach in die benötigte *N*-Acetamid-Funktion überführen lassen. Die Azidfunktion vereint beide Eigenschaften und lässt sich zusammen mit einer Nitratgruppe an Position 1 nach der von R. U. LEMIEUX^[138] beschriebenen Azidonitratisierung über das 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **36** einführen. In dieser Reaktion finden Cerammoniumnitrat und Natriumazid in absol. Acetonitril Verwendung, wobei das Azidonitrat **37** als Gemisch beider möglicher Anomere mit einer Ausbeute von 40% isoliert werden konnte (Abbildung 4.21).

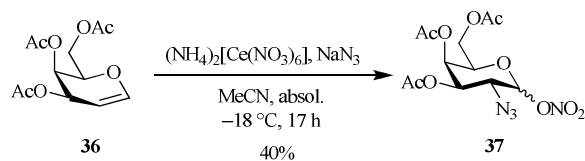


Abbildung 4.21: Azidonitratisierung nach LEMIEUX.

Der postulierte Mechanismus der Azidonitratisierung^[139] verläuft radikalisch, wobei das benötigte Azidradikal in einer vorgelagerten Reaktion des Azids mit dem Cerammoniumnitrat entsteht (vgl. Abbildung 4.22).

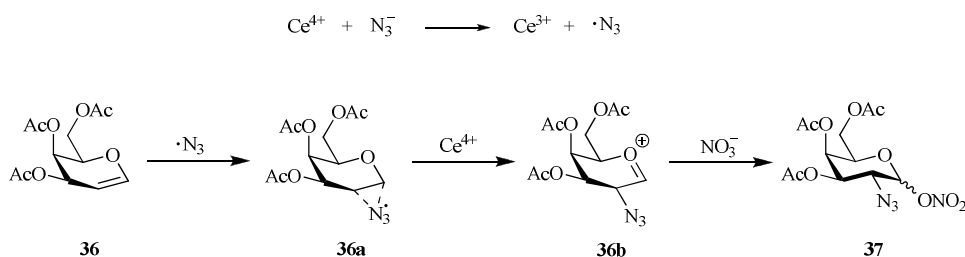


Abbildung 4.22: Postulierter radikalischer Mechanismus der Azidonitratisierung.

Die Initiierung erfolgt über eine Redoxreaktion, in der das starke Oxidationsmittel Cer(IV) zu Cer(III) reduziert wird und gleichzeitig das Azidanion zum Azidradikal oxidiert wird. Das entstandene Radikal koordiniert als Elektrophil an die Doppelbindung des Galactals **36a**, woraufhin es zu einer Einelektronenübertragung auf das C2-Atom kommt und sich ein Oxocarbeniumion **36b** mit dem Azidsubstituenten in der energetisch günstigeren äquatorialen Position bildet. Durch nucleophile Addition des Nitrations entsteht das anomere Gemisch des 2-Azido-2-desoxygalactosylnitrats **37**.

Anschließend wurde das erhaltene Azidonitrat **37** mit Lithiumbromid in absol. Acetonitril umgesetzt, und es entstand in einer nucleophilen Substitutionsreaktion selektiv das α -Triacetylazidobromid **38**.^[138] Die Ursache der Stereoselektivität in dieser Reaktion liegt erneut in dem bereits bei der Synthese des α -Galactosylbromids **35** ausführlich beschriebenen Anomeren Effekts (Abbildung 4.23).

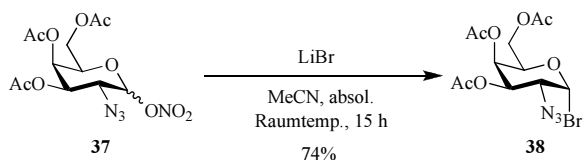


Abbildung 4.23: Synthese des Azidobromids **38**.

Der anomenrein entstandene Glycosyldonor **38** konnte nun direkt im Schlüsselschritt durch eine von PAULSEN und HÖLCK entwickelten Variante der KÖNIGS-KNORR-Glycosylierung, wie in

Abbildung 4.24 dargestellt, an die Hydroxyfunktion des orthogonal geschützten Threonins **32** gebunden werden.^[140,141]

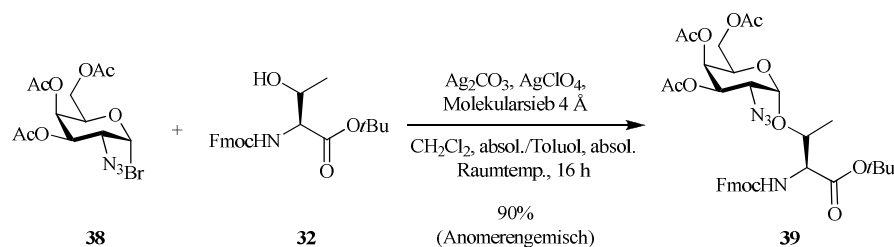


Abbildung 4.24: KÖNIGS-KNORR Glycosylierung nach PAULSEN und HÖLCK.

Dabei wurden Silbercarbonat und Silberperchlorat als Promotoren eingesetzt, die das Glycosylhalogenid **38** in ein instabiles, reaktives Oxocarbeniumion **36b** umwandeln (vgl. Abbildung 4.25).

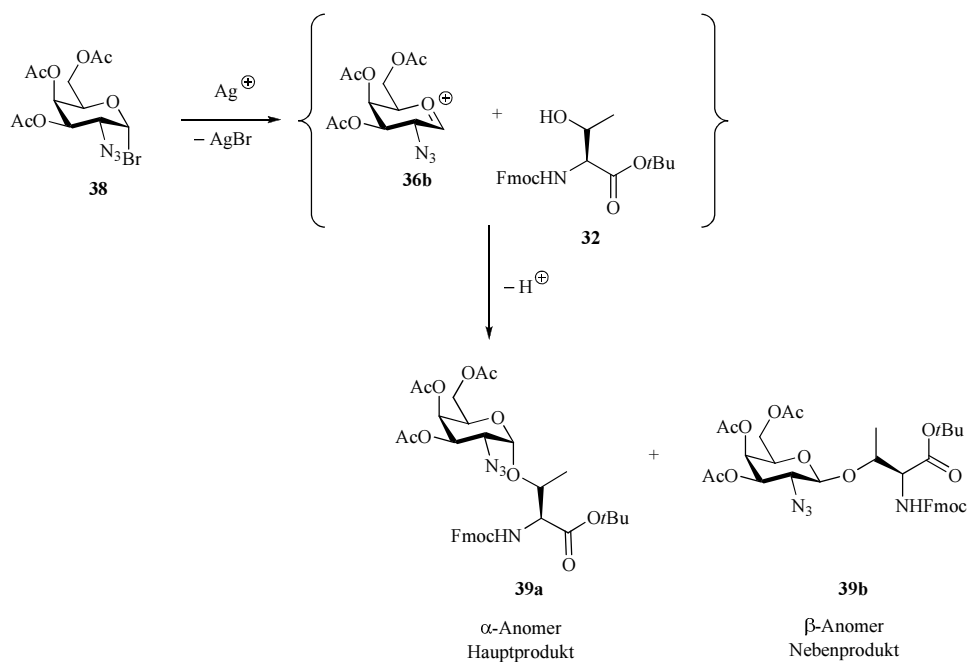


Abbildung 4.25: Ablauf der Königs-Knorr-Glycosylierung ohne Nachbargruppenbeteiligung.

Letzteres kann vom Glycosylakzeptor **32** nucleophil angegriffen werden, so dass das gewünschte Zucker-Aminosäure-Konjugat **39** erhalten wird^[142,143] und Silberbromid aus der Reaktionslösung ausfällt. Das daneben freiwerdende Säureäquivalent wird durch das Carbonat neutralisiert. Die in Position 2 eingeführte Azidgruppe ist wie erwähnt nicht in der Lage als partizipierende Gruppe zu agieren, so dass die Stereochemie dieser Reaktion erneut durch den Anomeren Effekt bestimmt wird. In der Gesamtausbeute von 90% wurde zwar überwiegend das gewünschte α -Produkt **39a** erhalten, jedoch traten auch geringe Mengen an β -Anomer **39b** auf, da die Stereoselektivität

dieser Reaktion aufgrund des hohen S_N1 -Charakters und fehlenden Nachbargruppeneffektes, sowie des geringeren Anomeren Effekts der O-glycosidischen Bindung nicht perfekt ist.

Eine säulenchromatographische Trennung der beiden Anomere ist auf dieser Stufe nur schwer zu bewerkstelligen, weshalb die beiden Isomere **39a** und **39b** zunächst gemeinsam mit aktiviertem Zink in einem Lösungsmittelgemisch aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (3:2:1) zur Acetamidoglycosylaminosäure **40** reduziert wurden.^[144] Auf dieser Stufe konnte nun das eingesetzte Anomerengemisch mittels Säulenchromatographie gut getrennt werden, so dass bezogen auf den Glycosyldonor **38** die Glycosylaminosäure **40** mit insgesamt 49% Ausbeute erhalten werden konnte (Abbildung 4.26).

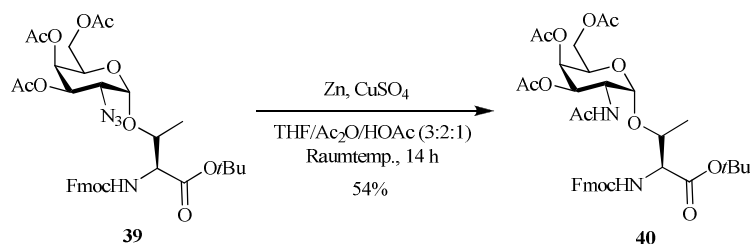


Abbildung 4.26: Zink-vermittelte Reduktion und Acetylierung zur Acetamidoglycosylaminosäure **40**.

Neben der Synthese des T_N -Antigen-Vorläufers **41**, für dessen Herstellung lediglich die C-terminale *tert*-Butyl-Schutzgruppe acidolytisch in Gegenwart von Trifluoressigsäure und Anisol^[145] als Kationenfänger abgespalten werden musste, stellt **40** auch eine zentrale Zwischenstufe für den Aufbau weiterer, komplexer Antigenstrukturen basierend auf der Akzeptorstruktur **42** dar (Abbildung 4.27).

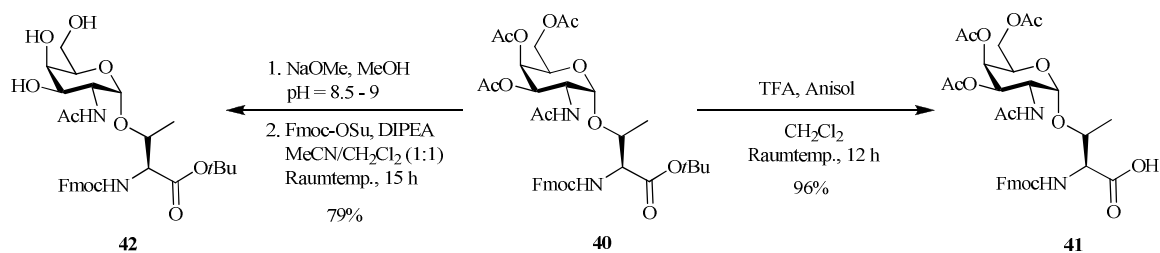


Abbildung 4.27: Schutzgruppenabspaltungen auf der Stufe des T_N -Antigens.

Hier wurde zur Entfernung aller *O*-Acetyl-Schutzgruppen zunächst eine Umesterung nach ZEMPLÉN^[146] mit katalytischen Mengen an Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 8.5^[143] durchgeführt. Bei dieser Reaktion ist eine genaue Einstellung und Kontrolle des pH-Wertes wichtig, da bei einem zu hohen pH-Wert die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls abgespalten wird. Ein vollständiges Zurückdrängen dieser Nebenreaktion konnte nicht erreicht werden, so dass das vor der Isolierung von **42** zwischenzeitlich gebildete freie Amin durch

Umsetzung mit Fmoc-OSu und Hünigs-Base (DIPEA) in einem Gemisch aus Acetonitril und Dichlormethan wieder in das Fmoc-geschützte Produkt **42** überführt wurde.

4.4 Synthese der von Glycerin abgeleiteten Konjugate

Im Folgenden sollen nun die Synthesen der auf eine Glycerolstruktur zurückgehenden Amphiphile einschließlich der Verbindungen mit Triethylenglycolspacer als polare Kopfgruppe sowie derjenigen mit dipeptidischer T_N-Antigenstruktur beschrieben werden.

4.4.1 Kupplungsreagenzien in der Peptidchemie

Um einen erfolgreichen Zugang zum Aufbau von Amidbindungen zu erhalten, ist es notwendig ein geeignetes Reagenziensystem zu identifizieren, in dem das verwendete Kupplungsreagenz sowohl für die Stabilität und Reaktivität der aktivierten Aminosäure, als auch für deren Racemisierungseigenschaften verantwortlich ist.^[147] Die klassische Aktivierung von Aminosäuren erfolgt durch deren Überführung in Säureanhydride,^[148] oder Säurehalogenide.^[149] Diese Derivate weisen jedoch eine Tendenz zur Racemisierung auf und sind häufig nicht einfach darstellbar bzw. wenig stabil. Darüber hinaus kann die Carbonsäure-Funktion *in situ* unter Einsatz von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC),^[150] wasserlöslichem *N*-Ethyl-*N'*-(2-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)^[151] oder durch *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) aktiviert werden. Da diese Reagenzien jedoch ebenfalls zur Racemisierung und Acylwanderung neigen, sowie nur ein vergleichsweise geringen Reaktivität aufweisen, werden in modernen Synthesen meist *in situ*-Aktivierungsmethoden unter Bildung von Aktivestern verwendet, wofür Oniumsalze^[152] wie z. B. Phosphoniumsalze^[153,154] oder Uroniumsalze zur Verfügung stehen (vgl. Abbildung 4.28).

Häufig verwendete Uroniumsalze sind *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HATU),^[155] *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluorborat (TBTU),^[156] 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorphosphat (HBTU)^[157] und *O*-(6-Chlor-1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HCTU). Es ist nicht ausschlaggebend, ob diese Verbindungen aufgrund unterschiedlicher Herstellungsprozesse als Uroniumsalze (*O*-Form) oder aber als Guanidiniumsalze (*N*-Form) vorliegen, das sich die *O*-Form unter den basischen Bedingungen einer Peptidkupplung in die reaktivere *N*-Form umwandelt.^[158]

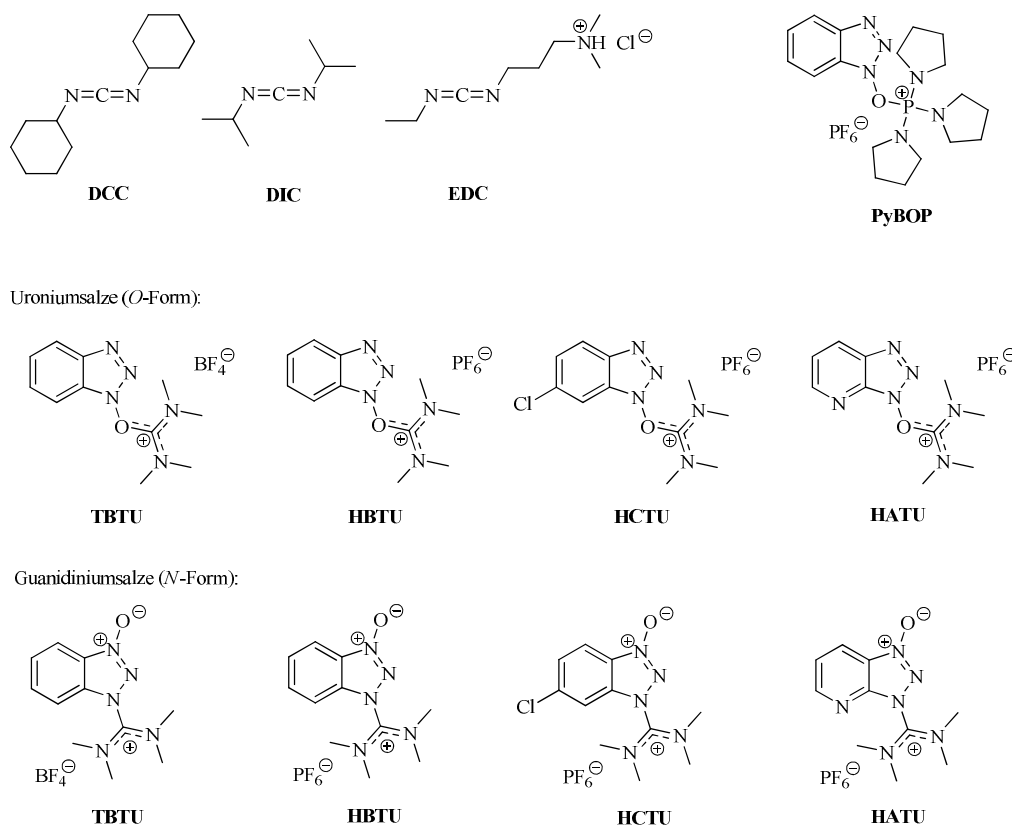


Abbildung 4.28: Kupplungsreagenzien zum Aufbau einer Amidbindung.

Ein wesentlicher Vorteil in der Verwendung von Uroniumsalzen bei der Knüpfung von Amidbindungen ist ihre geringe Neigung zu Nebenreaktionen und ihre niedrige Racemisierungstendenz in Gegenwart der Additive 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[159] oder 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)^[160] (Abbildung 4.29).

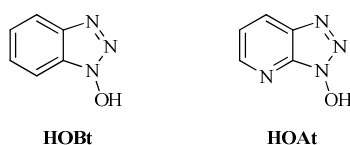


Abbildung 4.29: Struktur der Additive HOBt und HOAt.

Der sich beim Einsatz der Reagenziensystem mit Additiv bildende Reaktivester weist im Vergleich zum primär entstehenden *O*-Acylisoharnstoff eine geringere Reaktivität auf, ist dafür aber längere Zeit in Lösung stabil und eignet sich daher besonders für die Kupplung sterisch anspruchsvoller Verbindungen.

In Abbildung 4.30 ist exemplarisch der Mechanismus der Aktivesterbildung^[161] mit anschließender Knüpfung der Amidbindung bei Verwendung der Kupplungsreagenzien TBTU und HOBt dargestellt.

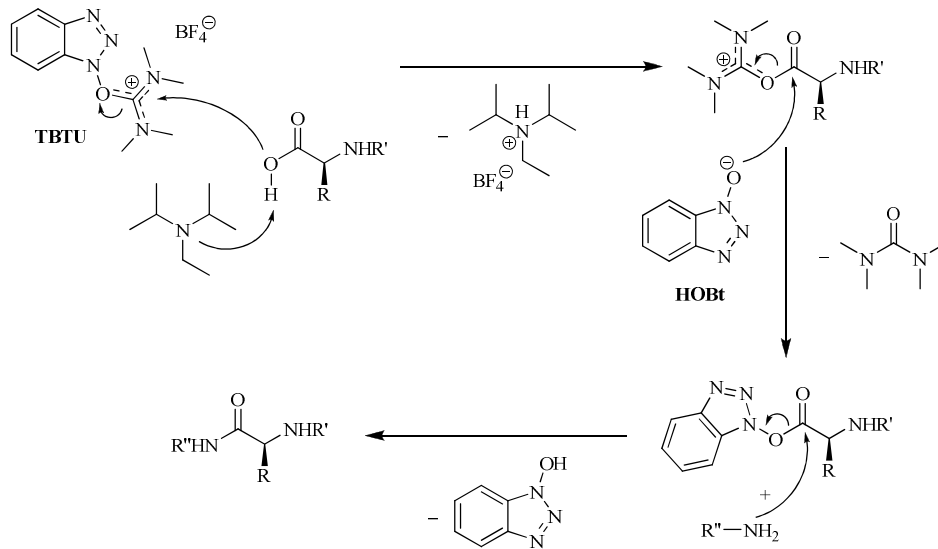


Abbildung 4.30: Reaktionsmechanismus der Aktivestermethode unter Verwendung von TBTU und HOBT.

Die Durchführung der Reaktion beginnt mit dem Vorlegen eines leichten Überschusses der Carbonsäurekomponente, dem Kupplungsreagenz und dem Additiv in einem geeigneten Lösungsmittel. Zum Starten wird dem Reaktionsgemisch *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA, Hünigs-Base) oder alternativ *N*-Methylmorpholin (NMM) zur Deprotonierung der Carbonsäure und des Additivs zugefügt. Dadurch erfolgt der nucleophile Angriff der deprotonierten Carboxyfunktion auf das Kohlenstoffatom des Guanidiniumsalzes, wodurch das *O*-Acyl-Uroniumsalz gebildet wird, das mit dem deprotonierten HOBT weiter zum Aktivester reagiert. Zumeist handelt es sich am Beginn der beschriebenen Reaktion um eine Suspension, die sich im Laufe der Aktivesterbildung klärt und dabei oft eine bestimmte Farbe annimmt. Im zweiten Schritt der Reaktion wird die Aminkomponente hinzugegeben, welche mit dem Aktivester unter Ausbildung der Amidbindung reagiert. Bei allen Peptidkupplungen in dieser Arbeit, welche in Lösung durchgeführt wurden, kamen 1.1 Äquiv. der Säure, 1.2 Äquiv. von Kupplungsreagenz und Additiv und 2.2 Äquiv. der Base zum Einsatz.

Ein Vergleich der HOAt- und HOBT-Aktivester zeigt, dass sich ersterer durch eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit auszeichnet (Abbildung 4.31).

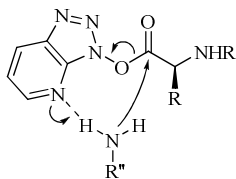


Abbildung 4.31: Vorkoordinierung der Aminkomponente bei der Verwendung von HOAt.

Diese lässt sich dadurch erklären, dass es während der Aminolyse zu einer Vororientierung des angreifenden Amins über eine intermolekulare Wasserstoffbrücke an den Aktivester kommt, woraus eine Beschleunigung der Amidbindungsbildung resultiert.

Für anspruchsvolle Kupplungsreaktionen wird daher das reaktivere Reagenzienpaar HATU/HOAt in Gegenwart der sterisch anspruchsvollen, nicht-nucleophilen Basen NMM oder DIPEA verwendet.

4.4.2 Konjugation mit dem Triethylenglycolspacer

Bereits in Kapitel 4.1.2 wurde erwähnt, dass eine Reinigung des mit Perfluoralkylketten versehenen freien Amins **21** präparativ kaum durchführbar ist. Daher wurde die für die Peptidkupplung benötigte Menge jeweils direkt vor Gebrauch reduziert und als Rohprodukt eingesetzt. In Tabelle 4.4 sind die getesteten Kupplungsbedingungen für die Peptidkupplung des Triethylenglycolspacers **27** mit dem Membrananker **21** aufgeführt.

Tabelle 4.4: *Getestete Kupplungsbedingungen.*

Nr.	Kupplungsreagenz	Additiv	Base	Lösungsmittel	Temp.	Dauer	Ausbeute
43	PyBOP	HOBt	NMM	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	15 h	34%
43	HCTU	HOBt	NMM	CH ₂ Cl ₂ /DMF, absol.	Raumtemp.	2 d	–
43	HCTU	HOBt	NMM	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	6 d	20%
43	HCTU	HOBt	DIPEA	DMF, absol.	Raumtemp.	6 d	–
43	HCTU	HOBt	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	7 d	50%

Der Ablauf der Reaktion erfolgte analog zu dem im vorigen Kapitel beschriebenen Peptidkupplungsschritt und lieferte mit der Carbonsäure **27** und den Kupplungsreagenzien PyBOP/HOBt/NMM in absol. Dichlormethan das gewünschte Produkt **43** in 34%iger Ausbeute. Jedoch ist die Abtrennung des dabei anfallenden Phosphoramids deutlich schwerer möglich, als der bei der analogen Umsetzung mit HCTU als Kupplungsreagenz anfallende Tetramethylaminoharnstoff. Unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen zeigte sich zudem eine Basen- und Lösungsmittelabhängigkeit. So führt die Reaktion nur zum gewünschten Konjugat **43**, wenn sie in absol. Dichlormethan durchgeführt wird. Die Verwendung von DMF und Lösungsmittelgemischen aus Dichlormethan und DMF verhinderte hingegen die Produktbildung. Weiterhin verlief die Umsetzung schlecht, wenn als Base NMM zum Einsatz kommt, wohingegen bei Gebrauch der Base DIPEA eine Steigerung der Ausbeute auf 50% festgestellt wurde. Als beste

Reagenzienkombination für diese Kupplung erwies sich damit HCTU/HOBt/DIPEA in absol. Dichlormethan (Abbildung 4.32).

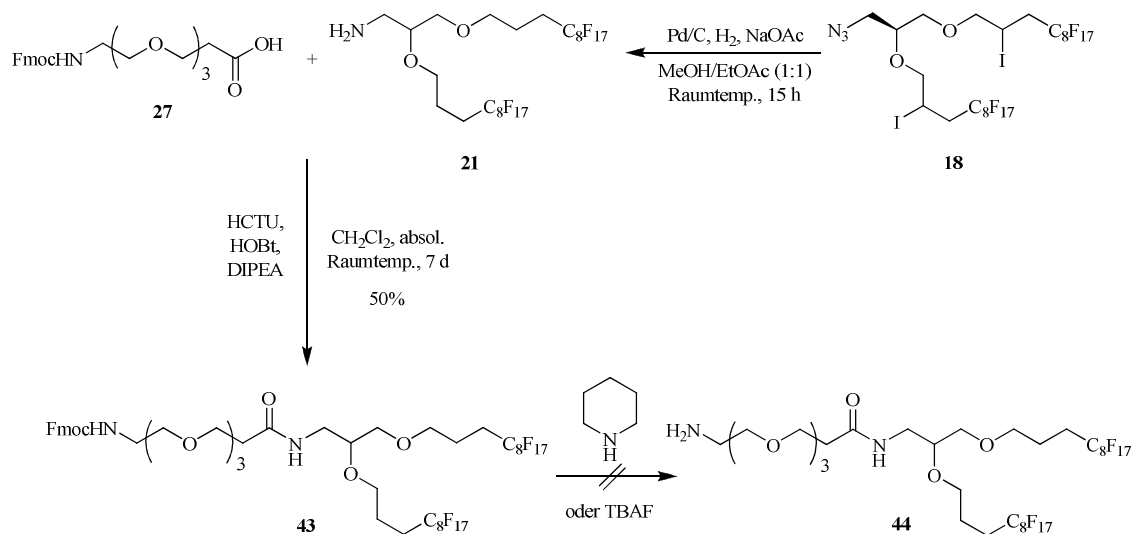


Abbildung 4.32: Anbindung des perfluorierten Glycerolankers an den Triethylenglycolspacer.

Die Reinigung des Fmoc-OEG-GlycF₃₄-Konjugats **43** erfolgte mittels fluoriger Festphasenextraktion (F-SPE) und lieferte das Produkt in guten Reinheiten. Die nun erforderliche *N*-terminale Deblockierung des Triethylenglycolspacers wurde mit Piperidin oder Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) durchgeführt. Obwohl laut DC-Kontrolle ein vollständiger Umsatz zu beobachten war, ließ sich jedoch das Amphiphil **44** nicht rein isolieren. Auch eine Reinigung durch Flashchromatographie bzw. RP-HPLC waren erfolglos. So wurde bei dem Versuch **44** über RP-HPLC mit einer Luna PFP-Säule zu reinigen keine eindeutigen Signale im Chromatogramm erhalten. Vielmehr traten mehrere breite, ineinanderlaufende Signale im erwarteten Retentionsbereich auf. Dennoch sollte das Rohprodukt **44** aus diesen Umsetzungen in den weiteren, in Kapitel 4.4.3 beschriebenen, Peptidkupplungen eingesetzt werden.

Für die Langmuir-Blodgett-Untersuchungen ist es erforderlich, das Amphiphil **44** in reiner Form zu isolieren, was jedoch mit der verwendeten Schutzgruppenstrategie nicht möglich war. Demzufolge wurde die Fmoc-Gruppe gegen eine Cbz-Schutzgruppe ausgetauscht, da diese eine hydrogenolytische Deblockierung erlaubt, bei der als Verunreinigung nur Toluol entsteht, das destillativ vom Produkt **48** abgetrennt werden kann. Für die Kupplung des entsprechenden Spacers **29** kamen neben HCTU als Kupplungsreagenz, HOBt als Additiv und NMM als Base in einem Gemisch aus absol. Dichlormethan, absol. Tetrahydrofuran und DMF zum Einsatz. Außerdem wurde die Reaktion bei einer leicht erhöhten Temperatur von 40 °C durchgeführt, da hierbei eine bessere Löslichkeit der Fluorverbindungen resultierte (Abbildung 4.33).

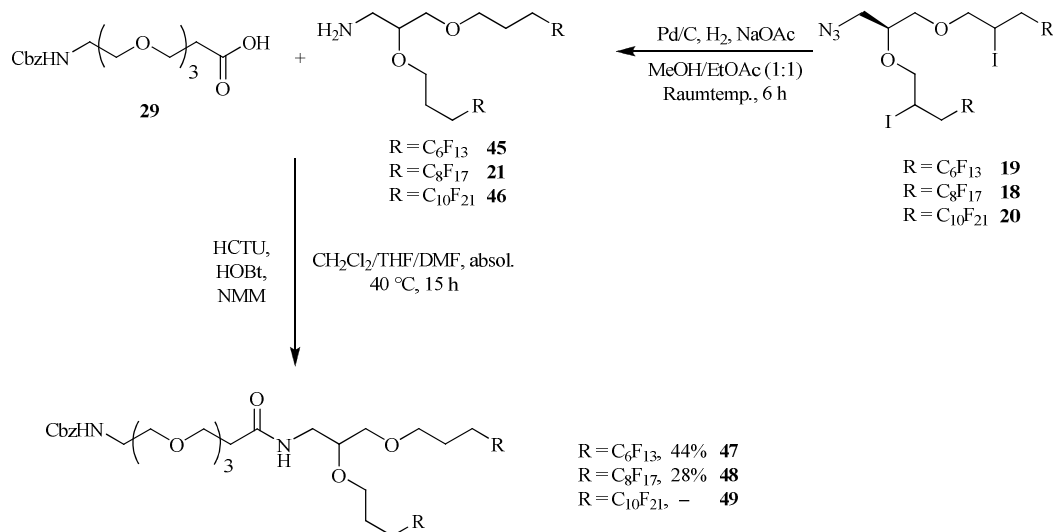


Abbildung 4.33: Cbz-Schutzgruppenstrategie zur Synthese der Cbz-OEG-Glyc-Konjugate.

An den Ausbeuten nach der RP-HPLC-Reinigung mithilfe einer Luna PFP-Säule lässt sich direkt ablesen, dass die Kupplungsausbeute umso höher ausfällt, je kürzer die eingesetzten Perfluoralkylketten sind. Während im Fall der Perfluorhexylkette über die zwei Stufen der Reduktion und Peptidkupplung noch 44% von **47** isoliert werden konnten, sinkt dieser Wert für die Perfluorooctyl-funktionalisierte Verbindung **48** auf nur noch 28%. Bei der Perfluordecyl-Verbindung **49** konnte schließlich gar kein Produkt mehr isoliert werden, was sich jedoch schon zuvor durch die äußerst schlechte Löslichkeit des Amphiphils **46** unter den Peptidkupplungsbedingungen andeutete.

Abschließend muss noch die Schutzgruppe der Konjugate **47** und **48** entfernt werden. Dies wird durch Behandlung mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff erreicht (Abbildung 4.34).

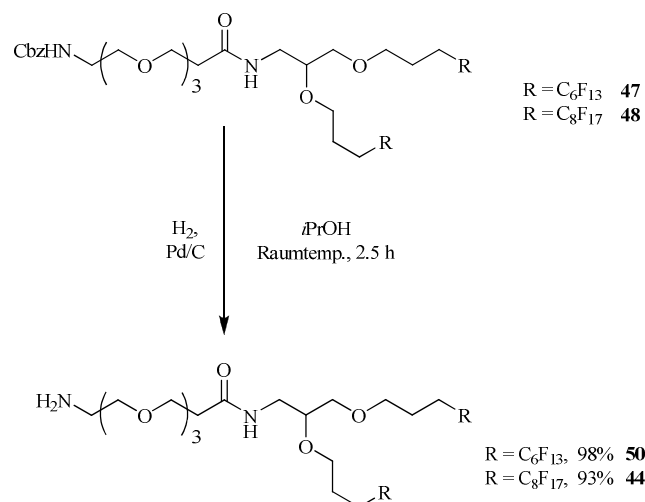


Abbildung 4.34: N-terminale Deblockierung zu den H_2N -OEG-Glyc-Konjugaten.

Dabei ist besonders die Wahl des verwendeten Lösungsmittels entscheidend. Methanol, aber auch Ethanol führten interessanterweise zu einer überwiegenden Methylierung^[162] bzw. Ethylierung der Stickstoff-Funktionalität. Erst die Verwendung von Isopropanol als Lösungsmittel drängte diese Nebenreaktion zurück und lieferte **44** und **50** in hinreichender Reinheit und Ausbeute.

Die auf diesem Weg hergestellten H₂N-OEG-GlycF₂₆ **50** und H₂N-OEG-GlycF₃₄ **44** konnten nun für erste orientierende Langmuir-Blodgett-Untersuchungen in Kooperation mit P. SCHEIBE aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. ZENTEL am Institut für Organische Chemie der Universität Mainz herangezogen werden (Kapitel 4.4.6).

4.4.3 Anbindungsversuche an ein T_N-Dipeptid

Wie in der Syntheseplanung beschrieben, sollen die Konjugate aus Membrananker und Triethylenglycolspacer **44** und **50** an ein T_N-Dipeptid gekuppelt werden, wobei die Anbindung des L-Valins als die in der *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 der Glycosylierungsstelle folgende Aminosäure im Wesentlichen der Stabilisierung der *O*-glycosidischen Bindung dient. Zu diesem Zweck musste die Aminfunktion des Threonins in **40** durch Behandlung mit Piperidin in Dichlormethan deblockiert werden (Abbildung 4.35).

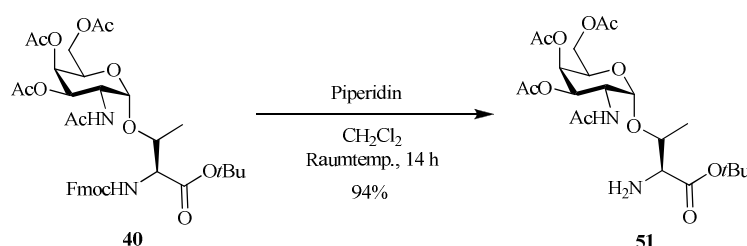


Abbildung 4.35: Abspaltung der basenlabilen *Fmoc*-Schutzgruppe.

Mechanistisch verläuft die Deblockierung der basenlabilen *Fmoc*-Schutzgruppe über die Abstraktion des Wasserstoffatoms an Position 9 der *Fmoc*-Gruppe durch Einwirkung einer Base, wobei letztlich ein Dibenzofulven-Piperidin-Addukt und Kohlendioxid gebildet werden (vgl. Abbildung 4.36).

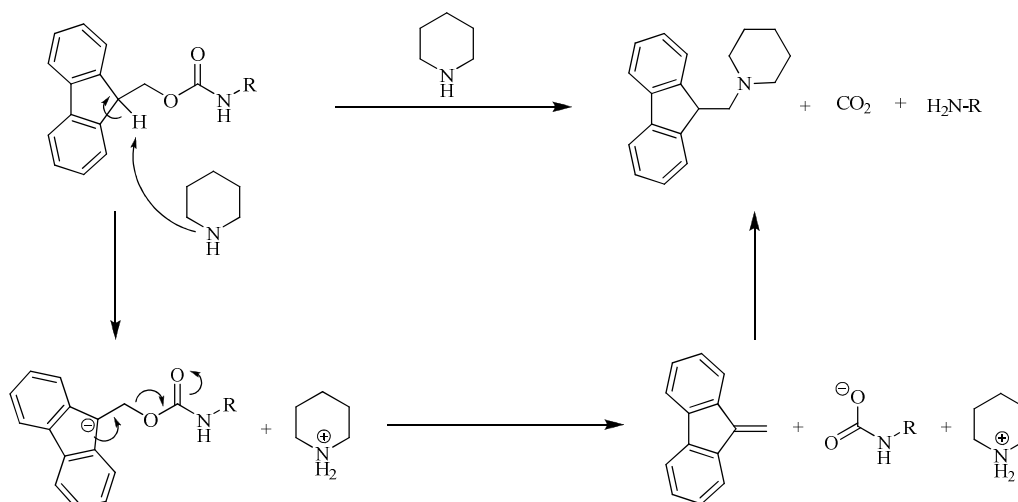


Abbildung 4.36: Mechanismus der Fmoc-Spaltung.

Das mit einer Ausbeute von 94% erhaltene Amin **51** wurde in der nun folgenden Kupplungsreaktion eingesetzt. Hierfür wurde zunächst die Fmoc-blockierte Aminosäure **52** zusammen mit TBTU und HOBT in absol. DMF gelöst bzw. suspendiert und anschließend mit Hünigs Base versetzt. Nach 60-minütigem Rühren hatte sich der Aktivester vollständig gebildet und die in absol. DMF gelöste Aminkomponente **51** wurde zur nun klaren Reaktionslösung gegeben. Nach vollständigem Reaktionsumsatz und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Dipeptid **53** schließlich mit 87% Ausbeute isoliert werden (Abbildung 4.37).

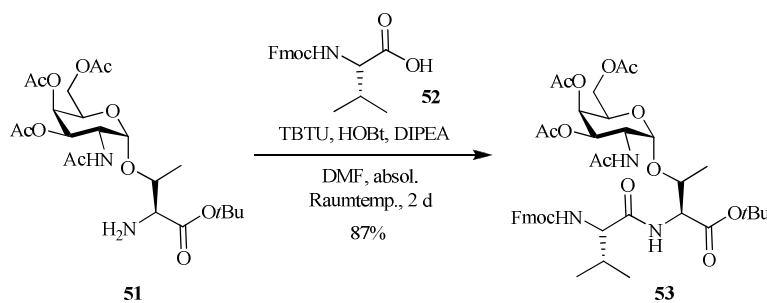


Abbildung 4.37: Synthese des Dipeptids **53**.

Die acidolytische Spaltung der C-terminalen *tert*-Butyl-Schutzgruppe des Dipeptids Fmoc-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-*Or*Bu **53** wurde in einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Anisol (10:1) durchgeführt (Abbildung 4.38). Nach vierstündigem Rühren bei Raumtemp. gefolgt von säulenchromatographischer Reinigung wurde die Säure **54** in 94%iger Ausbeute isoliert und steht für Versuche zur Kupplung an das Amphiphil **44** zur Verfügung.

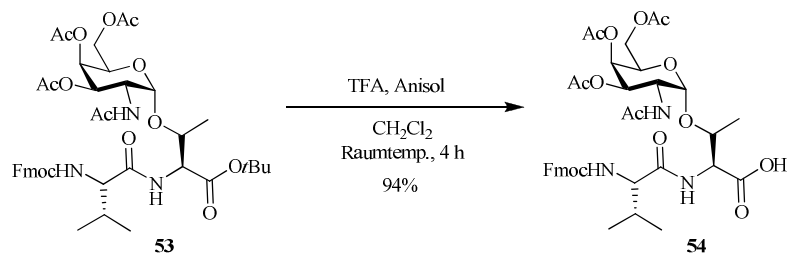


Abbildung 4.38: Acidolytische Spaltung der *tert*-Butylester-Schutzgruppe.

Die Umsetzung der beiden Verbindungen **44** und **54** erfolgte mit der bereits bewährten Reagenzienkombination aus HCTU, HOBT und DIPEA. Als Lösungsmittel kamen sowohl absol. Dichlormethan als auch absol. DMF zum Einsatz (Abbildung 4.39).

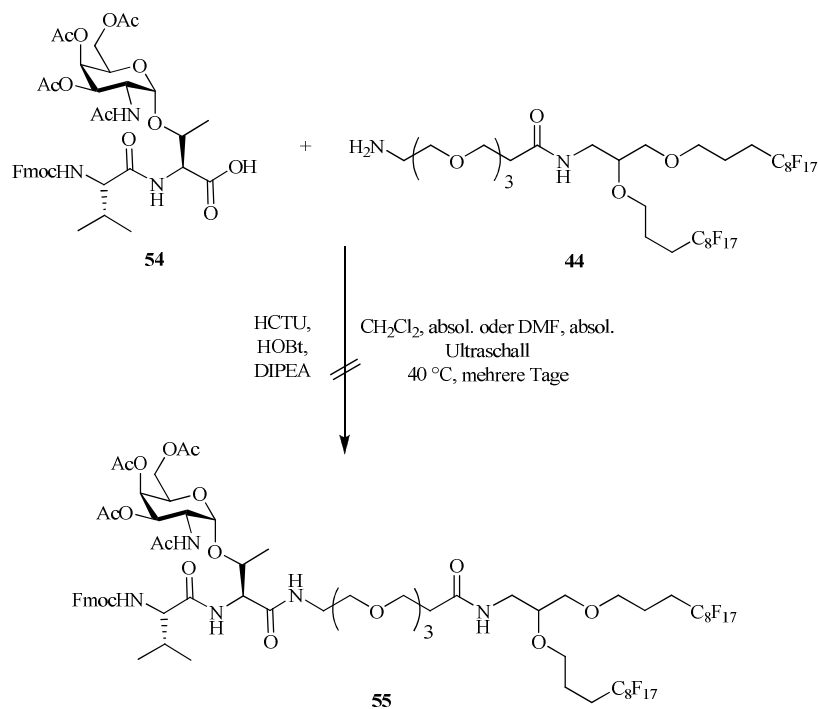


Abbildung 4.39: Versuchte Peptidkupplung zu dem Konjugat **55**.

Bei keiner der durchgeführten Reaktionen konnte jedoch die Bildung des Produktes **55** beobachtet werden, wobei die Vermutung nahe lag, dass **44** verknäuelte oder in Form von Mizellen vorliegt, wodurch die Aminfunktion für den elektrophilen Angriff nicht oder nur sehr schlecht zugänglich ist. Allerdings führte auch ein Erwärmen der Reaktionslösung auf 40 °C bzw. die Reaktionsführung im Ultraschallbad zu keinem Erfolg, obwohl geordnete Strukturen wie Mizellen unter diesen Bedingungen ggf. wieder aufgebrochen werden können. Folglich musste zur Herstellung des gewünschten Konjugats erneut eine Änderung der Synthesestrategie erfolgen, wobei der perfluoralkylierte Rest zunächst ohne den Triethylenglycolspacer an ein Peptidkonjugat gekuppelt

wurde. Dafür ist es allerdings von Vorteil den Triethylenglycolspacer zur Vermeidung konformeller Wechselwirkungen bereits zuvor an das T_N-Dipeptid anzubinden.

4.4.4 Darstellung der Konjugate mit dipeptidischer Kopfgruppe

Um die C-terminal deblockierte Verbindung **41** als gemeinsame Vorstufe für die Festphasenpeptidsynthese und die Synthese des Dipeptid-Konjugats nutzen zu können, wurde im ersten Schritt der Triethylenglycolspacer **25** an die Glycosylaminosäure **41** gekuppelt (Abbildung 4.40).

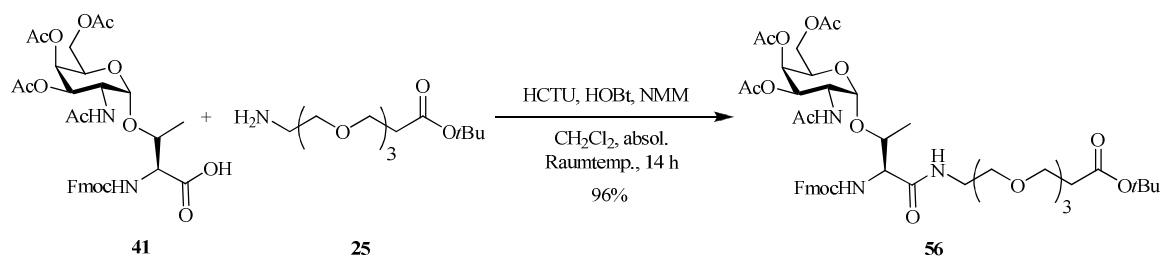


Abbildung 4.40: Anbringen des Triethylenglycolspacers an den C-Terminus der Glycosylaminosäure **41**.

Auch in dieser Reaktion zeigte sich erneut eine deutliche Abhängigkeit des Reaktionserfolges vom Kupplungsreagenz. Bei der Verwendung von HCTU/HOBT/NMM in absol. Dichlormethan und einer Reaktionszeit von 14 h bei Raumtemperatur wurde **56** mit 96% Ausbeute isoliert. Wurde hingegen unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen PyBOP als Kupplungsreagenz benutzt, entstand **56** nur zu 72%. Bei einer Betrachtung der R_F-Werte von Edukt **41** und Produkt **56** fiel zudem auf, dass mit der Anbindung des Triethylenglycolspacers eine deutliche Polaritätssteigerung einherging.

Im nächsten Schritt musste N-terminal die Peptidkette um ein N-Acetyl-blockiertes Valin verlängert werden. Dies ist jedoch stereoselektiv nicht möglich, da es unter den Reaktionsbedingungen basenkatalysiert zu einer Oxazolombildung der aktivierten Aminosäure käme.^[163] Dessen α -Wasserstoffatom ist so acide, dass über eine Keto-Enol-Tautomerie die ursprünglich gebildete Verbindung mit seinem Enantiomer im Gleichgewicht steht (Abbildung 4.41).

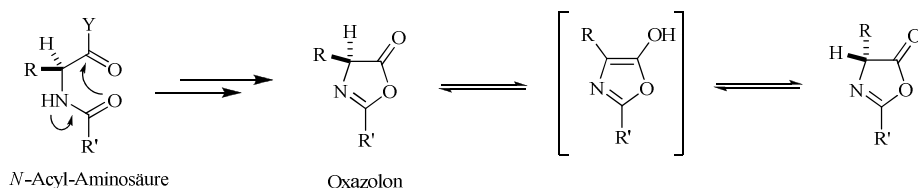


Abbildung 4.41: Racemisierung von N-Acyl-Aminosäuren über eine Oxazolone-Zwischenstufe.

Um die Racemisierung möglichst gering zu halten werden nicht-polare Lösungsmittel, möglichst geringe Mengen Base, niedrige Reaktionstemperaturen und Carbamat-Schutzgruppen für die Aminfunktion verwendet. Aus diesen Gründen musste die entsprechende Kupplung über zwei Stufen unter Einsatz eines kommerziell erhältlichen Fmoc-blockierten Valins durchgeführt werden.

Nach der Deblockierung der Aminfunktion von **56** mit Piperidin in Dichlormethan und flash-chromatographischer Abtrennung vom Fulven-Addukt wurde das aus **56** hervorgegangene freie Amin in der Peptidkupplung eingesetzt (Abbildung 4.42).

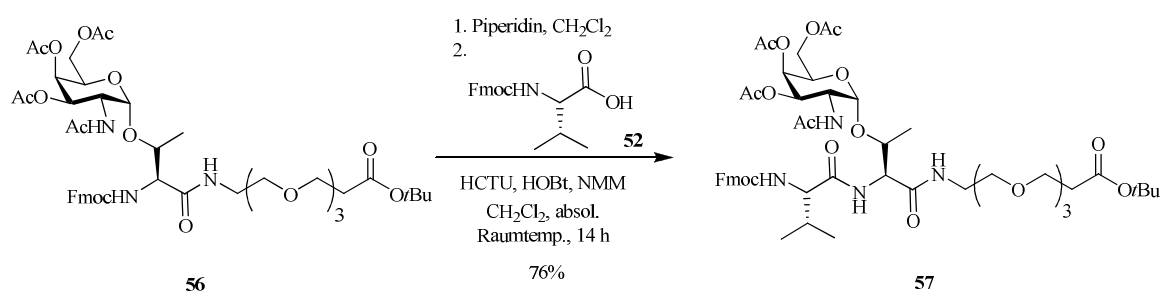


Abbildung 4.42: Kupplung des Fmoc-Valins **52**.

Auch in diesem Fall lieferte das System aus HCTU, HOBt und NMM in absol. Dichlormethan die besten Kupplungsergebnisse. So konnte **57** nach 14stündiger Reaktionszeit bei Raumtemperatur und flashchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 76%, bezogen auf die Fmoc-blockierte Verbindung **56**, isoliert werden. Um dieses Produkt als Carbonsäurekomponente in der Kupplung mit den Glycerin-Membranankern einsetzen zu können, musste zunächst das Schutzgruppenmuster von **57** angepasst werden.

Dazu wurde die Carbamatschutzgruppe gegen eine *N*-Acetyl-Gruppe ausgetauscht, indem nach Behandlung mit Piperidin eine dem *Capping*-Schritt bei der Festphasenpeptidsynthese analoge Umsetzung mit DIPEA, Essigsäureanhydrid und katalytischen Mengen an Hydroxybenzotriazol (HOBt) in Dichlormethan durchgeführt wurde. Dabei konnte das gewünschte Produkt **58** mit einer Ausbeute von 63% erhalten werden (Abbildung 4.43).

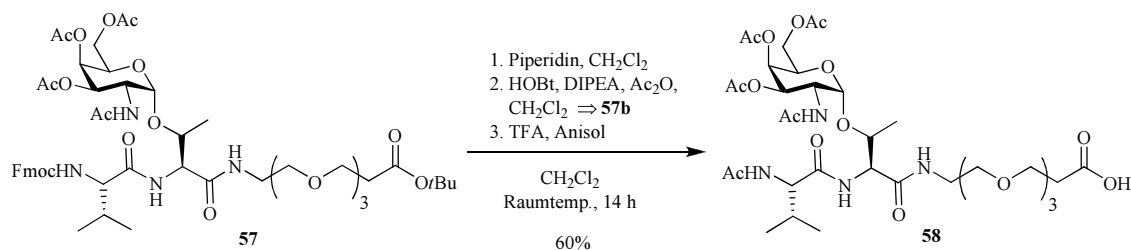


Abbildung 4.43: Schutzgruppenmanipulationen am *T_N*-Dipeptid **57**.

Die abschließende Freilegung der Carboxyfunktion, sprich die Spaltung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe, erfolgt acidolytisch mit Trifluoressigsäure in Gegenwart des Kationenfängers Anisol glatt, so dass **58** mit einer Gesamtausbeute von 60% über die drei Stufen erhalten wurde.

Die anschließend untersuchte Kupplung der Glycerolanker **21**, **45** und **46** mit **58** wurde wie zuvor unter Verwendung von HCTU durchgeführt, wobei sich der Einsatz eines Lösungsmittelgemisches aus absol. Tetrahydrofuran, absol. Dichlormethans und absol. DMF als besonders günstig erwies (Abbildung 4.44).

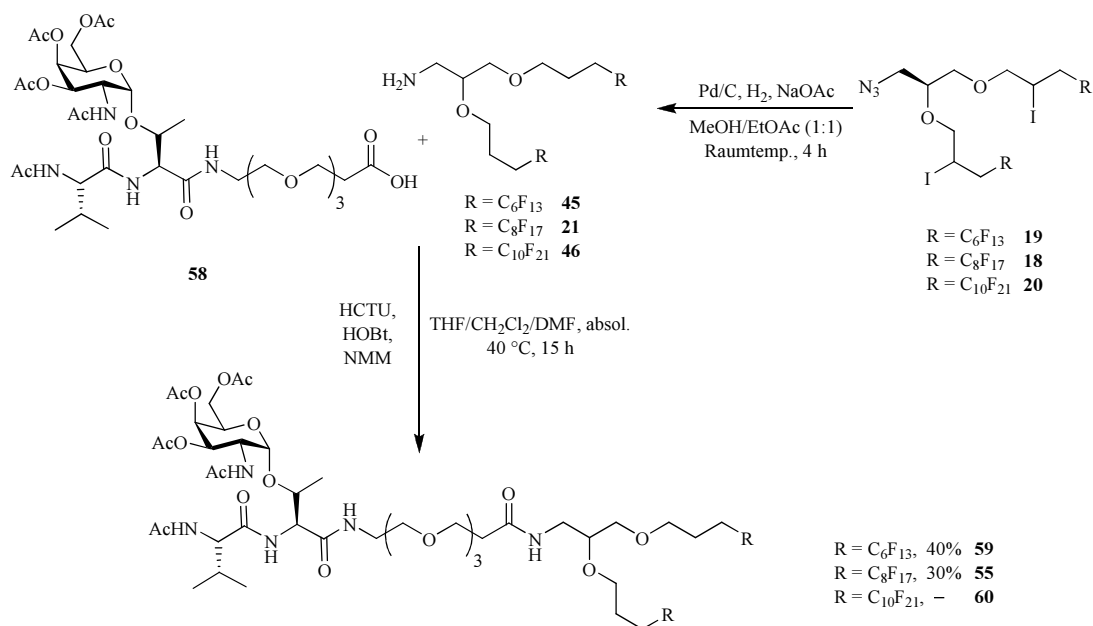


Abbildung 4.44: Peptidkupplung zu den Konjugaten **55** und **59**.

Wie schon bei den zuvor beschriebenen Peptidkupplungen von **27** (Kapitel 4.4.2) kamen als Aminkomponenten die Rohprodukte aus der direkt vorgelagerten Reduktion der Azide **18**, **19** und **20** zum Einsatz. Nach 15-stündiger Reaktionszeit bei 40 °C und anschließender Aufarbeitung konnten für die Perfluorhexyl- und Perfluoroctyl-substituierten Verbindungen die jeweiligen Produkte AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-GlycF₂₆ **59** (40% Ausbeute) und AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-GlycF₃₄ **55** (30% Ausbeute) isoliert werden. Dabei beziehen sich die Angaben zur Ausbeute auf die Azidkomponente, d. h. über zwei Stufen inkl. Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC. Für H₂N-GlycF₄₂ **46** konnten keine geeigneten Kupplungsbedingungen gefunden werden.

Die beiden erhaltenen Verbindungen **55** und **59** wurden im letzten Syntheseschritt einer selektiven *O*-Deacetylierung unterzogen. Die dafür gewählten Reaktionsbedingungen gehen auf ZEMPLÉN^[146] zurück und erfordern die Behandlung der acetylierten Edukte mit Natrium-methanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 9.5 (Abbildung 4.45).

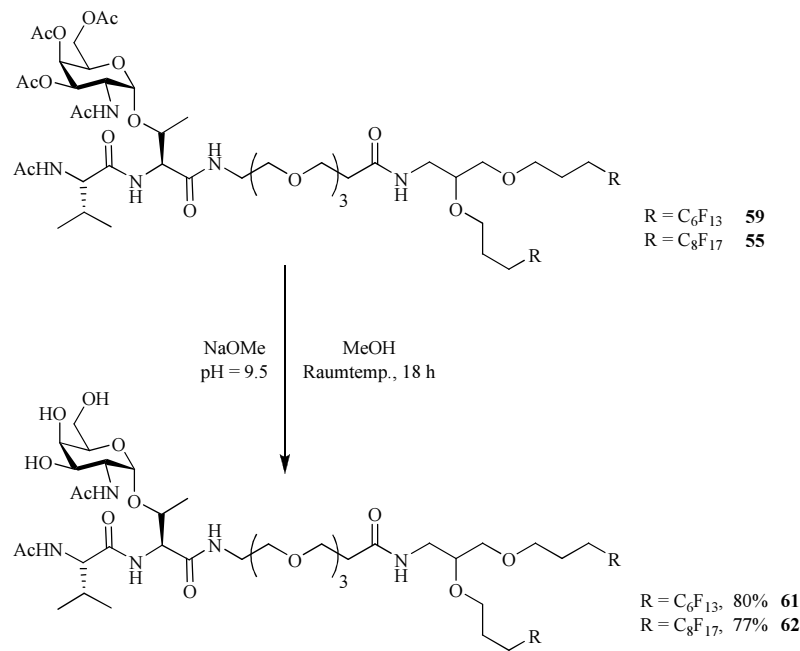


Abbildung 4.45: Deacetylierung unter Zemplén-Bedingungen.

Bei dieser Reaktion ist eine exakte Einstellung des pH-Wertes essentiell, denn ein zu niedriger Wert führt nur zu einer unvollständigen Deacetylierung, während bei einer zu basischen Reaktionslösung die basenkatalysierte β -Eliminierung der Galactosaminseitenkette einsetzen kann.^[164,165] Bei einem pH-Wert von 9.5 hingegen ließen sich die deacetylierten Produkte **61** und **62** in 80% und 77% Ausbeute nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC isolieren.

Mit den so hergestellten amphiphilen Glycerolderivaten **44** und **50** mit Triethylglycolspacer, bzw. dipeptidischer T_N -Kopfgruppe (**61** und **62**) konnten nun erste Studien zum Mischungsverhalten in Modell-Lipiden anhand von Langmuir-Blodgett-Untersuchungen in Kooperation mit P. SCHEIBE durchgeführt werden.

4.4.5 Die Langmuir-Blodgett-Technik

Die Untersuchungen zum Phasenverhalten und die Bildung von lateral ausgedehnten Lipidschichten werden in einem Langmuir-Blodgett-Trog durchgeführt.^[166] Dazu wird auf eine Subphase (Reinstwasser oder Pufferlösungen), deren Fläche durch zwei Barrieren variiert werden kann, eine verdünnte Lösung des Lipids gespreitet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels entsteht eine monomolekulare Lipidschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche, wobei die polaren Kopfgruppen zur Subphase zeigen und sich die hydrophoben Ketten zur Luft hin orientieren. Die bestimmten Langmuir-Isothermen beschreiben die Abhängigkeit des Drucks als Funktion der

Fläche pro Molekül, während eine laterale Kompression bei konstanter Temperatur auf die gespreitete Lipidmonolage wirkt. Das Aussehen einer solchen Isotherme ist in **Abbildung 4.46** dargestellt.

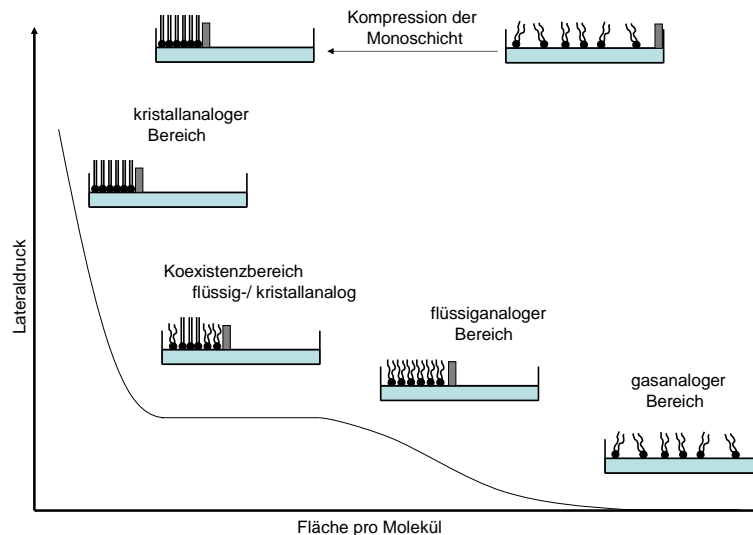


Abbildung 4.46: Schematische Darstellung einer Langmuir-Isotherme im Schub-Flächen-Diagramm.^[167]

Die Moleküle befinden sich bei einem geringen Druck im gasanalogen Bereich, in dem nur eine geringe Interaktion untereinander vorliegt. Durch einen Anstieg der lateralen Kräfte werden die intermolekularen Wechselwirkungen gesteigert, so dass sich der flüssiganaloge Bereich mit noch ungeordneten Lipidketten ausbildet. Ein horizontaler Bereich im Diagramm deutet auf einen Phasenübergang erster Ordnung hin, bei dem die flüssig- und kristallanaloge Phase mit einem für die Phase charakteristischen konstanten Lateraldruck koexistieren. Eine weitere Kompression führt aufgrund der zunehmenden elektrostatischen Abstoßung der polaren Kopfgruppen zu einem starken Druckanstieg sowie zur Ausbildung einer kristallanalogen Phase, in welcher die Alkylketten parallel zueinander ausgerichtet sind. Letztendlich kommt es zum Kollaps der Lipidschicht. Eine direkte Visualisierung des Phasenverhaltens der eingesetzten Lipide auf dem Langmuir-Blodgett-Trog kann über die Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM)^[168] erfolgen.

Nachdem die Charakterisierung der Lipidschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche abgeschlossen ist, wird bei einem bestimmten Lateraldruck häufig im oder in der Nähe des Koexistenzbereiches die Monoschicht auf ein Substrat übertragen, um am Rasterkraftmikroskop (AFM)^[169] die nun festkörpergestützten Lipidmonoschichten mit einer größeren Detailschärfe untersuchen zu können (vgl. Abbildung 4.47).

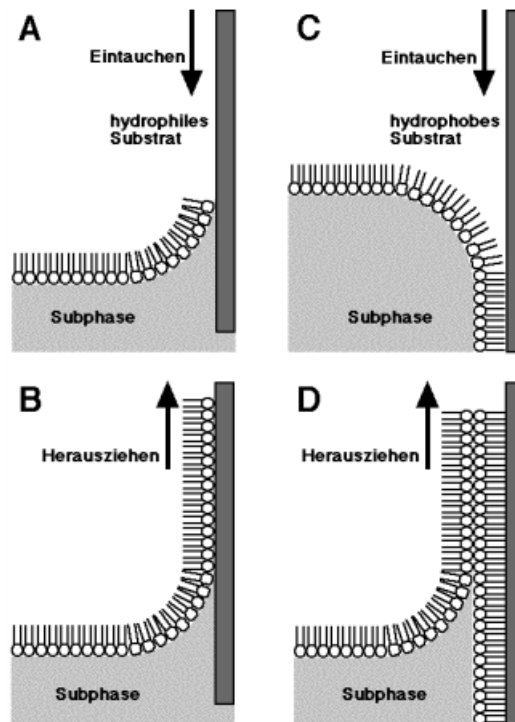


Abbildung 4.47: Schematische Darstellung von Langmuir-Blodgett-Übertragen: (A) Beim Eintauchen eines hydrophilen Substrates wird kein Film übertragen. (B) Beim Herausziehen desselben Substrates resultiert eine Monoschicht. (C) Übertrag einer Monoschicht auf ein hydrophobes Substrat durch Eintauchen. (D) Beim Herausziehen desselben Substrates resultiert eine zweite Monoschicht.^[170]

Dazu wird ein hydrophiles Substrat senkrecht in die Subphase getaucht und mit konstantem Druck bei möglichst gleichmäßiger Geschwindigkeit herausgezogen. Die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide orientieren sich zum Substrat und beim Herausziehen scheidet sich eine Monoschicht ab, bei der die hydrophoben Ketten nach außen zeigen. Prinzipiell ist der Übertrag von zwei oder mehreren Schichten möglich, jedoch sind die von P. SCHEIBE durchgeführten AFM-Messungen mit Monoschichten durchgeführt worden.

4.4.6 Schub-Flächen-Diagramme der Glycerin-Amphiphile

Die vier in Abbildung 4.48 dargestellten Isothermen der Reinverbindungen **44**, **50**, **61** und **62** sind bei 25 °C und einer Schubgeschwindigkeit von 5 cm² pro Minute von P. SCHEIBE auf einem Langmuir-Blodgett-Trog aufgenommen worden.

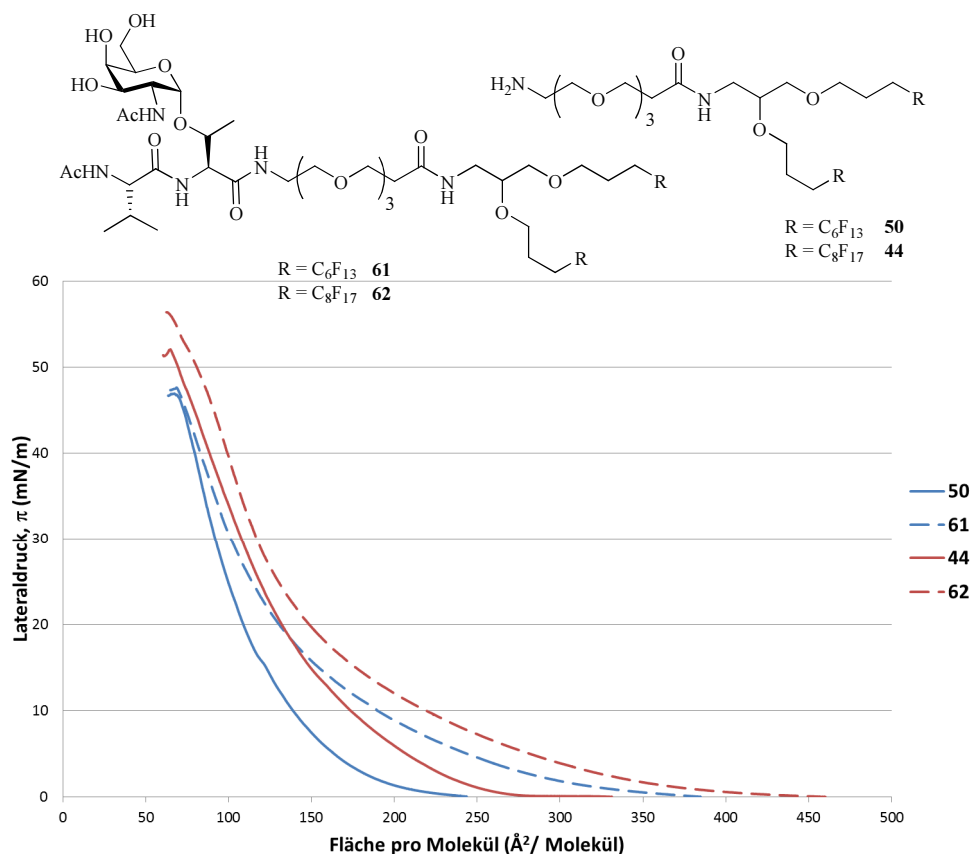


Abbildung 4.48: Isothermen der reinen Verbindungen 44, 50, 61 und 62.

Ein Phasenübergang in die kristallanalogue Phase ist nur in der Isotherme der Verbindung **50** bei einem Lateraldruck von 16 mN/m und einem Flächenbedarf von 120 Å² zu erkennen, während bei den drei anderen Isothermen keine eindeutigen Übergänge auftreten. Vergleicht man die Isothermen von **50** und **44** (durchgezogene Linie) sowie **61** und **62** (gestrichelte Linie), die identische Kopfgruppen tragen, so lässt sich feststellen, dass die Perfluorooctylkette gegenüber der Perfluorhexylkette bei gleicher Kopfgruppe eine größere Fläche für sich beansprucht. Aus dem Vergleich der Isothermen mit gleicher Kettenlänge der Perfluoralkylgruppen (gleiche Farbe), geht wie erwartet hervor, dass die größere T_N-dipeptidische Kopfgruppe bei identischen Lateraldrücken einen höheren Raumanspruch aufweist. Auch zeigt sich, dass der Übergang von der gasanalogen in die flüssiganalogue Phase mit zunehmender Größe der Moleküle hin zu größeren Flächen verschoben ist.

4.5 Synthese des Lysinankersystems

Die zweite Kernstruktur sollte ebenfalls die Einführung zweier unterschiedlicher Alkylketten ermöglichen, gleichzeitig ein Stereozentrum enthalten und in einer Peptidkupplung als Amin-

komponente fungieren. All diese Kriterien erfüllt die Aminosäure Lysin, weshalb diese in orthogonal geschützter Form zum Aufbau eines Perfluoralkylankersystems herangezogen werden. Zunächst wurden die unterschiedlichen Alkyl- bzw. Perfluoralkylketten an die Carboxyfunktion des Lysins gekuppelt, wobei neben Octylamin auch ein über zwei Stufen nach literaturbekannter Synthese^[171] herstellbares perfluoriertes Amin **65** eingesetzt wurde (Abbildung 4.49).

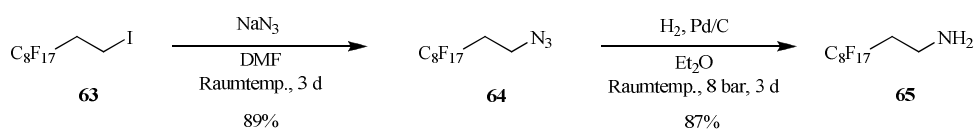


Abbildung 4.49: Synthese des perfluorierten Amins **65**.

Ein erster Versuch, das Azid in **64** über eine von Trioctylmethylammoniumiodid vermittelte Reaktion bei 90 °C in Wasser^[172] anzubinden, schlug jedoch fehl. Im Gegensatz hierzu führte die Umsetzung von 1-Iod-1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluordecan **63** mit einem großen Überschuss Natriumazid unter Einsatz eines Ultraschallbades zur gewünschten Produktbildung in 89% Ausbeute. Die Reduktion zum Amin **65** mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle musste bei erhöhtem Druck durchgeführt werden und lieferte in Diethylether bei 8 bar Wasserstoffdruck die benötigte Aminkomponente **65** nach dreitägiger Reaktionszeit.

Die Kupplung eines Alkylamins an *N*_α-Boc-*N*_ε-Z-Lysin wurde in der Literatur bereits mit DCC und HOBt in Dichlormethan beschrieben,^[173] jedoch konnte das Verfahren nicht mit zufriedenstellenden Ausbeuten reproduziert werden. Aus diesem Grund wurden alternative Reaktionsbedingungen für die in Abbildung 4.50 dargestellte Umsetzung des orthogonal geschützten Lysins **66** mit Octylamin **67** gesucht.

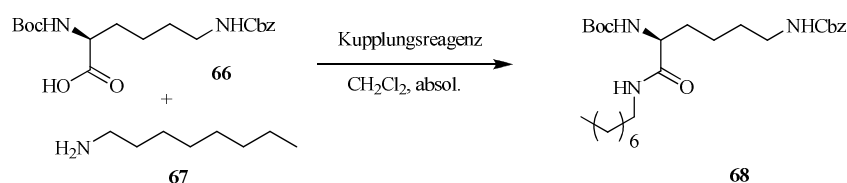


Abbildung 4.50: Zu optimierende Reaktion.

Durch einen Wechsel des Kupplungsreagenzes von DCC zu TBTU konnten relativ schnell geeignete Reaktionsbedingungen identifiziert werden. So wurden bei der Verwendung von DCC als Kupplungsreagenz nur 3% des gewünschten Amids erhalten, während TBTU unter ansonsten identischen Reaktionsbedingungen das gekuppelte Produkt **68** mit 61% Ausbeute lieferte. Wurde

zusätzlich die Reaktionsmischung noch leicht erwärmt, erfolgte die Peptidkupplung nahezu quantitativ (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Optimierungsstudien.

Nr.	Kupplungsreagenz	Additiv	Base	Lösungsmittel	Temp.	Dauer	Ausbeute
68	DCC	HOBt	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	15 h	3%
68	TBTU	HOBt	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	15 h	61%
68	TBTU	HOBt	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	40 °C	6 h	99%

Aufgrund der sehr guten Ausbeuten bei der Kupplung von Octylamin wurden diese Reaktionsbedingungen (TBTU, HOBt und NMM in absol. Dichlormethan) auch auf die schwierigere Umsetzung des perfluorierten Amins **65** angewendet (Abbildung 4.51).

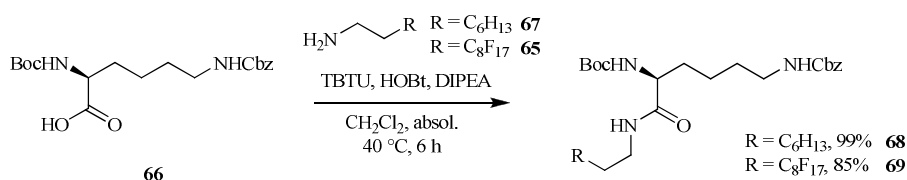


Abbildung 4.51: Kupplung von Octylamin **67** und einem perfluorierten Decylamin **65** an ein orthogonal geschütztes Lysin.

Zwar üben die elektronegativen Fluoratome einen –I-Effekt auf den Aminstickstoff aus und reduzieren damit dessen Nucleophilie, doch ist dieser Effekt aufgrund der beiden dazwischenliegenden CH₂-Einheiten nur noch schwach ausgeprägt. Entscheidender für den Reaktionsverlauf ist hingegen die begrenzte Löslichkeit von perfluorierten Verbindungen in organischen Lösungsmitteln. Sowohl das fluorierte Edukt **65** als auch das fluorierte Produkt **69** weisen eine deutlich geringere Löslichkeit im Vergleich zu ihren nicht-fluorierten Analoga **67** und **68** auf, was die geringere Ausbeute von 85% in der Synthese von **69** erklärt.

Für die Einführung einer perfluorierten Carbonsäure wird das α-Amin des Lysins selektiv deblockiert.^[174] Die Spaltung der *Boc*-Schutzgruppe erfolgt im Säuren durch Behandlung mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan, wobei erneut Anisol als Kationenfänger fungiert (Abbildung 4.52). Die Reaktionslösung wurde zur Aufarbeitung mit wässriger Ammoniaklösung gewaschen, um das freie Amin zu isolieren. Ohne einen solchen Waschschriff würde das TFA-Salz von **70** bzw. **71** anfallen, wodurch ein zusätzliches Äquivalent Base in der folgenden Peptidkupplung verwendet werden müsste.

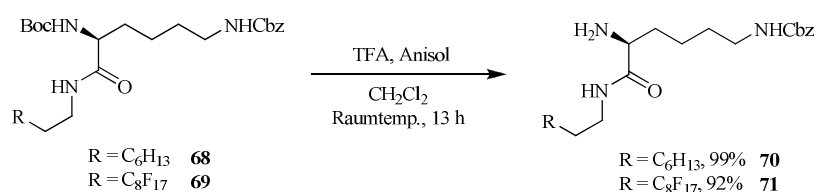


Abbildung 4.52: Selektive Deblockierung der Boc-Schutzgruppe.

Nach den guten Erfahrungen mit TBTU als Kupplungsreagenz sollte dieses wiederum für die Aktivierung der Perfluornonansäure **72** verwendet werden. Die Bildung des Aktivesters wurde im Ultraschallbad durchgeführt, bevor die Aminkomponente **70** zugegeben wurde. Nach Aufarbeitung konnte jedoch kein Produkt isoliert werden. Selbst bei Verwendung des reaktiveren Reagenzienpaares HATU und HOAt und einer erhöhten Reaktionstemperatur von 40 °C konnte keine Produktbildung erreicht werden (vgl. Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Untersuchte Reaktionsbedingungen für die Kupplung der Perfluornonansäure **72**.

Nr.	Kupplungsreagenz	Additiv	Base	Lösungsmittel	Temp.	Dauer	Ausbeute
74	TBTU	HOBt	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	15 h	–
74	HATU	HOAt	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	40 °C	15 h	–
74	Säurechlorid	–	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	15 h	84%
75	Säurechlorid	–	DIPEA	CH ₂ Cl ₂ , absol.	Raumtemp.	15 h	75%

Da die perfluorierte Säure kein Stereozentrum enthält und damit keine Racemisierung zu befürchten war, konnte eine klassische Aktivierung der Carbonsäure über das Säurechlorid **73** erzielt werden.^[175] Wird dieses in Gegenwart von DIPEA als Base in absol. Dichlormethan in der Kupplungsreaktion mit **70** bzw. **71** eingesetzt,^[176] entsteht das Produkt **74** mit einer Fluorkette in 84% Ausbeute. Wie auch schon in den vorigen Umsetzungen beobachtet wurde, verlaufen die analogen Reaktionen an dem perfluoralkylierten Substrat **71** mit niedrigeren Ausbeuten, so dass **75** nur mit 75% Ausbeute isoliert werden konnte (Abbildung 4.53).

Die Überführung der Perfluornonansäure mit Thionylchlorid und katalytischen Mengen Pyridin als Initiator der Reaktion führte nicht nur zu einer Reaktivitätssteigerung der Carbonylkomponente, vielmehr ist das Säurechlorid **73** im Gegensatz zur Säure **72** bzw. deren Aktivestern eine Flüssigkeit und besitzt eine deutlich höhere Löslichkeit in Dichlormethan und stellt damit auch die wahrscheinliche Erklärung dar, was die Umsetzung erleichtert. Die Reinigung von **74** erfordert eine Flash-Säulenchromatographie, während **75** bereits durch Umkristallisation aus Methanol in reiner Form erhalten werden konnte.

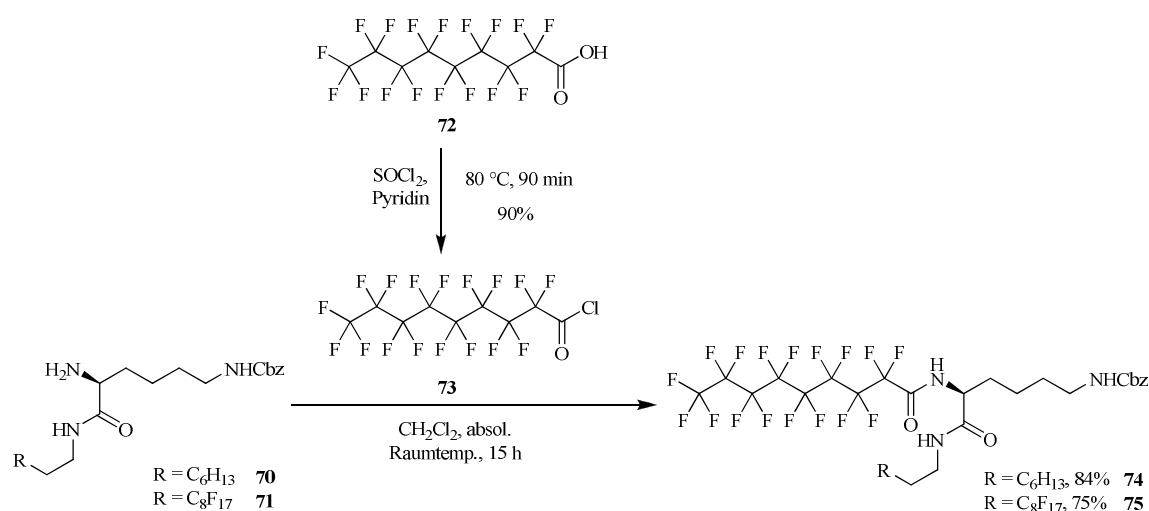


Abbildung 4.53: Einführung einer Perfluoralkylkette über ein Säurechlorid.

Um in den beiden Lysin-Derivaten die Amino-Gruppe zur Konjugation an den Triethylenglycolspacer **27** bzw. die T_N-dipeptidische Kopfgruppe **58** freizusetzen, wurde die Cbz-Schutzgruppe durch Hydrogenolyse mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle in Ethanol^[162] abgespalten (Abbildung 4.54). Die jeweiligen Amine **76** und **77** wurden dabei in hervorragender Ausbeute und ausreichender Reinheit isoliert, so dass kein weiterer Chromatographieschritt notwendig wurde.

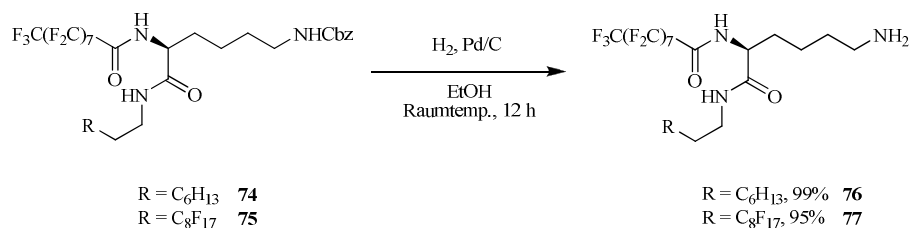


Abbildung 4.54: Deblockierung der Cbz-Schutzgruppe.

Aufgrund der Tatsache, dass die Anbindung des Triethylenglycol-verlängerten Glycerolmembran-ankers **44** an die T_N-dipeptidische Kopfgruppe fehlschlug (vgl. Abbildung 4.39), musste für die geplante Festphasenpeptidsynthese erneut eine Kettenverlängerung über Diglycolsäureanhydrid^[177] durchgeführt werden, um die die Aminfunktion in **76** und **77** in entsprechende Säurefunktionen zu überführen. Dadurch sollte der Einbau dieser Konjugate direkt an der festen Phase ermöglicht werden, was nicht zuletzt auch zu einer leichteren Reinigung der Produkte führen sollte (Abbildung 4.55).

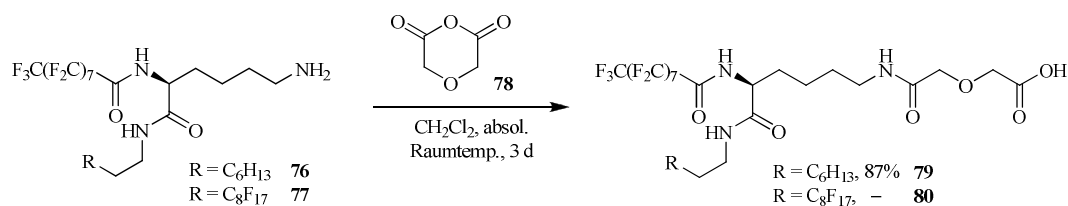


Abbildung 4.55: Kettenverlängerung einesamins zu einer Carbonsäure.

Die Umsetzung mit **78** verlief für die Verbindung **76** mit nur einer Fluorkette glatt und lieferte das Carbonsäurederivat **79** mit 87% Ausbeute. Demgegenüber wurde mit dem zwei Fluorketten tragenden Lysinderivat **77** bei Reaktion mit dem Diglycolsäureanhydrid ein Produktgemisch erhalten, welches nicht über Säulenchromatographie oder F-SPE getrennt werden konnte. Selbst durch Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC konnten nur Spuren des Produktes **80** isoliert werden. Weitere Versuche den Umsatz der Reaktionen zu vervollständigen, beinhaltete zunächst das Erwärmen auf 40 °C in Dichlormethan, den Zusatz von DIPEA als Base und schließlich den Wechsel des Lösungsmittels zu Toluol,^[178] um höhere Reaktionstemperaturen von 80 °C zu erreichen. Allerdings führte keiner dieser Versuche zu einer wesentlichen Verbesserung der Produktausbeute, weshalb die nachfolgende Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nur an dem Lysin-Derivat **79** mit einer Fluorkette durchgeführt werden konnte.

4.6 Synthese der von Lysin abgeleiteten Konjugate

Neben der Anbindung des Triethylenglycolspacers an die beiden mit Fluoralkylketten versehenen Lysin-Derivate **76** und **77**, sollte wie zuvor bei den Glycerolkonjugaten eine Funktionalisierung mit dem T_N-Dipeptid als antigene Kopfgruppe erfolgen. Darüber hinaus sollte durch die Anbindung eines Fluoreszenzmarkers der Nachweis erbracht werden, dass diese Ankersysteme für die spezifische Immobilisierung an perfluorierten Glaträgern und damit für die Entwicklung von Microarray-Systemen geeignet sind.

4.6.1 Darstellung eines fluoreszierenden Perfluoralkyl-Lysinkonjugats

Für einen direkten Nachweis der auf einer fluorierten Glasplatte aufgetragenen Membrananker wurde eine Derivatisierung mit 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) **81** gewählt. Durch nucleophile Substitution mit einem Amin wird dabei aus dem NBD-Cl ein *push-pull*-System generiert, welches fluoreszenzaktiv ist. Bei Einstrahlung von Licht mit einer Wellenlänge

im Absorptionsbereich des Fluorophors können diese Verbindungen direkt unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Ausgehend vom Amin **77** wurde in einer einstufigen Synthese das Benzofurazan **81** eingeführt^[179] und so das fluoreszenzaktive System **82** erhalten (Abbildung 4.56).

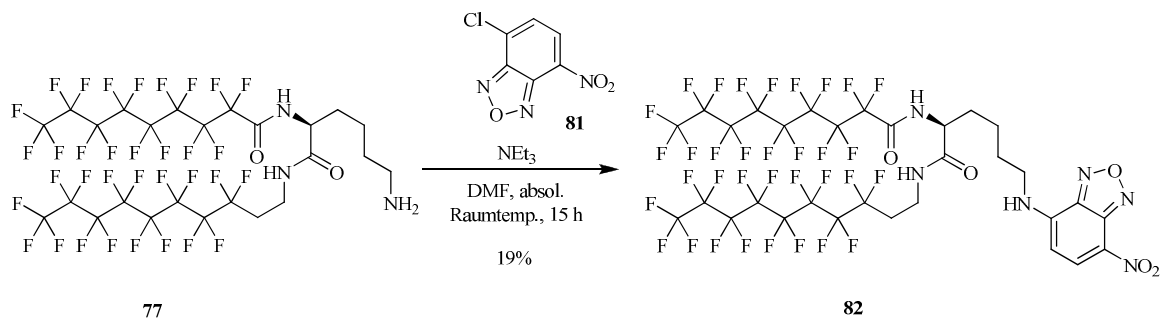


Abbildung 4.56: Synthese eines fluoreszierenden Lysinmembranankers.

Der Umsatz der Reaktion fiel deutlich höher aus, als es die geringe Ausbeute von nur 19% vermuten lässt, denn auch bei **82** ergaben sich aufgrund mangelnder Löslichkeit in organischen Solventien Schwierigkeiten in der Reinigung, weshalb bei der semipräparativen RP-HPLC-Chromatographie viel Produkt verloren ging.

Mit einer Kapillare wurde das funktionalisierte Amphiphil in verschiedenen Konzentrationen auf den fluorierten Glaträger aufgetragen und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. In Abbildung 4.57 sind die Vergrößerungen eines Tropfens einer 1 mmol Lösung von **82** in Methanol dargestellt.

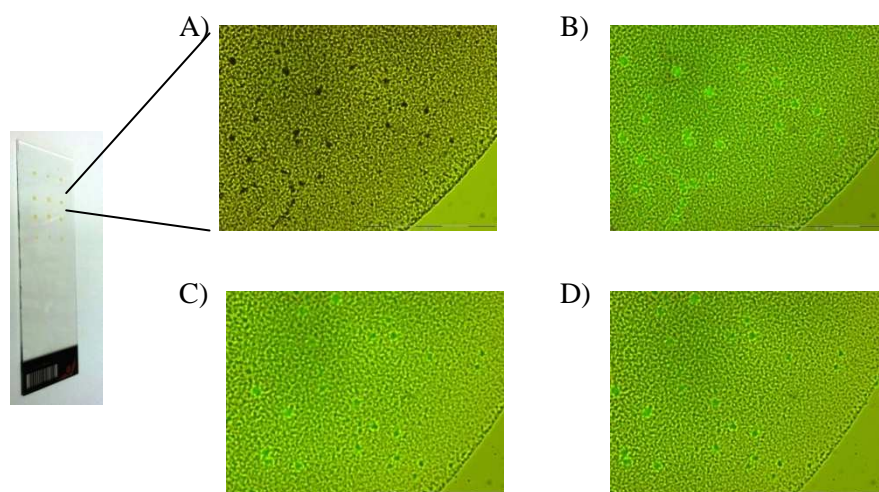


Abbildung 4.57: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. (A) Ohne Einstrahlung. (B) Mit Einstrahlung vor den Waschschriffen. (C) Nach fünf Waschschriffen mit PBS-Puffer. (D) Nach fünf weiteren Waschschriffen mit Reinstwasser.

Es zeigte sich, dass der Tropfen auf der Glasplatte fluoreszenzaktiv ist und sich dies auch nach fünf Waschschrinen mit PBS-Puffer, einer phosphatgepufferten Salzlösung mit $\text{pH} = 7.2$, nicht änderte. Selbst nach fünf weiteren Waschschrinen mit Reinstwasser war der Membrananker **82** nicht nennenswert heruntergespült, so dass die Glasplatte an entsprechender Stelle immer noch fluoreszierte. Folglich können die hergestellten Membrananker auf einer fluorierten Glasplatte effektiv immobilisiert werden und sollten für einen Einsatz in Microarray-Systemen geeignet sein.

4.6.2 Anbindung des Triethylenglycolspacers

Die in der Synthese der Glycerin-Triethylenglycol-Konjugate gemachten Erfahrungen bzgl. der Kupplungsreagenzien (vgl. Kapitel 4.4.2) konnten direkt auf die Synthese der Lysinkonjugate übertragen werden. So erwiesen sich auch hier Kupplungen unter Einsatz von HCTU, HOBT und NMM in einer Mischung aus absol. Dichlormethan und absol. DMF als besonders vielversprechend. Die ebenfalls untersuchte Kupplung über ein entsprechendes Säurechlorid brachte bspw. kein Produkt hervor, so dass sich die in Abbildung 4.58 dargestellte Synthesemethode als die bis dato für die Kupplung der Triethylenglycolsäure **29** an ein mit Perfluoralkylketten versehenes Amin **76** oder **77** herausstellte.

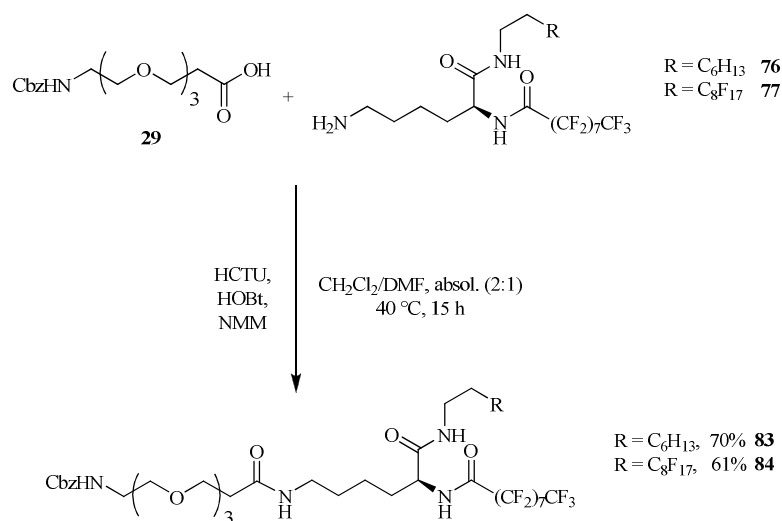


Abbildung 4.58: Peptidkupplung des Triethylenglycolspacers **27** an das Lysinmembranankersystem.

Da die Zielverbindungen **85** und **86** keiner Chromatographie im präparativen Maßstab unterworfen werden konnten, wurden die geschützten Verbindungen bereits über eine semipräparative RP-HPLC mit einer fluorierten stationären Phase gereinigt. So ließ sich **83** in 70% bzw. **84** in 61% Ausbeute isolieren. Die anschließende hydrogenolytische Spaltung der *Cbz*-

Schutzgruppe^[162] in Isopropanol lieferte die gewünschten Rohprodukte **85** und **86** in hohen Ausbeuten und guten Reinheiten (Abbildung 4.59).

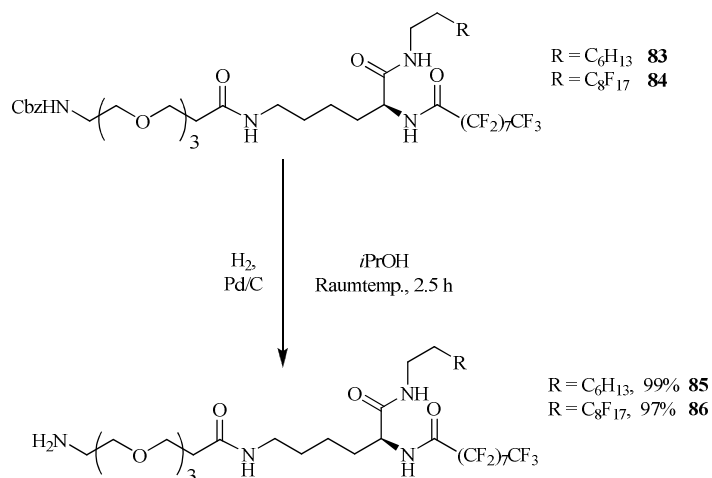


Abbildung 4.59: Finale hydrogenolytische Cbz-Deblockierung.

Wurde die Reaktion nicht in Isopropanol ausgeführt, sondern Methanol oder Ethanol als Lösungsmittel verwendet, konnte erneut die Bildung methylierter bzw. ethylierter Nebenprodukte beobachtet werden.

4.6.3 Synthese von Lysinkonjugaten mit T_N-dipeptidischer Kopfgruppe

Auch die Kupplung der T_N-dipeptidischen Kopfgruppe **58** konnte in Analogie zu Kapitel 4.4.4 ausgeführt werden. Die dort ausgearbeitete und angewendete Synthesestrategie ließ sich erneut erfolgreich auf die Lysinmembrananker übertragen (Abbildung 4.60).

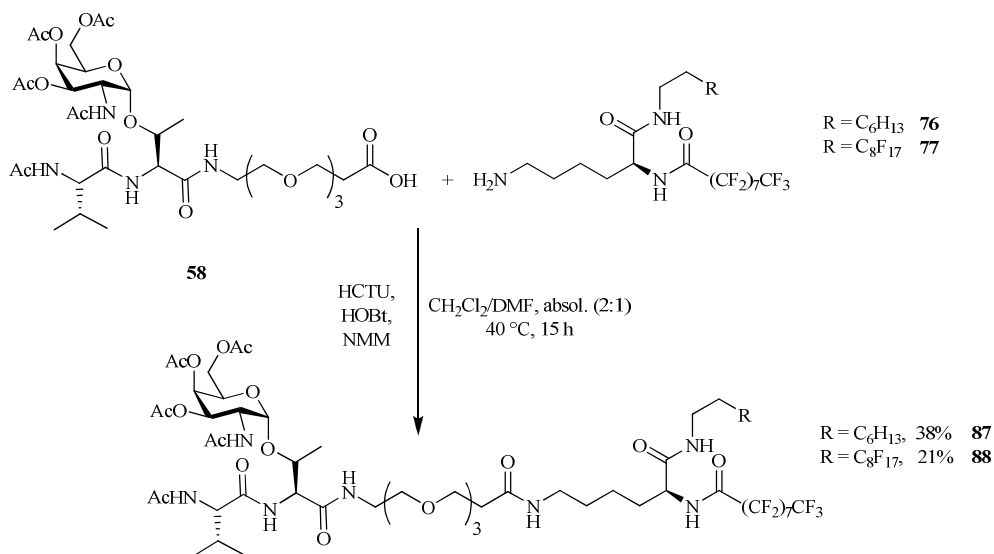


Abbildung 4.60: Konjugation der T_N-dipeptidischen Kopfgruppe mit Lysinmembranankern.

Mit HCTU als Kupplungsreagenz, HOBt als Additiv und NMM als Base gelang die Aktivierung der Säurekomponente in einer 2:1 Mischung aus absol. Dichlormethan und absol. DMF und es wurden die mit einer bzw. zwei Perfluoralkylketten versehene Aminverbindungen **87** bzw. **88** erhalten. Für einen erfolgreichen Verlauf musste diese Reaktion wieder bei leicht erhöhter Temperatur (40 °C) durchgeführt werden, um eine ausreichende Löslichkeit der fluorierten Verbindungen zu gewährleisten. Die RP-HPLC-chromatographische Reinigung führte nach beiden Reaktionen neben der Isolierung der Produkte **87** und **88** zu einer Rückgewinnung von nicht unumgesetzten Amin **76** bzw. **77**, was auf eine nicht vollständig abgelaufene Peptidkupplung hindeutet und die geringen Ausbeuten erklärt. Eine alternative Reaktionsführung mit Tetrahydrofuran als zusätzlichem Lösungsmittel sowie einer Aufteilung des Aktivesters auf zwei Portionen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reaktionsmischung zugesetzt werden, könnten zu einer Steigerung der Ausbeute führen. Entsprechende Optimierungsarbeiten wurden bisher noch nicht durchgeführt, da zunächst genügend Substanz für die Langmuir-Blodgett-Untersuchungen vorliegt.

Als abschließender Schritt mussten noch die Schutzgruppen auf dem Zuckerrest entfernt werden. Dies geschieht unter ZEMPLÉN-Bedingungen^[146] mit Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 9.5 (Abbildung 4.61).

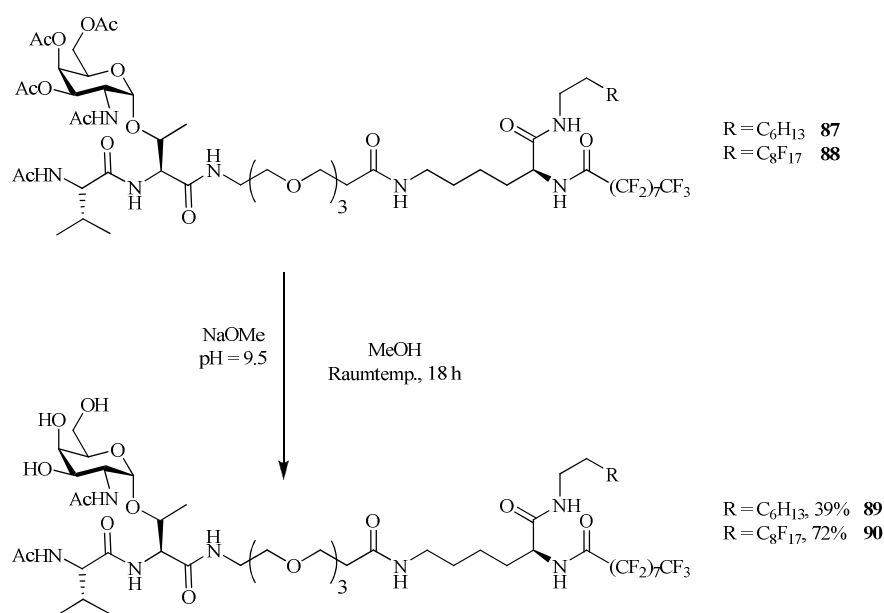


Abbildung 4.61: Deacetylierung nach ZEMPLÉN.

Im Gegensatz zur Deacetylierung des T_N-Antigens **40** kann bei der Deblockierung der peptidischen Strukturen eine alkalischere Lösung verwendet werden, da die Peptidverbindungen nicht so leicht einer β -Eliminierung unterliegen. Dies ist auf das Vorhandensein acider Amid-

protonen zurückzuführen, die für eine Stabilisierung der Struktur gegenüber Basen verantwortlich sind.

Im Folgenden sollen die in Kooperation mit P. SCHEIBE aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ZENTEL durchgeführten ersten Versuche zur Entmischung der vier synthetisierten Amphiphile **85**, **86**, **89** und **90** mithilfe des Langmuir-Blodgett-Trogs vorgestellt werden.

4.6.4 Ergebnisse der Langmuir-Blodgett-Experimente

In Abbildung 4.62 sind zunächst wieder die vier Isothermen der Reinverbindungen **85**, **86**, **89** und **90** mit der Lysingrundstruktur dargestellt. Die Aufnahmen wurden bei 25 °C und einer Schubgeschwindigkeit von 5 cm² pro Minute von P. SCHEIBE auf einem Langmuir-Blodgett-Trog durchgeführt.

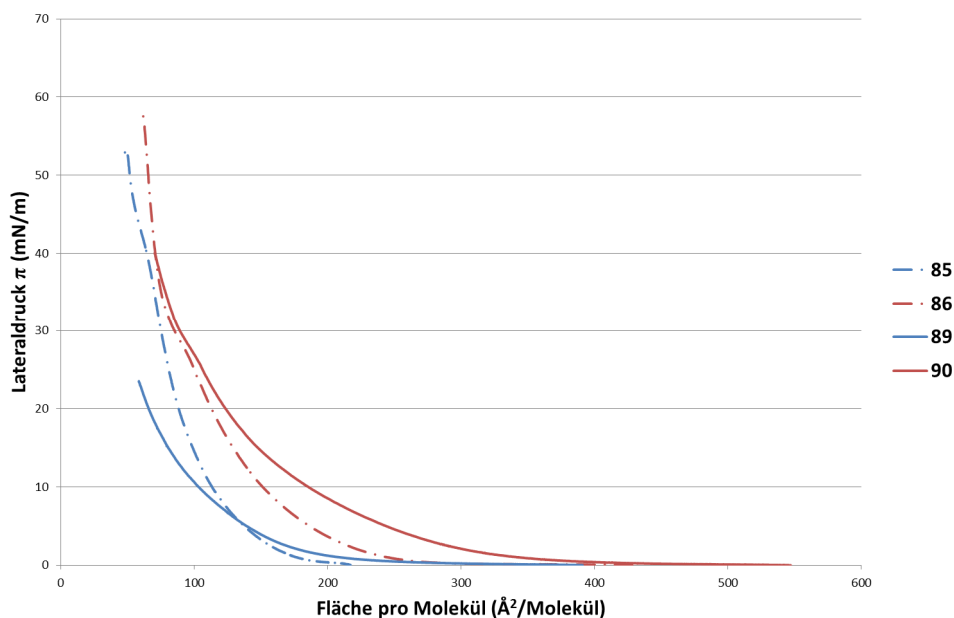
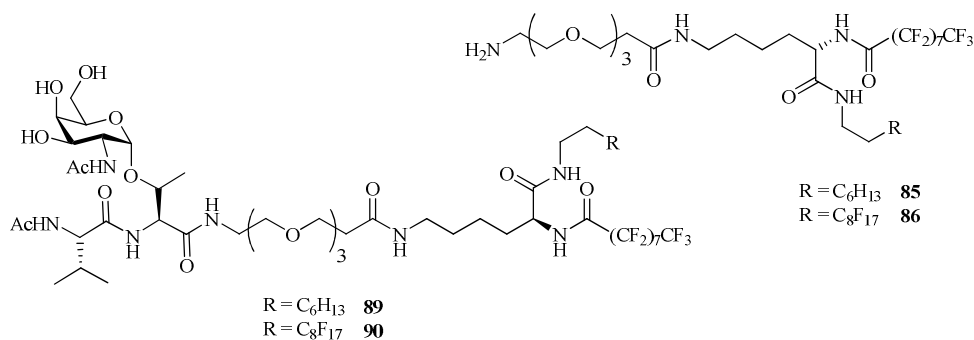


Abbildung 4.62: Isothermen der vier amphiphilen Reinverbindungen.

In den Isothermen für die Lipide mit zwei fluorierten Alkylketten findet der Phasenübergang von der flüssig- zur festanalogen Phase bei einem Lateraldruck von 30 mN/m statt, während bei den

einfach fluorierten Lipiden ein solcher nicht zu erkennen ist. Auffällig ist außerdem, dass für die Lipide mit T_N-dipeptidischer Kopfgruppe **89** und **90** (in der Abbildung mit durchgezogenen Linien dargestellt) kein Kollapsdruck detektiert werden konnte, was auf eine Instabilität der Monolagen zurückzuführen ist, bei denen die große hydrophile Kopfgruppe keine enge Packung der Perfluoralkylketten erlaubt. Weiterhin lässt sich feststellen, dass die Verbindungen mit zwei Perfluoralkylketten **86** und **90** (rote Linien), wie erwartet, einen größeren Platzbedarf als die gemischten Membrananker **85** und **89** (blaue Linien) aufweisen, da Fluoralkylketten ungefähr das Anderthalbfache Volumen einer Alkylkette einnehmen.^[72]

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Verhalten der Amphiphile mit Triethylenglycolspacer **85** und **86** in Mischungen mit einem polymerisierbaren Modelllipid 2-(2-(2-(Diocetadecylamino)-2-oxoethoxy)acetoxymethacrylsäureethylester (DODAMA) untersucht. Die Schub-Flächen-Diagramme der Mischsysteme wurden durch sukzessiven Zusatz von DODAMA erstellt und sind in Abbildung 4.63 für die Verbindung mit nur einer Fluorkette **85** dargestellt. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit werden die Isothermen der Mischungen aus 80 mol%, 60 mol%, 40 mol% und 20 mol% der fluorierten Komponente hier nicht aufgeführt.

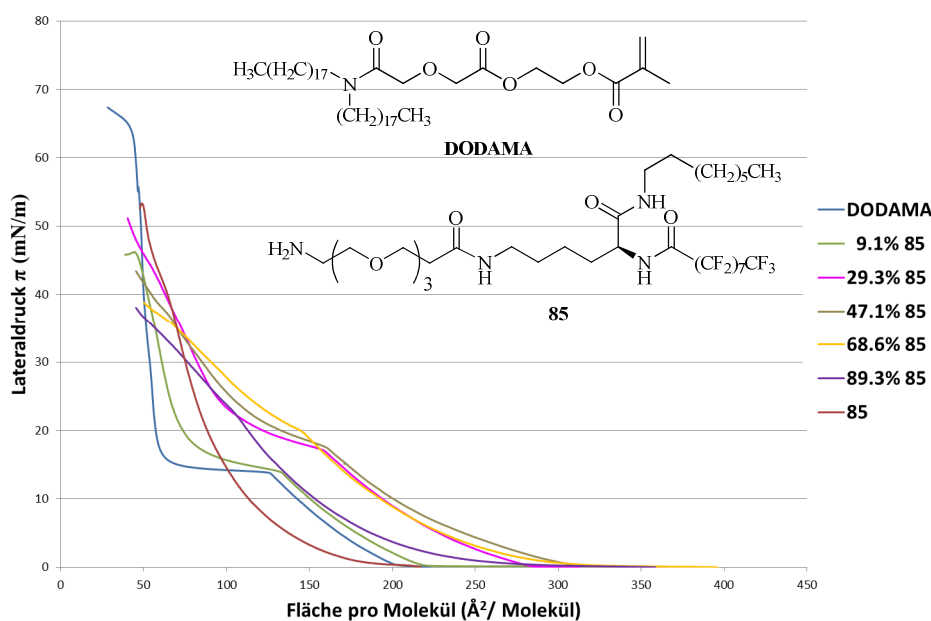


Abbildung 4.63: Isothermen der Mischsysteme mit nur einer Fluoralkylkette.

Die Isothermen der Mischsysteme für die Verbindung mit den zwei Perfluoralkylketten **86** sind in Abbildung 4.64 aufgeführt, wobei erneut die Isothermen der Mischungen aus 80 mol%, 60 mol%, 40 mol% und 20 mol% der fluorierten Komponente aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt sind.

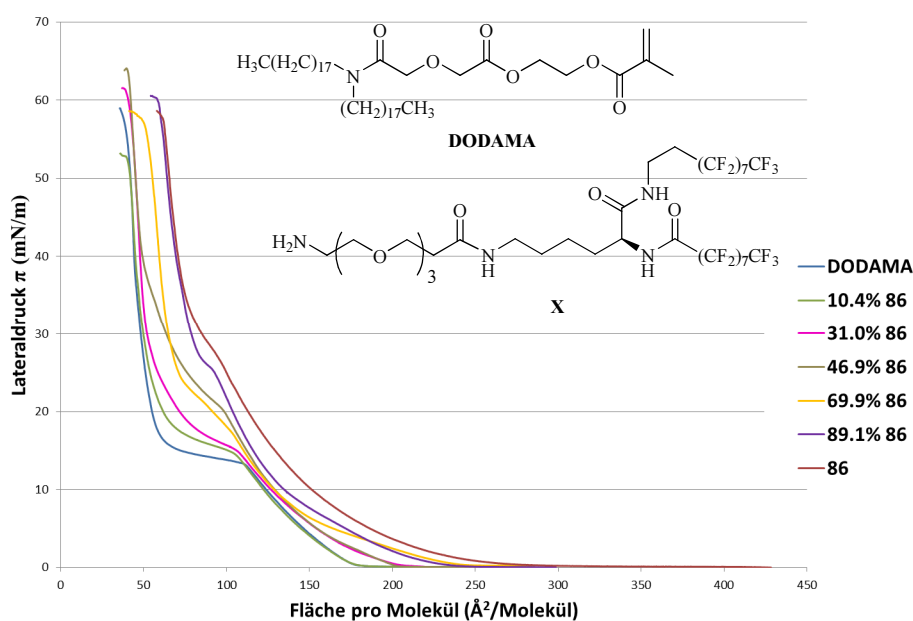


Abbildung 4.64: Isothermen der Mischsysteme mit zwei Perfluoralkylgruppen.

Während im System mit zwei Perfluoralkylketten die erwartete kontinuierliche Zunahme des Raumanpruchs mit steigender Konzentration der fluorierten Verbindung zu verzeichnen ist,^[72] zeigt sich ein solcher eindeutiger Trend nicht bei den in Abbildung 4.63 gezeigten. Zunächst steigt zwar auch hier der Raumanpruch mit höherer Konzentration der Fluorverbindung, jedoch fällt dieser bei Konzentrationen von über 60% des *F*-Amphiphils wieder ab, was vermutlich auf nicht gerichteten Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Eine Prüfung auf die Abhängigkeit des Molenbruchs vom Raumanpruch über das Additivitätsgesetz nach GAINS^[180] zeigt, ob eine Phasenseparation vorliegt. Findet sich eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Molenbruch einer Verbindung und deren Flächenanspruch pro Molekül bei einem konstanten Druck, so handelt es sich um eine ideale Mischung bzw. ideale Phasenseparation.

Die Anwendung dieser Methode für Lateraldrucke von 10 mN/m, 20 mN/m und 30 mN/m findet sich in Abbildung 4.65 für das System mit R_F -Lys(OEG-NH₂)-*O*-Octyl **85** wieder. Das Diagramm zeigt eindeutig für keinen der aufgetragenen Lateraldrucke einen linearen Zusammenhang zwischen Molenbruch und Flächenanspruch, was bereits aus der Auftragung der Isothermen in Abbildung 4.63 vermutet wurde. Dies bedeutet, dass das System kein eindeutiges Phasenverhalten bezüglich Mischung bzw. Entmischung zeigt, woraus sich schließen lässt, dass die beiden Lipide in variablen Zusammensetzungen in den gebildeten Domänen als Mischphasen vorkommen.

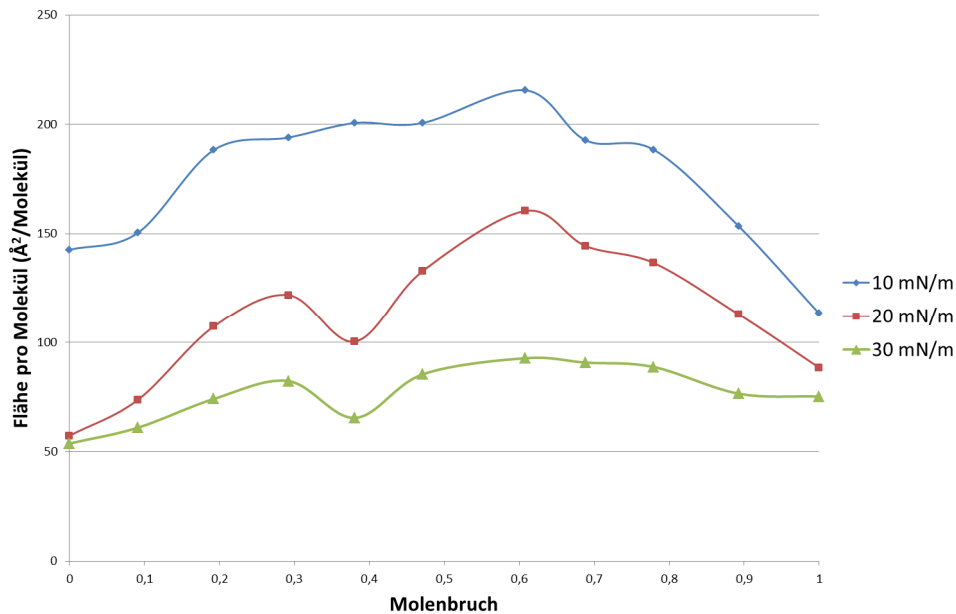


Abbildung 4.65: Auftragung nach dem Additivitätsgesetz für R_F -Lys(OEG-NH₂)-O-Octyl **85**.

Die Anwendung des Additivgesetzes auf die Isothermen der Verbindung R_F -Lys(OEG-NH₂)-O-Decyl(F₁₇) **86** zeigt Abbildung 4.66. Ein annähernd linearer Verlauf wird bei Lateraldrücken von 10 mN/m und 30 mN/m beobachtet, weshalb unter diesen Bedingungen von einer idealen Mischung bzw. Entmischung ausgegangen werden kann. Bei geringen Lateraldrücken liegen beide Lipide in der flüssiganalogen Phase als homogene Mischung vor, während bei hohen Lateraldrücken durch Entmischung das polymerisierbare Lipid bereits nahezu komplett auskristallisiert ist. Bei einem Lateraldruck von 20 mN/m findet man eine deutliche Abweichung vom idealen linearen Verlauf, was auf die Ausbildung von Mischphasen hindeutet.

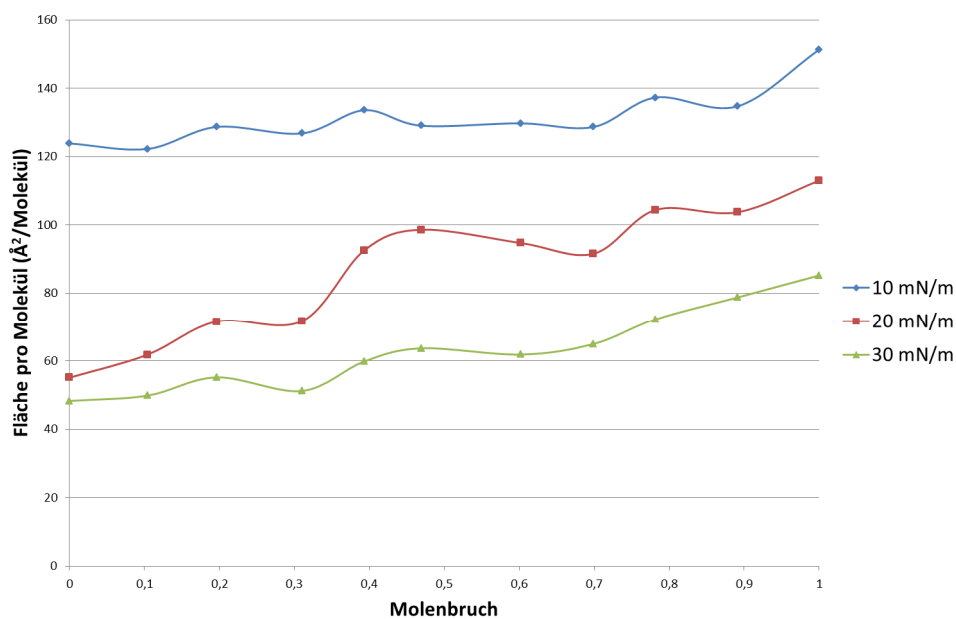


Abbildung 4.66: Additivgesetz nach GAINS für Mischungen mit R_F -Lys(OEG-NH₂)-O-Decyl(F₁₇) **86**.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verbindungen mit zwei Fluorketten ein deutlicher besser charakterisiertes Phasenverhalten zeigen. Bei geringen Lateraldrücken liegt eine homogene Mischung mit dem polymerisierbaren Lipid vor, während bei höheren Lateraldrücken das gegenteilige Verhalten beobachtet wird und eine vollständige Entmischung beider Lipide auftritt.

Die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Phasenseparation sollten durch Brewsterwinkel-Mikroskopie (BAM) und rasterkraftmikroskopische Aufnahmen (AFM) anhand des Systems aus 10.4 mol% **86** in DODAMA bestätigt bzw. ergänzt werden. Dargestellt in Abbildung 4.67 sind BAM-Aufnahmen bei verschiedenen Lateraldrücken im Koexistenzbereich von flüssig- und festanaloger Phase der Isotherme.

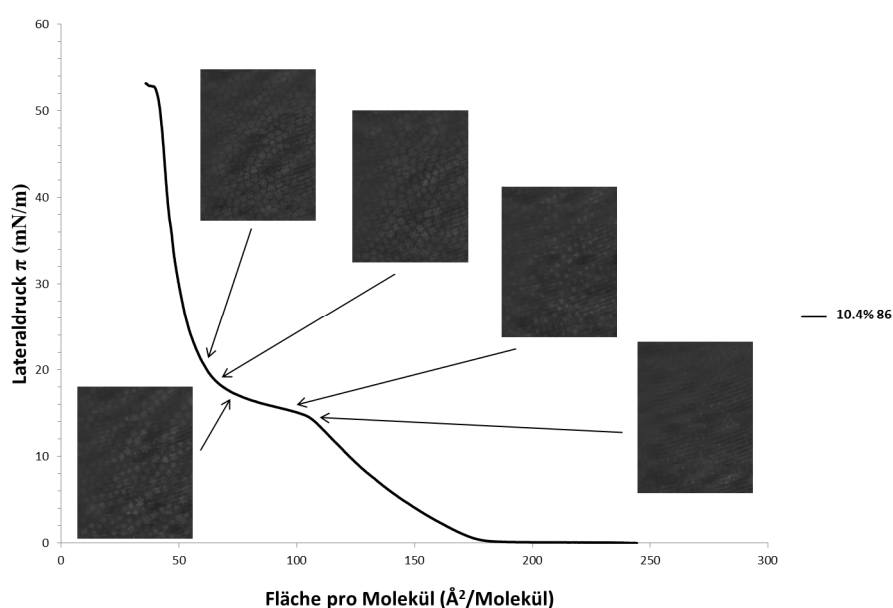


Abbildung 4.67: BAM-Aufnahmen bei Lateraldrücken im Koexistenzbereich.

Deutlich zu erkennen sind mikroseparierte Bereiche, die mit fortschreitender Kompression, d. h. bei steigendem Lateraldruck, wachsen. Diese Domänen stellen auskristallisiertes DODAMA dar, während sich die dunklen Bereiche aus einer Mischung aus Lipid **86** und dem noch nicht auskristallisierten DODAMA zusammensetzen. Folglich lässt sich bei mittleren Lateraldrücken auf eine partielle Mischbarkeit der beiden Komponenten schließen.

Für die Aufnahme am Rasterkraftmikroskop (AFM) wurde die Mischung auf dem Trog gespreitet und durch Langmuir-Blodgett-Übertrag bei einem Lateraldruck von 17.5 mN/m auf einem unbehandelten Glimmerplättchen mit hydrophiler Oberfläche abgebildet (Abbildung 4.68).

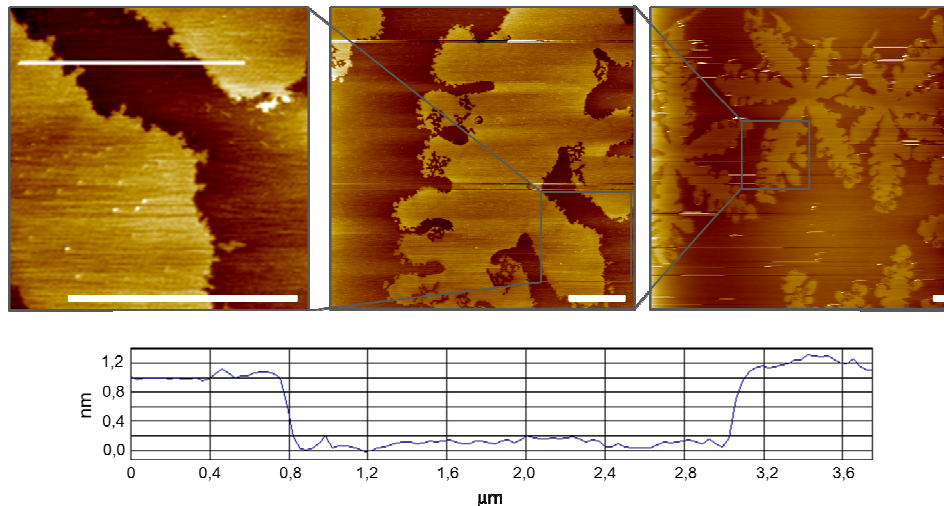


Abbildung 4.68: AFM-Aufnahmen mit Höhenprofil.

Die deutlich zu erkennenden helleren Bereiche stellen wie bei den BAM-Aufnahmen auskristallisiertes DODAMA dar und weisen Domänengrößen von etwa $50 \mu\text{m}$ auf mit ihrer typischen hexagonalen Form. Das Höhenprofil zeigt den aufgrund der Längenunterschiede der Alkylketten und Fluoralkylketten der beiden Lipide zu erwartenden Höhenunterschied von ungefähr 1 nm.

Die erhaltenen Ergebnisse mit dem polymerisierbaren Lipid DODAMA konnten auch auf ternäre Systeme übertragen werden, in denen neben den bereits besprochenen Lipiden **85** und **86** auch diejenigen mit T_N -dipeptidischer Kopfgruppe **89** und **90** zum Einsatz kamen. Die erhaltenen Strukturen zeigten eine deutliche Ähnlichkeit im Phasenverhalten mit denen der besprochenen binären Mischsysteme.^[181]

4.7 Synthese der Glutaminsäureanker

Um die hergestellten perfluoralkylierten Membrananker mithilfe der SPPS an den *N*-Terminus eines Peptides anbinden zu können, wurde ein weiterer Membranankertyp entwickelt, welcher bereits eine Carboxyfunktion enthält. In Analogie zum Lysin, bot sich hierzu Glutaminsäure an. Auch sie ist in ihrer orthogonal blockierten Form kommerziell erhältlich und erlaubt eine Anbindung der Perfluoralkylketten über die zuvor erarbeitete Synthesestrategie, so dass lediglich eine Anpassung des Schutzgruppenmusters durchgeführt werden muss.

Hierzu wurde zunächst das perfluorierte Amin **65** unter Einsatz der Kupplungsreagenzien TBTU und HOBt mit der orthogonal geschützten Aminosäure **91** zur Reaktion gebracht (Abbildung

4.69), wobei erneut die zuvor ausgearbeiteten Reaktionsbedingungen (vgl. Kapitel 4.5) verwendet wurden.

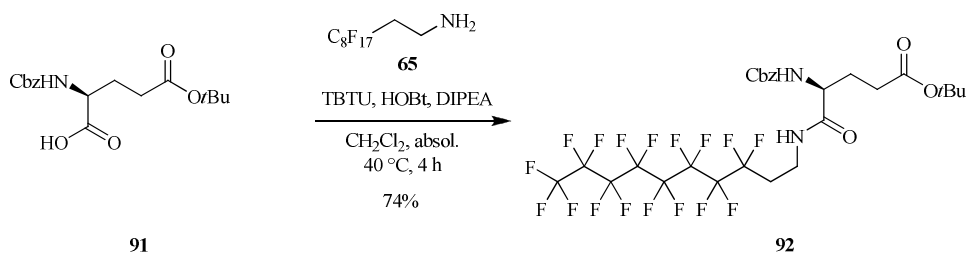


Abbildung 4.69: Anbringen der ersten Perfluoralkylkette an Glutaminsäure.

Dabei konnte das gewünschte Produkt **92** in 74% Ausbeute isoliert werden, wobei die auf dieser Stufe notwendige Säulenchromatographie der einzige chromatographische Reinigungsschritt in der Synthese dieses Ankertyps blieb.

Das in 99% durch hydrogenolytische Spaltung mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle in Ethanol erhaltene freie Amin **93** wurde in hoher Reinheit isoliert und konnte direkt mit dem frisch hergestellten perfluoralkylierten Säurechlorid **73** (vgl. Abbildung 4.53) umgesetzt werden. Letzteres zeigt auch in dieser Reaktion die erforderliche elektrophile Reaktivität und führt zur erfolgreichen Anbindung der Perfluoralkylkette (Abbildung 4.70).

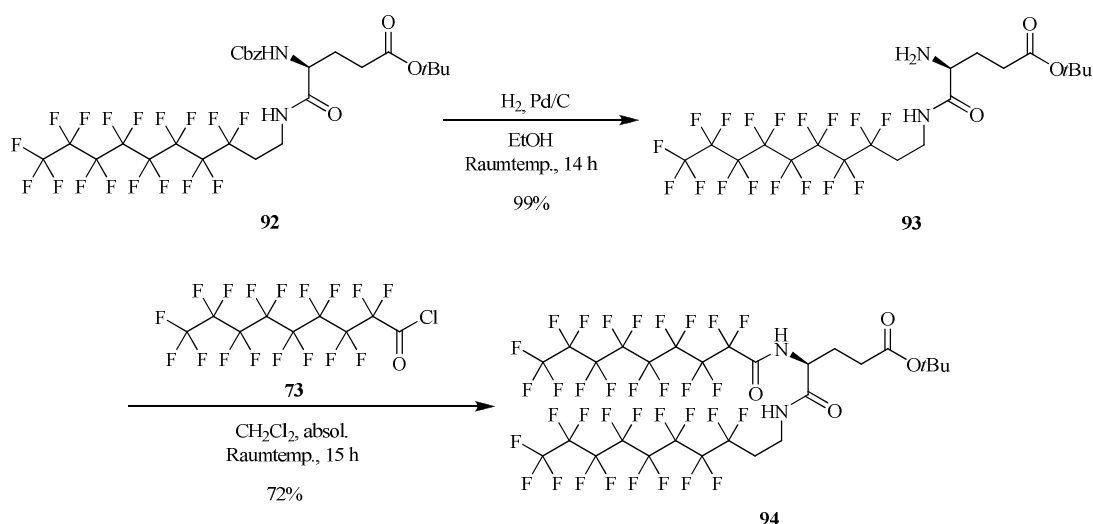


Abbildung 4.70: Cbz-Deblockierung mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle und anschließender Kupplung eines perfluorierten Säurechlorids.

Durch Umkristallisieren aus Methanol konnte das gewünschte Produkt $\text{R}_F\text{-Glu}(\text{OtBu})\text{-O-Decyl}(\text{F}_{17})$ **94** in Reinform und mit 72% Ausbeute erhalten werden. Anschließende acidolytische

Spaltung des tert-Butylesters unter Verwendung von Trifluoressigsäure und Wasser in Dichlormethan führte zur Freilegung des C-Terminus (Abbildung 4.71).

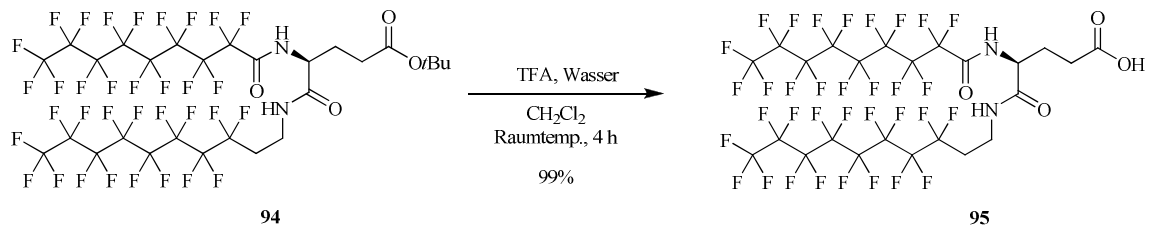


Abbildung 4.71: Freilegung der Carboxyfunktion.

Die Carbonsäure **95** kann nun für die direkte Anbindung an eine mithilfe der Festphasenpeptidsynthese aufgebaute Peptidkette verwendet werden.

4.8 Synthese komplexer tumorassoziierter Kohlenhydratantigene

Im Folgenden sollen die Synthesen des Thomsen-Friedenreich-Antigens (TF-Antigen) und des Sialyl-T_N-Antigens, die beide tumorassoziierte Kohlenhydratantigene darstellen, von einem gemeinsamen Vorläufer, dem T_N-Antigen, ausgehend beschrieben werden.

4.8.1 Synthese des Thomsen-Friedenreich-Antigen-Bausteins

Für die Synthese des TF-Antigens ist es notwendig, eine stereoselektive 3-β-Galactosylierung des T_N-Threonin-Konjugates **42** zu erreichen. Dazu wurden die Positionen 4 und 6 selektiv als Benzylidenacetal geschützt,^[182] was durch Umsetzung des N-Acetylgalactosaminakzeptors **42** mit Benzaldehyddimethylacetal in Gegenwart katalytischer Mengen *para*-Toluolsulfonsäure bei einem pH-Wert von 4.5 gelang (Abbildung 4.72).

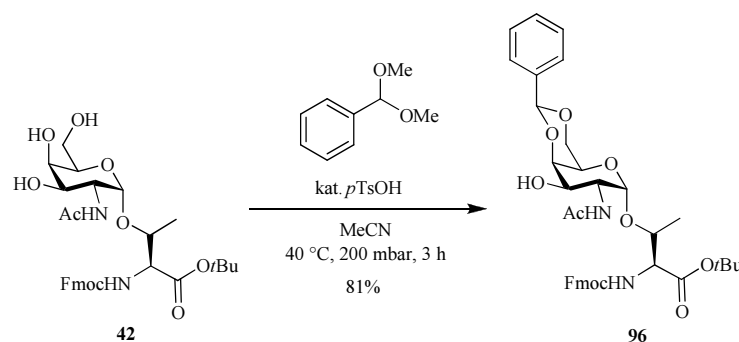


Abbildung 4.72: Synthese des Benzylidenacetal-geschützten Galactosylakzeptors **96**.

Die β -*O*-glycosidische Verknüpfung des Glycosylakzeptors **96** in 3-Position ließ sich nach einer von C. BROCKE^[183] beschriebenen Route mithilfe einer HELFERICH-Glycosylierung,^[184] unter Verwendung des Acetyl-geschützten α -Galactosylbromids **35**^[135] als Donor, realisieren. Bei dieser Umsetzung wird die erwünschte β -Selektivität durch den Nachbargruppeneffekt der Acetylenschutzgruppe in Position 2 des Donors sichergestellt,^[185] wodurch das entsprechende Disaccharid **97** in einer hervorragenden Ausbeute von 94% erhalten wurde (Abbildung 4.73).

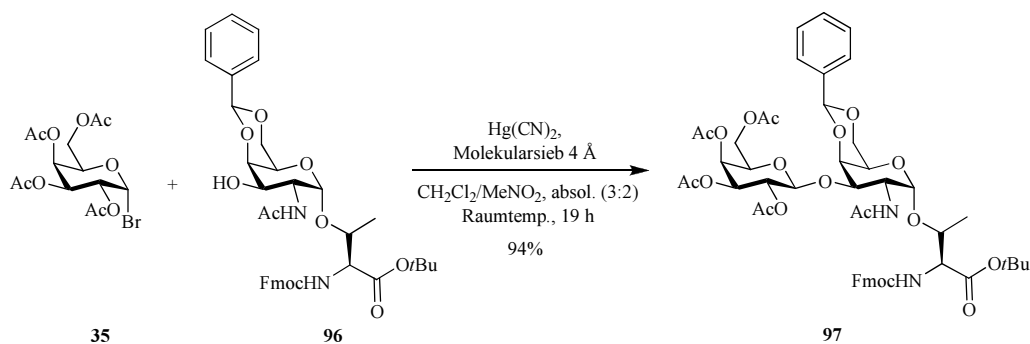


Abbildung 4.73: 3- β -Galactosierung nach der HELFERICH-Methode.

Die Aktivierung des Bromids **35** erfolgt bei der HELFERICH-Methode durch Quecksilber(II)cyanid, welches zugleich auch eine als Nebenreaktion auftretende Orthoesterbildung zurückdrängt. Vermutlich kommt es zu einer isonitrilartigen Koordination des Cyanidions an das harte Dioxolenium-Carbokation, wodurch nur ein β -Angriff des Nucleophils unter Ausbildung des β -Glycosids erfolgen kann. Die Isolierung des Orthoesters, wie sie bei anderen Aktivierungsmethoden auftritt, wird somit nicht beobachtet (**Abbildung 4.74**).

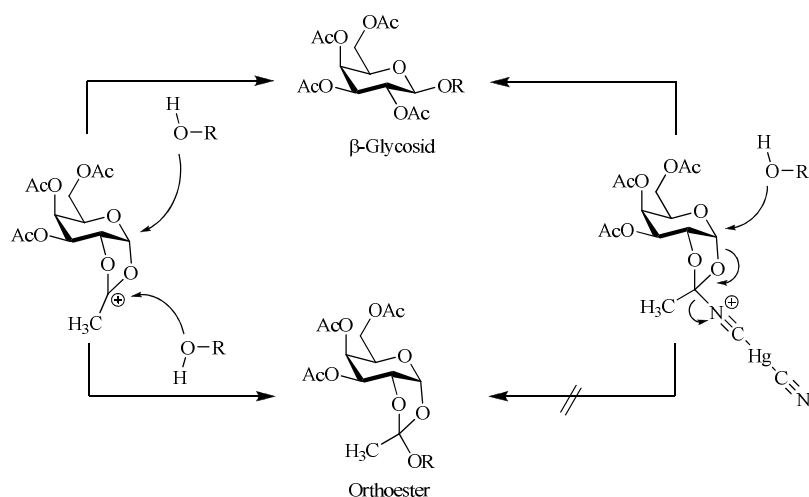


Abbildung 4.74: Steuerung der Regioselektivität bei Glycosylierungsreaktionen nach der HELFERICH-Methode.

Der Versuch, den *tert*-Butylester und die Benzylidenacetalschutzgruppe gleichzeitig durch Behandlung mit Trifluoressigsäure abzuspalten und anschließend die beiden Hydroxygruppen selektiv zu acetylieren,^[178] misslang, weshalb eine schrittweise Vorgehensweise gewählt werden musste. Dazu wurde zunächst das Benzylidenacetal gegen die stabileren Acetylenschutzgruppen ausgetauscht und erst im letzten Reaktionsschritt der C-Terminus der Glycosylaminosäure **98** deblockiert (Abbildung 4.75).

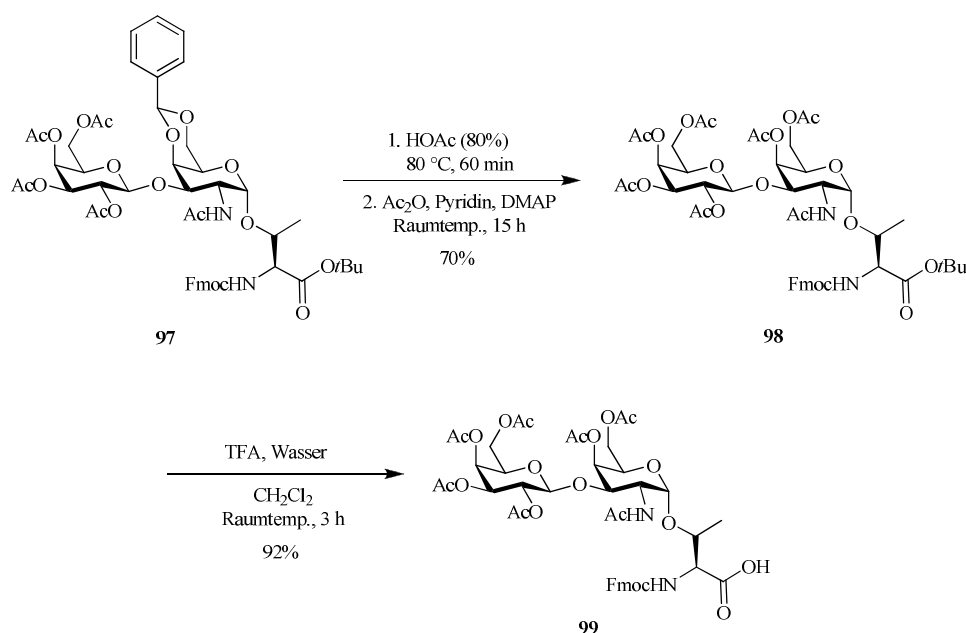


Abbildung 4.75: Notwendige Schutzgruppenmanipulationen des in der Festphasenpeptidsynthese einsetzbaren T-Antigen-Bausteins **99**.

Die selektive Spaltung des Benzylidenacetals in Verbindung **97** wurde durch Reaktion bei 80 °C in 80%iger Essigsäure^[186] erreicht. Das entstandene Diol wurde direkt mit Essigsäureanhydrid in Pyridin in Gegenwart des STEGLICH-Katalysators (DMAP) acetyliert.^[186] Um den Baustein **98** in der Festphasenpeptidsynthese einsetzen zu können, wurde dieser mit Trifluoressigsäure und Wasser als Kationenfänger behandelt. Letztlich konnten auf diese Weise 92% des T-Antigen-Bausteins **99** mit freier Carboxyfunktion isoliert werden.

4.8.2 Synthese des Sialyl-T_N-Antigen-Bausteins

In der Literatur finden sich für chemische Sialylierungsreaktionen^[187] eine Reihe effektiver Donoren wie z. B. Phosphite,^[188] Thioglycoside^[145] oder Xanthogenate.^[189,143] Unter Berücksichtigung dieser Arbeiten wurde daher der in das Ethylxanthogenat **104** überführte Neuraminsäurebenzylester als Sialinsäuredonor für die Synthese des Sialyl-T_N-Antigens verwendet. In C1-Position kam als Schutzgruppe der Carboxyfunktion nicht der oft verwendete

Methylester zum Einsatz, sondern analog zu den Arbeiten von B. LIEBE^[143] ein Benzylester, der unter neutralen Bedingungen hydrogenolytisch abspaltbar ist.^[41,190] Dadurch verringert sich die Wahrscheinlichkeit einer Epimerisierung von Aminosäuren im Peptid bzw. die als Nebenreaktion auftretende β -Eliminierung des Glycanrestes während des Deblockierungsschritts.

Ausgehend von *N*-Acetyl-D-neuraminsäure **100** wurden zur Synthese des Donors sämtliche Hydroxygruppen mit einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert. Für die Blockierung der Carboxyfunktion als Benzylester war es notwendig, zunächst das Anomerenmisch **101** mittels Cäsiumcarbonat in das entsprechende Salz zu überführen.^[191] In einer nucleophilen Substitutionsreaktion ließ sich dann der Benzylester **102**^[143] durch Umsetzung mit Benzylbromid erhalten (**Abbildung 4.76**).

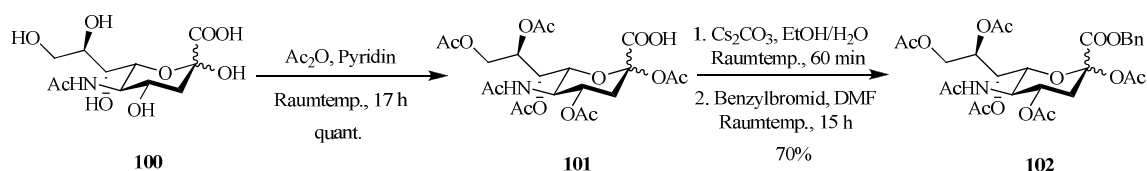


Abbildung 4.76: Vollständige Blockierung der *N*-Acetylneuraminsäure.

Zur Überführung in das Xanthogenat musste zunächst die Acetoxygruppe in 2-Position der vollständig blockierten Verbindung **102** durch ein Chlorid ersetzt werden. Dieses anomere Chlorid **103** wird durch Umsetzen mit *in situ* aus Acetylchlorid und katalytischen Mengen Wasser hergestellten Chlorwasserstoff generiert. In einer stereoselektiven Reaktion mit Kaliumethylxanthogenat in Ethanol wurde dann aus **103** der gewünschte α -Xanthogenat-Donor **104**^[143] hergestellt (**Abbildung 4.77**).

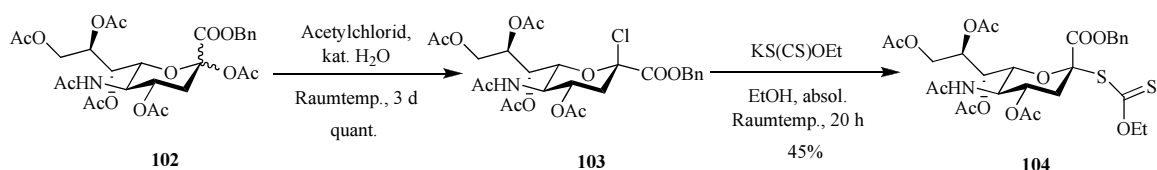


Abbildung 4.77: Darstellung des Sialinsäuredonors **104**.

Drei besondere strukturelle Eigenschaften der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure **100** sind verantwortlich dafür, dass eine stereoselektive α -Sialylierung gemeinhin als schwierig gilt.^[192,193] Zum einen entsteht nach Aktivierung der Neuraminsäure aufgrund des tertiären Kohlenstoffatoms am anomeren Zentrum ein sterisch gehindertes und damit unreaktiveres Oxocarbeniumion **104a**. Zum anderen müssen die Donoren im Überschuss eingesetzt werden, denn die elektronenziehende

Carboxyfunktion am anomeren Zentrum destabilisiert das in der Sialylierungsreaktion auftretende Glycosylkation **104a**, so dass es in einer 2,3-Eliminierung zur Bildung des in einer Sialylierung nicht-aktiven Glycals **105** kommt. Die dritte strukturelle Besonderheit, das Fehlen eines nachbargruppenaktiven Substituenten in der 3-Position, erschwert die stereochemische Kontrolle, so dass stets auch Anteile des unerwünschten β -Glycosids entstehen (Abbildung 4.78).

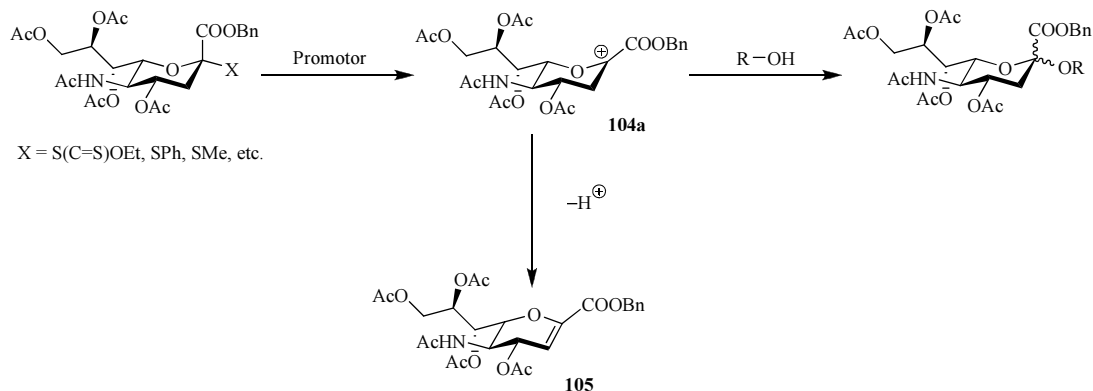


Abbildung 4.78: Auswirkungen der strukturellen Eigenschaften der Neuraminsäure auf die α -Sialylierung.

Der Vorteil in der Verwendung des Xanthogenat-Donors liegt darin, dass er sich relativ leicht handhaben und aktivieren lässt. Dafür werden äquimolare Mengen eines stark thiophilen Reagenzes *in situ* aus einer frisch hergestellten Methylsulfonylbromid-Lösung und Silbertriflat erzeugt. Das gebildete Methylsulfonyltriflat (MeSOTf) agiert als thiophiler Promotor,^[194,195] welcher als Elektrophil beim nucleophilen Angriff des Thiocarbonat-Schwefels unter Ausbildung einer Disulfidbindung fungiert. Diese formale Oxidation erhöht die Austrittstendenz des Xanthogenats und es kommt zur Eliminierung der Abgangsgruppe, wodurch das Sialykation **104a** gebildet wird (Abbildung 4.79).

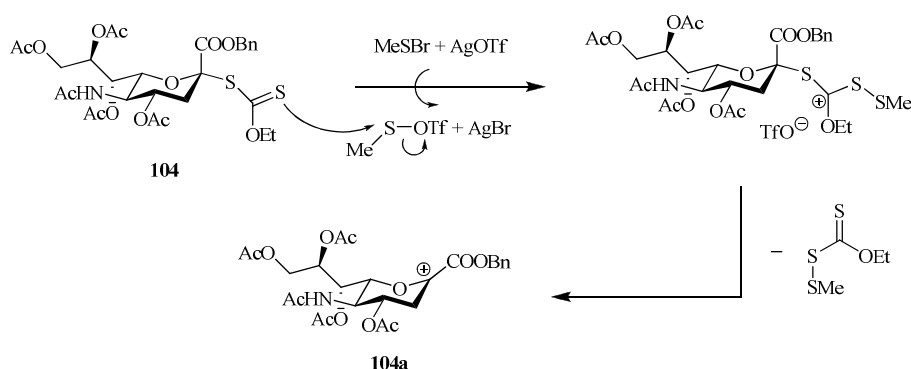


Abbildung 4.79: Aktivierung des Sialinsäuredonors.

Das Kation **104a** unterliegt einer Eliminierung zum Glycal **105** oder wird durch den Glycosylakzeptor abgefangen, wobei der stereochemische Verlauf dieser Glycosylierungsreaktion

durch Wahl eines geeigneten Lösungsmittels und Variation der Reaktionstemperatur beeinflusst werden kann.^[196,197,198] Im Lösungsmittel Acetonitril lässt sich unter Ausnutzung des sogenannten Nitrileffektes^[199] die Koordination der Nitrilgruppe an das intermediär gebildete Oxocarbeniumion **104a** unter Bildung eines axialen- **104b** oder äquatorialen Nitrilium-Addukts **104c** ausnutzen. Die Beeinflussung des Gleichgewichtes in die gewünschte Richtung kann durch die Wahl der Reaktionstemperatur gesteuert werden (**Abbildung 4.80**).

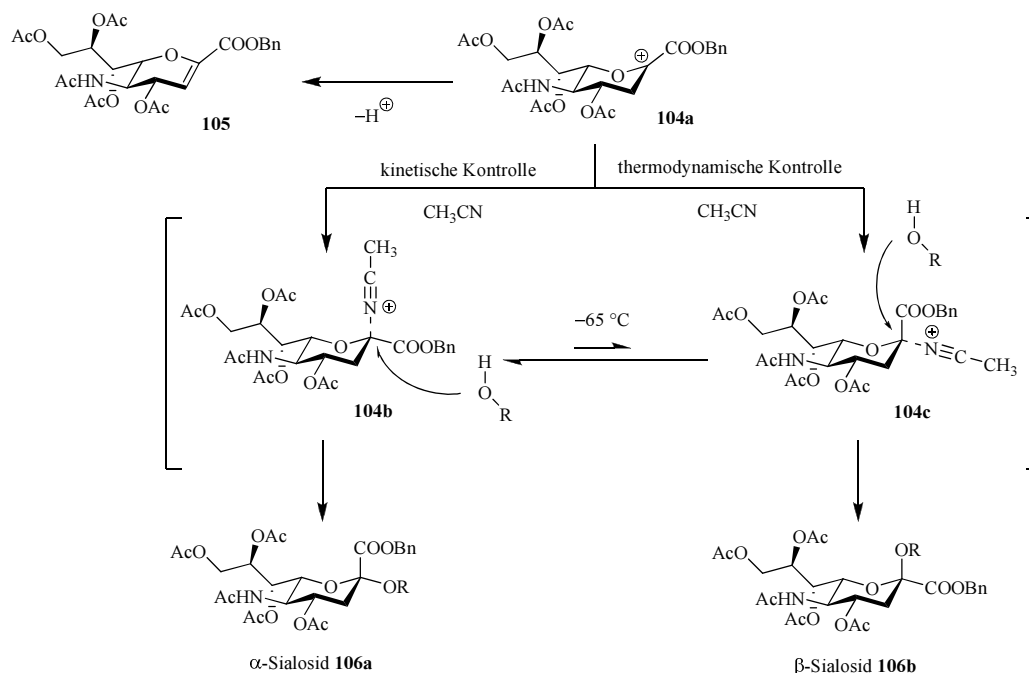


Abbildung 4.80: Nitrileffekt.

Bei hohen Reaktionstemperaturen wird bevorzugt das thermodynamisch stabilere äquatoriale Addukt **104c** gebildet und daraus folglich das unerwünschte β -Sialosid **106b**. Bei Senkung der Reaktionstemperatur wird das Gleichgewicht zunehmend zum kinetisch bevorzugten axialen β -Nitrilium-Addukt **104b** verschoben. Der Angriff des Alkohols muss dann stereoselektiv von der α -Seite erfolgen, so dass das α -konfigurierte Sialosid **106a** resultiert.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Effekte wird die α -Sialylierung zum Sialyl- T_N -Konjugat **107** nach den in **Abbildung 4.81** dargestellten Reaktionsbedingungen durchgeführt.^[143]

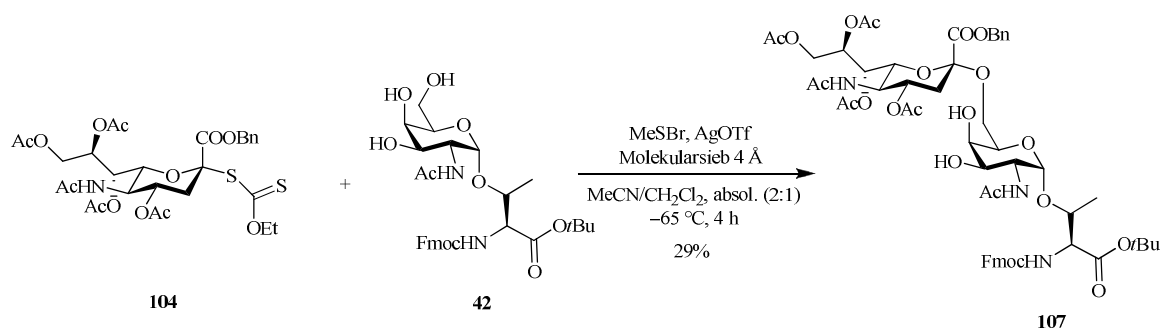


Abbildung 4.81: Sialylierung zum ST_N -Antigen **107**.

Die Sialylierung wurde bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, weshalb ein Arbeiten in reinem Acetonitril nicht möglich war und stattdessen ein 2:1-Gemisch aus Acetonitril und Dichlormethan verwendet werden musste. Bei dieser Temperatur erfolgte der Angriff des durch Zugabe von Methylsulfonylbromid und Silbertriflat aktivierten Donors **104a** stereo- und regioselektiv an der 6-OH-Gruppe des Galactosylakzeptors **42**, da diese als primäre Hydroxyfunktion eine erhöhte Reaktivität aufweist und auch sterisch weniger gehindert ist. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnten so 29% des α -Sialosids **107** isoliert werden.

Für dessen Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese mussten abschließend noch die beiden Hydroxyfunktionen acetyliert und der C-Terminus von der *tert*-Butylester-Schutzgruppe befreit werden (Abbildung 4.82).

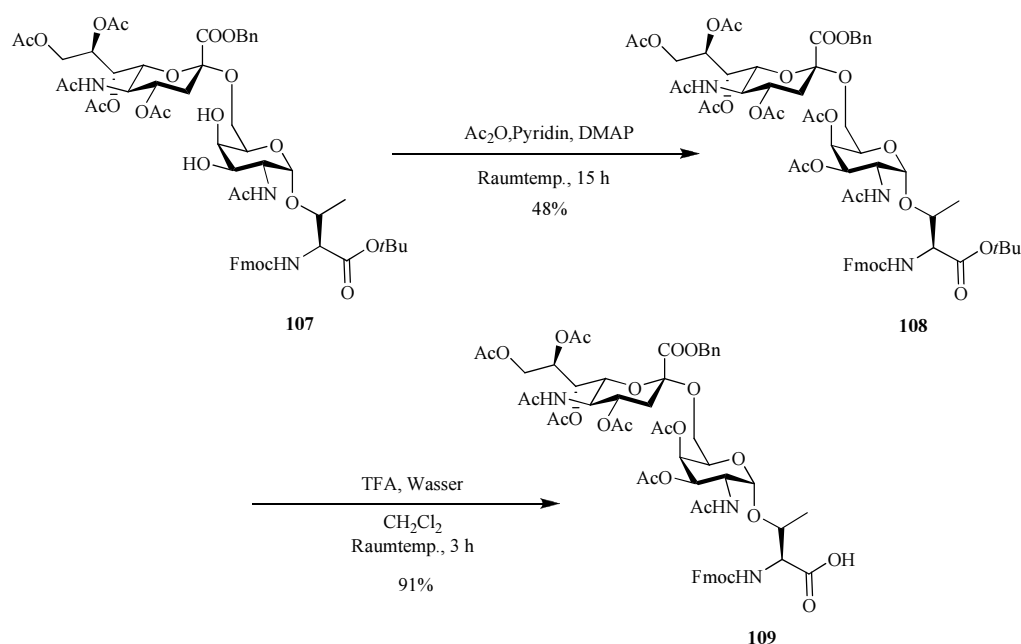


Abbildung 4.82: Fertigstellung des in der Festphasenpeptidsynthese einsetzbaren Glycopeptid-Bausteins **109**.

Mithilfe katalytischer Mengen an 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) in Essigsäureanhydrid und Pyridin war es möglich beide Hydroxygruppen in mäßigen Ausbeuten zu **108** zu acetylieren. Dabei fiel auf, dass die Hydroxygruppe in Position 4 sehr unreaktiv ist, was den Einsatz des STEGLICH-Katalysators für die Acetylierung unabdingbar macht. Die Freilegung der Säurefunktion im letzten Reaktionsschritt wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure unter Zusatz von Wasser als Kationenfänger erreicht. Die auf die acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters folgende chromatographische Reinigung lieferte **109** mit 91% Ausbeute.

Damit standen die drei tumorassoziierten Kohlenhydratantigene T_N **41**, T **99** und ST_N **109** für den Einbau in die *tandem-repeat*-Sequenz des epithelialen Mucins MUC1 mithilfe der Festphasen-peptidsynthese zur Verfügung.

4.9 Synthese von MUC1-Glycolipopeptid-Konjugaten

4.9.1 Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese

Neben der Synthese von Peptiden und Glycopeptiden in Lösung, kann diese nach einer von R. B. MERRIFIELD^[200,201,202] entwickelten Methode auch an der festen Phase durchgeführt werden. Dabei erfolgt die Anbindung der ersten Aminosäure über ihre Carboxyfunktion an ein unlösliches, filtrierbares Polymer, welches chemisch und mechanisch inert ist. Der große Vorteil dieser Methode ist die Geschwindigkeit im Aufbau exakt definierter Oligopeptide, da nach jedem Syntheseschritt an der Polymermatrix lediglich filtriert und gewaschen werden muss.

Ein spezielles Ankersystem verbindet das Trägermaterial mit der Startaminosäure und kann entsprechend den Anforderungen in der Synthesestrategie spezifisch angepasst werden, so dass es zur Entwicklung vielfältiger Ankersysteme kam, die sich unter unterschiedlichsten Bedingungen spalten lassen.^[203] (Abbildung 4.83).

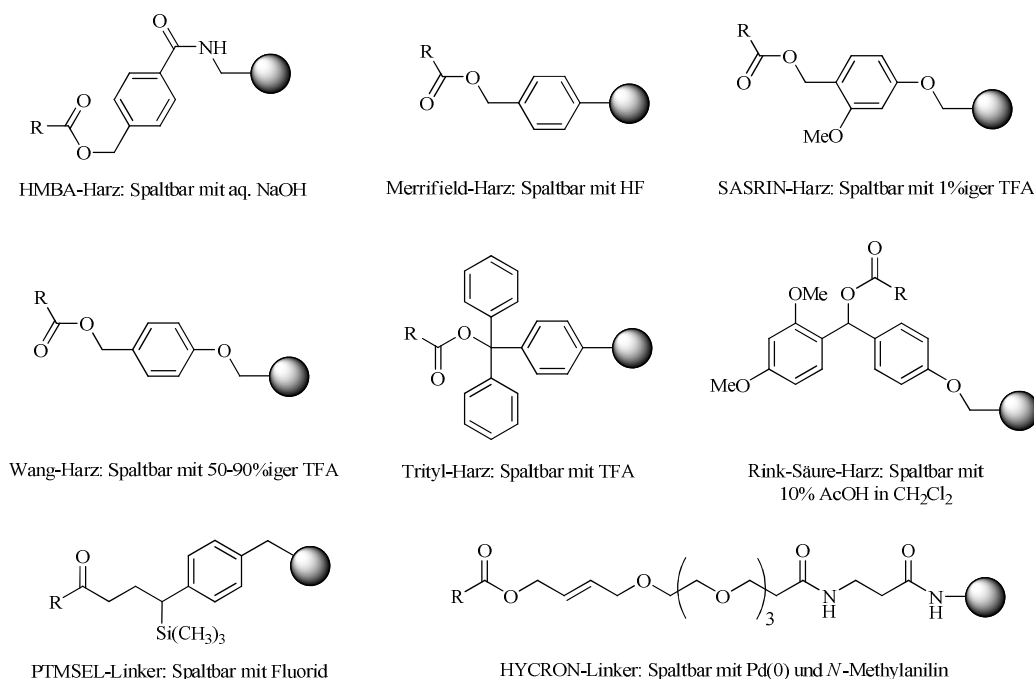


Abbildung 4.83: Ankersysteme für die Fmoc-Festphasensynthese.

In der Klasse der basenlabilen Anker, zu denen der HMBA-Linker (4-Hydroxymethylbenzoesäure)^[204] gehört, treten jedoch aufgrund der harschen Abspaltungsbedingungen vermehrt Aspartimidbildung und Racemisierungen auf. Aufgrund dessen werden in der Festphasenglycopeptidsynthese am häufigsten die säurelabilen Anker verwendet, von denen das Merrifield-Harz,^[200] das SASRIN-Harz,^[205] das Wang-Harz,^[206] das Trityl-Harz^[207] und das Rink-Säure-Harz^[208] zu den bekanntesten zählen. Sie ermöglichen durch ihre sauren Abspaltbedingungen die gleichzeitige Entfernung der säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen der Aminosäuren, so dass zusätzliche Syntheseschritte eingespart werden. Ist dies nicht erwünscht, kann auch auf fluoridspaltbare (PTMSEL),^[209] allylische (HYCRON)^[129] und photolabile^[210] Ankersysteme zurückgegriffen werden.

Der Syntheseverlauf beim Aufbau der Peptidkette erfolgt in iterativen Schritten vom C-Terminus her, wobei *N*-blockierte Aminosäuren verwendet werden. Ein selektiver Deblockierungsschritt in komplexen multifunktionalen Molekülen stellt spezielle Anforderungen an die Schutzgruppe, so dass in der automatisierten Synthese im Wesentlichen zwei Verfahren zur Anwendung kommen. Bei der Boc-Festphasensynthese wird auf die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Schutzgruppe)^[211,212,213] zurückgegriffen. Diese wird mittels 20-50%iger Trifluoressigsäure gespalten, was im Hinblick auf die Synthese von Glycopeptiden jedoch ungünstig ist, da viele glycosidische Bindungen und auch einige Seitenkettenschutzgruppen polyfunktioneller Aminosäuren unter den vorherrschenden Bedingungen instabil sind.^[214] Aus eben diesem Grund hat sich die Fmoc-Strategie^[215,216] zur Synthese von Glycopeptiden mit säurelabilen Seitenketten durchgesetzt. Die Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc-Gruppe)^[217,218] kann durch milde Basen wie Piperidin^[219] oder *N*-Methylmorpholin^[220] abgespalten werden. Dabei verhindern die Reaktionsbedingungen eine baseninduzierte β -Eliminierung an *O*-Glycopeptiden und erlauben so die Verwendung von säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen, um die Orthogonalität zu den Glycosidschutzgruppen zu gewährleisten.

Im nach der Abspaltung der Schutzgruppe folgenden Bindungsbildungsschritt ist die Wahl des richtigen Kupplungsreagenzes für eine erfolgreiche Knüpfung von Amidbindungen von entscheidender Bedeutung und wurde ebenso wie der Mechanismus der Reaktivestermethode mit den zur Verfügung stehenden Reagenziensystemen bereits in Kapitel 4.4.1 erläutert.

Bei der Ablösung des fertigen Peptids vom polymeren Träger im letzten Syntheseschritt kommt dem verwendeten Ankersystem noch einmal eine entscheidende Bedeutung zu, denn auch in diesem Syntheseschritt besteht die Gefahr die Amid- bzw. Glycosid-Bindungen zu beeinträchtigen und sollte in der Syntheseplanung berücksichtigt sein. Das Prinzip der sequentiellen Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll ist in Abbildung 4.84 schematisch dargestellt.

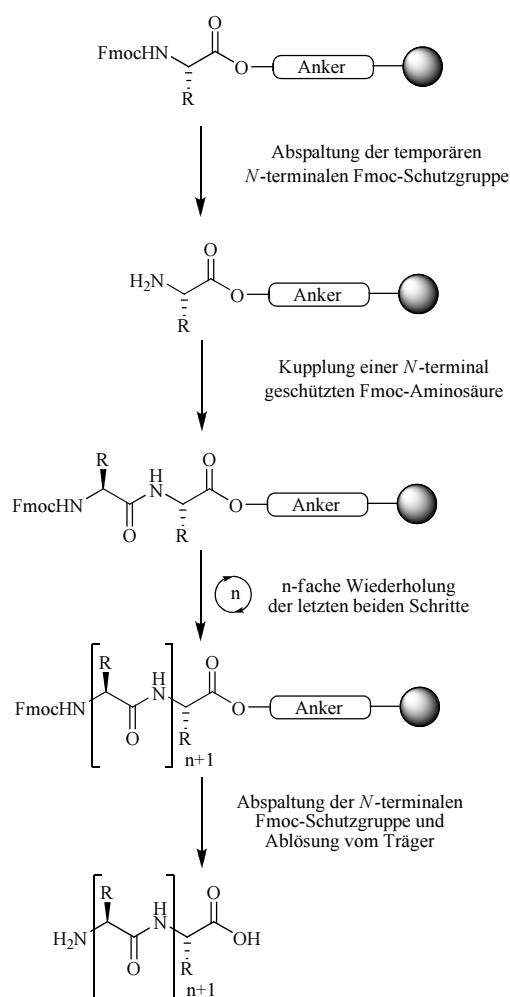


Abbildung 4.84: Prinzip der Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll.

Trotz aller Vorteile der Reaktivestermethode in Hinblick auf Reinheit und Ausbeute des Peptides, können Nebenreaktionen auftreten, welche die Produktausbeute deutlich reduzieren. Eine häufig zu beachtende Nebenreaktion in Peptidsynthesen, in denen als erste Aminosäure Prolin, Alanin oder Glycin eingesetzt wird, ist die Diketopiperazinbildung. Aber auch D-Aminosäuren und N-Alkylaminosäuren begünstigen die Bildung des Diketopiperazins. Dabei kann es während der Fmoc-Abspaltung auf der Stufe des Dipeptides zu einer basenkatalysierten intramolekularen Aminolyse der Esterbindung kommen, wodurch das Dipeptid als 2,5-Diketopiperazin^[221,222] vom polymeren Träger abgelöst und damit das Kettenwachstum beendet wird (Abbildung 4.85).

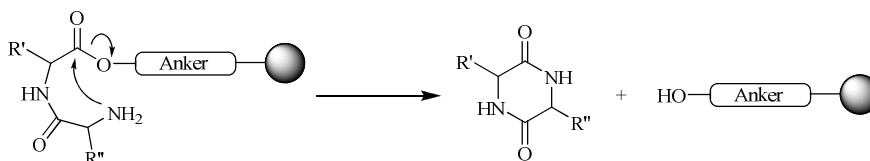


Abbildung 4.85: Diketopiperazin-Bildung.

Ein effizientes Zurückdrängen dieser Nebenreaktion gelingt durch die Verwendung von sterisch anspruchsvollen, voluminösen Ankern, wie dem Trityl-Anker.^[223] In der Synthese der gewählten MUC1-Peptidsequenz wurde dieser Umstand berücksichtigt, indem ein Prolin vorbeladenes TentaGel-Trityl-Harz^[224] eingesetzt wurde.

Weitere Probleme können beim Einbau der Aminosäure Asparaginsäure auftreten, denn in einer sequenzabhängigen Nebenreaktion, die besonders häufig auftritt, wenn Asparaginsäure auf die Aminosäuren Asparagin, Glycin, Alanin oder Glutamin folgt,^[225] kommt es in einer Ringschlussreaktion zur Ausbildung eines Succinimids. Dieses kann wiederum zum α -Aspartyl-Peptid, aber auch zum unerwünschten β -Aspartyl-Peptid nucleophil geöffnet werden (Abbildung 4.86). Als β -Carboxylschutzgruppe wird daher ein sterisch anspruchsvoller *tert*-Butylester gewählt, der die Nebenprodukt-Bildung erfolgreich zurückdrängt. Allerdings kann die Aspartimid-Umlagerung auch bei der Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen auftreten.

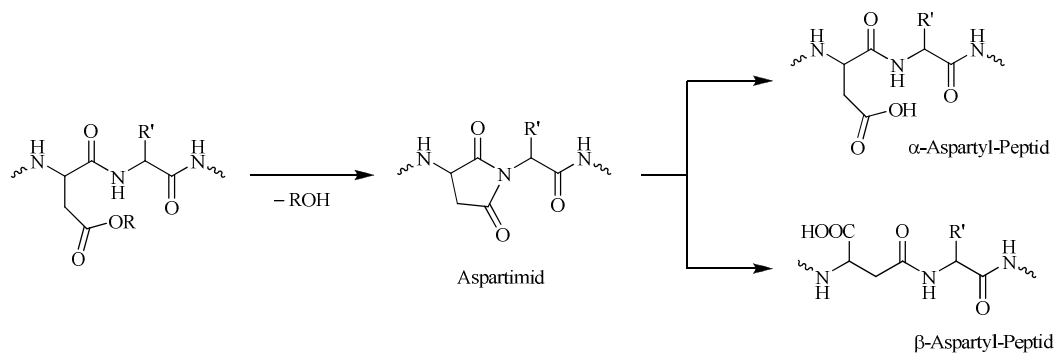


Abbildung 4.86: Aspartimid-Umlagerung.

Die nucleophile Guanidinium-Gruppe im Arginin ist eine weitere Quelle für Nebenreaktionen. Durch eine aktivierte Säurefunktion ist eine Acylierung des Stickstoffs möglich, wodurch nach Abspaltung eines 2-Iminoimidazolidins ein Ornithin-Derivat entsteht (Abbildung 4.87).

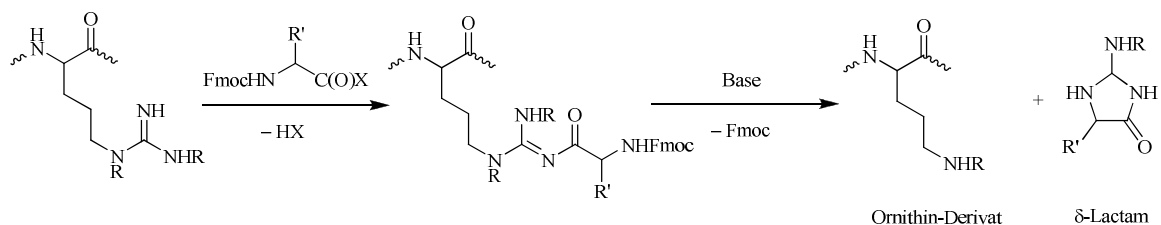


Abbildung 4.87: Reaktionen der Guanidinium-Gruppe in Arginin mit aktivierten Carbonsäuren.

Auch in diesem Fall ermöglicht die Wahl einer geeigneten Schutzgruppe ein Unterdrücken der Nebenreaktion. Der Gebrauch einer Sulfonylschutzgruppe, wie der 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc-Gruppe), führt zu einer Herabsetzung der Nucleophilie der

Guanidino-Gruppe, so dass die Gefahr einer intramolekularen Lactambildung deutlich geringer ist.^[226]

4.9.2 Allgemeines Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese

Die in dieser Arbeit an der festen Phase zu synthetisierenden MUC1-Glycopeptide wurden nach der Fastmoc-Strategie unter Verwendung von Fmoc-Prolin vorbeladenen TentaGel-Harzen an einem *Perkin-Elmer Applied Biosystems* ABI 433 A Peptidsynthesizer hergestellt. Im Gegensatz zu den häufig verwendeten Polystyrol-Harzen, die mit Divinylbenzol quervernetzt sind, weisen die TentaGel-Harze mit ihren Polyethylenglycolseitenketten bessere Quelleigenschaften in den benutzten polaren Lösungsmitteln auf. Dadurch wird ein guter Zugang zu den Reaktionszentren am Harz gewährleistet. Um die gegenseitige Beeinflussung der wachsenden Peptidstränge zu verringern, wurden außerdem Harze mit einer niedrigen Beladungsdichte von etwa 0.23 mmol/g verwendet.

Die an fester Phase für die unterschiedlichen sekundären funktionellen Gruppen der Aminosäuren zum Einsatz kommenden Schutzgruppen finden sich in Abbildung 4.88 wieder. Ihre Spaltbarkeit mit Säuren gewährleistet die Orthogonalität zu den verwendeten Acetylenschutzgruppen der Glycanseitenketten.

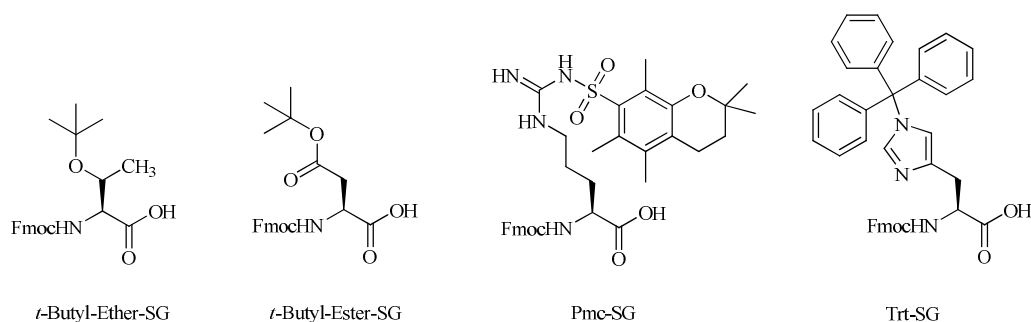


Abbildung 4.88: Sekundäre Schutzgruppen für Threonin, Asparaginsäure, Arginin und Histidin.

Die Labilität all dieser Schutzgruppen ist im sauren Milieu ungefähr vergleichbar, so dass sie in einem Schritt, bei der Ablösung vom polymeren Träger mitabgespalten werden können. Jedoch ist dafür ein geeignetes Abfangreagenz wie beispielsweise Wasser notwendig, um u. a. eine Sulfonierung der Seitenketten von Threonin und Serin zu vermeiden.^[227]

Im Peptidsynthesizer werden die einzelnen Fmoc-Aminosäurebausteine vollautomatisch in iterativen, jeweils aus drei Teilschritten bestehenden Synthesesyklen verknüpft. Im ersten Schritt wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe durch wiederholte Behandlung mit einer 20%igen

Lösung von Piperidin in NMP basenkatalysiert abgespalten (vgl. Abbildung 4.36). Durch UV-spektroskopische Messung des entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-Addukts konnte der Verlauf des Abspaltungsvorgangs kontrolliert werden, wobei ein Vergleich der Extinktionswerte Rückschlüsse auf den Erfolg der einzelnen Kupplungsschritte zulässt (Abbildung 4.89).

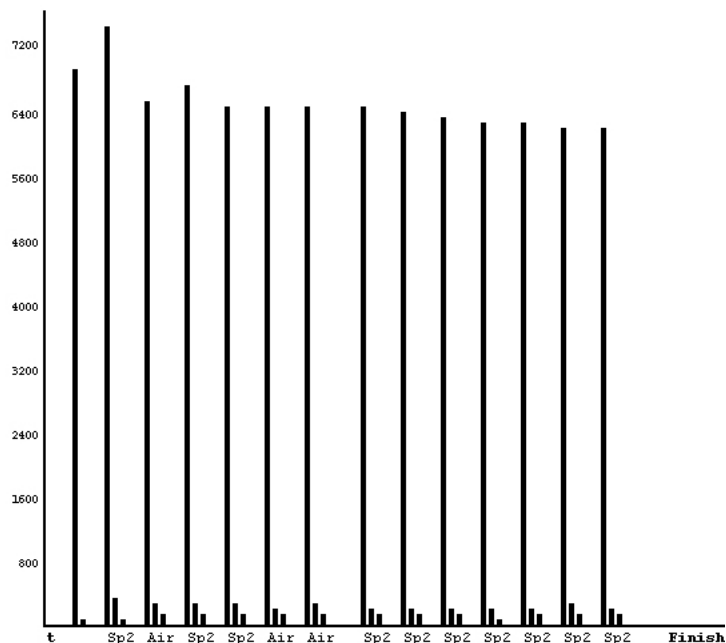


Abbildung 4.89: Abspaltungsprotokoll einer Peptidsynthese.

Anschließend wurde die Kupplungsreaktion mit jeweils 1 mmol (10 Äquiv.) der Fmoc-Aminosäuren, den Kupplungsreagenzien HBTU und HOBT sowie mit 2 mmol Hünigs Base über einen Zeitraum von 20 bis 30 min durchgeführt. Im letzten Schritt, dem sogenannten *Capping*-Schritt, wurden mit Essigsäureanhydrid, Hünigs Base und katalytischen Mengen an HOBT nicht umgesetzte Aminogruppen blockiert, um die Bildung von Fehlsequenzen zu minimieren.

Die Kupplungsreaktionen der wertvollen glycosylierten Aminosäuren erfolgten halbautomatisch und wurden in Abweichung zum Standardprotokoll mit einem maximal 2.5-fachen Überschuss an Glycosylaminosäure durchgeführt. Dazu wurde die Aktivierung des Aminosäurebausteins durch Zugabe des reaktiveren Reagenzienpaares HATU und HOAt sowie der Base NMM hervorgerufen, bevor der Aktivester in den Reaktor des Synthesizers eingebracht und dort bei einer ausgedehnten Reaktionszeit von bis zu acht Stunden gekuppelt wurde.

Nach vollständigem Aufbau der MUC1-Peptidsequenz und Anbindung des Triethylglycol-spacers **27**, dessen Anbindung wieder unter Standard-*Fastmoc*-Bedingungen ablief, erfolgte die Kupplung der Membranankereinheit, wobei analog zur Kupplung der Glycosylaminosäure vorgegangen wurde. Aufgrund der benötigten größeren Lösungsmittelmengen wurde das Harz zur Kupplung in einen MERRIFIELD-Reaktor überführt. Nach Beendigung der Reaktion erfolgte mit

einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser (10:1:1) die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz. Weil unter diesen Reaktionsbedingungen auch die Seitenketten-schutzgruppen der Aminosäuren entfernt wurden, mussten im Anschluss lediglich noch die Schutzgruppen des jeweiligen Kohlenhydrat-Bausteins abgespalten werden.

4.9.3 Synthese von MUC1-Eicosapeptiden mit perfluoralkylierten Membranankern

Die bisherigen Erfahrungen in der Reinigung, Handhabung und Reaktivität von perfluoralkylierten Membranankern führte dazu, dass die Kupplung der Ankersysteme an den *N*-Terminus des an fester Phase aufgebauten Peptides in einem letzten Reaktionsschritt erfolgen sollte. Diese Abfolge erlaubte die Anwendung einer aus der Arbeitsgruppe KUNZ bekannten Synthesestrategie^[228,37] zum Aufbau der MUC1-*tandem-repeat*-Sequenz, in der die Glycosylaminosäure an Position 6 und der Amin-funktionalisierte Triethylglycolspacer **27** als letzte Aminosäure eingebaut werden.

In Abbildung 4.90 findet sich eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte dieses Festphasenpeptidsynthese-Protokolls.

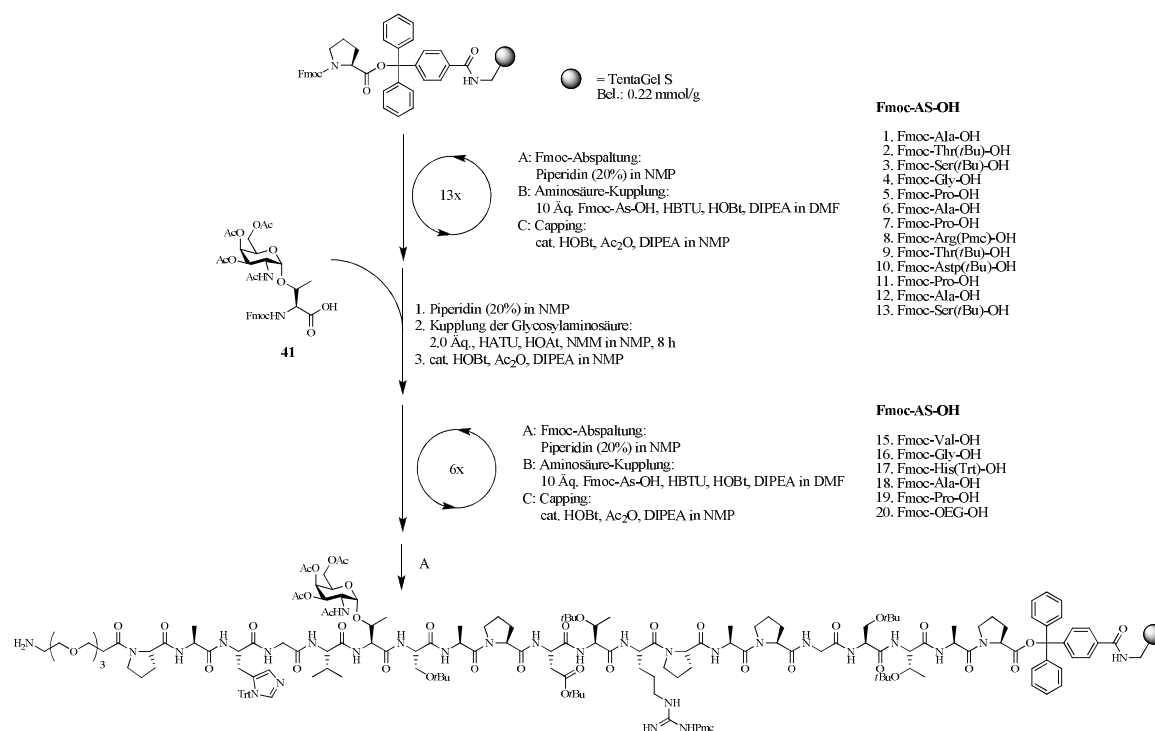


Abbildung 4.90: Festphasenpeptidsynthese des aminfunktionalisierten MUC1-Glycopeptides.

Unter Einsatz des bereits bewährten mit Fmoc-Prolin beladenen Trityl-TentaGel-Harzes, wurden die ersten 13 Aminosäure-Bausteine nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Abschließend wurde

die terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die Glycosylaminosäure **41** in Gegenwart von HATU/HOAt mit NMP binnen acht Stunden gekuppelt. Nach Acetylierung eventuell verbliebener Aminfunktionen mit dem *Capping*-Reagenz, werden die Kupplungen der folgenden fünf Aminosäuren und des Spacermoleküls **27** wieder vollautomatisch durchgeführt.

Im entscheidenden Reaktionsschritt ist es möglich, den auf Basis von Lysin hergestellten, teilfluorierten Membrananker **79** ebenfalls halbautomatisch am Synthesizer zu koppeln (Abbildung 4.91). Dabei wurden 2 Äquiv. von **79** unter den Bedingungen der Glycosylaminosäurekupplung umgesetzt, wobei erfreulicherweise der verhältnismäßig geringe Fluorierungsgrad des Membranankers **79** ein Lösen im maximalen Volumen von 2 mL NMP erlaubte.

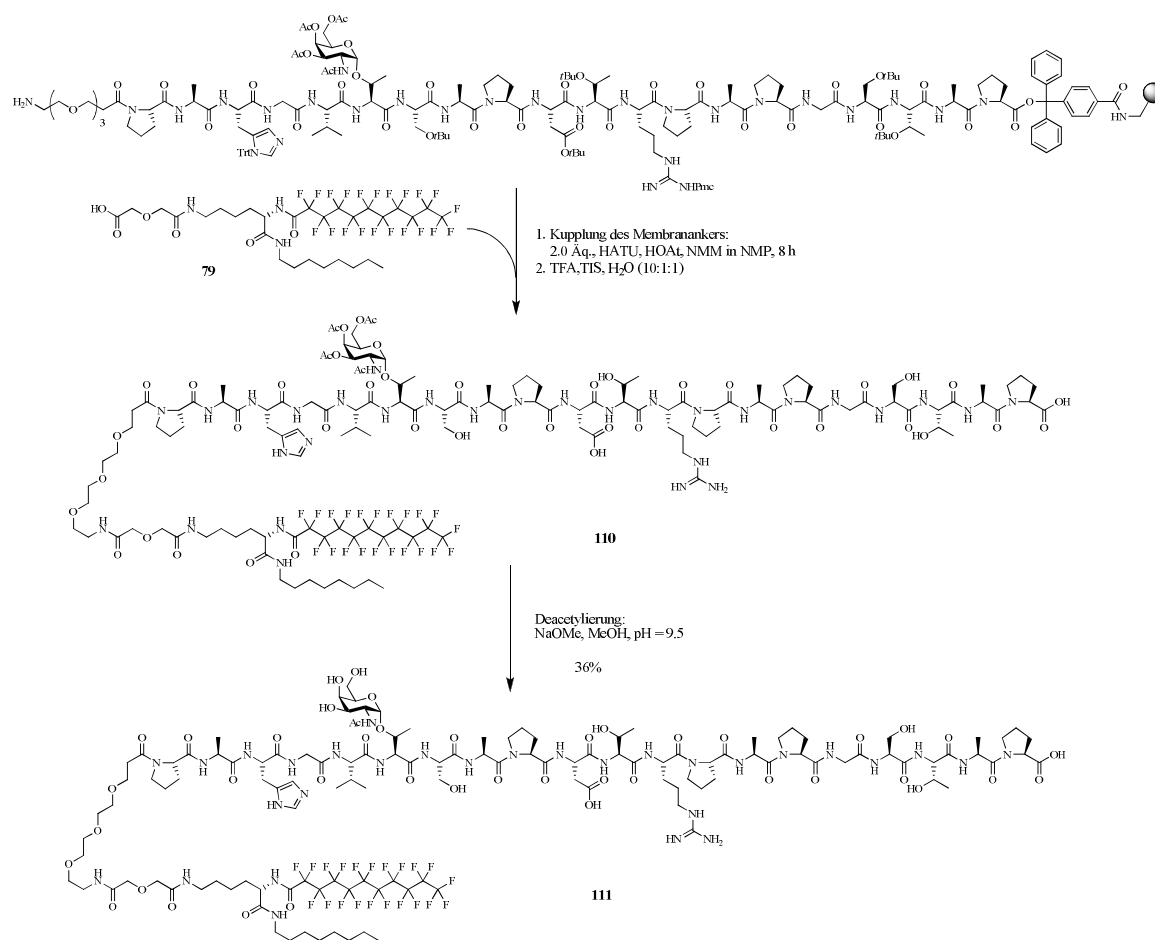


Abbildung 4.91: Kupplung des Membranankers an das MUC1-Peptid und Deacetylierung.

Nach achtstündiger Reaktionszeit wurde das polymergebundene Glycopeptid in einen MERRIFIELD-Reaktor überführt und dort durch Behandlung mit TFA, TIS und Wasser (10:1:1) vom Harz gelöst. Leider gelang es nicht das partiell geschützte Glycolipopeptid **110** mittels semipräparativer RP-HPLC zu reinigen, weshalb zunächst die Acetyl-Schutzgruppen der Glycosylseitenkette im Rohprodukt durch Umesterung mit einer methanolischen Natrium-methanolat-Lösung bei einem pH-Wert von 9.5 entfernt wurden. Wie zuvor musste auch hier die

exakte Einstellung des pH-Wertes gewährleistet werden, um die β -Eliminierung der Glycanseitenkette zu verhindern. Der Versuch, die Deacetylierung schonend bei einem pH-Wert von 11 in wässriger Natriumhydroxid-Lösung durchzuführen,^[178] wurde nicht weiter verfolgt, da hierbei üblicherweise sehr lange Reaktionszeiten von bis zu 3 d notwendig waren.

Das erhaltene Rohprodukt **110** wurde anschließend in wenig Methanol gelöst und durch Eintropfen in einen großen Überschuss gekühlten Diethylethers ausgefällt. Nach Zentrifugieren und Dekantieren der überstehenden Lösung konnte gereinigtes **111** erhalten werden. Das MALDI-TOF-Massenspektrum der Verbindung zeigte, dass keine Abbruchsequenzen im Lyophilisat enthalten waren. Insgesamt konnte daher das Glycolipopeptid **111** mit teilfluoriertem Membrananker in einer Ausbeute von 36%, bezogen auf die Beladung des Harzes, gewonnen werden.

Dasselbe Peptid sollte auch durch mikrowellenunterstützte Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden. Dafür kam der *Liberty1* Mikrowellenpeptidsynthesizer der Firma *CEM* zum Einsatz. Im Vergleich zur konventionellen Festphasensynthese liegt der wesentliche Unterschied im Protokoll der Mikrowellen-Peptidsynthese darin, dass auf einen *Capping*-Schritt verzichtet wird. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgte mit 4 Äquiv. bei 15 W Mikrowelleneinstrahlung und einer Temperatur von 55 °C über einen Zeitraum von zehn Minuten. Im Gegensatz dazu sollte die Kupplung von 2 Äquiv. des Glycosylbausteins **41** mit HATU und HOAt binnen 60 Minuten bei einer Temperatur von 70 °C erfolgen. Die gleichen Reaktionsbedingungen wurden am Ende der Synthese auch zur Kupplung des Lysinmembranankers **79** herangezogen. Eine Analyse des ESI-Massenspektrums nach Abspaltung des Peptids vom Trityl-Harz ergab jedoch, dass es unter den Reaktionsbedingungen eine Eliminierung der Glycanseitenkette auftrat. Zudem erfolgte die Kupplung der Glycosylaminosäure nicht vollständig, was aufgrund des fehlenden *Capping*-Schrittes dazu führte, dass eine um das Threonin verkürzte Peptidkette aufgebaut wurde. Damit zeigte sich, dass die Peptidkupplung einfacher Aminosäuren schnell und effizient am Mikrowellengerät durchgeführt werden kann, der Einbau komplexerer Aminosäuren aber noch weiterer Optimierungsarbeiten hinsichtlich der Reaktionsbedingungen bedarf.

Nach dem erfolgreichen Einbau des Lysinmembranankers **79** in ein 20er-MUC1-Peptid mithilfe der konventionellen Festphasenpeptidsynthese sollte auch der auf Glutaminsäure basierende Anker **95** mit zwei Perfluoralkylketten zum Aufbau entsprechender Glycopeptide herangezogen werden. Neben dem bereits eingesetzten T_N-Antigen-Baustein **41** war geplant die komplexeren tumorassoziierten Kohlenhydratantigene T **99** und ST_N **109** jeweils an Position 6 des MUC1-Peptides einzubauen. Da sich die Synthese solcher Glycopeptide bisweilen als schwierig erwiesen hatte, wurde das Syntheseprotokoll derart angepasst, dass die anschließende Kupplung des Valins doppelt durchgeführt wurde, um einen möglichst hohen Umsatz am N-Terminus der

Glycosylaminosäure zu erzielen. Die folgenden Syntheseschritte wurden dann wieder nach dem Standardprotokoll ausgeführt. Eine schematische Zusammenfassung des beschriebenen Vorgehens ist in Abbildung 4.92 gegeben.

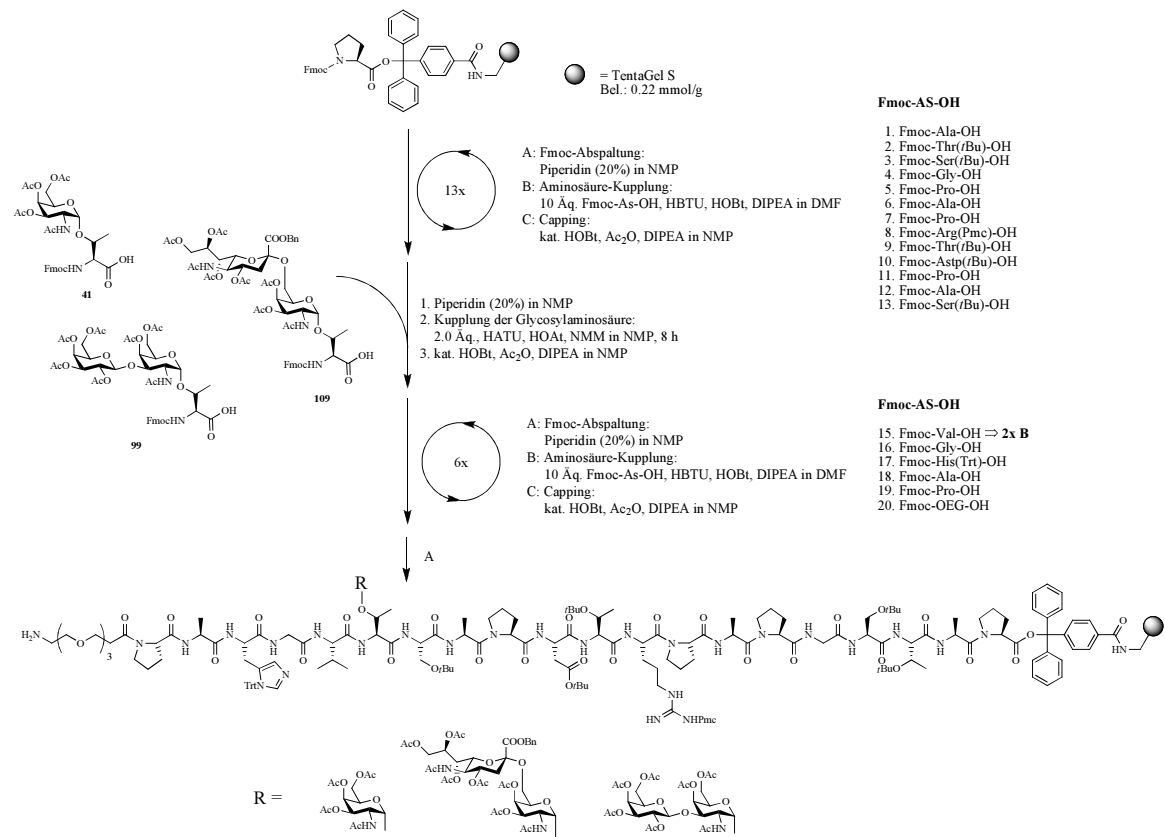


Abbildung 4.92: Festphasenpeptidsynthese zum aminfunktionalisierten MUC1-Peptid mit den integrierten Kohlenhydratantigenen T_N , ST_N und T .

Aufgrund der geringen Löslichkeit des Glutaminsäureankers **95** in NMP wurde die Einführung des Membranankers nicht halbautomatisch am Peptidsyntheser vorgenommen. Vielmehr wurde das Harz in einen MERRIFIELD-Reaktor überführt, der es erlaubt mit größeren Lösungsmittelmengen und verschiedenen Lösungsmittelgemischen zu arbeiten. Beispielsweise wurden Lösungsmittelgemische aus Dioxan/DMF/NMP und DMF/Dioxan/Chloroform eingesetzt, deren Komponenten abwechselnd bei 35 °C zugetropft wurden. Dadurch gelang es zwar den Glutaminsäure-Reaktivester zu lösen, doch lief die Kupplung mit dem Glycopeptid nur unvollständig unter Ausbildung eines komplexen Produktgemisches ab. Eine vollständige Umsetzung gelang erst, nachdem Tetrahydrofuran im Lösungsmittelgemisch eingesetzt wurde. So war es schließlich möglich, das mit zwei Perfluoralkylketten versehene Glutaminsäure-Derivat **95** mit HATU/HOAt und NMM in einem 2:1:1-Lösungsmittelgemisch aus Tetrahydrofuran, Chloroform und DMF an das aminfunktionalisierte MUC1-*tandem-repeat*-Peptid zu knüpfen. Die Reaktionszeiten betragen

dabei 3 d und die Kupplung erfolgte quantitativ. Die erhaltenen Glycolipopeptide wurden durch Behandlung mit Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser vom Harz gelöst und von den Aminosäureseitenketten-Schutzgruppen befreit (Abbildung 4.93).

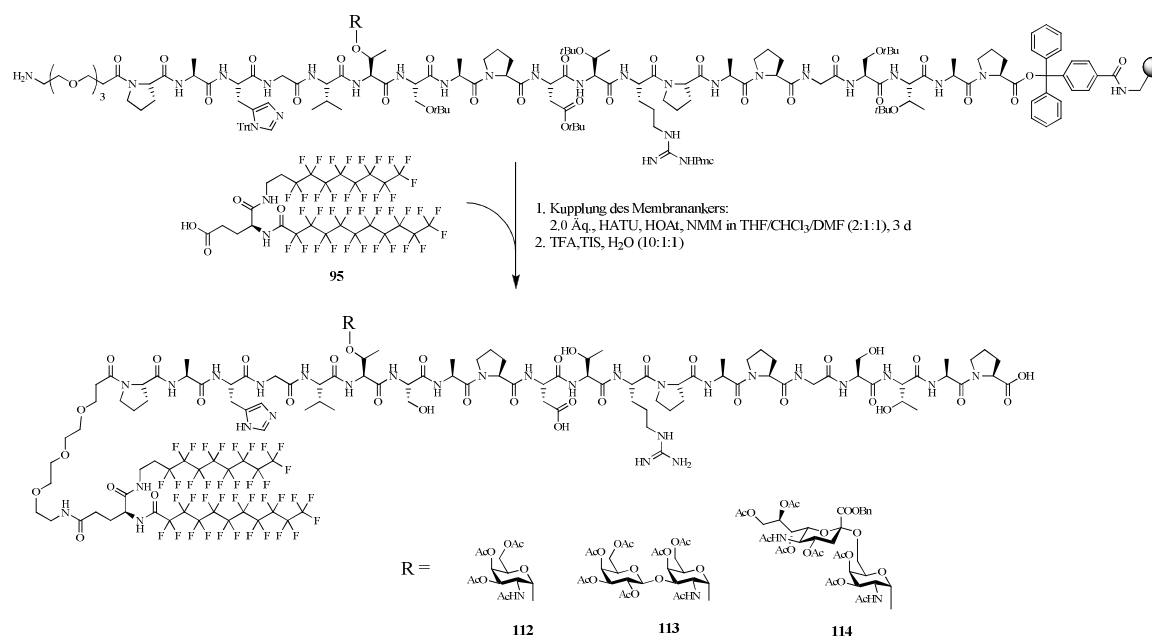
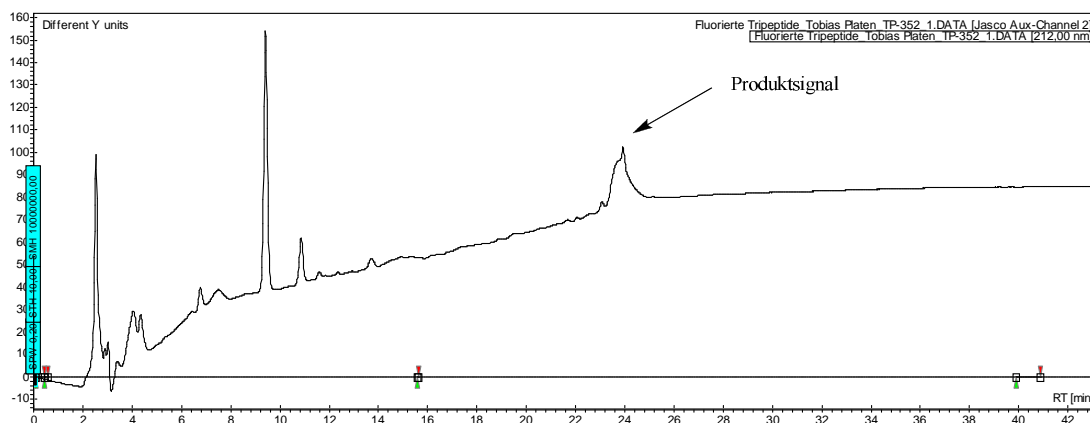


Abbildung 4.93: Membranankerkupplung an die verschiedenen MUC1-Glycopeptide.

Die Reinigung dieser Glycolipopeptide mittels HPLC gelang jedoch nicht, da das Produktsignal aus der analytischen RP-HPLC bei der Durchführung im semipräparativen Maßstab nur noch sehr klein und breit auftrat und nur geringe Mengen an **112** isoliert werden konnten (Abbildung 4.94). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnten Wechselwirkungen der amphiphilen Glykokonjugaten **112** unter Ausbildung von übergeordneten Strukturen beim Lösen sein. Die Wechselwirkungen dieser Strukturen mit der stationären Phase erlauben dann keine vollständige Trennung mehr. Da die Auftragung bei der semipräparativen RP-HPLC deutlich konzentrierter erfolgt, ist dieser Effekt dort ausgeprägter, während er im analytischen Maßstab kaum zutage tritt.

A)



B)

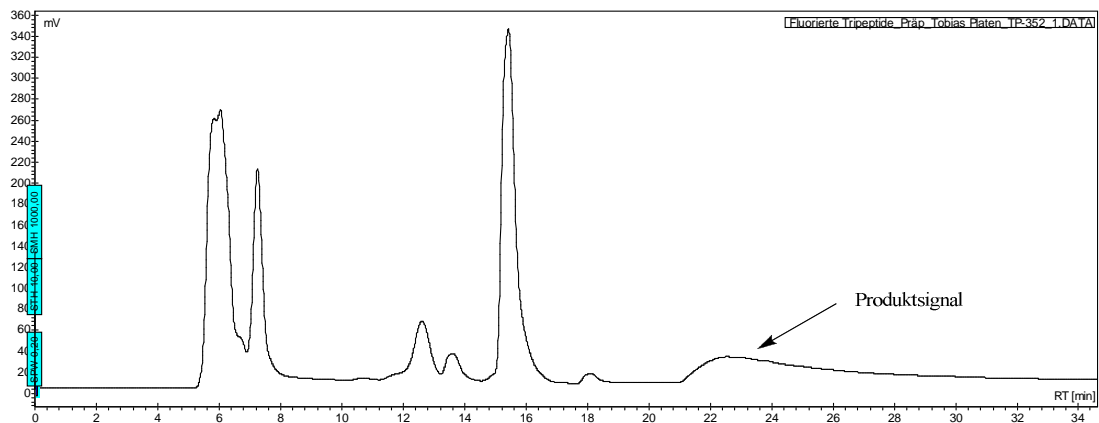


Abbildung 4.94: A) Chromatogramm des analytischen RP-HPLC-Laufs von **112**. B) Chromatogramm des semipräparativen RP-HPLC-Laufs von **112**.

Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Rohprodukte ohne Reinigung den weiteren Deblockierungsschritten bis zum komplett deblockierten Glycolipopeptid unterworfen (Abbildung 4.95).

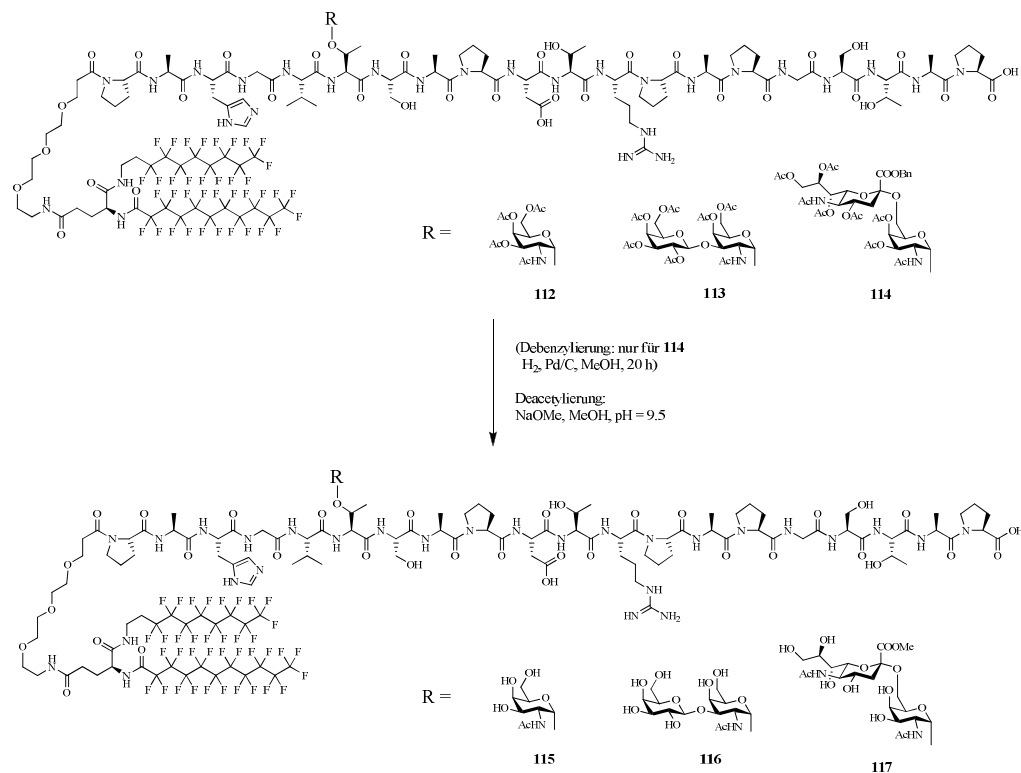


Abbildung 4.95: Vollständige Deblockierung der Glycolipopeptide mit Glutaminsäuremembrananker.

Für die mit dem T_N-Antigen **112** bzw. mit dem T-Antigen **113** ausgestatteten Glycopeptide wurde die Deacetylierung durch Umesterung mit 2.5%-iger methanolischer Natriummethanol-Lösung

bei einem pH-Wert von 9.5 erreicht. Im Fall des sialylierten Antigens **114** musste zunächst der Benzylester hydrogenolytisch gespalten werden, da es andernfalls zu Löslichkeitsproblemen im verwendeten Lösungsmittel Methanol kommen würde. Darüber hinaus käme es bei der Deacetylierung mit Natriummethanolat in Methanol zu einer Umwandlung des Benzylesters der Neuraminsäure in einen Methylester, dessen Spaltung deutlich drastischere Bedingungen erfordern würde. Nach Hydrogenolyse und Abtrennung des Palladiums wurde auch das ST_N-Konjugat der oben genannten Deacetylierung unterworfen. Die spätere Analyse des MALDI-TOF-Massenspektrums von **117** brachte hervor, dass die Hydrierung nur unvollständig abgelaufen ist, so dass es in der Tat als Hauptprodukt zur Bildung des unerwünschten Methylesters kam. Aus den oben erwähnten Gründen wurden auch diese Peptide keiner RP-HPLC-Chromatographie unterzogen, so dass sie ebenfalls durch Fällen in Diethylether und Zentrifugation gereinigt wurden. Die MALDI-TOF-Massenspektren offenbarten jedoch, dass alle drei Peptide **115**, **116** und **117** als Gemische aus Produkt und einer 13 Aminosäuren umfassenden Abbruchsequenz **118** vorlagen (Abbildung 4.96).

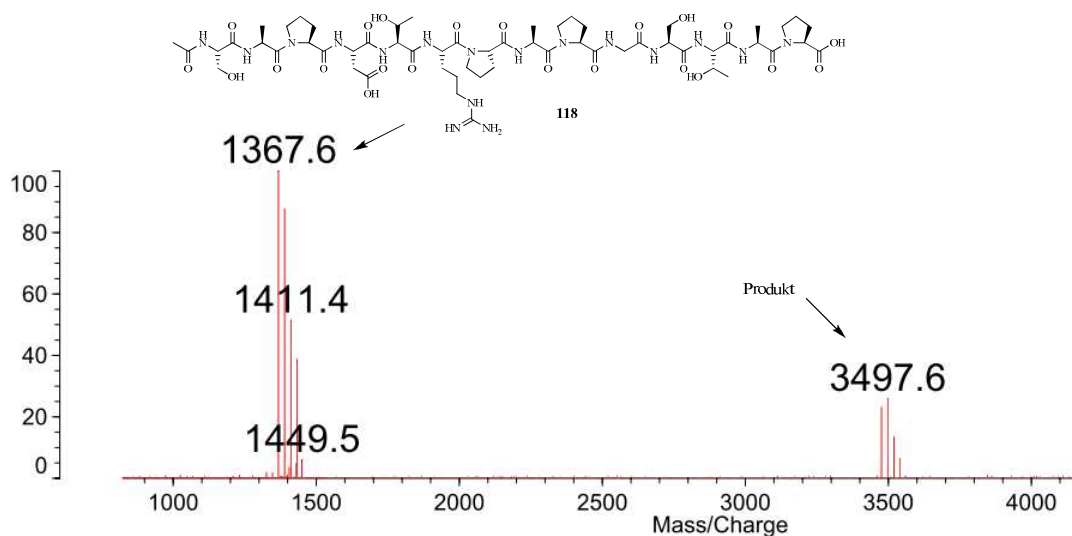


Abbildung 4.96: MALDI-Spektrum des Glutaminsäure-MUC1-T-Konjugates X mit Abbruchsequenz.

Diese Abbruchsequenz rührt von einer unvollständigen Kupplung der Glycosylaminosäuren her und konnte durch Fällung nicht abgetrennt werden. Da aber weitere Abbruchsequenzen nicht detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass alle nachgelagerten Peptidkupplungen, einschließlich der in Tetrahydrofuran ausgeführten Kupplung des Glutaminsäureankers **95**, mit hohen Ausbeuten verlaufen sein müssen.

Es wurde noch der Versuch unternommen die Abbruchsequenz über Größenausschlusschromatographie mit einer Säule auf Basis von Polyacrylamid abzutrennen. Deren Ausschlussgröße lag mit 1800 g/mol zwischen der der Abbruchsequenz (1367 g/mol) und den der

Peptide ($M > 3000$ g/mol). Allerdings zeigte die MALDI-TOF-Analyse auch hier keine erfolgreiche Trennung von Abbruch- und Produktsequenz. Da es sich hierbei jedoch nur um einen ersten Versuch ohne UV-Detektion handelte, sind die Grenzen dieser Reinigungsmethode noch lange nicht ausgereizt. Leider konnte bisher keine Möglichkeit gefunden werden, die Abbruchsequenz **118** zu entfernen, so dass die erhaltenen Glutaminsäure-Derivate **115**, **116** und **117** in ersten orientierenden immunologischen Untersuchungen zusammen mit dem 13er-Peptid eingesetzt werden mussten.

4.9.4 Immunologische Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen

Aufgrund des Vorliegens als Produktgemische wurde bisher lediglich die Erkennung der hergestellten Glycopeptidkonjugate durch spezifische anti-MUC1-Antikörper in einem ELISA-Experiment untersucht (Abbildung 4.97).

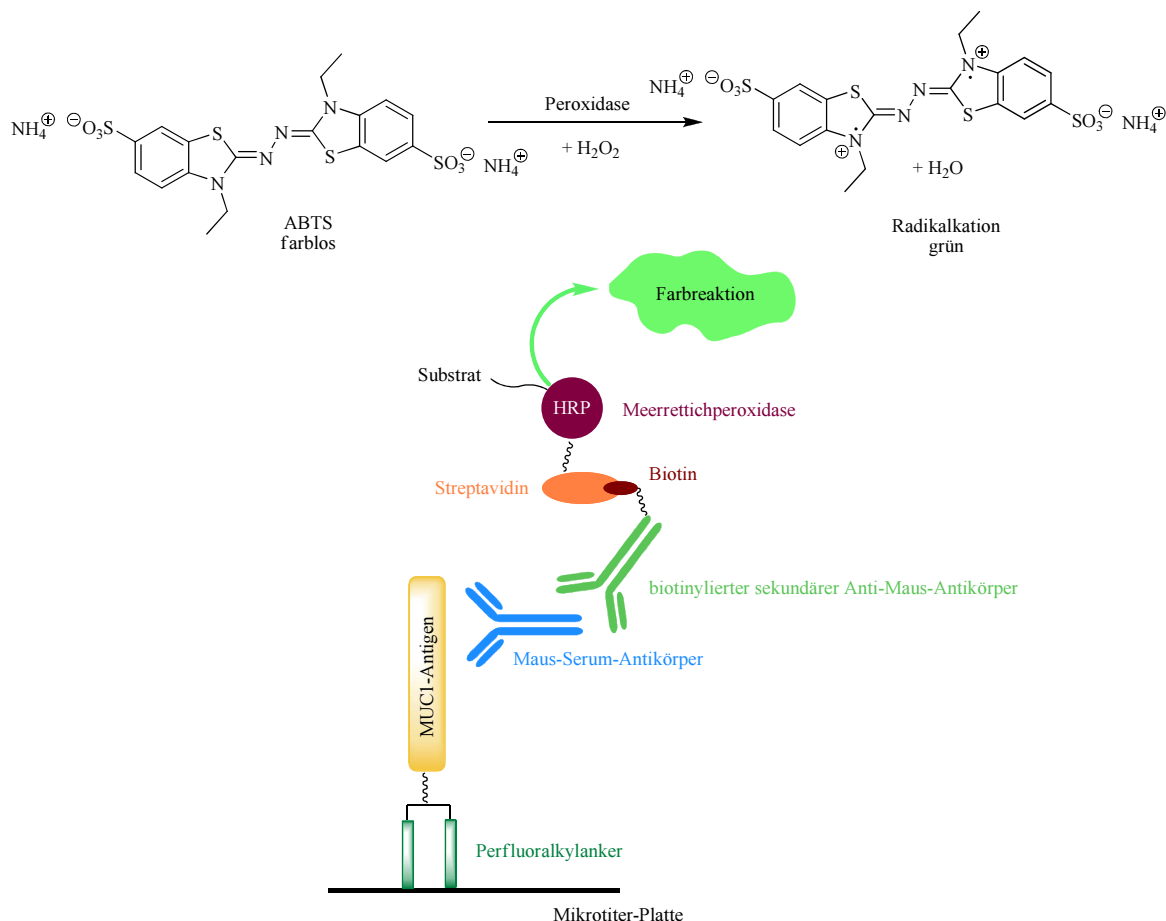


Abbildung 4.97: Prinzip des ELISA-Testes mit den Glycolipokonjugaten.

Dazu wurden ELISA-Mikrotiterplatten mit den synthetisierten Glycolipopeptiden beschichtet und mit einem Antikörper-enthaltenden Serum, welches durch Impfen von Balb/c-Mäusen mit einem

TF-Antigen-MUC1-Glycopeptid-Tetanus-Toxoid-Konjugat^[229] erhalten wurde, inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden abgewaschen, während die an das Glycolipoepitid gebundenen Antikörper über eine Farbreaktion, die durch einen biotinylierten sekundären Anti-Maus-Ig-Antikörper induziert wird, nachgewiesen werden können. Der zugegebene sekundäre Antikörper bindet an einen Streptavidin-Myeloperoxidase-Konjugat (*Horseradish Peroxidase*, *HRP*), wodurch die Oxidation des farblosen 2,2'-Azino-di-(2-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) zu einem grün gefärbten Radikal katalysiert wird.^[230] Dessen charakteristische Absorptionsbande von $\lambda = 414 \text{ nm}$ kann detektiert werden und erlaubt damit die Visualisierung der Bindung der Antikörper an das Antigen.

Die direkte Proportionalität der Absorptionsmesswerte (Optische Dichte, OD) zur Konzentration der gebundenen Antikörper, erlaubt eine Aussage über die Affinität des Antikörpers bezüglich der untersuchten Antigene. Zu Vergleichszwecken wurde auch die natürliche Struktur (MUC1(20)Thr6T)^[229], mit deren Hilfe der Antikörper gewonnen wurde, untersucht. Die Ergebnisse dieser von S. WAGNER am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführten ELISA-Tests sind in Abbildung 4.98 wiedergegeben.

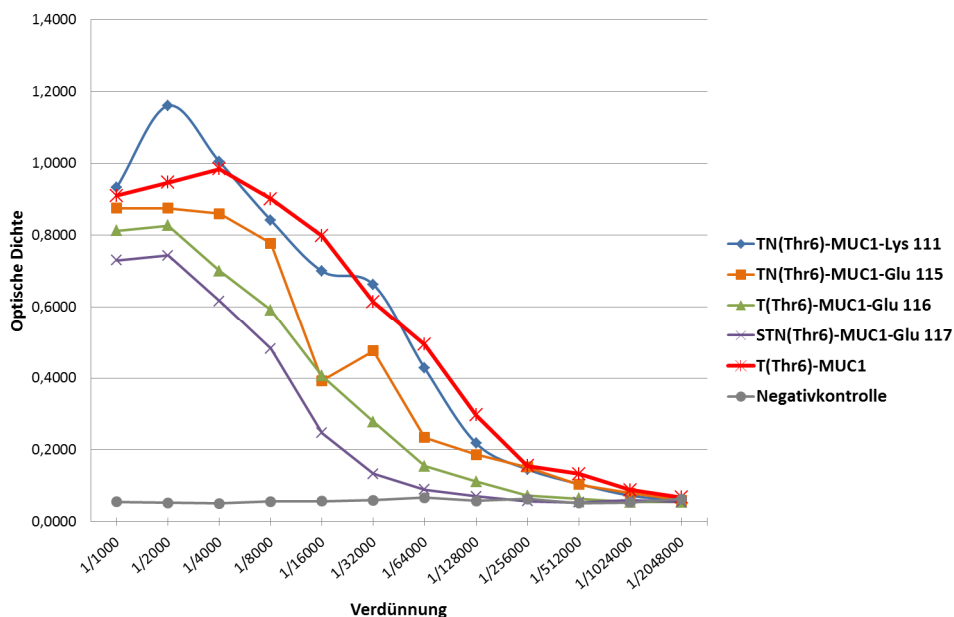


Abbildung 4.98: ELISA-Experimente von den synthetisierten Glycolipopeptiden 111, 115, 116, und 117.

Es ist zu erkennen, dass der Antikörper eine ähnliche Affinität zu dem Glycolipoepitid mit Lysinanker 111 aufweist, wie zu seinem ursprünglichen Antigen. Die Bindungsaffinität zu den Glycolipoepitiden mit Glutaminsäureankern 115, 116 und 117 ist etwas schwächer ausgeprägt, was sich durch das Vorhandensein der Abbruchsequenz und einem damit einhergehenden Fehler in der Konzentrationsangabe erklären lässt. Damit kann aus diesen Experimenten zunächst nur auf die erfolgreiche Bindung geschlossen werden, woraus folgt, dass die verwendeten

Perfluoralkylanker keine Strukturänderung in der MUC1-Sequenz hervorrufen, die die Erkennung durch den Antikörper behindert. Die relativ ähnlichen Affinitäten in Gegenwart der verschiedenen Kohlenhydratseitenketten belegen zudem den starken Einfluss des Peptidpitopes im Vergleich zu den Kohlenhydratantigenen.^[37]

In Zukunft sollen weitergehende Studien zeigen, ob eine multivalente Anordnung dieser tumor-assoziierten Kohlenhydratantigene über die Perfluoralkylanker in den Verbindungen **111**, **115**, **116** und **117** auch für die Erzeugung von MUC1-spezifischen Antikörpern eingesetzt werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Verständnis der grundlegenden molekularen Prozesse bei der Erkennung und Bindung eines Antikörpers an geclusterte Haptene in polyfunktionalisierten Mikrodomänen ist vor dem Hintergrund der Entwicklung einer Krebsimmuntherapie basierend auf Vakzinen mit multiplen tumorassoziierter Kohlenhydratantigenen von großer Bedeutung. Bisher wird eine räumliche Konzentration mehrerer Haptene vor allem durch die Anbindung an Trägerproteine wie Rinderserumalbumin (BSA) oder Tetanus-Toxoid (TTox) erreicht. Alternativ ist eine multivalente Präsentation aber auch über Konjugation der tumorassozierten Antigene an selbstaggregierende perfluorierte Alkylketten vorstellbar, denn deren Entmischungstendenz in Matrixlipiden kann zu einer Anreicherung führen, die der in *raft*-Domänen auf der Zelloberfläche ähnelt. Die Darstellung solcher künstlicher Membranmodelle, hervorgegangen aus einer modularen Synthese amphiphiler, fluorierter Glycolipokonjugate, erlaubt die Untersuchung vielfältiger Struktur-Aktivitätsbeziehungen. So lässt sich beispielsweise durch Veränderung des Fluorierungsgrades der Membrananker die laterale Ausdehnung der Mikrodomänen beeinflussen. Ebenso erlaubt die Variation der hydrophilen Kopfgruppe eine große Zahl von unterschiedlichen Anwendungen in der Immuntherapie, aber auch in der Behandlung verschiedener viraler und bakterieller Infekte. Dabei besteht eine wesentliche Herausforderung auch für zukünftige Forschungsvorhaben darin, geeignete Membranankersysteme zu entwickeln, mit deren Hilfe stabile entmischte und funktionalisierte Lipiddomänen erzeugt werden können. Mit einem solchen System ließen sich dann die Einflüsse zentraler Parameter, wie beispielsweise die Größe der Domänen und deren innere Ligandendichte, auf die Antigenerkennung untersuchen und hinsichtlich eines Einsatzes als Vakzinträger in der Immuntherapie optimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür zunächst verschiedene Membranankersysteme mit unterschiedlichem Fluorierungsgrad entwickelt. Basierend auf einer Glycerin-Kernstruktur konnten ausgehend von D-Mannitol in einer achtstufigen Synthese erste fluorkettenhaltige Membrananker dieses Typs synthetisiert werden, die zur C-terminalen Verknüpfung mit dem Glycopeptid eine Aminfunktionalität tragen. Da leider die Perfluoralkylketten im Schlüsselschritt der Reaktionssequenz über eine S_N2 -Reaktion des Glyceroldiols **8** mit einem perfluorierten Elektrophil nicht eingebaut werden konnten, musste auf eine radikalische Perfluoralkylierung, in der Triethylboran als Radikalstarter zur Addition der entsprechenden Perfluoralkyliodide an Allylether verwendet wurde, zurückgegriffen werden. Diese Reaktion verlief mit hervorragenden Ausbeuten für alle verwendeten Perfluoralkyliodide (Perfluorhexyliodid, -octyliodid, -decyliodid), führte jedoch zu einer Racemisierung des Stereozentrums, so dass die weiteren Syntheseschritte

von diesem Punkt aus racemisch ausgeführt wurden (Abbildung 5.1). Bei den Umsetzungen bestätigte sich der allgemeine Trend, dass die Ausbeuten mit steigender Zahl an Fluoratomen niedriger ausfallen, was primär auf die zunehmend geringere Löslichkeit der Perfluoralkyliodide in organischen Solventien zurückzuführen ist. Außerdem zeigte sich, dass die Reinigung der resultierenden Amphiphile mit einer freien Aminogruppe extrem schwierig ist, weshalb diese Produkte in den Synthesen stets als Rohprodukte eingesetzt wurden.

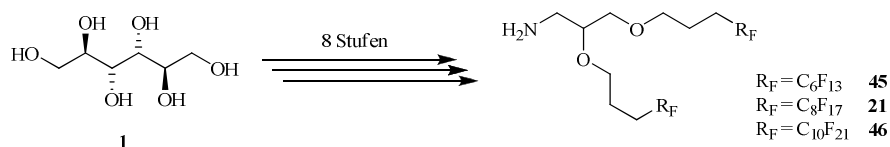


Abbildung 5.1: Synthese der Glycerin-basierenden Membrananker mit Perfluoralkylketten von C_6F_{13} über C_8F_{17} bis $C_{10}F_{21}$.

Das zweite im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Membranankersystem basiert auf orthogonal geschütztem Lysin und trägt damit bereits eine Aminofunktion zur Anbringung an den C-Terminus des Peptides. Synthetische Varianten, die mit diesem System erzeugt wurden, umfassen sowohl einen sog. gemischten Membrananker **76** mit einer Fluoralkylkette und einer normalen Alkylkette, als auch einen Membrananker **77**, der zwei Perfluoralkylketten trägt. Während die Synthese des gemischten Alkyl-/Perfluoralkylankers **76** in insgesamt 5 Stufen ausgehend von Lysin erfolgte, benötigte das komplett perfluoralkylierte Molekül **77** insgesamt 7 Stufen (Abbildung 5.2). Der Einbau der perfluorierten Alkylketten wurde dabei jeweils durch klassische Peptidkupplungen erreicht, wobei sowohl Säurechloride als auch moderne Kupplungsreagenzien, in diesem Fall TBTU, eingesetzt werden konnten. Die bereits bei den Glycerolankern beobachtete schlechtere Löslichkeit der Verbindungen mit größerer Zahl an Fluoratomen und deren erschwerte Reinigung der freien Amine fiel auch bei den Lysinderivaten auf.

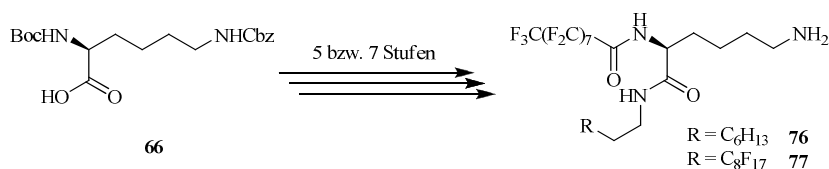


Abbildung 5.2: Synthese des Membranankersystem mit Lysin Grundstruktur.

Im weiteren Syntheseverlauf konnten diese Membrananker mit dem bifunktionalisierten Spacer **29**, der in sechs Stufen nach einer modifizierten literaturbekannten Vorschrift gekuppelt werden, wobei sich die Verwendung einer Cbz-Schutzgruppe mit Blick auf die Reinheit der entstehenden reineren Rohprodukte als vorteilhaft erwies. Nach N-terminaler Deblockierung wurde mit der Aminfunktion eine hydrophile Kopfgruppe erhalten, die eine Untersuchung des Amphiphils auf

dem Langmuir-Blodgett-Trog zulässt (Abbildung 5.3). Damit konnten bereits erste Hinweise auf das Entmischungsverhalten dieses Verbindungstyps in verschiedenen Matrixlipiden erhalten werden. Zudem eignet sich Verbindung **86** auch als kleineres fluoriertes Matrixlipid, das binären Mischungen eines Alkylipids und einem *F*-Amphiphil mit relativ großer Kopfgruppe (z. B. T_N-Dipeptid bzw. MUC1-Glycopeptidstruktur) zugesetzt werden kann, um die Entmischung zu erleichtern und die aggregierten Amphiphil-Domänen zu stabilisieren.

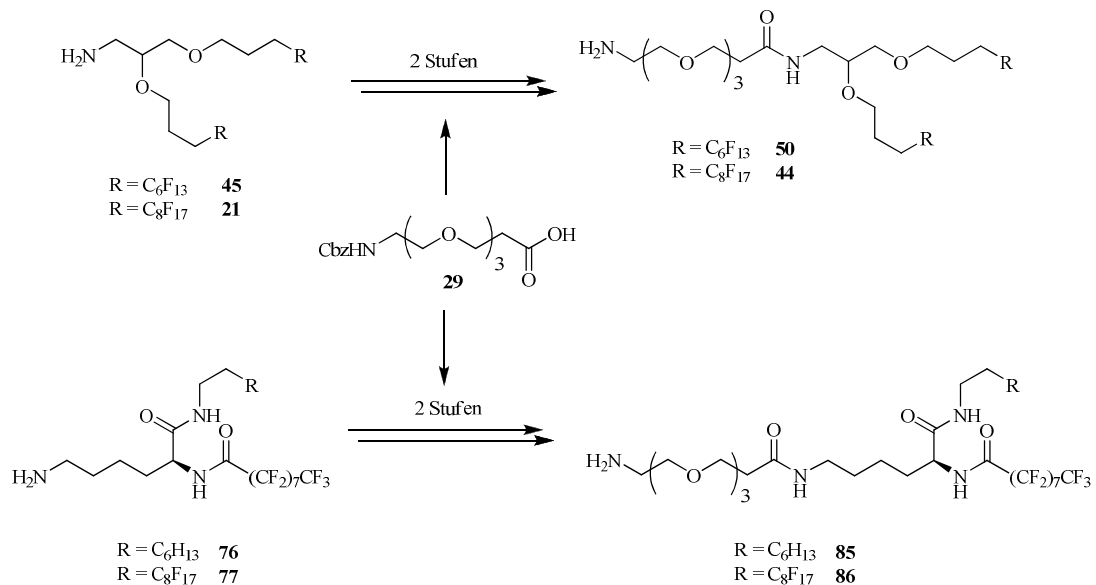


Abbildung 5.3: Konjugation der Membrananker mit dem bifunktionalisierten Spacer **29**.

Für derartige Modellstudien wurde ein mit dem T_N-Antigen glycosyliertes Thr-Val-Dipeptid als hydrophile Kopfgruppe hergestellt, wobei der hierzu notwendige T_N-Thr-Baustein ausgehend von D-Galactose in neun Stufen nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert wurde. Da die direkte Kupplung dieses Bausteins mit den Membranankern in Gegenwart des Triethylglycolspacers aufgrund mangelnder Löslichkeit misslang, mussten in sieben Stufen Valin und der Triethylglycolspacer jeweils separat C- und N-terminal angebunden werden (Abbildung 5.4).

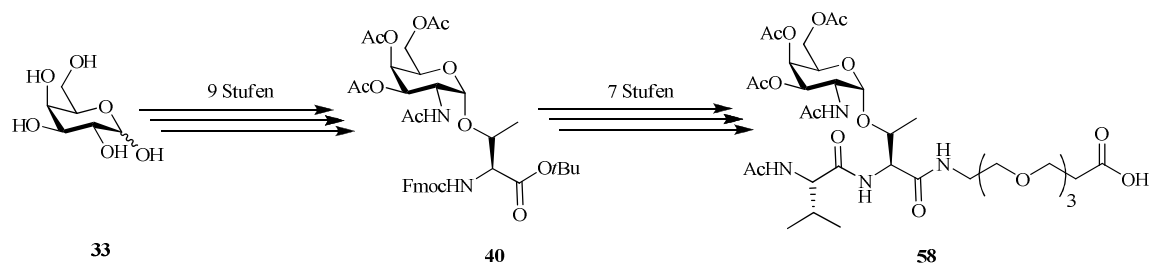


Abbildung 5.4: Synthese des dipeptidischen T_N-Antigens mit Triethylglycolspacer.

Die resultierende hydrophile Kopfgruppen-Einheit konnte schließlich über eine Amidbindung an die zuvor hergestellten Membrananker angebunden werden, womit erste Konjugate dieses Typs mit Glycerolankern, die je zwei Perfluorhexylketten **45** bzw. Perfluoroktylketten **21** tragen, erhalten wurden (Abbildung 5.5).

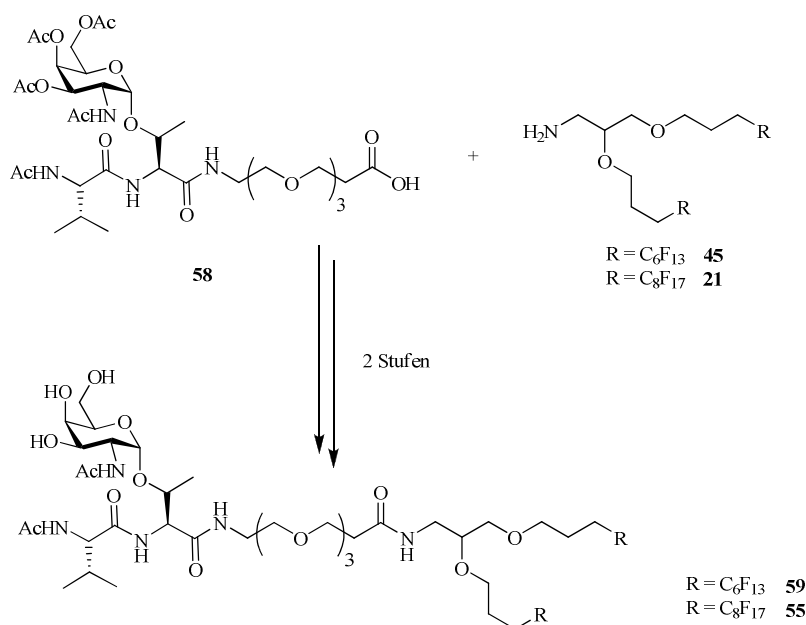


Abbildung 5.5: Synthese der Glycerolkonjugate mit hydrophiler T_N -dipeptidischer Kopfgruppe.

Analog war auch eine Konjugation mit den beiden Lysinmembranankern **76** und **77** zu den in Abbildung 5.6 gezeigten Amphiphilen erfolgreich.

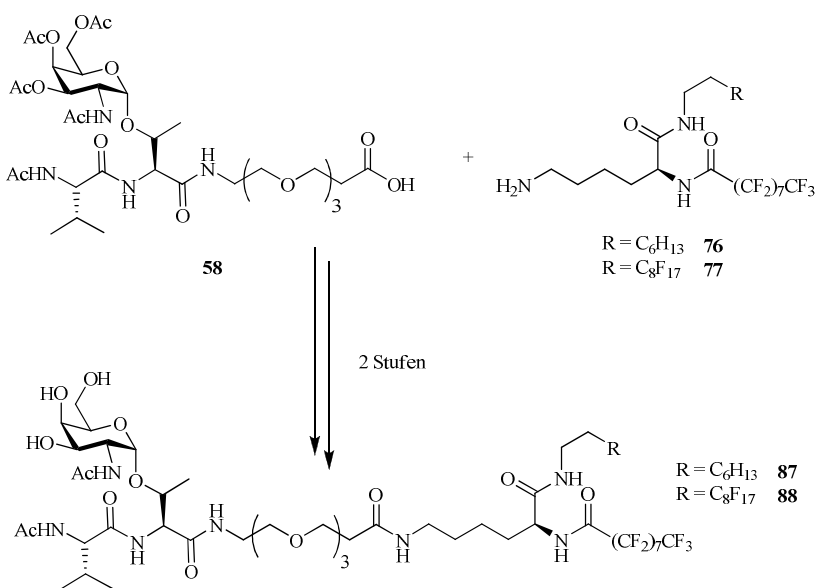
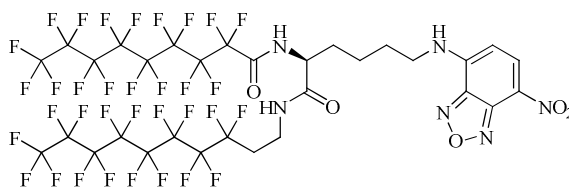


Abbildung 5.6: Synthese der Lysinkonjugate mit hydrophiler T_N -dipeptidischer Kopfgruppe.

Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg dieser doch anspruchsvollen Peptidkupplungen erwies sich dabei das reaktive Reagenzienpaar HCTU/HOBt in Gegenwart von NMM als Base und unter Verwendung eines Lösungsmittelgemischs aus Tetrahydrofuran, Dichlormethan und DMF. Nach diesem Protokoll konnten schließlich reproduzierbar mit Ausbeuten zwischen 30% und 40% der verschiedenen Amphiphile nach RP-HPLC-Reinigung erhalten werden. Lediglich die Kupplung der Perfluordecylverbindung **46** gelang aufgrund mangelnder Löslichkeit weder mit dem Triethylglycolspacer **29** noch mit dem T_N-Dipeptid-Baustein **58**. Nichtsdestoweniger stehen nun mit den hergestellten Verbindungen acht Amphiphile für entsprechende Entmischungsstudien mit Hilfe von Langmuir-Blodgett-Untersuchungen und Rasterkraftmikroskopie zur Verfügung.

Erste derartige Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. ZENTEL am Institut für Organische Chemie der Universität Mainz, durchgeführt. Dabei konnte beispielsweise mit 2-(2-(2-(Dioctadecylamino)-2-oxoethoxy)acetoxy)methacrylsäureethylester (DODAMA) als Matrixlipid die Ausbildung mikroseparierter Bereiche nachgewiesen werden, wobei sich zeigte, dass in diesen DODAMA auskristallisierte. Bei Verwendung eines alternativen, besser geeigneten Matrixlipids sollte jedoch auch die gewünschte Kristallisation der antigenen Strukturen, d. h. der *F*-Amphiphile möglich sein. Die hierzu notwendigen Arbeiten sollen in Kürze in Angriff genommen werden.

Eine interessante Einsatzmöglichkeit der perfluorierten Membranankersysteme in der medizinischen Diagnostik beruht auf deren Verwendung in sog. *Fluorous Microarrays*. Deren Grundprinzip beruht auf einer stabilen spezifischen Immobilisierung der Verbindungen an fluorierten Oberflächen mithilfe von hydrophoben Fluor-Fluor-Wechselwirkungen. Um die Eignung der hergestellten Lysinconjunkte für einen solchen Einsatz zu demonstrieren, wurde das in Abbildung 5.7 gezeigte fluoreszenzmarkierte Derivat **82** hergestellt.



82

Abbildung 5.7: Fluoreszenzmarkierter Lysinanker.

Für dieses konnte in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eine persistente Immobilisierung auf fluorierten Glaträgern nachgewiesen werden, wobei selbst zehn Waschschrte mit Reinstwasser bzw. PBS-Puffer keinen signifikanten Verlust der Verbindung bewirkten.

Der Einsatz der Membrananker in der Festphasenpeptidsynthese zur Herstellung der Amphiphile mit vollständiger MUC1-Antigen-Einheit erforderte eine leicht abgewandelte Synthesestrategie, bei der die Anbindung des Ankers über den *N*-Terminus des Peptides erfolgen sollte. Die dafür benötigte Säurefunktion wurde in den teilfluorierten Lysinanker **79** durch Reaktion mit Diglycol-säureanhydrid eingeführt (Abbildung 5.8), wohingegen die komplett perfluorierten Verbindungen nur zu untrennbaren Gemischen aus eingesetztem Amin und Produkt führten.

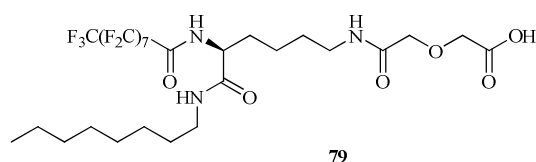


Abbildung 5.8: Säurefunktionalisiertes teilfluoriertes Lysin für die Festphasenpeptidsynthese.

Aufgrund dessen wurde speziell für die Festphasenpeptidsynthese ein weiteres Membranankersystem entwickelt, das sich auf Glutaminsäure stützt und damit bereits die benötigte Carboxyfunktion zur Kupplung an den *N*-Terminus des Peptidteils enthält. Die Einführung der beiden Perfluoralkylketten gelingt mithilfe der zuvor beschriebenen Synthesestrategie, so dass in nur sieben Stufen mit durchweg hohen Ausbeuten und nur einem Chromatographieschritt der gewünschte Membrananker mit zwei Perfluoralkylketten zugänglich gemacht werden konnte (Abbildung 5.9).

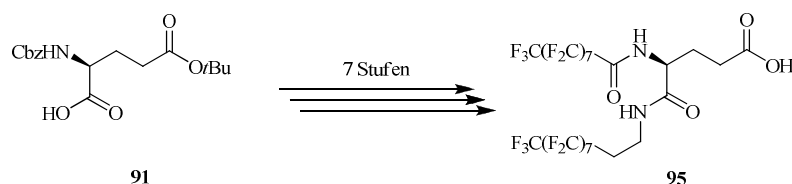


Abbildung 5.9: Synthese des Glutaminsäureankers für die Festphasenpeptidsynthese.

Ausgehend von dem T_N -Antigen (vgl. Abbildung 5.4) wurden zudem noch weitere komplexere Glycosylaminosäuren, die in Zusammenhang mit Krebs stehen, synthetisiert, um sie in der Festphasenpeptidsynthese als Teil der kompletten Wiederholungseinheit des MUC1 einzusetzen (Abbildung 5.10). In Anlehnung an literaturbekannte Synthesen konnte so das Thomsen-Friedenreich-Antigen **99** durch eine 3- β -selektive Glycosylierung des *N*-Acetylgalactosamins unter Helferich-Bedingungen erhalten werden. Ebenso wurde das Sialyl- T_N -Antigen **109** regioselektiv über eine α -selektive Glycosylierung von **42** mit einem Xanthogenatdonor der Neuraminsäure **104** gewonnen. Nach Freilegung der Carbonsäurefunktionen standen damit die drei tumorassoziierte Kohlenhydratantigene T_N , ST_N und T für den Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese zur Verfügung.

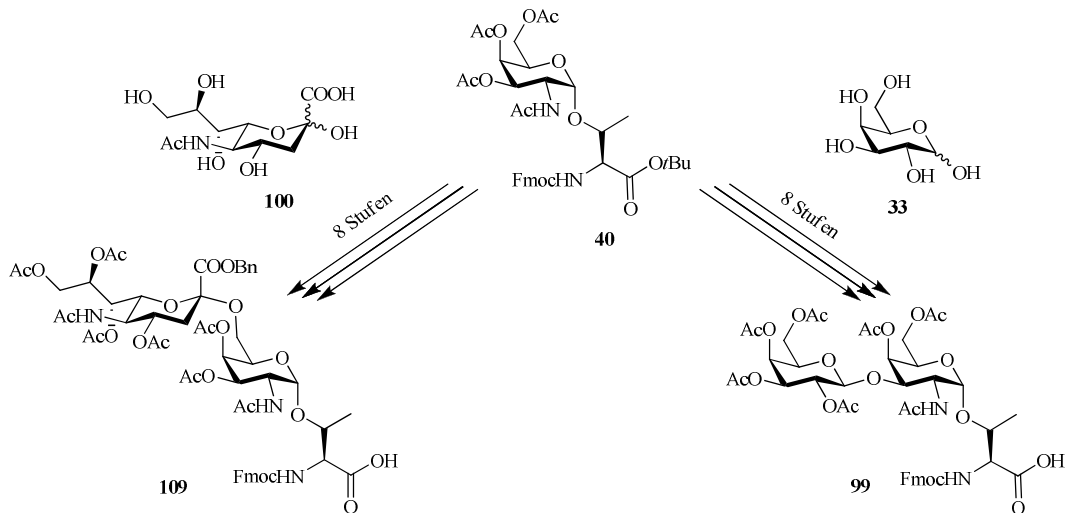


Abbildung 5.10: Herstellung der tumorassoziierten Kohlenhydratantigene.

Schließlich gelang es, durch Verwendung der vollautomatischen Glycopeptidsynthese ein MUC1-analoges Glycopeptid aufzubauen, bei dem eine T_N -Antigen-Einheit an Position 6 der vollständigen, aus zwanzig Aminosäuren bestehenden MUC1-Wiederholungseinheit eingeführt wurde. Dieses Glycopeptidfragment wurde zudem am Peptidsynthesizer über den nicht-immunogenen Triethylglycolspacer mit dem teilfluorierten Lysinanker gekuppelt. Die Reinigung des Glycolipopeptides **111** erfolgte nach Entfernen sowohl der Peptidschutzgruppen als auch der Zuckerschutzgruppen durch Fällung in Diethylether, wodurch **111** in 36% Ausbeute erhalten wurde (Abbildung 5.11).

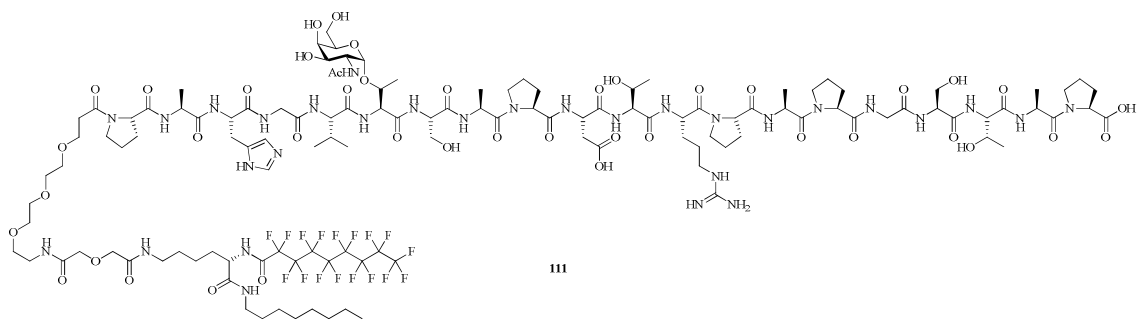


Abbildung 5.11: Struktur des Glycopeptids mit teilfluoriertem Lysinmembrananker.

Die Anbindung des Glutaminsäuremembranankers mit zwei Fluoralkylketten konnte aufgrund der geringen Löslichkeit nicht direkt im Synthesizer erfolgen und musste daher manuell in einem Merrifield-Reaktor durchgeführt werden. Hierdurch konnten neben dem MUC1-Glycopeptid mit dem T_N -Antigen in Position 6 auch jeweils eines mit einem T- und eines mit einem ST_N -Antigen in Position 6 der Wiederholungssequenz synthetisiert werden (Abbildung 5.12). Allerdings konnten diese Produkte **115**, **116** und **117** zunächst nicht in reiner Form isoliert werden, da bei der

Synthese eine aus 14 Aminosäuren bestehende Abbruchsequenz **118** anfiel, die weder durch HPLC noch durch Größenausschlusschromatographie abgetrennt werden konnte.

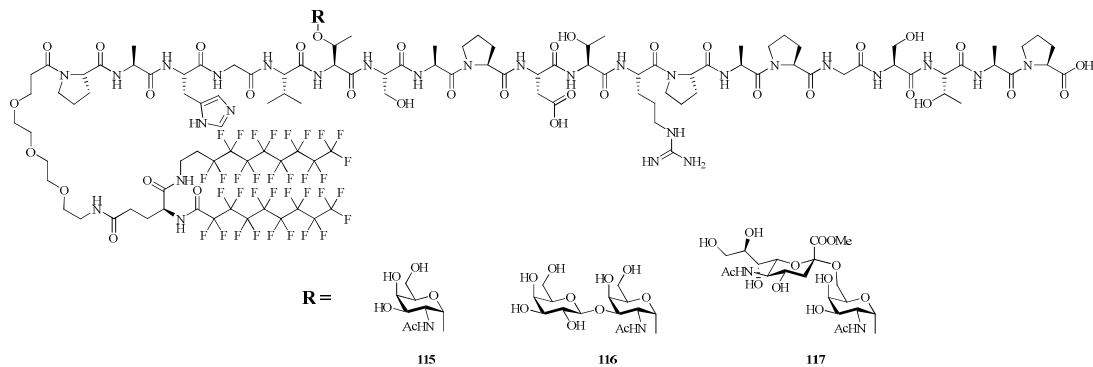


Abbildung 5.12: Synthetisierte Glycopeptide auf Basis des Glutaminsäureankers.

Die synthetisierten MUC1-Glycolipopeptide wurden trotz der enthaltenen Verunreinigungen (Abbruchsequenz) im ELISA-Experiment auf ihre Bindung an Mausserum-Antikörper untersucht. Diese Antikörper wurden nach der Immunisierung mit einem strukturell vergleichbaren T(Thr⁶)-MUC1-TTox-Vakzin erhalten und dienen dazu, etwaige Einflüsse des Membranankers auf die Antigenerkennung sichtbar zu machen.

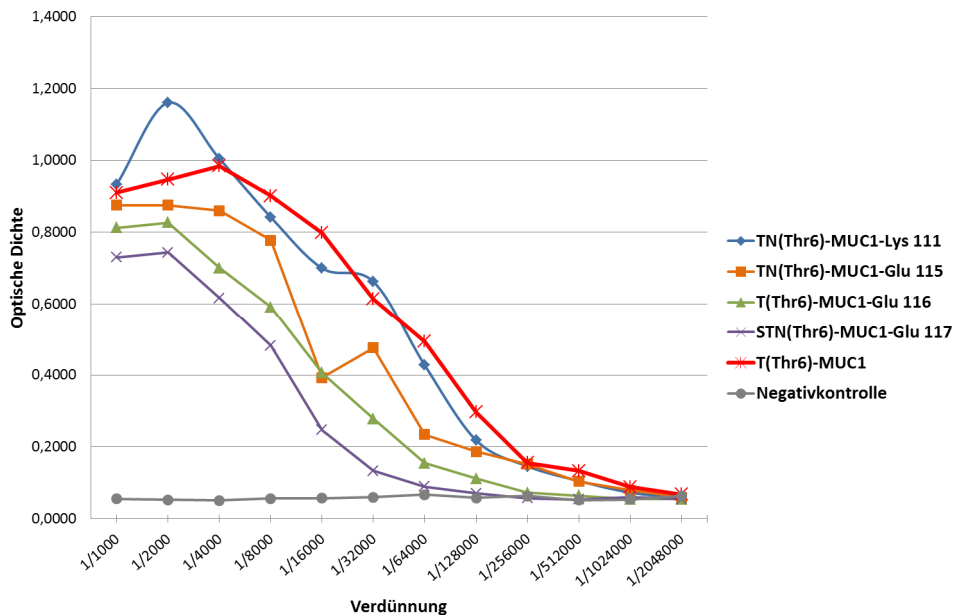


Abbildung 5.13: ELISA-Experiment.

Wie aus der Abbildung 5.13 zu entnehmen ist, werden die amphiphilen Antigeneinheiten auch in Gegenwart der Perfluoralkylanker erkannt, so dass letztere die Bindung des Antikörpers nicht behindern bzw. die Antigenpräsentation nicht beeinflussen. Zudem zeigte das MUC1-T_N-

Lysinkonjugat **111** eine ähnliche Affinität wie die Vergleichssubstanz, aus der die Antikörper gewonnen wurden. Im Gegensatz hierzu wiesen die Peptide mit den Glutaminsäureankern **115**, **116** und **117** bei ähnlichem Bindungsverhalten eine etwas geringere Affinität auf, was sicherlich auf die vorhandene Abbruchsequenz zurückzuführen ist (geänderte Konzentration). Um jedoch zu belastbaren Aussagen bezüglich der Affinitäten zu gelangen, müssten diese Messungen mit den reinen Verbindungen wiederholt werden.

Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass die hergestellten fluorierten Antigenkonjugate nicht nur interessante Bausteine für multivalente liposomale Krebsvakzine darstellen, sondern auch für den Nachweis von tumorspezifischen Antikörpern im Rahmen von diagnostischen Microarrays und ELISA-Formaten herangezogen werden können.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Messgeräte und allgemeine Anmerkungen zur Durchführung der organischen Synthese

Lösungsmittel: Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* (p. a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden durch Trocknen nach literaturbekannten Verfahren^[231] und anschließender Destillation gewonnen.

Inertgase: Sämtliche feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in vorgetrockneten und ausgeheizten Glasgeräten unter einer Argon- oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die dabei zum Einsatz gekommenen Inertgase wurden in handelsüblichen Qualitäten ohne weitere Trocknung verwendet.

Dünnschichtchromatographie: Dünnschichtchromatographien wurden ausschließlich für analytische Zwecke unter Verwendung von mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminiumfertigplatten der Firma *Merck*, Darmstadt, durchgeführt. Die Substanz-Detektion erfolgte entweder durch Fluoreszenzlöschung nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm oder mittels einer der folgenden Färbemethoden:

- Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)sulfat-tetrahydrat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in einer Mischung aus 94 mL entionisiertem Wasser und 6 mL konz. Schwefelsäure)
- Methoxyphenol-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%iger ethanolischer *m*-Methoxyphenol-Lösung und 2 N ethanolischer Schwefelsäure)
- Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin in 15 mL Eisessig und 500 mL Methanol)
- 1%ige Kaliumpermanganat-Lösung

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

Säulenchromatographie:^[232] Zur Reinigung der in Lösung erzeugten Verbindungen durch Flashchromatographie unter erhöhtem Druck (0.4-0.6 mbar) wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 0.032-0.063 nm der Firma *Acros Organics*, Geel, Belgien, eingesetzt. Das Laufmittel wurde in der Regel durch Redestillation der Eluate anderer Chromatographien

gewonnen. Um das Lösungsmittelgemisch so einzustellen, dass die zu isolierende Substanz einen für das jeweilige Trennproblem günstigen R_f -Wert aufwies, wurde jeweils die polare oder unpolare Komponente zugemischt.

Fluorous Solid Phase Extraction:^[127] Die Technik der *Fluorous Solid Phase Extraction* (FSPE) ist ein schnelles Elutionsverfahren und dient zur Trennung von fluorierten und nicht-fluorierten Bestandteilen einer Reaktionsmischung. Für diese Chromatographie wurden die Kieselgele 60 C₈-Umkehrphase der Firmen *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA, und *Fluorous Technologies*, Pittsburgh, USA, verwendet, welche eine Funktionalisierung mit Perfluorooctylethylsilylgruppen ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_8\text{F}_{17}$) und eine Partikelgröße von 0.035-0.070 nm aufwiesen. Nach Regeneration der stationären Perfluorooctylethylsilyl-Phase mit Aceton konnte diese mehrfach wiederverwendet werden. Die allgemeine Vorgehensweise zur Trennung von 100-300 mg Rohprodukt ist im Folgenden dargestellt:

1. Waschen: Waschen von 2 g unbenutzter Perfluorooctylethylsilyl-Phase mit 1 mL DMF
2. Konditionierung: Spülen mit 6 mL MeOH/H₂O (80:20)
3. Beladen: Lösen des Rohproduktes in 0.2 mL DMF und vollständiges Adsorbieren auf dem Kieselgel
4. Fluorophobe Elution: Spülen mit 8 mL MeOH/H₂O (80:20), um die organischen Bestandteile zu eluieren
5. Fluorophile Elution: Spülen mit 8 mL MeOH, um die fluorhaltigen Verbindungen zu eluieren
6. Regeneration: Waschen mit 10 mL Aceton

RP-HPLC:^[233] Analytische RP-HPLC wurde mit einer *Jasco*-HPLC-Pumpe (PU-2080 Plus), einer ternären *Jasco*-Gradienteneinheit (LG-2080-02), einem *Jasco*-3-Wege-Entgaser (DG-2080-53), sowie einem *Jasco*-Diodenarraydetektor (MD-2010 Plus) unter Verwendung der Software *ChromPass* der Firma *Jasco*, Groß-Umstadt, bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Folgende RP-Säulen fanden diesbezüglich Verwendung:

- *Luna PFP 5 μm, 250 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA*
- *Jupiter C18 5 μm, 250 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA*

Semipräparative RP-HPLC wurde unter Verwendung zweier *Jasco* Gradientenpumpen (PU-2087 Plus), einem variablen *Jasco* Wellenlängendetektor, einer Flussrate von 20 mL/min und nachstehend aufgeführter RP-Säulen durchgeführt:

- *Luna PFP 5 μm, 250 x 20 mm, Phenomenex, Torrance, USA*

Als Eluentien für die analytische und semipräparative HPLC dienten Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Gemische, gegebenenfalls unter Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure. Die verwendeten Gradienten sowie die Wellenlänge, bei welcher die Detektion erfolgte, sind in der jeweiligen Synthesevorschrift der entsprechenden Verbindungen aufgeführt. Acetonitril (HPLC-grade) und Methanol (HPLC-grade) wurden bei der Firma *Fisher-Scientific*, Schwerte, erworben, während das verwendete Wasser einer Simplicity 185-Anlage der Firma *Millipore*, Billerica, USA, entnommen wurde.

Festphasenpeptidsynthese: Die Peptid- und Glycopeptidsynthesen an der Festphase wurden mithilfe eines *Perkin-Elmer* ABI 433A-Peptidsynthesizers der Firma *Applied Biosystems*, Foster City, USA, durchgeführt, welcher zur Kontrolle des Syntheseverlaufs mit einem externen *Perkin-Elmer* Series 200 UV/Vis-Detektor der Firma *Applied Biosystems* ausgestattet ist. Die polymeren Träger der Festphasensynthese wurden von der Firma *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läfelingen, Schweiz, und der Firma *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, erworben, während die verwendeten Aminosäurebausteine von den Firmen *Orpegen Pharma*, Heidelberg, bzw. *Calbiochem-Novabiochem AG*, Läfelingen, Schweiz, bezogen wurden.

In den sich wiederholenden Syntheseabschnitten wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung (3×2.5 min) des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin (NMP) abgespalten. Zur Überprüfung des Abspaltvorgangs wurde durch UV-Absorption das gebildete Dibenzofulven-Piperidin-Addukt in NMP bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm detektiert. Die darauf folgenden sequentiellen Aminosäurekupplungen wurden jeweils mit einer Reaktionslösung aus 1 mmol des Fmoc-geschützten Aminosäurebausteins, 1 mmol HBTU, 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2 mmol *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) in *N,N'*-Dimethylformamid unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min) durchgeführt. Nach jedem Kupplungsschritt wurde 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 wurde nach jedem Syntheseschritt mit NMP gespült und nach Abschluss der Synthese mit Dichlormethan gewaschen.

Zentrifugation: In der thermisch regulierbaren HERAEUS Labofuge 400 R der Firma *Thermo Scientific*, Waltham, USA, wurden die Peptide nach der Fällung bei 4 °C und 4000 Umdrehungen pro Minute für 10 min zentrifugiert.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 241 bei den Wellenlängen $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 578$ nm in einer 10 cm langen Polarimeterzelle gemessen und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration, die in g/100 mL angegeben ist, sind jeweils bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

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

- Bruker WT-300: 300 MHz- ^1H -NMR und 75.5 MHz- ^{13}C -NMR
- Bruker AM-400: 400 MHz- ^1H -NMR, 100.6 MHz- ^{13}C -NMR und 376.4 MHz- ^{19}F -NMR

Die angegebenen Werte für die chemische Verschiebungen δ (in ppm) beziehen sich auf das Signal des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels als Standard.^[234] Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte, soweit angegeben, unter Verwendung von COSY-, HSQC- und HMBC-Experimenten. In der schriftlichen Interpretation der ^1H - und ^{13}C -Signale sind die Atome des D-Galactosamins ohne (), der D-Galactose mit einfacher (') und die der N-Acetylneuraminsäure durch zweifache Apostrophierung (") gekennzeichnet. Indizierte griechische Buchstaben markieren die Atome der Aminosäuren, während für die Signalmultiplizitäten, deren Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz) angegeben sind, folgende Abkürzungen verwendet werden:

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

In allen ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindungen mit perfluorierten Alkylketten sind sämtliche Kohlenstoffatome mit direkter Bindung zu Fluoratomen aufgrund von C-F-Kopplungen nicht detektierbar und in der Spektrenauswertung daher nicht aufgeführt.

Massenspektrometrie: Folgende Geräte wurden für die Aufnahme der Massenspektren verwendet:

- ESI-Massenspektren wurden an einem *Micromass* LCT-Spektrometer der Firma *Micromass*, Manchester, England gemessen;
- Hochaufgelöste HR-ESI-TOF-Spektren wurden mit einem *Micromass* Q-TOF Ultima Spektrometer aufgenommen;

- FD-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan* MAT-95-Spektrometer der Firma *ThermoElectron*, Boston, USA, gemessen;
- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem *Bruker* Time-of-flight-Spektrometer der Firma *Bruker*, Billerica, USA, gemessen, wobei 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dihb, 17 mg/mL in H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/mL in H₂O/Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA) als Matrices dienten.

Molekulare Massen in runden Klammern beziehen sich auf die natürliche Isotopenverteilung, Molmassen in eckigen Klammern hingegen auf die exakten Massen der Isotope ¹H, ¹³C, ¹⁴N, ¹⁶O, ¹⁹F, ³²S, ⁷⁹Br. Die Massen sind nach ihrer Intensität geordnet angegeben.

6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Peptidkupplungen der Membranankersysteme

a) *für die auf Glycerin basierenden Konjugate*: Mittels drei Vakuum-Wasserstoff-Zyklen wurde zuerst das Palladium auf Aktivkohle (10%) aktiviert, bevor eine Lösung der Azidkomponente (1.0 Äquiv.) und des Natriumacetats (7.0 Äquiv.) in einer 1:1 Mischung aus Methanol und Essigsäureethylester zugetropft wurde. Nach fünfstündigem Rühren unter einer Wasserstoffatmosphäre wurde das Palladium über *Hyflo Super Cel* abfiltriert, und der Filtrerrückstand wurde mit der doppelten Menge des Lösungsmittelgemisches nachgewaschen. Die Lösungsmittel der vereinigten Filtrate wurden schließlich bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wurde als Aminkomponente im nachfolgenden Reaktionsschritt ohne weitere Reinigung eingesetzt.

b) Zunächst wurde die Säurekomponente (1.1 Äquiv.) zusammen mit HCTU (1.2 Äquiv.) und Hydroxybenzotriazol (1.2 Äquiv.) in absol. Dichlormethan gelöst/suspendiert und daraufhin mit *N*-Methylmorpholin (2.2 Äquiv.) versetzt. Nach 1 h Rühren bei Raumtemp. wurde das entsprechende Amin (1.0 Äquiv.), jeweils gelöst in einem geeigneten Lösungsmittel, zugetropft. Die Reaktionslösung wurde anschließend 15 h bei 40 °C gerührt. Daraufhin wurde mit Dichlormethan verdünnt und im Anschluss zweimal mit einer 1 M Salzsäure-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat, Filtration und destillativem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde das Rohprodukt durch semipräparative RP-HPLC gereinigt.

AAV2: Cbz-Deblockierung

Das Palladium auf Aktivkohle (10%) wurde durch drei Vakuum-Wasserstoff-Zyklen aktiviert und anschließend mit dem in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten Cbz-geschützten Substrat (1.0 Äquiv.) versetzt. Unter einer Wasserstoffatmosphäre wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Mittels Filtration durch *Hyflo Super Cel* wurde das Palladium entfernt, und der Filtrerrückstand wurde mit dem jeweiligen Lösungsmittel gründlich nachgewaschen. Abschließend wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt, wobei sich das Produkt in hinreichender Reinheit isolieren ließ.

AAV3: Deblockierung der Acetylschutzgruppen

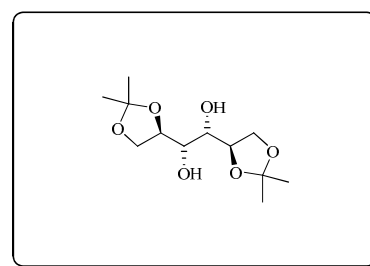
Die Acetyl-blockierte Komponente (1.0 Äquiv.) wurde in Methanol (HPLC-grade) gelöst und tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (2.5% in Methanol) versetzt bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht war. In den ersten vier Stunden der Reaktion wurde alle 60 min der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert. Nach 18stündigem Rühren bei Raumtemp. wurde mit Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte abschließend mittels semipräparativer RP-HPLC.

6.3 Synthese des Glycerolankersystems

1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden-D-mannitol (**2**)^[92]

In 600 mL über Phosphorpentoxid getrocknetes Aceton wurden 103 g (758 mmol, 1.84 Äquiv.) Zinkchlorid gelöst und mit 75.0 g (412 mmol, 1.0 Äquiv.) D-Mannitol **1** versetzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend 22 h bei Raumtemp.

gerührt, bevor sie in 400 mL ges. Kaliumcarbonat-Lösung gegossen und weitere 30 min gerührt wurde, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Hernach wurde das Gemisch dreimal mit je 300 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde aus einer Cyclohexan/Dichlormethan-Mischung (9:1) umkristallisiert, welche über Nacht zur Kristallisation bei 4 °C aufbewahrt wurde. So



konnten 81.05 g (309 mmol, 75%) 1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden-D-mannitol **2** als farbloser Feststoff isoliert werden.

$R_f = 0.54$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 8.6$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[235] $[\alpha]_D^{20} = 2.0$ ($c = 2.38$, CHCl_3).

$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (M = 262.30 g/mol) [262.14].

ESI-MS (positiv), m/z : 285.10 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, ber.: 285.13).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.22-4.09 (m, 4 H, H1a, H2, H5, H6a), 3.97 (dd, 2 H, $J_{\text{H1b}/\text{H6b}, \text{H1a}/\text{H6a}} = 8.4$ Hz, $J_{\text{H1b}/\text{H6b}, \text{H2}/\text{H5}} = 5.6$ Hz, H1b, H6b), 3.74 (pt, 2 H, $J_{\text{H3}/\text{H4}, \text{H2}/\text{H5}} = J_{\text{H3}/\text{H4}, 3\text{-OH}/4\text{-OH}} = 6.1$ Hz, H3, H4), 2.60 (d, 2 H, $J_{3\text{-OH}/4\text{-OH}, \text{H3}/\text{H4}} = 6.1$ Hz, 3-OH, 4-OH), 1.41 (s, 6 H, $2 \times >\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.35 (s, 6 H, $2 \times >\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

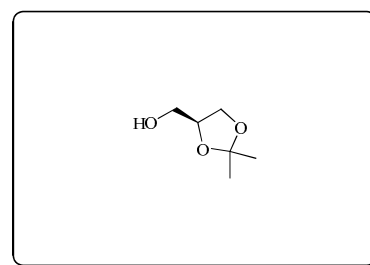
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 109.46 ($2 \times >\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 76.10 (C2, C5), 71.13 (C3, C4), 66.84 (C1, C6), 26.84 ($2 \times >\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.31 ($2 \times >\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

(*S*)-(+)-2,3-*O*-Isopropylidenglycerol (**3**)^[94]

In 500 mL Wasser wurden 66.3 g (310 mmol, 1.0 Äquiv.) Natriumperiodat gelöst und die Lösung wurde mit Lithiumhydroxid auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 81.0 g (310 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden-D-mannitol **2**, gelöst in 110 mL Methanol, getropft, wobei die Temperatur nicht über 35 °C stieg. Nach 2 h Rühren bei Raumtemp. wurde mit 500 mL Methanol verdünnt und mittels 5 M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH = 8 gestellt. Anschließend wurde die Reaktionslösung im Eisbad auf 10 °C abgekühlt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel, der abfiltriert wurde. Zum Filtrat wurden 10.56 g (279 mmol, 0.9 Äquiv.) Natriumborhydrid gegeben und es wurde erneut 2 h gerührt. Zunächst wurde die Reaktionsmischung mit 300 mL Cyclohexan ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit 80 g Natriumchlorid versetzt und dann zweimal mit je 400 mL Chloroform extrahiert. Im weiteren Verlauf wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Vakuumdestillation und lieferte 34.61 g (262 mmol, 42%) (*S*)-(+)-2,3-*O*-Isopropylidenglycerol **3** als farblose Flüssigkeit.

$R_f = 0.21$ (CH/EE, 2:1).

Siedepunkt: 99-102 °C bei $4 \cdot 10^{-2}$ mbar.



Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 13.9$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[94] $[\alpha]_D^{20} = 15.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$ (M = 132.16 g/mol) [132.08].

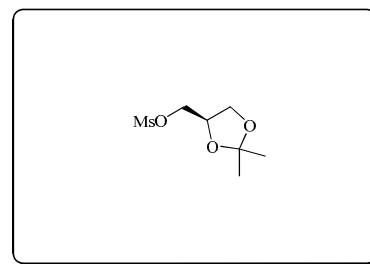
FD-MS (positiv), m/z : 133.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 133.1), 117.1 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, ber.: 117.1), 93.1 ($[\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_2+\text{H}]^+$, ber.: 93.1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.25-4.18 (m, 1 H, H2), 4.02 (dd, 1 H, $J_{\text{H3a,H3b}} = 8.2$ Hz, $J_{\text{H3a,H2}} = 6.6$ Hz, H3a), 3.77 (dd, 1 H, $J_{\text{H3b,H3a}} = 8.2$ Hz, $J_{\text{H3b,H2}} = 6.5$ Hz, H3b), 3.70 (dd, 1 H, $J_{\text{H1a,H1b}} = 11.7$ Hz, $J_{\text{H1a,H2}} = 3.8$ Hz, H1a), 3.57 (dd, 1 H, $J_{\text{H1b,H1a}} = 11.7$ Hz, $J_{\text{H1b,H2}} = 5.2$ Hz, H1b), 2.20 (s, 1 H, 1-OH), 1.42 (s, 3 H, $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.35 (s, 3 H, $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 109.43 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 76.27 (C2), 65.81 (C3), 63.03 (C1), 26.71 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.29 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

(R)-(-)-1-Mesyloxy-2,3-O-isopropylidenpropandiol (**4**)^[95]

Nachdem 8.88 mL (71.9 mmol, 1.0 Äquiv.) (S)-(+)-2,3-O-Isopropylidenglycerol **3** in 30 mL absol. Dichlormethan gelöst worden waren, wurden 12.0 mL (86.0 mmol, 1.2 Äquiv.) frisch destilliertes Triethylamin hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde im Eisbad gekühlt und tropfenweise mit 6.4 mL (83.0 mmol, 1.15 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid versetzt. Nach langsamem Erwärmen auf Raumtemp. wurde 14 h gerührt, bevor dreimal mit je 30 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt wurde. Die wässrigen Phasen wurden einmal mit 30 mL Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 30 mL Wasser gewaschen wurden. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück blieben 13.75 g (65.4 mmol, 91%) (R)-(-)-1-Mesyloxy-2,3-O-isopropylidenpropandiol **4** als orange-braunes Öl, welches ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.



$R_f = 0.45$ (CH/EE, 2:1).

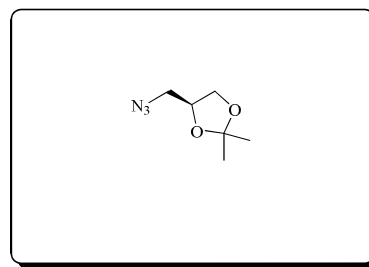
$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$ (M = 210.25 g/mol) [210.06].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.38-4.31 (m, 1 H, H2), 4.20-4.18 (m, 2 H, H1a/b), 4.07 (dd, 1 H, $J_{\text{H3a,H3b}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{H3a,H2}} = 6.5$ Hz, H3a), 3.79 (dd, 1 H, $J_{\text{H3b,H3a}} = 8.8$ Hz, $J_{\text{H3b,H2}} = 5.5$ Hz, H3b), 3.04 (s, 3 H, $-\text{OSO}_2\text{CH}_3$), 1.41 (s, 3 H, $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.33 (s, 3 H, $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 110.05 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 73.28 (C2), 69.33 (C1), 65.83 (C3), 37.68 ($-\text{OSO}_2\text{CH}_3$), 26.73 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.23 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

(S)-(-)-1-Azido-1-deoxy-2,3-O-isopropylidenglycerol (5)^[95]

Zunächst wurden 13.0 g (61.8 mmol, 1.0 Äquiv.) (R)-(-)-1-Mesyloxy-2,3-O-isopropylidenpropandiol **4** in 17 mL *N,N'*-Dimethylformamid und 4.82 g (74.2 mmol, 1.2 Äquiv.) Natriumazid in 15 mL Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und 15 h auf 110 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen



wurden 30 mL ges. Natriumchlorid-Lösung zugegeben und die resultierende Mischung wurde fünfmal mit je 40 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 50 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1) gereinigt. Dabei konnten 7.65 g (48.7 mmol, 79%) (S)-(-)-1-Azido-1-deoxy-2,3-O-isopropylidenglycerol **5** als gelbes Öl isoliert werden.

$R_f = 0.75$ (CH/EE, 2:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -53.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[236] $[\alpha]_D^{20} = -40.54$ ($c = 44.9$, CHCl_3).

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$ (M = 157.17 g/mol) [157.09].

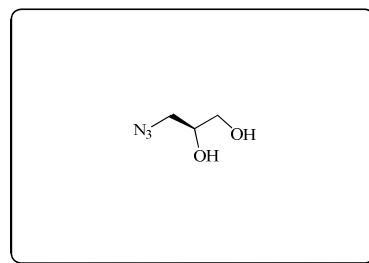
FD-MS (positiv), m/z : 142.3 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, ber.: 142.1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.29-4.22 (m, 1 H, H2), 4.04 (dd, 1 H, $J_{\text{H3a,H3b}} = 8.4$ Hz, $J_{\text{H3a,H2}} = 6.4$ Hz, H3a), 3.76 (dd, 1 H, $J_{\text{H3b,H3a}} = 8.4$ Hz, $J_{\text{H3b,H2}} = 5.9$ Hz, H3b), 3.38 (dd, 1 H, $J_{\text{H1a,H1b}} = 12.8$ Hz, $J_{\text{H1a,H2}} = 4.7$ Hz, H1a), 3.28 (dd, 1 H, $J_{\text{H1b,H1a}} = 12.8$ Hz, $J_{\text{H1b,H2}} = 5.5$ Hz, H1b), 1.45 (s, 3 H, $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.35 (s, 3 H, $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 110.28 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 74.67 (C2), 66.68 (C3), 52.92 (C1), 26.71 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.33 ($>\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

(S)-(-)-3-Azido-1,2-propandiol (8)

Eine Lösung aus 7.5 g (47.7 mmol, 1.0 Äquiv.) (S)-(-)-1-Azido-1-deoxy-2,3-O-isopropylidenglycerol **5** und 11.99 g (47.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Pyridinium-*p*-toluolsulfonsäure in 200 mL Methanol wurde 4 d refluxiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotations-



verdampfer entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 19:1) gereinigt. So konnten 5.25 g (44.8 mmol, 94%) (S)-(-)-3-Azido-1,2-propandiol **8** als gelbes Öl gewonnen werden.

$R_f = 0.25$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 19:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -11.8$ ($c = 1.00$, MeOH), Lit.:^[237] $[\alpha]_D^{23} = -7.4$ ($c = 1.01$, MeOH).

$\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2$ (M = 117.11 g/mol) [117.05].

FD-MS (positiv), m/z : 117.2 ($[\text{M}]^+$, ber.: 117.1).

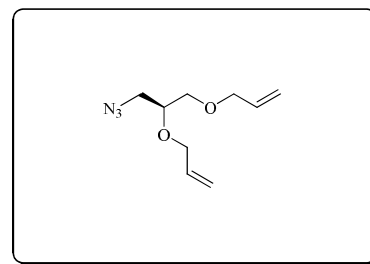
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.91-3.84 (m, 1 H, H2), 3.69 (dd, 1 H, $J_{\text{H1a,H1b}} = 11.5$ Hz, $J_{\text{H1a,H2}} = 3.4$ Hz, H1a), 3.65 (bs, 2 H, $2 \times -\text{OH}$) 3.58 (dd, 1 H, $J_{\text{H3b,H3a}} = 11.5$ Hz, $J_{\text{H3b,H2}} = 6.4$ Hz, H1b), 3.39-3.36 (m, 2 H, H3a/b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 71.13 (C2), 64.03 (C1), 53.44 (C3).

Weitere analytische Daten finden sich in der Literatur.^[238]

1-Azido-2,3-bis(allyloxy)propan (16)

Zunächst wurden 5.12 g (128 mmol, 3.0 Äquiv.) 60%iges Natriumhydrid zweimal mit je 10 mL Cyclohexan im Stickstoffgegenstrom gewaschen und in 80 mL absol. N,N' -Dimethylformamid suspendiert. Diese Suspension wurde im Eisbad gekühlt und tropfenweise mit 5.00 g (42.7 mmol, 1.0 Äquiv.) (*S*)-(-)-3-Azido-1,2-propandiol **8**, gelöst in 15 mL absol. N,N' -Dimethylformamid, versetzt. Nach 60minütigem Rühren bei Raumtemp. wurde erneut im Eisbad gekühlt. Zuerst erfolgte die Zugabe einer Spatelspitze Tetrabutylammoniumbromid und anschließend wurden 11.1 mL (128 mmol, 3.0 Äquiv.) Allylbromid zugetropft. Unter langsamen Erwärmen auf Raumtemp. wurde die Lösung 15 h gerührt. Nun wurden zum Vernichten überschüssigen Natriumhydrids 15 mL Ethanol zugegeben und die Reaktionslösung wurde mit 100 mL Diethylether verdünnt. Es wurde mit 100 mL halbges. Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen, wobei die anfallende wässrige Phase noch einmal mit 50 mL Diethylether extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 75 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erfolgte die Reinigung des Rohprodukts mittels Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: CH/EE, 9:1). So konnten 7.74 g (39.3 mmol, 92%) 1-Azido-2,3-bis(allyloxy)propan **16** als gelbes Öl gewonnen werden.



$R_f = 0.47$ (CH/EE, 9:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 11.25$ ($c = 1.00$, MeOH).

$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ (M = 197.23 g/mol) [197.12].

FD-MS (positiv), m/z : 198.3 ($[M+H]^+$, ber.: 198.1).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 5.99-5.82 (m, 2 H, $2 \times -OCH_2CH=CH_2$), 5.31 (pddd, 1 H, $J_{vic} = 9.9$ Hz, $J_{gem} = 3.1$ Hz, $J_{allyl} = 1.4$ Hz, $-OCH_2CH=CH_2$ (trans)), 5.26 (pddd, 1 H, $J_{vic} = 9.9$ Hz, $J_{gem} = 3.3$ Hz, $J_{allyl} = 1.6$ Hz, $-OCH_2CH=CH_2$ (trans)), 5.22-5.20 (m, 1 H, $-OCH_2CH=CH_2$ (cis)), 5.19-5.17 (m, 1 H, $-OCH_2CH=CH_2$ (cis)), 4.20-4.01 (m, 2 H, $-OCH_2CH=CH_2$), 4.01-3.99 (m, 2 H, $-OCH_2CH=CH_2$), 3.70-3.64 (m, 1 H, $-CHCH_2N_3$), 3.56-3.46 (m, 2 H, $-CHCH_2O-$), 3.38-3.36 (m, 2 H, $-CHCH_2N_3$).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 134.53, 134.40 ($2 \times -OCH_2CH=CH_2$), 117.30, 117.20 ($2 \times -OCH_2CH=CH_2$), 77.01 ($-CHCH_2N_3$), 72.35, 71.28 ($2 \times -OCH_2CH=CH_2$), 69.43 ($-CHCH_2O-$), 51.95 ($-CHCH_2N_3$).

1-Azido-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluor-2-iodnonoxy)propan (19)

(N_3 -GlycF₂₆)

Zu einer Lösung aus 1.00 g (5.07 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Azido-2,3-bis(allyloxy)propan **16** in 50 mL Hexan wurden unter Lichtausschluss 4.5 mL (20.7 mmol, 4.1 Äquiv.) 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6-Tridecafluor-6-iodhexan gegeben. Die Reaktionslösung wurde im Eisbad gekühlt und mit 1.0 mL (1.01 mmol, 0.2 Äquiv.) Triethylboran (1 M in Hexan) tropfenweise versetzt. Nach 15minütigem Rühren bei offenem Kolben wurde dieser geschlossen und es wurden weitere 6 h gerührt. Lösungsmittel und Reagenzien wurden anschließend am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL Diethylether aufgenommen und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen. Anschließend wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck abgetrennt. Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: Toluol) lieferte 4.80 g (4.41 mmol, 87%) aller möglicher Diastereomere von N_3 -GlycF₂₆ **19** als gelbes Öl.

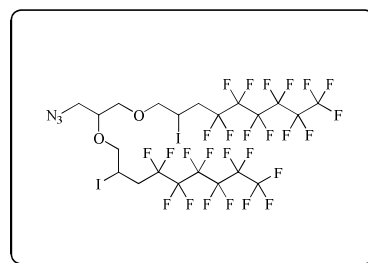
$R_f = 0.84$ (Toluol).

$C_{21}H_{15}F_{26}I_2N_3O_2$ (M = 1089.13 g/mol) [1088.88].

ESI-MS (positiv), m/z : 1111.89 ($[M+Na]^+$, ber.: 1111.87).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1111.8761 ($[M+Na]^+$, ber.: 1111.8736).

1H -NMR (300 MHz, $(CD_3)_2O$), δ (ppm): 4.55-4.45 (m, 4 H, $2 \times -OCH_2CHICH_2-$), 4.13 (tdd, 1 H, $J_{H2,H3a} = 10.7$ Hz, $J_{H2,H1} = 4.8$ Hz, $J_{H2,H3b} = 1.5$ Hz, $-CHCH_2N_3$), 4.07-3.99 (m, 2 H,



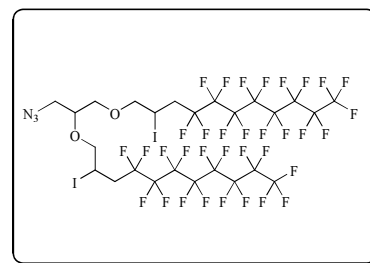
-OCH₂CHICH₂-), 3.95-3.87 (m, 5 H, -OCH₂CHICH₂-, -CHCH₂N₃), 3.86-3.78 (m, 2 H, -OCH₂CHICH₂-), 3.77-3.72 (m, 4 H, -CHCH₂O), 3.62-3.53 (m, 2 H, -CHCH₂N₃), 3.49-3.43 (dd, 2 H, J_{H1a/H1b} = 13.1 Hz, J_{H1a/b,H2} = 6.4 Hz, -CHCH₂N₃), 3.40-3.11 (m, 4 H, -OCH₂CHICH₂-), 2.94-2.74 (m, 4 H, -OCH₂CHICH₂-).

¹³C-NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂O), δ (ppm): 79.34, 79.32, 79.13, 79.10 (-OCH₂CHICH₂-), 77.03 (-CHCH₂O-), 76.21, 76.12, 76.09 (-OCH₂CHICH₂-), 71.48, 71.27 (-CHCH₂O-), 52.72, 52.60 (-CHCH₂N₃), 38.17-37.38 (m, -OCH₂CHICH₂-), 15.31-15.19 (m, -OCH₂CHICH₂-).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, (CD₃)₂O), δ (ppm): -82.0 (t, 6 F, J_{F,F} = 10.0 Hz, 2× -CF₃), -114.31-114.84 (m, 4 F), -122.72 (bs, 4 F), -123.80 (bs, 4 F), -124.50-124.62 (m, 4 F), -127.12-127.20 (m, 4 F).

1-Azido-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluor-2-iodoundecyloxy)propan (**18**)

(N₃-GlycF₃₄)



In 100 mL Hexan wurden 2.00 g (10.14 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Azido-2,3-bis(allyloxy)propan **16** gelöst und unter Lichtausschluss mit 11.0 mL (41.7 mmol, 4.1 Äquiv.) 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-Heptafluor-8-iodhexan versetzt. Die Reaktionslösung wurde im Eisbad gekühlt und mit 2.0 mL (2.03 mmol, 0.2 Äquiv.) Triethylboran (1 M in Hexan) tropfenweise versetzt. Nach 15minütigem Rühren bei offenem Kolben wurde dieser geschlossen und es wurden weitere 3 h gerührt. Lösungsmittel und Reagenzien wurden am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 150 mL Diethylether aufgenommen und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen. Anschließend wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: Toluol) lieferte 10.71 g (8.31 mmol, 82%) aller möglicher Diastereomere von N₃-GlycF₃₄ **18** als gelbes Wachs.

R_f = 0.92 (Toluol).

C₂₅H₁₅F₃₄I₂N₃O₂ (M = 1289.16 g/mol) [1288.87].

ESI-MS (positiv), m/z: 1311.92 ([M+Na]⁺, ber.: 1311.86).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1311.8584 ([M+Na]⁺, ber.: 1311.8609).

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂O, COSY), δ (ppm): 4.56-4.46 (m, 4 H, 2× -OCH₂CHICH₂-), 4.12 (dd, 1 H, J_{H2,H1a/H3a} = 10.7 Hz, J_{H2,H1b/H3b} = 4.8 Hz, -CHCH₂N₃), 4.06-4.01 (m, 2 H, -OCH₂CHICH₂-), 3.94-3.86 (m, 5 H, -OCH₂CHICH₂-, -CHCH₂N₃), 3.85-3.78 (m, 2 H, -OCH₂CHICH₂-), 3.77-3.70

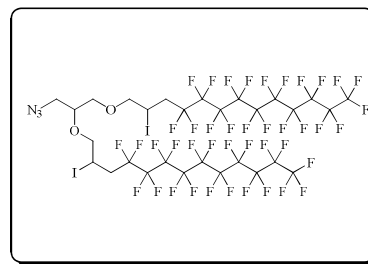
(m, 4 H, $-\text{CHCH}_2\text{O}$), 3.61-3.53 (m, 2 H, $-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 3.49-3.43 (m, 2 H, $-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 3.26-3.14 (m, 4 H, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 2.94-2.76 (m, 4 H, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, HSQC), δ (ppm): 79.38, 79.35, 79.20, 79.17 ($-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 77.07, 77.04 ($-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 76.23, 76.20, 76.15, 76.11 ($-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 71.57, 71.53, 71.34, 71.32 ($-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 52.70, 52.59 ($-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 38.11-37.47 (m, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 15.33-15.20 (m, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): -82.15 (t, 6 F, $J_{\text{F,F}} = 9.9$ Hz, $2\times -\text{CF}_3$), -114.36-114.84 (m, 4 F), -122.53 (bs, 4 F), -122.86 (bs, 8 F), -123.71 (bs, 4 F), -124.55 (bs, 4 F), -127.20 (m, 4 F, $2\times -\text{CF}_2\text{CF}_3$).

1-Azido-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,13,13,13-henicosafuor-2-iodtridecyloxy)propan (20)

(N_3 -GlycF₄₂)



Zu einer Lösung aus 1.00 g (5.07 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Azido-2,3-bis(allyloxy)propan **16** in 50 mL Hexan wurden unter Lichtausschluss 9.83 mL (15.2 mmol, 3.0 Äquiv.) 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10-henicosafuor-10-ioddecan gegeben. Die Reaktionslösung wurde im Eisbad gekühlt und mit 1.0 mL (1.01 mmol, 0.2 Äquiv.) Triethylboran (1 M in Hexan) tropfenweise versetzt. Nach 15minütigem Rühren bei offenem Kolben wurde dieser geschlossen und es wurden weitere 5 h gerührt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde aus Methanol umkristallisiert. So konnten 5.21 g (3.50 mmol, 69%) aller möglicher Diastereomere von N_3 -GlycF₄₂ **20** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert werden.

$R_f = 0.67$ (Toluol).

$\text{C}_{29}\text{H}_{15}\text{F}_{42}\text{I}_2\text{N}_3\text{O}_2$ (M = 1489.19 g/mol) [1488.86].

ESI-MS (positiv), m/z : 1464.00 ($[\text{M}-\text{N}_2+3\text{H}]^+$, ber.: 1463.88).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): 4.55-4.46 (m, 4 H, $2\times -\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 4.12 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_{1a}/\text{H}_{3a}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_{1b}/\text{H}_{3b}} = 4.5$ Hz, $-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 4.02 (t, 2 H, $^3J = 6.3$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 3.96-3.87 (m, 5 H, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$, $-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 3.85-3.80 (m, 2 H, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 3.78-3.73 (m, 4 H, $-\text{CHCH}_2\text{O}$), 3.62-3.53 (m, 2 H, $-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 3.50-3.43 (m, 2 H, $-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 3.40-3.13 (m, 4 H, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 2.97-2.84 (m, 4 H, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): 79.40, 79.35, 79.26, 79.22 ($-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 77.09, 77.06 ($-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 76.22, 76.17 ($-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 71.65, 71.58, 71.41, 71.36 ($-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 52.68, 52.58 ($-\text{CHCH}_2\text{N}_3$), 38.18-37.42 (m, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$), 15.37-15.07 (m, $-\text{OCH}_2\text{CHICH}_2-$).

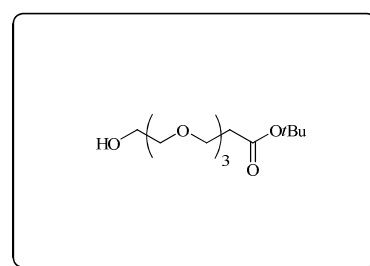
$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): -82.10 (t, 6 F, $J_{\text{F,F}} = 11.0$ Hz, $2\times -\text{CF}_3$), -114.38-114.79 (m, 4 F), -122.59 (bs, 10 F), -122.70 (bs, 10 F), -123.64 (bs, 4 F), -124.53 (bs, 4 F), -127.14 (bs, 4 F, $2\times -\text{CF}_2\text{CF}_3$).

6.4 Synthese der Triethylenglycolspacer

12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**23**)

(HO-OEG-COO*t*Bu)^[128]

In 100 mL absol. Tetrahydrofuran wurden nach Zugabe von 25.6 mL (192 mmol, 2.93 Äquiv.) wasserfreiem Triethylenglycol **22** 40 mg (1.74 mmol, 0.03 Äquiv.) Natrium gelöst. Anschließend wurden 9.6 mL (65.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Acrylsäure-*tert*-butylester zugetropft und die Reaktionslösung wurde unter einer Argonatmosphäre 2 d gerührt. Mittels 1 M Salzsäure wurde ein pH-Wert von 6 eingestellt und das Tetrahydrofuran am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 200 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit jeweils 100 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnten 14.68 g (52.4 mmol, 80%) HO-OEG-COO*t*Bu **23** als klares, farbloses Öl gewonnen werden.



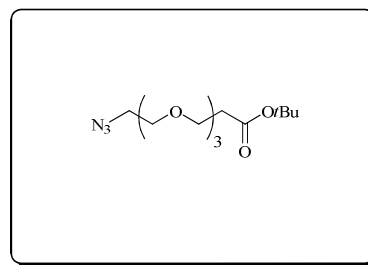
$R_f = 0.34$ (EE).

$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_6$ (M = 278.34 g/mol) [278.17].

ESI-MS (positiv), m/z : 245.09 ($[\text{M}-i\text{Buten}+\text{Na}]^+$, ber.: 245.10), 301.17 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 301.16), 317.15 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 317.13).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.74-3.58 (m, 14 H, $7\times -\text{OCH}_2-$), 2.50 (t, 2 H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 6.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{COO}-$), 2.48 (bs, 1 H, $-\text{OH}$), 1.43 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 171.00 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Ester}}$), 80.60 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 72.60 (10- CH_2), 70.66, 70.53, 70.39 (5- CH_2 , 6- CH_2 , 8- CH_2 , 9- CH_2), 66.94 (3- CH_2), 61.74 (11- CH_2), 36.25 (2- CH_2), 28.13 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (24)**(N₃-OEG-COO*t*Bu)^[186]**

Eine Lösung von 20.0 g (71.9 mmol, 1.0 Äquiv.) HO-OEG-COO*t*Bu **23** in 80 mL absol. Dichlormethan wurde in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 12.0 mL (86.0 mmol, 1.2 Äquiv.) frisch destilliertem Triethylamin versetzt. Nach langsamem Zutropfen von 6.4 mL (83.0 mmol, 1.15 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid wurde die Reaktionsmischung 15 h bei Raumtemp. gerührt. Ausgefallenes Aminhydrochlorid wurde abfiltriert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 30 mL Wasser und mit 30 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat, Filtration und Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurden 24.1 g MsO-OEG-COO*t*Bu als oranges Öl isoliert, welches ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt wurde.

Bezogen auf die 24.1 g des in 35 mL *N,N'*-Dimethylformamid gelösten MsO-OEG-COO*t*Bu wurden 5.27 g (81.1 mmol, 1.2 Äquiv.) Natriumazid in 30 mL Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden zu einem zweiphasigen Gemisch vereinigt und 15 h auf 110 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung versetzt und die Reaktionsmischung wurde dreimal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: CH/EE, 3:1) wurden 14.05 g (46.3 mmol, 65%) N₃-OEG-COO*t*Bu **24** als klares, gelbes Öl isoliert.

$R_f = 0.23$ (CH/EE, 3:1).

C₁₃H₂₅N₃O₅ (M = 303.35 g/mol) [303.18].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 326.18 ([M+Na]⁺, ber.: 326.17), 270.11 ([M-*i*Buten+Na]⁺, ber.: 270.11), 342.17 ([M+K]⁺, ber.: 342.14).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.71-3.56 (m, 12 H, 6× -OCH₂-), 3.36 (t, 2 H, J_{H12,H11} = 5.1 Hz, -CH₂N₃), 2.47 (t, 2 H, J_{H2,H3} = 6.6 Hz, -CH₂COO-), 1.42 (s, 9 H, -C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.96 (C=O), 80.54 (-C(CH₃)₃), 70.77, 70.72, 70.67, 70.44, 70.10 (5-CH₂, 6-CH₂, 8-CH₂, 9-CH₂, 10-CH₂), 66.96 (3-CH₂), 50.74 (11-CH₂), 36.34 (2-CH₂), 28.15 (-C(CH₃)₃).

12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (25)**(H₂N-OEG-COO*t*Bu)^[41]**

Eine Suspension von 5.1 g einer Ni-Al-Legierung in 150 mL Wasser wurde bis zum Abklingen der Gasentwicklung mit festem Natriumhydroxid versetzt. Nach 10minütigem Stehen bei Raumtemperatur wurde diese Suspension 30 min auf 70 °C erhitzt. Man dekantierte die überstehende Lösung vom gebildeten Raney-Nickel ab und wusch mit Wasser neutral, bevor noch dreimal mit Isopropanol gewaschen wurde. Zum Katalysator wurden 8.02 g (26.4 mmol, 1.0 Äquiv.) N₃-OEG-COO*t*Bu **24**, gelöst in 100 mL Isopropanol, gegeben. Die Reaktionsmischung wurde fünfmal evakuiert und mit Argon geflutet, und schließlich 23 h unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemp. gerührt. Nach Abtrennen des Raney-Nickels über *Hyflo Super Cel* wurde das Filtrat bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und es konnten 7.12 g (25.9 mmol, 98%) H₂N-OEG-COO*t*Bu **25** als klares, gelbes Öl erhalten werden, wobei auf eine weitere Reinigung verzichtet wurde.

 $R_f = 0.17$ (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1).

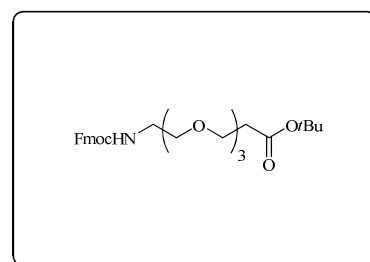
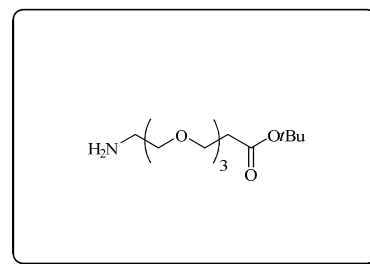
 C₁₃H₂₇NO₅ (M = 277.36 g/mol) [277.19].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 538.37 ([2M-*i*Buten+H+K]⁺, ber.: 538.29), 278.20 ([M+H]⁺, ber.: 278.20), 222.13 ([M-*i*Buten+H]⁺, ber.: 222.13).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.70 (t, 2 H, J_{H3,H2} = 6.6 Hz, -CH₂CH₂COO-), 3.67-3.58 (m, 8 H, 2× -OCH₂CH₂O-), 3.50 (t, 2 H, J_{H11,H12} = 5.2 Hz, -CH₂CH₂NH₂), 2.85 (t, 2 H, J_{H12,H11} = 5.2 Hz, -CH₂NH₂), 2.49 (t, 2 H, J_{H2,H3} = 6.6 Hz, -CH₂COO-), 1.48 (bs, 2 H, -NH₂), 1.43 (s, 9 H, -C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.97 (C=O), 80.57 (-C(CH₃)₃), 73.55 (10-CH₂), 70.65, 70.59, 70.46, 70.37 (5-CH₂, 6-CH₂, 8-CH₂, 9-CH₂), 66.97 (3-CH₂), 41.87 (11-CH₂), 36.33 (2-CH₂), 28.15 (-C(CH₃)₃).
N*-(9*H*-Fluoren-9yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (26)*(FmocHN-OEG-COO*t*Bu)^[186]**

Zu einer Lösung aus 7.0 g (25.2 mmol, 1.0 Äquiv.) H₂N-OEG-COO*t*Bu **25** in 150 mL einer 1:1 Mischung aus Wasser und Aceton wurden 2.12 g (25.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Danach wurden 8.51 g (25.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-OSu zugegeben und die Reaktionslösung wurde



20 h bei Raumtemp. gerührt. Durch Zugabe von 2 M Salzsäure-Lösung wurde die Reaktionsmischung auf einen pH-Wert von 5 angesäuert, bevor das Aceton i. Vak. Entfernt wurde. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit 150 mL 1 M Salzsäure-Lösung und 200 mL Wasser gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde schließlich am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Abschließende Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1 → 0:1) lieferte 10.99 g (21.9 mmol, 87%) FmocHN-OEG-COO*t*Bu **26** als gelbliches Öl.

$R_f = 0.17$ (CH/EE, 1:1).

$C_{28}H_{37}NO_7$ (M = 499.60 g/mol) [499.26].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 522.25 ([M+Na]⁺, ber.: 522.25), 222.14 ([M-Fmoc-*i*Buten+H]⁺, ber.: 222.13), 538.25 ([M+K]⁺, ber.: 538.22), 278.21 ([M-Fmoc+H]⁺, ber.: 278.20), 466.22 ([M-*i*Buten+Na]⁺, ber.: 466.18).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.39 (pt, 2 H, $J_{H3,H2} = J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = J_{H6,H7} = 7.4$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.33-7.28 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 5.42 (bs, 1 H, -NH_{Carbamat}), 4.40 (d, 2 H, $J_{CH_2,H9} = 6.8$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1 H, $J_{H9,CH_2} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), 3.79-3.51 (m, 12 H, 6× -OCH₂-), 3.46-3.33 (m, 2 H, 12-CH₂), 2.48 (t, 2 H, $J_{H2,H3} = 6.5$ Hz, -CH₂COO-), 1.43 (s, 9 H, -C(CH₃)₃).

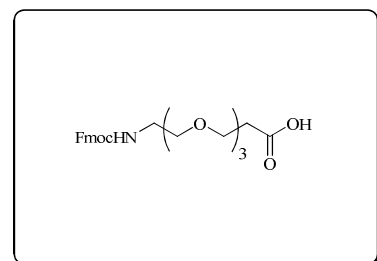
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.90 (C=O_{Ester}), 156.60 (C=O_{Carbamat}), 144.09 (C1a, C8a-Fmoc), 143.37 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.71 (C3-, C6-Fmoc), 127.09 (C2-, C7-Fmoc), 125.15 (C1-, C8-Fmoc), 120.00 (C4-, C5-Fmoc), 80.57 (-C(CH₃)₃), 70.62, 70.56, 70.44, 70.42, 70.11 (5-CH₂, 6-CH₂, 8-CH₂, 9-CH₂, 11-CH₂), 66.96 (3-CH₂), 66.62 (CH₂-Fmoc), 47.34 (C9-Fmoc), 41.00 (FmocHNCH₂), 36.28 (2-CH₂), 28.15 (-C(CH₃)₃).

***N*-(9*H*-Fluoren-9yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure (27)**

(FmocHN-OEG-COOH)^[45]

In 30 mL Trifluoressigsäure, zu welcher 3 mL Wasser gegeben worden waren, wurden 8.00 g (16.01 mmol, 1.0 Äquiv.)

FmocHN-OEG-COO*t*Bu **26** gelöst. Diese Reaktionslösung wurde 15 h bei Raumtemp. gerührt, bevor sie mit 30 mL Toluol verdünnt wurde und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt wurden. Um Reste von Trifluoressigsäure zu entfernen erfolgte noch zweimaliges



Destillieren mit Toluol. Die Reinigung mittels Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 40:1:0.5) lieferte nach erneuter zweimaliger azeotroper Destillation mit Toluol 6.72 g (15.21 mmol, 95%) FmocHN-OEG-COOH **27** als gelbliches, hochviskoses Öl.

$R_f = 0.14$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1).

C₂₄H₂₉NO₇ (M = 443.49 g/mol) [443.14].

ESI-MS (positiv), m/z : 466.12 ([M+Na]⁺, ber.: 466.18).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2 H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.59 (pt, 2 H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 8.2 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.40 (pt, 2 H, J_{H3,H2} = J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = J_{H6,H7} = 7.3 Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.31 (pt, 2 H, J_{H2,H3} = J_{H2,H1} = J_{H7,H6} = J_{H7,H8} = 7.4 Hz, H2-, H7-Fmoc), 5.51 (bs, 1 H, -NH_{Carbamat}), 4.46-4.40 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.27-4.20 (m, 1 H, H9-Fmoc), 3.74 (t, 2 H, J_{H11,H12} = 5.9 Hz, 11-CH₂), 3.63-3.56 (m, 10 H, 5× -OCH₂-), 3.43-3.39 (m, 2 H, 12-CH₂), 2.60 (t, 2 H, J_{H2,H3} = 5.8 Hz, -CH₂COO-).

Das Proton der Säure tritt aufgrund von Austauschprozessen im Spektrum nicht auf.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 172.68 (C=O_{Säure}), 156.20 (C=O_{Carbamat}), 143.95 (C1a, C8a-Fmoc), 140.77 (C4a-, C5a-Fmoc), 128.93, 128.23 (C3-, C6-Fmoc), 127.63, 127.08 (C2-, C7-Fmoc), 125.34, 125.20 (C1-, C8-Fmoc), 120.13 (C4-, C5-Fmoc), 69.76, 69.73, 69.65, 69.59 (5-CH₂, 6-CH₂, 8-CH₂, 9-CH₂), 69.12 (11-CH₂), 66.27 (3-CH₂), 65.36 (CH₂-Fmoc), 46.76 (C9-Fmoc), 41.19 (12-CH₂), 34.76 (2-CH₂).

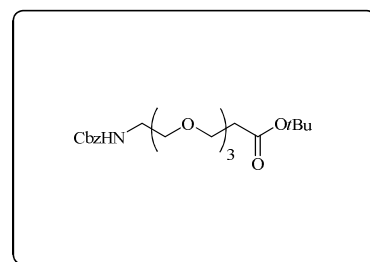
N-Benzoyloxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**28**)

(CbzHN-OEG-COO*t*Bu)

Eine Lösung von 2.0 g (7.21 mmol, 1.0 Äquiv.) H₂N-OEG-COO*t*Bu **25** in 40 mL Tetrahydrofuran wurde zunächst mit

1.55 mL (10.82 mmol, 1.5 Äquiv.) Chlorameisensäurebenzylester und daraufhin mit 10 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Nach 2stündigem Rühren bei Raumtemp. wurde Wasser hinzugegeben und dreimal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL Wasser und 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer destillativ entfernt. Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 1:1 → 0:1) lieferte 2.70 g (6.56 mmol, 91%) CbzHN-OEG-COO*t*Bu **28** als farbloses Öl.

$R_f = 0.28$ (CH/EE, 1:1).



$C_{21}H_{33}NO_7$ (M = 411.49 g/mol) [411.23].

ESI-MS (positiv), m/z : 434.20 ($[M+Na]^+$, ber.: 434.22), 378.15 ($[M-i\text{Buten}+H]^+$, ber.: 378.15), 450.21 ($[M+K]^+$, ber.: 450.19), 789.42 ($[M+M-i\text{Buten}+H]^+$, ber.: 789.38).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 434.2161 ($[M+Na]^+$, ber.: 434.2155).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 5.9 min, λ = 212 nm).

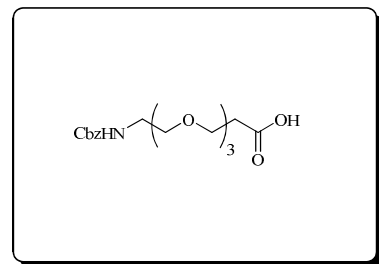
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.39-7.27 (m, 5 H, **H**_{Ar}), 5.46 (bs, 1 H, -NH_{Carbamat}), 5.08 (s, 2 H, **CH**₂-Ar), 3.66 (t, 2 H, J_{H_3,H_2} = 6.5 Hz, 3-**CH**₂), 3.59 (s, 8 H, 4× -O**CH**₂-), 3.54 (t, 2 H, $J_{H_{11},H_{12}}$ = 5.1 Hz, 11-**CH**₂), 3.39-3.34 (m, 2 H, 12-**CH**₂), 2.46 (t, 2 H, J_{H_2,H_3} = 6.5 Hz, 2-**CH**₂), 1.42 (s, 9 H, -C(**CH**₃)₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.01 (C=O_{Ester}), 156.09 (C=O_{Carbamat}), 136.70 (CH₂-C_{Ar}), 128.54, 128.11 (5× C_{Ar}), 80.60 (-C(**CH**₃)₃), 70.56, 70.40, 70.35, 70.10 (5-**CH**₂, 6-**CH**₂, 8-**CH**₂, 9-**CH**₂, 11-**CH**₂), 66.94 (3-**CH**₂), 66.68 (CH₂-Ar), 40.95 (12-**CH**₂), 36.27 (2-**CH**₂), 28.14 (-C(**CH**₃)₃).

N-Benzoyloxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure

(29)

(CbzHN-OEG-COOH)



In 20 mL Trifluoressigsäure, zu welcher 2 mL Wasser gegeben worden waren, wurden 2.10 g (5.10 mmol, 1.0 Äquiv.)

CbzHN-OEG-COOtBu **28** gelöst. Diese Reaktionslösung wurde 15 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor mit 30 mL Toluol verdünnt wurde und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt wurden. Um Reste von Trifluoressigsäure zu entfernen, wurde noch zweimal mit Toluol destilliert. Die Reinigung mittels Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1) lieferte nach erneuter zweimaliger azeotroper Destillation mit Toluol 1.28 g (3.62 mmol, 71%) CbzHN-OEG-COOH **29** als braunes, hochviskoses Öl.

R_f = 0.39 (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1).

$C_{17}H_{25}NO_7$ (M = 355.38 g/mol) [355.16].

ESI-MS (positiv), m/z : 749.28 ($[2M+K]^+$, ber.: 749.29), 378.10 ($[M+Na]^+$, ber.: 378.15), 394.13 ($[M+K]^+$, ber.: 394.13).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 378.1535 ($[M+Na]^+$, ber.: 378.1529).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 3.9 min, λ = 212 nm).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.38 (bs, 1 H, $-\text{COOH}$), 7.40-7.28 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.49 (bs, 1 H, $-\text{NH}_{\text{Carbamat}}$), 5.09 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3.71 (t, 2 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 6.2$ Hz, 3- CH_2), 3.61 (s, 8 H, $4 \times -\text{OCH}_2-$), 3.56 (t, 2 H, $J_{\text{H}_{11},\text{H}_{12}} = 5.2$ Hz, 11- CH_2), 3.40-3.35 (m, 2 H, 12- CH_2), 2.58 (t, 2 H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 6.1$ Hz, 2- CH_2).

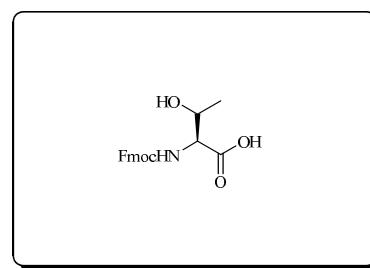
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 175.77 (COOH), 156.78 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Carbamat}}$), 136.63 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$), 128.58, 128.22, 128.19 ($5 \times \text{C}_{\text{Ar}}$), 70.56, 70.45, 70.39, 70.31, 70.19 (5- CH_2 , 6- CH_2 , 8- CH_2 , 9- CH_2 , 11- CH_2), 66.83 (3- CH_2), 66.46 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 40.95 (12- CH_2), 34.83 (2- CH_2).

6.5 Synthese des Galactosamin-Threonin-Konjugats

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin (**31**)

(Fmoc-Thr-OH)^[130]

In 1 L eines 1:1-Gemisches aus Aceton und Wasser wurden 20.29 g (170 mmol, 1.0 Äquiv.) L-Threonin **30** und 14.31 g (170 mmol, 1.0 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat gelöst und portionsweise unter Rühren mit 57.5 g (170 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) versetzt. Nach 15 h Rühren bei Raumtemp. wurde die nun klare Reaktionslösung mit konz. Salzsäure auf pH = 2 angesäuert und das Aceton i. Vak. abdestilliert. Die verbliebende Lösung wurde viermal mit jeweils 200 mL Dichlormethan extrahiert, woraufhin die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 200 mL 1 M Salzsäure-Lösung, mit 200 mL Wasser und mit 200 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurden. Nach dem Trocknen mit Magnesiumsulfat und Filtration wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und anschließend zweimal mit Dichlormethan kodestilliert, so dass 56.87 g (166.6 mmol, 98%) Fmoc-Thr-OH **31** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten wurden.



$R_f = 0.12$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$, 19:1:0.1).

$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (M = 341.36 g/mol) [341.13].

ESI-MS (positiv), m/z : 364.11 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 364.12).

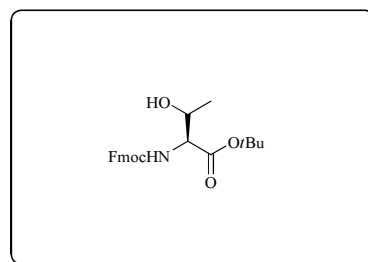
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.72 (d, 2 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.64-7.52 (m, 2 H, H1-, H8-Fmoc), 7.37-7.19 (m, 4 H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.24 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{Tx}} = 9.1$ Hz, $-\text{NH}_{\text{Carbamat}}$), 4.48-4.30 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, T^α , T^β), 4.13 (t, 1 H, $J_{\text{H}_9,\text{CH}_2} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), 2.39 (s, 1 H, $\text{T}^\beta\text{-OH}$), 1.25 (d, 3 H, $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

Das Proton der Säure tritt aufgrund von Austauschprozessen im Spektrum nicht auf.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 174.65 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Säure}}$), 157.39 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Carbamat}}$), 143.88, 143.62 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.34 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.82 (C3-, C6-Fmoc), 127.18 (C2-, C7-Fmoc), 125.21 (C1-, C8-Fmoc), 120.07 (C4-, C5-Fmoc), 68.08 (T^β), 67.56 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 59.21 (T^α), 47.09 (C9-Fmoc), 19.46 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (32)**

(Fmoc-Thr-*Or*Bu)^[133]



Eine Mischung aus 53.7 g (725 mmol, 4.36 Äquiv.) *tert*-Butanol, 114.7 g (556 mmol, 3.34 Äquiv.) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und 1.48 g (14.9 mmol, 0.09 Äquiv.) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wurde 4 d unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Die entstandene dunkelgrüne Reaktionsmischung wurde mit 50 mL absol. Dichormethan verdünnt und im Eisbad gekühlt. Eine Lösung von 56.8 g (166 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr-OH **31** in 100 mL absol. Dichlormethan wurde innerhalb von 40 min hinzugegeben. Es wurde 75 min bei Raumtemp. gerührt, bevor der in der Reaktion ausgefallene Dicyclohexylharnstoff über *Hyflo Super Cel* abfiltriert wurde. Nach mehrmaligem Spülen mit eiskaltem Dichlormethan wurde die organische Lösung dreimal mit jeweils 150 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit 150 mL Dichlormethan extrahiert, bevor die vereinigten organischen Phasen mit 200 mL ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt wurden. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und i. Vak. eingengt. Der so erhaltene Rückstand wurde in wenig Essigsäureethylester aufgenommen und über Nacht bei $-28\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt, wobei weiterer Harnstoff ausfiel, der abfiltriert wurde. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 4:1 \rightarrow 1:1) und anschließender Fällung des in wenig Diethylether gelösten Fmoc-Thr-*Or*Bu **32** mit einem großen Überschuss Cyclohexan. Auf diese Weise konnten 40.24 g (101 mmol, 61%) Fmoc-Thr-*Or*Bu **32** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert werden.

$R_f = 0.27$ (CH/EE, 3:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -7.80$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[239] $[\alpha]_D^{28} = -9.5$ ($c = 1.05$, CHCl_3).

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ (M = 397.46 g/mol) [397.28].

ESI-MS (positiv), m/z : 420.16 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 420.18), 364.08 ($[\text{M}-i\text{Buten}+\text{Na}]^+$, ber.: 364.12).

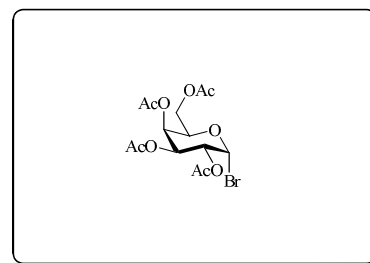
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.5$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.38 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.34-7.24 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 5.56 (d, 1 H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 8.8$ Hz, $-\text{NH}_{\text{Carbamate}}$), 4.41 (d, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{H9}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.31-4.22 (m, 3 H, H9-Fmoc, T^α , T^β), 2.95 (bs, 1 H, $\text{T}^\beta\text{-OH}$), 1.49 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.25 (d, 3 H, $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.36 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Ester}}$), 156.87 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Carbamate}}$), 143.97, 143.83 (C1a- , C8a-Fmoc), 141.36 (C4a- , C5a-Fmoc), 127.78 (C3- , C6-Fmoc), 127.14 (C2- , C7-Fmoc), 125.21 (C1- , C8-Fmoc), 120.04, 120.03 (C4- , C5-Fmoc), 82.64 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 68.33 (T^β), 67.25 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 59.71 (T^α), 47.23 (C9-Fmoc), 28.09 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 19.46 (T^γ).

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid (**35**)

($\alpha\text{Ac}_4\text{GalBr}$)^[135]

Es wurden 0.5 g Galactose **33** in 210 mL Essigsäureanhydrid vorgelegt und mit 1.25 mL Perchlorsäure (60%) versetzt. Nun wurden die restlichen 49.5 g (278 mmol, 1.0 Äquiv.) Galactose **33** so zugegeben, dass die Temperatur zwischen 30 °C und 40 °C gehalten werden konnte. Nach einstündigem Rühren bei Raumtemp. wurden 230 mL Bromwasserstoff-Lösung in Eisessig (33%ig) zugegeben und weitere 150 min bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 300 mL Dichlormethan verdünnt und zur Hydrolyse auf 500 mL Eiswasser gegossen. Nachdem mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert worden war, wurde noch dreimal mit jeweils 150 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Es resultierten 112.0 g (272 mmol, 98%) $\alpha\text{Ac}_4\text{GalBr}$ **35** als braunes Öl, welches ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.



$R_f = 0.44$ (CH/EE, 4:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 202.76$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[240] $[\alpha]_D^{25} = 210$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

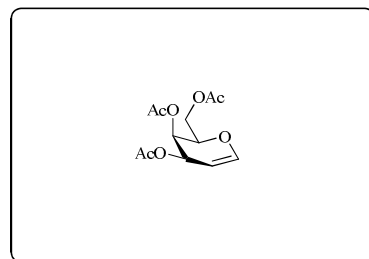
$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{BrO}_9$ (M = 411.20 g/mol) [410.02].

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.69 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.9$ Hz, H1), 5.51 (dd, 1 H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 1.3$ Hz, H4), 5.39 (dd, 1 H, $J_{\text{H3,H2}} = 10.7$, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, H3), 5.04 (dd, 1 H, $J_{\text{H2,H3}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.9$ Hz, H2), 4.48 (pt, 1 H, $J_{\text{H5,H6a/b}} = 6.8$ Hz, H5), 4.21-4.07 (m, 2 H, H6a/b), 2.14 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.11 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.05 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.00 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.37, 170.16, 170.13, 168.94 (4× C=O(Ac)), 89.71 (C1), 68.77 (C3), 67.43 (C4), 67.37 (C5), 66.46 (C2), 61.26 (C6), 23.19, 23.14, 20.90, 20.80 (4× $\text{CH}_3(\text{Ac})$).

3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**36**)^[241]

Eine auf $-18\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlte Mischung aus 400 mL Essigsäure und 550 mL Wasser wurde mit 150 g Zink und einer Kupfersulfatlösung (15.0 g CuSO_4 in 75 mL Wasser) versetzt. Nach Einsetzen der Wasserstoffentwicklung wurden 112.0 g (272 mmol, 1.0 Äquiv.) des in 150 mL Dichlormethan gelösten $\alpha\text{Ac}_4\text{GalBr}$ **35** über einen Zeitraum von 60 min zugetropft. Innerhalb von 100 min wurde die Lösung auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ bis $5\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Es wurde durch *Hyflo Super Cel* filtriert und mit insgesamt 200 mL Essigsäure/Wasser (1:1) nachgewaschen. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit 300 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit 200 mL Eiswasser und 200 mL kalter ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1) gereinigt, so dass 56.4 g (207 mmol, 76%) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **36** als farbloses, hochviskoses Öl erhalten wurden.



$R_f = 0.73$ (CH/EE, 1:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -8.82$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[242] $[\alpha]_D^{23} = -16.9$ ($c = 1.10$, CHCl_3).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (M = 272.25 g/mol) [272.09].

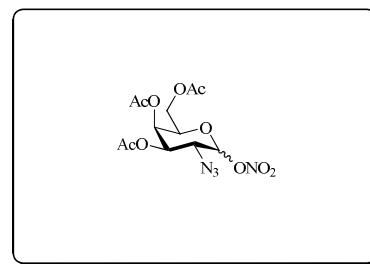
ESI-MS (positiv), m/z : 295.08 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 295.08).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.45 (dd, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 6.3$ Hz, $J_{\text{H1,H3}} = 1.5$ Hz, H1), 5.55-5.53 (m, 1 H, H3), 5.41-5.43 (m, 1 H, H4), 4.73-4.69 (m, 1 H, H2), 4.34-4.14 (m, 3 H, H5, H6a/b), 2.12 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.07 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.01 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.57, 170.30, 170.16 (3× C=O(Ac)), 145.47 (C1), 98.91 (C2), 72.87 (C5), 63.94, 63.80 (C3, C4), 61.80 (C6), 20.84, 20.79, 20.69 (3× $\text{CH}_3(\text{Ac})$).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (**37**)

(α/β Ac₃GalN₃-ONO₂)^[138]



Die am Hochvakuum getrockneten 121 g (220 mmol, 3.0 Äquiv.) Cerammoniumnitrat und 11.46 g (176 mmol, 2.4 Äquiv.) Natriumazid wurden gemischt und auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nun erfolgte innerhalb von 30 min das Zutropfen von 20.0 g (73.5 mmol, 1.0 Äquiv.) des in 250 mL absol. Acetonitril gelösten 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactals **36**. Die orange Suspension wurde daraufhin im Tiefkühlschrank bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 h gerührt. Anschließend wurde die nun intensiv gelb gefärbte Reaktionslösung noch weitere 2 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann mit 500 mL eiskaltem Diethylether und 500 mL Eiswasser versetzt. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase noch zweimal mit 300 mL Eiswasser gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Abschließend wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1) gereinigt, wobei 11.0 g (29.2 mmol, 40%) α/β Ac₃GalN₃-ONO₂ **37** als gelber Feststoff (Anomerengemisch) isoliert werden konnten.

$R_f = 0.40$ (CH/EE, 2:1).

C₁₂H₁₆N₄O₁₀ (M = 376.28 g/mol) [376.09].

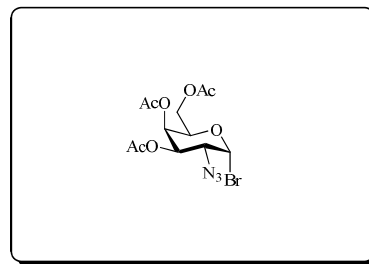
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.33 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 4.2$ Hz, H1 α), 5.57 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 8.8$ Hz, H1 β), 5.49 (d, 1 H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.2$ Hz, H4 α), 5.38 (d, 1 H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.2$ Hz, H4 β), 5.24 (dd, 1 H, $J_{\text{H3,H2}} = 11.3$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.2$ Hz, H3 α), 4.95 (dd, 1 H, $J_{\text{H3,H2}} = 10.6$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, H3 β), 4.36 (pt, 1 H, $J_{\text{H5,H6a/b}} = 6.3$ Hz, H5 α), 4.23-4.04 (m, 6 H, H2 α , H5 β , H6 α , H6 β), 3.82 (dd, 1 H, $J_{\text{H2,H3}} = 10.5$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 8.8$ Hz, H2 β), 2.16 (s, 6 H, CH₃(Ac) α/β), 2.07 (s, 3 H, CH₃(Ac) β), 2.06 (s, 3 H, CH₃(Ac) α), 2.03 (s, 3 H, CH₃(Ac) β), 2.02 (s, 3 H, CH₃(Ac) α).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.38 (C=O(Ac) β), 170.33 (C=O(Ac) α), 169.95 (C=O(Ac) β), 169.84 (C=O(Ac) α), 169.62 (C=O(Ac) β), 169.55 (C=O(Ac) α), 98.13 (C1 β), 96.97 (C1 α), 71.92, 71.74 (C3 β , C5 β), 69.55 (C5 α), 68.64 (C3 α), 66.69 (C4 α), 65.91 (C4 β), 60.99 (C6 α), 60.92 (C6 β), 57.55 (C2 β), 55.99 (C2 α), 20.63, 20.60, 20.58 (6 \times CH₃(Ac) α/β).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**38**)

(α Ac₃GalN₃Br)^[138]

Nachdem 11.0 g (29.2 mmol, 1.0 Äquiv.) α/β Ac₃GalN₃-ONO₂ **37** in 300 mL absol. Acetonitril gelöst worden waren, wurden 21.4 g (246 mmol, 8.43 Äquiv.) am Hochvakuum getrocknetes Lithiumbromid zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 15 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit 300 mL Dichlormethan verdünnt. Nach zweimaligem Waschen der organischen Phase mit je 300 mL halbges. Natriumchlorid-Lösung wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1) lieferte 8.54 g (21.7 mmol, 74%) α Ac₃GalN₃Br **38** als gelbes Öl.



$R_f = 0.49$ (CH/EE, 2:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 173.65$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[138] $[\alpha]_D^{25} = 188.6$ ($c = 1.95$, CHCl₃).

C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (M = 394.18 g/mol) [393.02].

ESI-MS (positiv), m/z : 368.10 ([M-Br+OCH₃+Na]⁺, ber.: 368.11), 406.02 ([M+Na]⁺, ber.: 406.01).

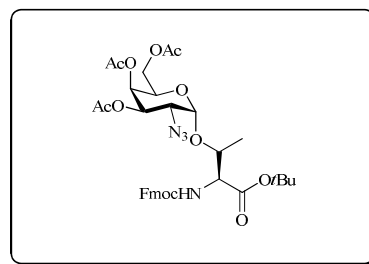
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.46 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, H1), 5.49 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, H4), 5.33 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 10.7$, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3), 4.47 (pt, 1 H, $J_{H5,H6a/b} = 6.5$ Hz, H5), 4.20-4.06 (m, 2 H, H6a/b), 3.98 (dd, 1 H, $J_{H2,H3} = 10.7$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, H2), 2.15 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.05 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.04 (s, 3 H, CH₃(Ac)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.38, 169.81, 169.57 (3× C=O(Ac)), 88.99 (C1), 71.50 (C5), 69.92 (C3), 66.59 (C4), 60.82 (C6), 58.71 (C2), 20.70, 20.63 (3× CH₃(Ac)).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**39**)

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu)^[143]

Eine Lösung von 10.72 g (27.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr-OtBu **32** in 50 mL absol. Dichlormethan und 40 mL absol. Toluol wurde mit 20.0 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å) für 1 h unter Argon gerührt. Mithilfe eines Eisbades wurde die Temperatur der Suspension auf 0 °C gesenkt, bevor unter Lichtausschluss 8.92 g (32.4 mmol, 1.2 Äquiv.)



Silbercarbonat hinzugefügt wurden. Nun wurden 1.12 g (5.39 mmol, 0.2 Äquiv.) wasserfreies Silberperchlorat, gelöst in 10 mL absol. Toluol, zur Reaktionsmischung gegeben und es wurde erneut 1 h im Eisbad gerührt. Innerhalb von 60 min wurden daraufhin 11.16 g (28.3 mmol, 1.05 Äquiv.) des in 200 mL einer 1:1-Mischung aus absol. Dichlormethan und absol. Toluol gelösten α Ac₃GalN₃Br **38** zugetropft und nach Erwärmen auf Raumtemp. wurde die Reaktionsmischung weitere 16 h gerührt. Die gelbe Reaktionslösung wurde mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und über *Hyflo Super Cel* filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit jeweils 200 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit 200 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1), wobei das β -Anomer nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Auf diese Weise wurden 16.23 g (24.3 mmol, 90%) Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu **39a** im Gemisch mit Fmoc-Thr(β Ac₃GalN₃)-OtBu **39b** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten. Zu analytischen Zwecken wurde eine bei der Säulenchromatographie rein angefallene Fraktion verwendet.

$R_f = 0.50$ (CH/EE, 3:2).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 58.97$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[143] $[\alpha]_D^{23} = 65.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

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

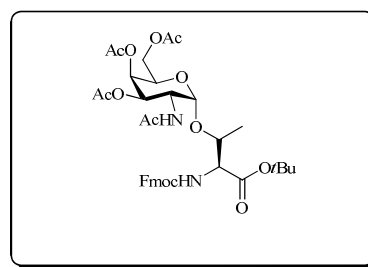
ESI-MS (positiv), m/z : 1443.65 ([2M+Na]⁺, ber.: 1443.55), 733.30 ([M+Na]⁺, ber.: 733.27), 749.30 ([M+Na]⁺, ber.: 749.24).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.37 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.35-7.29 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 5.65 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 8.8$ Hz, -NH_{Carbamat}), 5.48 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, H4), 5.35 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 11.3$, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3), 5.11 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.5$ Hz, H1), 4.49-4.25 (m, 6 H, H5, H6a/b, H9-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 4.13-4.09 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 3.64 (dd, 1 H, $J_{H2,H3} = 11.0$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, H2), 2.15 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.08 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.05 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.51 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.36 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.5$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.34, 170.00, 169.86, 169.21 (4× C=O), 156.85 (C=O_{Carbamat}), 143.90, 143.88 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.31, 141.29 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.71 (C3-, C6-Fmoc), 127.12, 127.08 (C2-, C7-Fmoc), 125.29, 125.16 (C1-, C8-Fmoc), 119.98, 119.96 (C4-, C5-Fmoc), 99.22 (C1), 82.87 (-C(CH₃)₃), 76.40 (T ^{β}), 68.06 (C3), 67.54, 67.50 (C4, CH₂-Fmoc), 67.08 (C5), 61.82 (C6), 59.24 (T ^{α}), 57.73 (C2), 47.13 (C9-Fmoc), 27.97 (-C(CH₃)₃), 20.66, 20.62, 20.60 (3× CH₃(Ac)), 18.92 (T ^{γ}).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**40**)**

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu)^[144]



Zunächst wurden 14.73 g (225 mmol, 10.0 Äquiv.) Zinkstaub durch Aufschlämmen in 500 mL einer 2%igen Kupfer(II)sulfat-Lösung aktiviert. Nach Waschen mit 200 mL Wasser, 200 mL Essigsäureethylester und zweimal mit je 100 mL Diethylether wurden 16.0 g (22.51 mmol, 1.0 Äquiv.) des Gemisches aus Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu **39a** und Fmoc-Thr(β Ac₃GalN₃)-OtBu **39b**, gelöst in 300 mL Tetrahydrofuran, zugegeben. Daraufhin wurden 200 mL Essigsäureanhydrid und 100 mL Essigsäure zur Reaktionslösung hinzugefügt, bevor diese 14 h bei Raumtemp. gerührt wurde. Das Zink wurde durch Filtration über *Hyflo Super Cel* abgetrennt und der Filterkuchen wurde mit 200 mL Tetrahydrofuran gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde azeotrop mit Toluol destilliert. Das Rohprodukt wurde in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit 150 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat, Filtration und destillativem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde eine Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 1:1 → 1:4) durchgeführt. Hierbei fielen 8.85 g (12.2 mmol, 54%) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu **40** als farbloser, amorpher Feststoff an.

$R_f = 0.41$ (CH/EE, 1:4).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 51.99$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[143] $[\alpha]_D^{22} = 63.4$ ($c = 1.03$, CHCl₃).

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

ESI-MS (positiv), m/z : 1475.62 ([2M+Na]⁺, ber.: 1475.59), 749.30 ([M+Na]⁺, ber.: 749.29), 765.31 ([M+K]⁺, ber.: 765.26), 1491.66 ([2M+K]⁺, ber.: 1491.56).

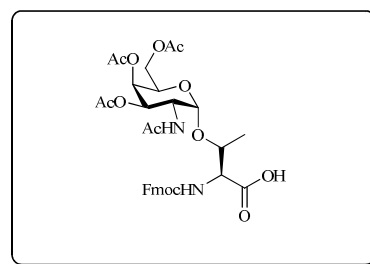
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.38 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.36-7.30 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 5.95 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, -NH_{Carbamat}), 5.50 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz, NH_{GalNAc}), 5.39 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.3$ Hz, H4), 5.09 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 11.5$, $J_{H3,H4} = 3.0$ Hz, H3), 4.89 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.4$ Hz, H1), 4.62 (ptd, 1 H, $J_{H2,NH} = J_{H2,H3} = 10.7$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, H2), 4.47-4.43 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.28-4.08 (m, 6 H, H5, H6a/b, H9-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 2.17 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.04 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 2.00 (s, 6 H, 2× CH₃(Ac)), 1.46 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.33 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 171.02 ($\text{C}=\text{O}_{\text{GalNAc}}$), 170.49, 170.44, 170.39 ($3\times \text{C}=\text{O}$), 170.10 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Ester}}$), 156.57 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Carbamat}}$), 143.88 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.48 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.91 (C3-, C6-Fmoc), 127.26 (C2-, C7-Fmoc), 125.27, 125.20 (C1-, C8-Fmoc), 120.19, 120.16 (C4-, C5-Fmoc), 100.12 (C1), 83.40 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 68.88 (C3), 67.56, 67.54, 67.52 (C4, C5, CH_2 -Fmoc), 62.25 (C6), 59.05 (T^α), 47.46, 47.34 (C2, C9-Fmoc), 28.24 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.41, 20.90, 20.88, 20.78 ($3\times \text{CH}_3(\text{Ac})$, $\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 18.65 (T^γ).

Das Signal von (T^β) befindet sich unter dem Chloroform-Signal.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (41)**

(Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OH)^[145]



In eine Lösung von 7.41 g (10.19 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OtBu **40** in 50 mL Dichlormethan wurden 5 mL Anisol gegeben. Nun wurden 50 mL Trifluoressigsäure zugegeben und es wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend verdünnte man mit 50 mL Toluol und entfernte die Lösungsmittel destillativ bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer. Nach zweimaliger azeotroper Destillation mit jeweils 50 mL Toluol erfolgte die Reinigung des Rohproduktes mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$, 19:1:0.1), so dass 6.55 g (9.77 mmol, 96%) Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OH **41** als bräunlicher, amorpher Feststoff erhalten wurden.

$R_f = 0.38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 70.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[178] $[\alpha]_D^{23} = 76.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

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

ESI-MS (positiv), m/z : 693.26 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 693.23), 1363.56 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1363.46), 709.25 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 709.20), 1379.55 ($[\text{2M}+\text{K}]^+$, ber.: 1379.44).

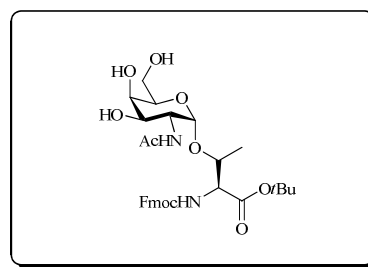
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.2$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.38 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.36-7.30 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 5.95 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.7$ Hz, $-\text{NH}_{\text{Carbamat}}$), 5.50 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.2$ Hz, $\text{NH}_{\text{GalNAc}}$), 5.39 (d, 1 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 2.3$ Hz, H4), 5.09 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.5$, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.0$ Hz, H3), 4.89 (d, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.4$ Hz, H1), 4.62 (ptd, 1 H, $J_{\text{H}_2,\text{NH}} = J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 3.8$ Hz, H2), 4.47-4.43 (m, 2 H, CH_2 -Fmoc), 4.28-4.08 (m, 6 H, H5, H6a/b, H9-Fmoc, T^α , T^β), 2.17 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.04 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 2.00 (s, 6 H, $2\times \text{CH}_3(\text{Ac})$), 1.33 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

Das Proton der Säure tritt aufgrund von Austauschprozessen im Spektrum nicht auf.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 171.02, 170.49, 170.44, 170.39 (5× C=O), 156.57 (C=O_{Carbamat}), 143.88 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.48 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.91 (C3-, C6-Fmoc), 127.26 (C2-, C7-Fmoc), 125.27, 125.20 (C1-, C8-Fmoc), 120.19, 120.16 (C4-, C5-Fmoc), 100.12 (C1), 72.4 (T^β), 68.88, 67.56, 67.54, 67.52 (C3, C4, C5, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 62.25 (C6), 59.05 (T^α), 47.46, 47.34 (C2, C9-Fmoc), 23.41 ($\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 20.90, 20.88, 20.78 (3× $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 18.65 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (42)**

(Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu)^[143]



Nachdem 3.50 g (4.82 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu **40** in 60 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst worden waren, wurde unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes eine frisch hergestellte 1%ige methanolische Natrium-methanolat-Lösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 8.5-9 zugetropft. Nun erfolgten über 5 h stündliche Kontrollen und gegebenenfalls Nachregulierungen des pH-Wertes. Nach weiteren 12 h Rühren bei Raumtemp. und vollständiger Deacetylierung wurde mit 1 N Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend in 100 mL einer 1:1 Mischung aus Acetonitril und Dichlormethan aufgenommen und mit 1.30 g (3.86 mmol, 0.8 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-succinimidylcarbonat und 0.7 mL (4.24 mmol, 0.88 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde weitere 15 h gerührt, mit dem Kationentauscher Amberlyst 15 neutralisiert, filtriert und schließlich destillativ i. Vak. eingengt. Nach Aufnahme des Rohproduktes in 150 mL Essigsäureethylester wurde sukzessive mit 100 mL Wasser, 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Abschließend wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: EE/MeOH, 20:1) gereinigt. Dabei fielen 2.30 g (3.82 mmol, 79%) Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu **42** als farbloser, amorpher Feststoff an.

$R_f = 0.11$ (EE/MeOH, 20:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 27.6$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[143] $[\alpha]_D^{22} = 40.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (M = 600.66 g/mol) [600.27].

ESI-MS (positiv), m/z : 623.32 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 623.26).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.75 (d, 2 H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.2$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.61 (d, 2 H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.3$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41-7.28 (m, 4 H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc), 6.96 (d, 1 H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 8.6$ Hz, $-\text{NH}_{\text{GalNAc}}$), 5.99 (d, 1 H, $J_{\text{NH,H2}} = 8.9$ Hz, $\text{NH}_{\text{Carbamat}}$), 4.86 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.4$ Hz, H1), 4.45-4.38 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.29-4.22 (m, 3 H, H2, H9-Fmoc, T^α), 4.15-4.10 (m, 2 H, H4, T^β), 3.91-3.83 (m, 4 H, H3, H5, H6a/b), 2.11 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 1.43 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.27 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 7.1$ Hz, T^γ).

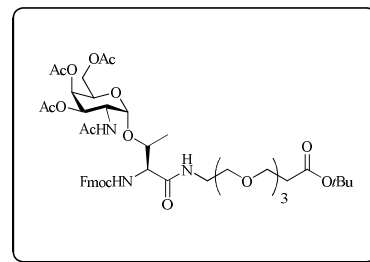
Die drei Protonen der Hydroxygruppen treten im Spektrum nicht auf.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.68 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Ester}}$), 170.64 ($\text{C}=\text{O}_{\text{NHAc}}$), 156.90 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Carbamat}}$), 143.90 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.39 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.85 (C3-, C6-Fmoc), 127.22 (C2-, C7-Fmoc), 125.25 (C1-, C8-Fmoc), 120.08 (C4-, C5-Fmoc), 99.81 (C1), 83.04 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 76.54 (T^β), 68.87 (C3, C4, C5), 67.29 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 62.09 (C6), 59.27 (T^α), 50.41 (C2), 47.28 (C9-Fmoc), 28.14 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.21 ($\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 18.98 (T^γ).

6.6 Synthese der T_N -dipeptidischen Kopfgruppe

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**56**)

(Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OEG-*O*tBu)



In 35 mL absol. Dichlormethan wurden 2.44 g (3.63 mmol, 1.1 Äquiv.) Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OH **41**, 1.64 g (3.96 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU und 0.607 g (3.96 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydroxybenzotriazol gelöst bzw. suspendiert und mit 0.8 mL (7.26 mmol, 2.2 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin versetzt. Nach 1 h Rühren bei Raumtemp. wurden 0.916 g (3.30 mmol, 1.0 Äquiv.) $\text{H}_2\text{N-OEG-COOtBu}$ **25**, gelöst in 15 mL absol. Dichlormethan, zuge tropft. Die Reaktionslösung wurde 15 h bei Raumtemp. gerührt, mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und im Anschluss zweimal mit je 50 mL einer 1 M Salzsäure-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat, Filtration und destillativem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde eine Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 39:1) durchgeführt. Es wurden 2.96 g (3.18 mmol, 96%) Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OEG-*O*tBu **56** als gelbes Öl erhalten.

$R_f = 0.39$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 39:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 36.45$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

C₄₆H₆₃N₃O₁₇ (M = 930.00 g/mol) [929.42].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 952.41 ([M+Na]⁺, ber.: 952.41), 968.40 ([M+K]⁺, ber.: 968.38), 930.42 ([M+H]⁺, ber.: 930.42).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 952.4088 ([M+Na]⁺, ber.: 952.4055).

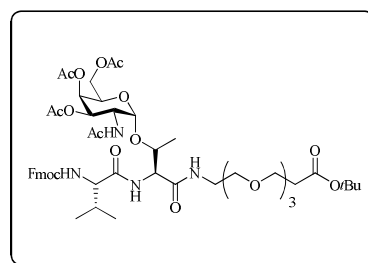
Analytische RP-HPLC (Jupiter C18, CH₃CN/H₂O, 50:50, 5 min, dann 50:50→100:0, 25 min, R_t = 22.9 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2 H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41-7.36 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.34-7.27 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 7.12 (t, 1 H, J_{NH,CH2} = 5.0 Hz, NH_{OEG}), 6.62 (d, 1 H, J_{NH,H2} = 9.4 Hz, NH_{GalNAc}), 5.90 (d, 1 H, J_{NH,Tα} = 9.1 Hz, NH_T), 5.39 (d, 1 H, J_{H4,H5} = 2.2 Hz, H4), 5.06 (dd, 1 H, J_{H3,H2} = 11.4 Hz, J_{H3,H4} = 3.0 Hz, H3), 4.91 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.4 Hz, H1), 4.60-4.53 (m, 1 H, H2), 4.46-4.38 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.35-4.16 (m, 4 H, H5, T^α, T^β, H9-Fmoc), 4.10-4.01 (m, 2 H, H6a/b), 3.67 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.4 Hz, H3-OEG), 3.60-3.57 (m, 8 H, H5-, H6, H8-, H9-OEG), 3.55-3.51 (m, 2 H, H11-OEG), 3.47-3.42 (m, 2 H, H12-OEG), 2.47 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.4 Hz, H2-OEG), 2.15 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.01 (s, 6 H, 2× CH₃(Ac)), 1.97 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.41 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.29 (d, 3 H, J_{Tγ,Tβ} = 6.2 Hz, T^γ).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.17, 171.14, 170.92, 170.50, 170.47, 170.34 (6× C=O), 156.76 (C=O_{Carbamat}), 143.84 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.39 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.88 (C3-, C6-Fmoc), 127.24 (C2-, C7-Fmoc), 125.27 (C1-, C8-Fmoc), 120.11 (C4-, C5-Fmoc), 100.24 (C1), 80.83 (-C(CH₃)₃), 78.12 (T^β), 70.52, 70.41, 70.34, 70.27 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 69.42 (C11-OEG), 69.03 (C3), 67.50, 67.46, 67.36 (C4, C5, CH₂-Fmoc), 66.91 (C3-OEG), 62.18 (C6), 58.63 (T^α), 47.63, 47.25 (C2, C9-Fmoc), 39.60 (C12-OEG), 36.28 (C2-OEG), 28.16 (-C(CH₃)₃), 23.10, 20.87, 20.85, 20.74 (4× CH₃(Ac)), 18.02 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (57)**

(Fmoc-Val-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-*O*tBu)



Nachdem 5.62 g (6.04 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-*O*tBu **56** in 80 mL Dichlormethan gelöst worden waren, wurden 4.19 mL (42.3 mmol, 7.0 Äquiv.) Piperidin zugesetzt. Es wurde 14 h bei Raumtemp. gerührt, mit Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. destillativ entfernt. Nach dreifacher Kodestillation mit Toluol wurde das gebildete

Fulven über eine Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1; R_f = 0.36 (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1)) abgetrennt. Das nach Entfernen des Laufmittels erhaltene Rohprodukt wurde in 25 mL absol. Dichlormethan gelöst und in eine bei Raumtemp. 1 h vorgerührte Lösung aus 2.25 g (6.64 mmol, 1.1 Äquiv.) Fmoc-Val **52**, 3.00 g (7.25 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 1.11 g (7.25 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydroxybenzotriazol und 1.46 mL (13.29 mmol, 2.2 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in 100 mL absol. Dichlormethan gegeben. Nach weiteren 15 h Rühren bei Raumtemp. wurde durch Zugabe von 100 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde zweimal mit jeweils 100 mL einer 1 M Salzsäure-Lösung gewaschen. Abschließend wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wurde flash-chromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH, 39:1) gereinigt, wobei 4.72 g (4.59 mmol, 76%) Fmoc-Val-Thr(αAc₃GalNAc)-OEG-*Or*Bu **57** als bräunlicher Feststoff isoliert werden konnten.

R_f = 0.11 (CH₂Cl₂/MeOH, 39:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 28.33$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₁H₇₂N₄O₁₈ (M = 1029.13 g/mol) [1028.48].

ESI-MS (positiv), m/z: 1051.48 ([M+Na]⁺, ber.: 1051.47), 1067.46 ([M+K]⁺, ber.: 1067.45).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1051.4749 ([M+Na]⁺, ber.: 1051.4739).

Analytische RP-HPLC (Jupiter C18, CH₃CN/H₂O, 50:50, 5 min, dann 50:50→100:0, 25 min, R_t = 23.5 min, λ = 212 nm).

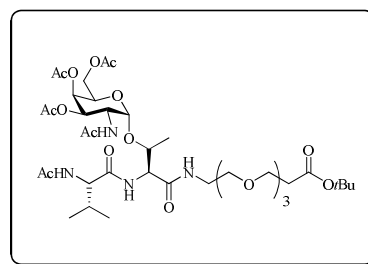
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, 2 H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2 H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41-7.36 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.32-7.27 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 7.08-7.00 (m, 2 H, NH_T, NH_{OEG}), 6.87 (d, 1 H, J_{NH,H2} = 8.7 Hz, NH_{GalAc}), 5.61 (d, 1 H, J_{NH,Vα} = 7.9 Hz, NH_V), 5.33 (d, 1 H, J_{H4,H5} = 3.0 Hz, H4), 5.07 (dd, 1 H, J_{H3,H2} = 10.9 Hz, J_{H3,H4} = 3.1 Hz, H3), 4.93 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.4 Hz, H1), 4.57-4.49 (m, 2 H, H2, T^α), 4.46-4.35 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.29-4.20 (m, 3 H, H5, T^β, H9-Fmoc), 4.07-3.98 (m, 3 H, V^α, H6a/b), 3.70 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.5 Hz, H3-OEG), 3.60-3.56 (m, 8 H, H5-, H6, H8-, H9-OEG), 3.53-3.49 (m, 2 H, H11-OEG), 3.47-3.38 (m, 2 H, H12-OEG), 2.49 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.4 Hz, H2-OEG), 2.25-2.16 (m, 1 H, V^β), 2.13 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.01 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.93 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.91 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.43 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.24 (d, 3 H, J_{Tγ,Tβ} = 6.2 Hz, T^γ), 0.99 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.8 Hz, V^γ), 0.97 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.8 Hz, V^γ).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 172.03, 171.12, 170.83, 170.47, 169.92 (7× C=O), 156.44 (C=O_{Carbamat}), 144.03 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.39 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.86 (C3-, C6-Fmoc),

127.20 (C2-, C7-Fmoc), 125.24, 125.18 (C1-, C8-Fmoc), 120.12, 120.08 (C4-, C5-Fmoc), 99.86 (C1), 80.84 (-C(CH₃)₃), 77.32 (T^β), 70.56, 70.48, 70.40, 70.33 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 69.44 (C11-OEG), 68.89 (C3), 67.47, 67.25, 67.22 (C4, C5, CH₂-Fmoc), 66.96 (C3-OEG), 62.23 (C6), 61.06 (V^α), 56.72 (T^α), 47.78, 47.26 (C2, C9-Fmoc), 39.59 (C12-OEG), 36.32 (C2-OEG), 30.65 (V^β), 28.20 (-C(CH₃)₃), 23.12, 20.85, 20.65 (4× CH₃(Ac)), 19.46 (2× V^γ), 18.11 (T^γ).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**57b**)**

(AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-*Ot*Bu)



Zu einer Lösung von 2.00 g (1.94 mmol, 1.0 Äquiv.) FmocVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-*Obu* **57** in 30 mL Dichlormethan wurden 1.35 mL (13.6 mmol, 7.0 Äquiv.) Piperidin gegeben. Nach 5stündigem Rühren bei Raumtemp. wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer destillativ entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol kodestilliert. Anschließend wurde der Rückstand zusammen mit 89 mg (0.583 mmol, 0.3 Äquiv.) Hydroxybenzotriazol-Monohydrat in 30 mL Dichlormethan gelöst, bevor sukzessive 0.64 mL (3.89 mmol, 2.0 Äquiv.) Diisopropylethylamin und 1.29 mL (13.60 mmol, 7.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugesetzt wurden. Bei Raumtemp. wurde die klare Reaktionslösung anschließend 15 h gerührt und dann zweimal mit jeweils 15 mL 1 M Salzsäure-Lösung extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat, Filtration und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck wurde der verbleibende Rückstand mittels Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH, 39:1 → 19:1) gereinigt. So konnten 1.10 g (1.30 mmol, 67%) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-*Obu* **57b** als gelber, amorpher Feststoff gewonnen werden.

$R_f = 0.33$ (CH₂Cl₂/MeOH, 19:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 38.11$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₃₈H₆₄N₄O₁₇ (M = 848.93 g/mol) [848.43].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 815.33 ([M-*i*Buten+Na]⁺, ber.: 815.35), 871.31 ([M+Na]⁺, ber.: 871.42).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 871.4149 ([M+Na]⁺, ber.: 871.4164).

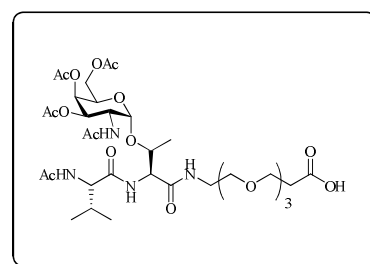
Analytische RP-HPLC (Jupiter C18, CH₃CN/H₂O, 50:50, 5 min, dann 50:50→100:0, 25 min, $R_t = 12.4$ min, $\lambda = 212$ nm).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 7.27 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 8.0$ Hz, NH_T), 7.13 (t, 1 H, $J_{\text{NH},\text{CH}_2} = 5.0$ Hz, NH_{OEG}), 6.87 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.2$ Hz, $\text{NH}_{\text{GalNAc}}$), 6.60 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{V}\alpha} = 7.9$ Hz, NH_V), 5.35 (d, 1 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 2.3$ Hz, H4), 5.08 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.4$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.2$ Hz, H3), 4.94 (d, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.6$ Hz, H1), 4.55-4.48 (m, 2 H, H2 {4.53}, T^α {4.50}), 4.31-4.25 (m, 2 H, H5 {4.30}, T^β {4.26}), 4.22 (pt, 1 H, $J_{\text{V}\alpha,\text{NH}} = J_{\text{V}\alpha,\text{V}\beta} = 7.7$ Hz, V^α), 4.09-4.00 (m, 2 H, H6a/b), 3.69 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.4$ Hz, H3-OEG), 3.60-3.56 (m, 8 H, H5-, H6, H8-, H9-OEG), 3.55-3.47 (m, 2 H, H11-OEG), 3.46-3.38 (m, 2 H, H12-OEG), 2.49 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.4$ Hz, H2-OEG), 2.20-2.14 (m, 1 H, V^β), 2.13 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.03 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 2.00 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3(\text{Ac})$), 1.95 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 1.42 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.22 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$ Hz, T^γ), 0.97 (d, 3 H, $J_{\text{V}\gamma,\text{V}\beta} = 6.4$ Hz, V^γ), 0.95 (d, 3 H, $J_{\text{V}\gamma,\text{V}\beta} = 6.4$ Hz, V^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , HSQC), δ (ppm): 174.15, 172.11, 171.34, 171.17, 170.82, 170.69, 170.52, 169.92 ($8 \times \text{C}=\text{O}$), 99.55 (C1), 80.94 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 76.64 (T^β), 70.52, 70.44, 70.38, 70.28 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 69.54 (C11-OEG), 68.73 (C3), 67.52 (C4), 67.19 (C5), 66.38 (C3-OEG), 62.32 (C6), 59.63 (V^α), 56.90 (T^α), 47.81 (C2), 39.55 (C12-OEG), 36.28 (C2-OEG), 30.11 (V^β), 28.17 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.09, 20.86, 20.78 ($5 \times \text{CH}_3(\text{Ac})$), 19.49 (V^γ), 18.41 (V^γ), 18.22 (T^γ).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure (58)**

(AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-OH)



Es wurden 1.00 g (1.18 mmol, 1.0 Äquiv.) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-OtBu **57b** in 30 mL Dichlormethan gelöst und mit 1 mL Anisol sowie 10 mL Trifluoressigsäure versetzt. Das Lösungsmittel wurde nach 15stündiger Reaktion bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde dreimal azeotrop mit Toluol destilliert, um die Reste der Trifluoressigsäure zu entfernen. Nach der Reinigung mittels Flash-Säulenchromatographie (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$ 19:1:0.1) konnten 889 mg (1.12 mmol, 95%) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-OH **58** als braunes Öl gewonnen werden.

$R_f = 0.07$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 19:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 36.01$ ($c = 1.00$, MeOH).

$\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{17}$ (M = 792.83 g/mol) [792.36].

ESI-MS (positiv), m/z : 815.28 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 815.35), 831.30 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 831.33), 793.35 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 793.37), 1607.69 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1607.72), 1623.67 ($[\text{2M}+\text{K}]^+$, ber.: 1623.69).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 815.3541 ([M+Na]⁺, ber.: 815.3538).

Analytische RP-HPLC (Jupiter C18, CH₃CN/H₂O, 50:50, 5 min, dann 50:50→100:0, 25 min, R_t = 4.5 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.72-7.68 (m, 1 H, NH_{OEG}), 7.54 (d, 1 H, J_{NH,Tα} = 9.0 Hz, NH_T), 7.07 (d, 1 H, J_{NH,Vα} = 9.1 Hz, NH_{GalNAc}), 6.56 (d, 1 H, J_{NH,H2} = 8.3 Hz, NH_V), 5.35 (d, 1 H, J_{H4,H5} = 2.5 Hz, H4), 5.10 (dd, 1 H, J_{H3,H2} = 11.4 Hz, J_{H3,H4} = 3.2 Hz, H3), 4.92 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.5 Hz, H1), 4.66 (dd, 1 H, J_{Tα,NH} = 8.9 Hz, J_{Tα,Tβ} = 1.9 Hz, T^α), 4.57-4.50 (m, 1 H, H2), 4.41 (pt, 1 H, J_{Vα,NH} = J_{Vα,Vγ} = 8.0 Hz, V^α), 4.31-4.27 (m, 2 H, T^β {4.31}, H5 {4.29}), 4.06-4.04 (m, 2 H, H6a/b), 3.76-3.71 (m, 2 H, H3-OEG), 3.62-3.56 (m, 8 H, H5-, H6, H8-, H9-OEG), 3.50-3.43 (m, 4 H, H11- {3.49}, H12-OEG {3.44}), 2.62 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 5.4 Hz, H2-OEG), 2.14 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.12-2.08 (m, 1 H, V^β), 2.05 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.03 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.01 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.95 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.26 (d, 3 H, J_{Tγ,Tβ} = 6.4 Hz, T^γ), 0.97 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.8 Hz, V^γ), 0.95 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.8 Hz, V^γ).

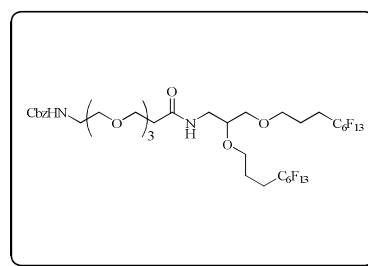
Das Proton der Säure tritt aufgrund von Austauschprozessen im Spektrum nicht auf.

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 175.13, 172.49, 171.47, 171.30, 170.77, 170.66, 170.61, 169.88 (8× C=O), 99.80 (C1), 77.02 (T^β), 70.72, 70.58, 70.24 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 69.65 (C11-OEG), 68.84 (C3), 67.65 (C4), 67.20 (C5), 66.68 (C3-OEG), 62.32 (C6), 59.15 (V^α), 57.35 (T^α), 47.78 (C2), 39.73 (C12-OEG), 35.00 (C2-OEG), 30.81 (V^β), 23.19, 23.14, 20.90, 20.80 (5× CH₃(Ac)), 19.49 (V^γ), 18.35 (V^γ), 18.23 (T^γ).

6.7 Synthese der auf Glycerin basierenden Konjugate

N-Benzoyloxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxa-dodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluoronyloxy)-propylamid (47)

(Cbz-OEG-GlycF₂₆)



Die Reduktion der Azidkomponente wurde nach **AAV1**

durchgeführt. In dieser Reaktion wurden 15 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) mit 200 mg (0.185 mmol, 1.0 Äquiv.) N₃-GlycF₂₆ **19** und 106 mg (1.29 mmol, 7.0 Äquiv.) Natriumacetat in 30 mL Methanol/Essigsäureethylester (1:1) umgesetzt. Anschließend wurde das erhaltene Rohprodukt mit 72 mg (0.204 mmol, 1.1 Äquiv.) CbzHN-OEG-COOH **29**, 92 mg (0.222 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 34 mg (0.222 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBt und 45 μL (0.407 mmol, 2.2 Äquiv.) *N,N'*-

Dimethylformamid und 10 mL absol. Tetrahydrofuran umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 93 mg (0.081 mmol, 44%) Cbz-OEG-GlycF₂₆ **47** als farbloses Öl.

$R_f = 0.42$ (EE).

$C_{38}H_{42}F_{26}N_2O_8$ (M = 1148.71 g/mol) [1148.25].

ESI-MS (positiv), m/z : 1171.23 ($[M+Na]^+$, ber.: 1171.24), 1187.27 ($[M+K]^+$, ber.: 1187.22), 1149.32 ($[M+H]^+$, ber.: 1149.26).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1171.2446 ($[M+Na]^+$, ber.: 1171.2424).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 22.2$ min, $\lambda = 212$ nm).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 7.35-7.28 (m, 5 H, **H**_{Ar}), 5.07 (s, 2 H, **CH**₂-Ar), 3.71 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.0$ Hz, H3-OEG), 3.67-3.57 (m, 11 H, -O**CH**₂CH₂CH₂-, H5-, H6-, H8-, H9-OEG, -**CH**CH₂O-), 3.55-3.50 (m, 5 H, H11-OEG, -CH**CH**₂O-, -O**CH**₂CH₂CH₂-), 3.45 (dd, 1 H, $J_{H3a,H3b} = 10.4$ Hz, $J_{H3a/b,H2} = 6.1$ Hz, -CH**CH**₂O-), 3.38-3.25 (m, 4 H, H12-OEG, -CH**CH**₂NH-), 2.44 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.1$ Hz, H2-OEG), 2.35-2.17 (m, 4 H, 2× -O**CH**₂CH₂**CH**₂-), 1.89-1.80 (m, 4 H, 2× -O**CH**₂**CH**₂CH₂-).

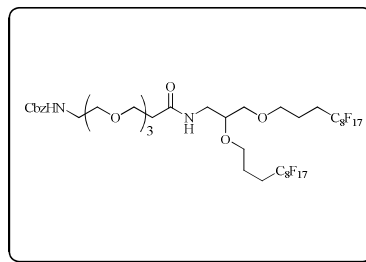
Die beiden Amid-Protonen befinden sich im H₂O-Signal des Lösungsmittels.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 174.18 (C=O_{Amid}), 158.88 (C=O_{Carbamat}), 138.40 (CH₂-C_{Ar}), 129.47, 128.98, 128.84 (5× C_{Ar}), 78.82 (-CHCH₂O-), 72.45 (-CHCH₂O-), 71.56, 71.47, 71.27 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.94 (C11-OEG), 70.75, 69.58 (2× -O**CH**₂CH₂CH₂-), 68.26 (C3-OEG), 67.42 (CH₂-Ar), 41.76 (C12-OEG), 41.24 (-CHCH₂NH-), 37.60 (C2-OEG), 28.82 (t, $^2J_{C,F} = 22.4$ Hz, 2× -O**CH**₂CH₂CH₂-), 22.21 (t, $^3J_{C,F} = 3.8$ Hz, -O**CH**₂CH₂CH₂-), 21.83 (t, $^3J_{C,F} = 3.7$ Hz, -O**CH**₂CH₂CH₂-).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -84.35 (t, 6 F, $J_{F,F} = 10.2$ Hz, 2× -**CF**₃), -117.20- -117.42 (m, 4 F), -124.84 (bs, 4 F), -125.82 (bs, 4 F), -126.30- -126.38 (m, 4 F), -129.22- -129.30 (m, 4 F).

***N*-Benzyloxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluorundecyloxy)propylamid (48)**

(Cbz-OEG-GlycF₃₄)



Die Reduktion der Azidkomponente wurde nach **AAV1** mit 10 mg Palladium auf Aktivkohle (10%), 130 mg (0.099 mmol, 1.0 Äquiv.) N₃-GlycF₃₄ **18** und 857 mg (0.69 mmol, 7.0 Äquiv.) Natriumacetat in 20 mL Methanol/Essigsäureethylester (1:1) durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt mit 39 mg (0.109 mmol, 1.1 Äquiv.) CbzHN-OEG-COOH **29**, 49 mg (0.119 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 18 mg (0.119 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBt und 25 µL (0.218 mmol, 2.2 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in einer Mischung aus 5 mL absol. Dichlormethan, 1 mL absol. *N,N'*-Dimethylformamid und 10 mL absol. Tetrahydrofuran umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 38 mg (0.028 mmol, 28%) Cbz-OEG-GlycF₃₄ **48** als farbloses Lyophilisat.

$R_f = 0.49$ (EE).

C₄₂H₄₂F₃₄N₂O₈ (M = 1348.74 g/mol) [1348.24].

ESI-MS (positiv), m/z : 1371.12 ([M+Na]⁺, ber.: 1371.23), 1387.17 ([M+K]⁺, ber.: 1387.20), 1349.20 ([M+H]⁺, ber.: 1349.25).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1371.2272 ([M+Na]⁺, ber.: 1371.2296).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 25.3 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 7.35-7.27 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.07 (s, 2 H, CH₂-Ar), 3.71 (t, 2 H, J_{CH₂,CH₂} = 6.1 Hz, H3-OEG), 3.68-3.57 (m, 11 H, -OCH₂CH₂CH₂- {3.65}, H5-, H6-, H8-, H9-OEG {3.60}, -CHCH₂O- {3.58}), 3.55-3.51 (m, 5 H, H11-OEG, -CHCH₂O-, -OCH₂CH₂CH₂-), 3.44 (dd, 1 H, J_{H3a,H3b} = 10.5 Hz, J_{H3a/b,H2} = 6.3 Hz, -CHCH₂O-), 3.36-3.24 (m, 4 H, H12-OEG, -CHCH₂NH-), 2.44 (t, 2 H, J_{CH₂,CH₂} = 6.1 Hz, H2-OEG), 2.33-2.19 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 1.89-1.81 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-).

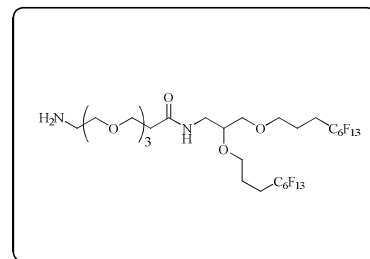
Die beiden Amid-Protonen befinden sich im H₂O-Signal des Lösungsmittels.

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, HSQC), δ (ppm): 174.21 (C=O_{Amid}), 158.88 (C=O_{Carbamat}), 138.40 (CH₂-C_{Ar}), 129.47, 128.99, 128.85 (5× C_{Ar}), 78.84 (-CHCH₂O-), 72.51 (-CHCH₂O-), 71.56, 71.47, 71.28 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.95 (C11-OEG), 70.73, 69.57 (-OCH₂CH₂CH₂-), 68.26 (C3-OEG), 67.43 (CH₂-Ar), 41.76 (C12-OEG), 41.20 (-CHCH₂NH-), 37.59 (C2-OEG), 28.82 (t, ²J_{C,F} = 22.1 Hz, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 22.21, 21.83 (2× -OCH₂CH₂CH₂-).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -84.34 (t, 6 F, $J_{\text{F,F}} = 10.2$ Hz, $2\times -\text{CF}_3$), -117.27-117.54 (m, 4 F), -124.69 (bs, 4 F), -124.88 (bs, 8 F), -125.71 (m, 4 F), -126.34 (m, 4 F), -129.26 (m, 4 F).

12-Amino-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononyloxy)propylamid (50)

($\text{H}_2\text{N-OEG-GlycF}_{26}$)



Nach **AAV2** wurden 50 mg (0.044 mmol, 1.0 Äquiv.) Cbz-OEG-GlycF₂₆ **47** mit 8 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) in 15 mL Essigsäureethylester umgesetzt. So konnten 44 mg (0.043 mmol, 98%) $\text{H}_2\text{N-OEG-GlycF}_{26}$ **50** als farbloses Öl gewonnen werden.

$\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{F}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$ (M = 1014.58 g/mol) [1014.22].

ESI-MS (positiv), m/z : 1015.22 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1015.22).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1015.2224 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1015.2236).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 3.73 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.1$ Hz, H3-OEG), 3.68-3.59 (m, 11 H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, H5-, H6-, H8-, H9-OEG, $-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 3.57-3.51 (m, 5 H, H11-OEG, $-\text{CHCH}_2\text{O}-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 3.46 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_{3a},\text{H}_{3b}} = 10.3$ Hz, $J_{\text{H}_{3a/b},\text{H}_2} = 6.1$ Hz, $-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 3.39-3.25 (m, 2 H, $-\text{CHCH}_2\text{NH}-$), 2.88-2.81 (m, 2 H, H12-OEG), 2.46 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.1$ Hz, H2-OEG), 2.38-2.18 (m, 4 H, $2\times -\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.91-1.83 (m, 4 H, $2\times -\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

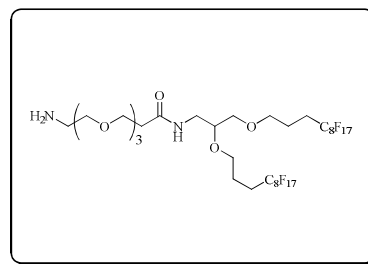
Sowohl die Amin-Protonen, als auch das Amid-Protonen befinden sich im H_2O -Signal des Lösungsmittels.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 174.16 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Amid}}$), 78.83 ($-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 72.45 ($-\text{CHCH}_2\text{O}-$), 71.55, 71.47, 71.28, 71.27 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.76 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 70.17 (C11-OEG), 69.59 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 68.30 (C3-OEG), 41.77 (C12-OEG), 41.27 ($-\text{CHCH}_2\text{NH}-$), 37.59 (C2-OEG), 28.83 (t, $^2J_{\text{C,F}} = 21.8$ Hz, $2\times -\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 22.22 (t, $^3J_{\text{C,F}} = 3.7$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 21.85 (t, $^3J_{\text{C,F}} = 3.7$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, CD_3OD), δ (ppm): -84.37 (t, 6 F, $J_{\text{F,F}} = 10.1$ Hz, $2\times -\text{CF}_3$), -117.25-117.42 (m, 4 F), -124.86 (bs, 4 F), -125.85 (bs, 4 F), -126.36-126.40 (m, 4 F), -129.28-129.32 (m, 4 F).

**2-Amino-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluorundecyloxy)-propylamid
(44)**

(H₂N-OEG-GlycF₃₄)



Nach AAV2 wurden 42 mg (0.031 mmol, 1.0 Äquiv.) Cbz-OEG-GlycF₃₄ **48** mit 8 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) in 15 mL Essigsäureethylester umgesetzt. So konnten 34 mg (0.043 mmol, 93%) H₂N-OEG-GlycF₃₄ **44** als farbloser, amorpher Feststoff gewonnen werden.

C₃₄H₃₆F₃₄N₂O₆ (M = 1214.61 g/mol) [1214.20].

ESI-MS (positiv), m/z: 1215.19 ([M+H]⁺, ber.: 1215.21).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1215.2101 ([M+H]⁺, ber.: 1215.2109).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 3.76-3.71 (m, 2 H, H3-OEG), 3.69-3.60 (m, 11 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG, -OCH₂CH₂CH₂-, -CHCH₂O-), 3.59-3.52 (m, 5 H, H11-OEG, -CHCH₂O-, -OCH₂CH₂CH₂-), 3.46 (dd, 1 H, J_{H3a,H3b} = 10.4 Hz, J_{H3a/b,H2} = 6.2 Hz, -CHCH₂O-), 3.39-3.34 (m, 2 H, -CHCH₂NH-), 3.03 (t, 2 H, J_{CH₂,CH₂} = 5.1 Hz, H12-OEG), 2.49-2.44 (m, 2 H, H2-OEG), 2.37-2.17 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 1.90-1.83 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-).

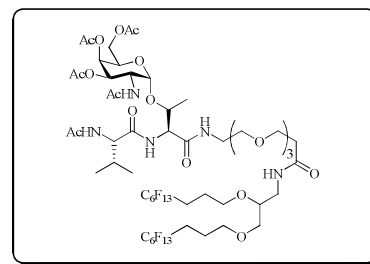
Sowohl die Amin-Protonen, als auch das Amid-Protonen befinden sich im H₂O-Signal des Lösungsmittels.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 174.14 (C=O_{Amid}), 78.84 (-CHCH₂O-), 72.51 (-CHCH₂O-), 71.54, 71.43, 71.22, 71.18 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.74, 70.77 (-OCH₂CH₂CH₂, C11-OEG), 69.57 (-OCH₂CH₂CH₂-), 68.29 (C3-OEG), 41.25, 41.06 (C12-OEG, -CHCH₂NH-), 37.48 (C2-OEG), 28.83 (t, ²J_{C,F} = 22.8 Hz, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 22.23 (t, ³J_{C,F} = 3.2 Hz, -OCH₂CH₂CH₂-), 21.85 (t, ³J_{C,F} = 3.1 Hz, -OCH₂CH₂CH₂-).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -84.33 (t, 6 F, J_{F,F} = 10.2 Hz, 2× -CF₃), -117.27- -117.49 (m, 4 F), -124.66 (bs, 4 F), -124.85 (bs, 8 F), -125.70 (m, 4 F), -126.32 (m, 4 F), -129.25 (m, 4 F).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9,9-tridecafluoronyloxy)propylamid (**59**)**

(AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-GlycF₂₆)



Zunächst wurden 200 mg (0.185 mmol, 1.0 Äquiv.) N₃-GlycF₂₆ **19** mit 15 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) und 106 mg (1.29 mmol, 7.0 Äquiv.) Natriumacetat in 30 mL Methanol/Essigsäureethylester (1:1) nach **AAV1** reduziert. Im weiteren Verlauf wurde das Rohprodukt dieser Reduktion mit 161 mg (0.204 mmol, 1.1 Äquiv.) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH **58**, 92 mg (0.222 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 34 mg (0.222 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBt und 0.045 mL (0.407 mmol, 2.2 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in einer Mischung aus 10 mL absol. Dichlormethan, 1 mL absol. *N,N*-Dimethylformamid und 20 mL absol. Tetrahydrofuran umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 118 mg (0.074 mmol, 40%) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-GlycF₂₆ **59** als farbloses Öl.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 19.3$ ($c = 1.00$, Aceton).

C₅₅H₇₃F₂₆N₅O₁₈ (M = 1586.15 g/mol) [1585.45].

ESI-MS (positiv), m/z : 1608.45 ([M+Na]⁺, ber.: 1608.44), 1624.50 ([M+K]⁺, ber.: 1624.42).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1608.4471 ([M+Na]⁺, ber.: 1608.4433).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 21.2 min, $\lambda = 212$ nm).

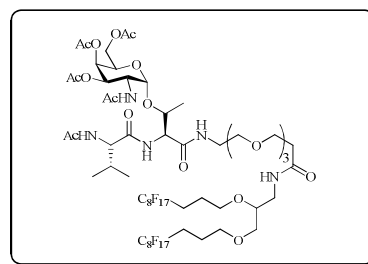
¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂O), δ (ppm): 7.65-7.62 (m, 2 H, NH_T, NH_{OEG}), 7.46 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 8.3 Hz, NH_V), 7.34 (t, 1 H, J_{NH,CH2} = 5.7 Hz, NH_{Glyc}), 7.02 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 9.4 Hz, NH_{GalNAc}), 5.36 (d, 1 H, J_{H4,H5} = 2.5 Hz, H4), 5.05 (dd, 1 H, J_{H3,H4} = 11.5 Hz, J_{H3,H4} = 3.3 Hz, H3), 4.98 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.6 Hz, H1), 4.56 (dd, 1 H, J_{T α ,NH} = 8.9 Hz, J_{T α ,T β} = 2.3 Hz, T ^{α}), 4.43 (ddd, 1 H, J_{H2,H3} = 11.7 Hz, J_{H2,NH} = 9.6 Hz, J_{H2,H1} = 3.6 Hz, H2), 4.38-4.34 (m, 2 H, T ^{β} {4.37}, H5 {4.35}), 4.24 (pt, 1 H, J_{V α ,NH} = J_{V α ,V β} = 7.9 Hz, V ^{α}), 4.13-4.03 (m, 2 H, H6a/b), 3.76-3.67 (m, 4 H, H3-OEG, -OCH₂CH₂CH₂-), 3.64-3.56 (m, 11 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG, -OCH₂CH₂CH₂-, -CHCH₂O-), 3.54-3.52 (m, 3 H, H11-OEG, -CHCH₂O-), 3.50-3.45 (m, 2 H, H12-OEG, -CHCH₂O-), 3.43-3.34 (m, 1 H, -CHCH₂NH-), 3.31-3.22 (m, 2 H, H12-OEG, -CHCH₂NH-), 2.43 (t, 2 H, J_{CH₂,CH₂} = 6.3 Hz, H2-OEG), 2.39-2.26 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 2.14-2.09 (m, 1 H, V ^{β}), 2.11, 1.99, 1.98, 1.97, 1.90 (s, 15 H, 5× CH₃(Ac)), 1.87-1.82 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 1.27 (d, 3 H, J_{T γ ,T β} = 6.4 Hz, T ^{γ}), 0.96 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.2 Hz, V ^{γ}), 0.95 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.3 Hz, V ^{γ}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): 172.57 (C=O_V), 171.64 (C=O_{OEG}), 171.18 (C=O_{V(Ac)}), 170.88 (C=O_{H4(Ac)}), 170.82 (C=O_T), 170.68 (C=O_{H3(Ac)}), 170.62 (C=O_{H6(Ac)}, C=O_{GalNAc}), 100.20 (C1), 78.53 (-CHCH₂O-), 77.30 (T^β), 72.34 (-CHCH₂O-), 71.11, 70.92 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.19 (-OCH₂CH₂CH₂-), 70.08 (C11-OEG), 69.46 (C3), 69.00 (-OCH₂CH₂CH₂-), 68.42 (C4), 68.05 (C3-OEG), 67.94 (C5), 62.88 (C6), 59.52 (V^α), 57.50 (T^α), 48.19 (C2), 40.73 (-CHCH₂NH-), 40.11 (C12-OEG), 37.44 (C2-OEG), 30.77 (V^β), 28.36 (t, $^2J_{\text{C,F}} = 22.0$ Hz, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 23.18, 22.79 (2× CH₃(NHAc)), 21.88, 21.50 (-OCH₂CH₂CH₂-), 20.73, 20.63, 20.60 (3× CH₃(Ac)), 19.92 (V^γ), 18.95 (T^γ), 18.69 (V^γ).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): -82.10- -82.17 (m, 6 F, 2× -CF₃), -115.00- -115.25 (m, 4 F), -122.88 (bs, 4 F), -123.86 (bs, 4 F), -124.33- -124.38 (m, 4 F), -127.16- -127.26 (m, 4 F).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecyloxy)propylamid (55)**

(AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-GlycF₃₄)



Die Reduktion der Azidkomponente wurde nach **AAV1** unter Verwendung von 15 mg Palladium auf Aktivkohle (10%), 193 mg (0.150 mmol, 1.0 Äquiv.) N₃-GlycF₃₄ **18** und 86 mg (1.05 mmol, 7.0 Äquiv.) Natriumacetat in 30 mL einer 1:1-Mischung aus Methanol und Essigsäureethylester durchgeführt. Anschließend wurde das Rohprodukt der Reduktion mit 129 mg (0.163 mmol, 1.1 Äquiv.) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH **58**, 73 mg (0.178 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 27 mg (0.178 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBt und 0.036 mL (0.326 mmol, 2.2 Äquiv.) *N,N'*-Dimethylmorpholin in einer Mischung aus 10 mL absol. Dichlormethan, 1 mL absol. *N,N'*-Dimethylformamid und 20 mL absol. Tetrahydrofuran umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 80 mg (0.044 mmol, 30%) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-GlycF₃₄ **55** als farbloses Lyophilisat.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 24.9$ (c = 1.00, Aceton).

C₅₉H₇₃F₃₄N₅O₁₈ (M = 1786.18 g/mol) [1785.44].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1808.46 ([M+Na]⁺, ber.: 1808.43), 1824.47 ([M+K]⁺, ber.: 1824.40).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1808.4330 ([M+Na]⁺, ber.: 1808.4305).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 24.3 min, λ = 212 nm).

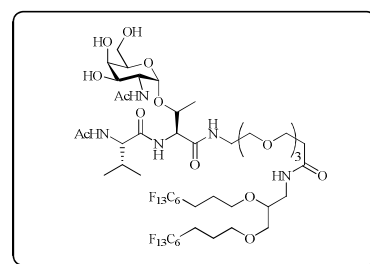
¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂O, COSY), δ (ppm): 7.65-7.63 (m, 2 H, NH_T, NH_{OEG}), 7.47 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 8.3 Hz, NH_V), 7.35 (t, 1 H, J_{NH,CH2} = 5.7 Hz, NH_{Glyc}), 7.02 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 9.4 Hz, NH_{GalNAc}), 5.36 (d, 1 H, J_{H4,H5} = 2.4 Hz, H4), 5.05 (dd, 1 H, J_{H3,H4} = 11.5 Hz, J_{H3,H4} = 3.2 Hz, H3), 4.98 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.6 Hz, H1), 4.56 (dd, 1 H, J_{Tα,NH} = 8.9 Hz, J_{Tα,Tβ} = 2.2 Hz, T^α), 4.43 (ddd, 1 H, J_{H2,H3} = 11.7 Hz, J_{H2,NH} = 9.6 Hz, J_{H2,H1} = 3.5 Hz, H2), 4.38-4.34 (m, 2 H, T^β {4.37}, H5 {4.35}), 4.24 (pt, 1 H, J_{Vα,NH} = J_{Vα,Vβ} = 7.9 Hz, V^α), 4.13-4.03 (m, 2 H, H6a/b), 3.75-3.68 (m, 4 H, H3-OEG, -OCH₂CH₂CH₂-), 3.61-3.56 (m, 11 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG, -OCH₂CH₂CH₂-, -CHCH₂O-), 3.54-3.52 (m, 3 H, H11-OEG, -CHCH₂O-), 3.49-3.45 (m, 2 H, H12-OEG, -CHCH₂O-), 3.42-3.35 (m, 1 H, -CHCH₂NH-), 3.31-3.24 (m, 2 H, H12-OEG, -CHCH₂NH-), 2.43 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.3 Hz, H2-OEG), 2.39-2.26 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 2.14-2.09 (m, 1 H, V^β), 2.11, 1.99, 1.98, 1.97, 1.90 (s, 15 H, 5× CH₃(Ac)), 1.87-1.82 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 1.27 (d, 3 H, J_{Tγ,Tβ} = 6.4 Hz, T^γ), 0.96 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.4 Hz, V^γ), 0.95 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.0 Hz, V^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, (CD₃)₂O, HSQC), δ (ppm): 172.57 (C=O_V), 171.66 (C=O_{OEG}), 171.19 (C=O_{V(Ac)}), 170.89 (C=O_{H4(Ac)}), 170.83 (C=O_T), 170.69 (C=O_{H3(Ac)}), 170.62 (C=O_{H6(Ac)}), C=O_{GalNAc}), 100.20 (C1), 78.55 (-CHCH₂O-), 77.29 (T^β), 72.40 (-CHCH₂O-), 71.11, 70.91 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.17 (-OCH₂CH₂CH₂-), 70.09 (C11-OEG), 69.43 (C3), 68.99 (-OCH₂CH₂CH₂-), 68.42 (C4), 68.05 (C3-OEG), 67.94 (C5), 62.88 (C6), 59.54 (V^α), 57.50 (T^α), 48.18 (C2), 40.70 (-CHCH₂NH-), 40.11 (C12-OEG), 37.44 (C2-OEG), 30.76 (V^β), 28.37 (t, ²J_{C,F} = 22.1 Hz, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 23.18, 22.79 (2× CH₃(NHAc)), 21.87, 21.50 (-OCH₂CH₂CH₂-), 20.73, 20.63, 20.60 (3× CH₃(Ac)), 19.93 (V^γ), 18.95 (T^γ), 18.69 (V^γ).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, (CD₃)₂O), δ (ppm): -82.10 (t, 6 F, J_{F,F} = 10.1 Hz, 2× -CF₃), -115.00-115.22 (m, 4 F), -122.67 (bs, 4 F), -122.86 (bs, 8 F), -123.69 (m, 4 F), -124.29 (m, 4 F), -127.18 (m, 4 F).

N-Acetyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluorononyloxy)propylamid (61)

(AcVal-Thr(αGalNAc)-OEG-GlycF₂₆)



Nach AAV3 wurden 90 mg (0.057 mmol, 1.0 Äquiv.) AcVal-Thr(αAc₃GalNAc)-OEG-GlycF₂₆ **59** in 25 mL Methanol umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC

lieferte 66 mg (0.046 mmol, 80%) AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG-GlycF₂₆ **61** als farbloses Lyophilisat.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 30.3$ (c = 1.00, Aceton).

C₄₉H₆₇F₂₆N₅O₁₅ (M = 1460.04 g/mol) [1459.42].

ESI-MS (positiv), m/z: 1482.39 ([M+Na]⁺, ber.: 1482.41).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1482.4110 ([M+Na]⁺, ber.: 1482.4116).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 19.1 min, λ = 212 nm).

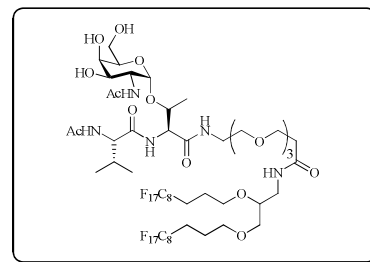
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 4.88 (s, 8 H, alle OH und NH), 4.84 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.8 Hz, H1), 4.52 (d, 1 H, J_{T α ,T β} = 2.1 Hz, T ^{α}), 4.26-4.22 (m, 2 H, H2, V ^{α}), 4.20-4.16 (m, 1 H, T ^{β}), 3.91-3.88 (m, 2 H, H4, H5), 3.79 (dd, 1 H, J_{H3,H4} = 10.9 Hz, J_{H3,H4} = 2.9 Hz, H3), 3.75-3.70 (m, 4 H, H3-OEG, H6a/b), 3.67-3.62 (m, 8 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG), 3.60-3.57 (m, 3 H, -CHCH₂O-, -OCH₂CH₂CH₂-), 3.56-3.51 (m, 4 H, H11-OEG -OCH₂CH₂CH₂-, -CHCH₂O-, H12-OEG), 3.48-3.44 (m, 2 H, H12-OEG, -CHCH₂O-), 3.38-3.25 (m, 2 H, -CHCH₂NH-), 2.47 (t, 2 H, J_{CH₂,CH₂} = 6.2 Hz, H2-OEG), 2.35-2.20 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 2.12-2.07 (m, 1 H, V ^{β}), 2.10 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 2.01 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 1.90-1.82 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 1.26 (d, 3 H, J_{T γ ,T β} = 6.4 Hz, T ^{γ}), 1.00 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.7 Hz, V ^{γ}), 0.99 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.7 Hz, V ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 174.23, 174.14, 174.07, 173.52, 171.88 (5× C=O), 100.95 (C1), 78.82 (-CHCH₂O-), 78.25 (T ^{β}), 72.93 (C5 o. C4), 72.47 (-CHCH₂O-), 71.51, 71.47, 71.27 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.74 (-OCH₂CH₂CH₂-), 70.38 (C11-OEG, C3), 70.28 (C4 o. C5), 69.58 (-OCH₂CH₂CH₂-), 68.28 (C3-OEG), 62.71 (C6), 60.72 (V ^{α}), 58.01 (T ^{α}), 51.51 (C2), 41.23 (-CHCH₂NH-), 40.48 (C12-OEG), 37.58 (C2-OEG), 31.28 (V ^{β}), 28.80 (t, ²J_{C,F} = 22.3 Hz, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 23.21, 22.38 (2× CH₃(NHAc)), 22.20, 21.83 (-OCH₂CH₂CH₂-), 19.94 (V ^{γ}), 19.26 (T ^{γ}), 18.97 (V ^{γ}).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CD₃OD), δ (ppm): -84.31- -84.37 (m, 6 F, 2× -CF₃), -117.19- -117.49 (m, 4 F), -124.84 (bs, 4 F), -125.82 (bs, 4 F), -126.29- -126.38 (m, 4 F), -129.20- -129.30 (m, 4 F).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecyloxy)propylamid (**62**)**

(AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG-GlycF₃₄)



In 25 mL Methanol wurden 70 mg (0.039 mmol, 1.0 Äquiv.) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-GlycF₃₄ **55** gelöst und nach **AAV3** umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semi-präparativer RP-HPLC lieferte 50 mg (0.030 mmol, 77%) AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG-GlycF₃₄ **62** als farbloses Lyophilisat.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 22.1$ (c = 1.00, Aceton).

C₅₃H₆₇F₃₄N₅O₁₅ (M = 1660.07 g/mol) [1659.41].

ESI-MS (positiv), m/z: 1682.38 ([M+Na]⁺, ber.: 1682.40).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1682.3970 ([M+Na]⁺, ber.: 1682.3988).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 22.9 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 4.88 (s, 8 H, alle OH und NH), 4.84 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.7 Hz, H1), 4.52 (d, 1 H, J_{T α ,T β} = 2.2 Hz, T ^{α}), 4.26-4.22 (m, 2 H, H2 {4.25}, V ^{α} {4.23}), 4.20-4.16 (m, 1 H, T ^{β}), 3.91-3.88 (m, 2 H, H4, H5), 3.79 (dd, 1 H, J_{H3,H4} = 10.9 Hz, J_{H3,H4} = 2.9 Hz, H3), 3.75-3.70 (m, 4 H, H3-OEG, H6a/b), 3.67-3.62 (m, 8 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG), 3.60-3.58 (m, 3 H, -CHCH₂O-, -OCH₂CH₂CH₂-), 3.57-3.55 (m, 2 H, H11-OEG), 3.53-3.51 (m, 4 H, -OCH₂CH₂CH₂-, -CHCH₂O-, H12-OEG), 3.48-3.44 (m, 2 H, H12-OEG, -CHCH₂O-), 3.37-3.25 (m, 2 H, -CHCH₂NH-), 2.47 (t, 2 H, J_{CH₂,CH₂} = 6.3 Hz, H2-OEG), 2.33-2.19 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 2.12-2.07 (m, 1 H, V ^{β}), 2.08 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 2.01 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 1.90-1.82 (m, 4 H, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 1.26 (d, 3 H, J_{T γ ,T β} = 6.4 Hz, T ^{γ}), 1.01 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.7 Hz, V ^{γ}), 1.00 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.7 Hz, V ^{γ}).

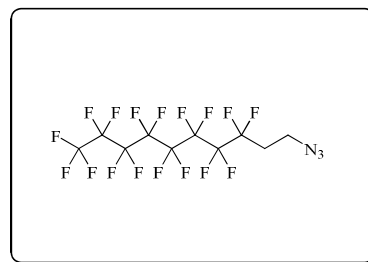
¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, HSQC), δ (ppm): 174.25, 174.16, 174.09, 173.53, 171.89 (5× C=O), 100.96 (C1), 78.87 (-CHCH₂O-), 78.26 (T ^{β}), 72.94 (C5 o. C4), 72.56 (-CHCH₂O-), 71.53, 71.48, 71.29 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.74 (-OCH₂CH₂CH₂-), 70.40 (C11-OEG, C3), 70.29 (C4 o. C5), 69.59 (-OCH₂CH₂CH₂-), 68.30 (C3-OEG), 62.73 (C6), 60.73 (V ^{α}), 58.02 (T ^{α}), 51.52 (C2), 41.20 (-CHCH₂NH-), 40.50 (C12-OEG), 37.60 (C2-OEG), 31.29 (V ^{β}), 28.82 (t, ²J_{C,F} = 22.1 Hz, 2× -OCH₂CH₂CH₂-), 23.22, 22.39 (2× CH₃(NHAc)), 22.22, 21.84 (-OCH₂CH₂CH₂-), 19.94 (V ^{γ}), 19.25 (T ^{γ}), 18.98 (V ^{γ}).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, CD_3OD), δ (ppm): -84.33 (t, 6 F, $J_{\text{F,F}} = 10.2$ Hz, $2\times -\text{CF}_3$), -117.22-117.49 (m, 4 F), -124.65 (bs, 4 F), -124.84 (bs, 8 F), -125.68 (m, 4 F), -126.30 (m, 4 F), -129.25 (m, 4 F).

6.8 Synthese des Lysinankersystems

10-Azido-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluorodecan (**64**)^[171]

Es wurden 8.0 g (13.94 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Iod-1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorodecan **63** mit Hilfe eines Ultraschallbades in 100 mL *N,N'*-Dimethylformamid gelöst. Unter



Lichtausschluss wurden 5.44 g (84.0 mmol, 6.0 Äquiv.) Natriumazid hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde 3 d bei Raumtemp. gerührt. Nach Verdünnen mit 100 mL Diethylether und 100 mL Wasser und anschließender Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Nach zweimaligem Waschen der vereinigten organischen Phasen mit 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung wurde diese mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Abtrennung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer wurden 6.07 g (12.40 mmol, 89%) 10-Azido-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluorodecan **64** als gelbes Öl gewonnen.

$R_f = 0.68$ (CH/EE, 9:1).

$\text{C}_{10}\text{H}_4\text{F}_{17}\text{N}_3$ (M = 489.13 g/mol) [489.01].

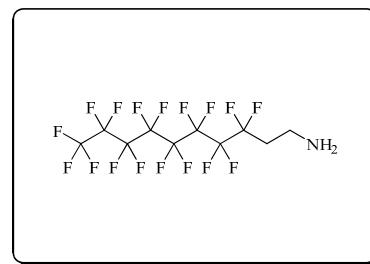
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.62 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{N}_3$), 2.50-2.25 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 43.47 (t, $^3J_{\text{C,F}} = 4.5$ Hz, $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 30.98 (t, $^2J_{\text{C,F}} = 21.9$ Hz, $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): -81.02 (t, 3 F, $J_{\text{F,F}} = 17.9$ Hz, $-\text{CF}_3$), -113.92-114.23 (m, 2 F, $-\text{CF}_2\text{CH}_2-$), -121.79 (bs, 2 F), -122.03 (bs, 4 F), -122.85 (bs, 2 F), -123.61 (bs, 2 F), -126.23-126.35 (m, 2 F, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$).

10-Amino-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluordecane (65)^[171]

In einem Autoklaven wurden zu 200 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) 5.94 g (12.14 mmol, 1.0 Äquiv.) 10-Azido-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluordecane **64**, gelöst in 100 mL Diethylether, gegeben. Die Reaktionslösung wurde bei einem Wasserstoffdruck von 8 bar 3 d bei Raumtemp. gerührt, durch *Hyflo Super Cel* filtriert und der Filterrückstand wurde mit 200 mL Diethylether gewaschen. Abschließend wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt, so dass 4.87 g (10.56 mmol, 87%) 10-Amino-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluordecane **65** als gelbes Wachs erhalten wurden.



$R_f = 0.11$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$, 19:1:0.1).

$\text{C}_{10}\text{H}_6\text{F}_{17}\text{N}$ (M = 463.97 g/mol) [463.02].

ESI-MS (positiv), m/z : 463.97 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 464.03).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.06 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 7.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2.37-2.15 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 1.28 (bs, 2 H, $-\text{NH}_2$).

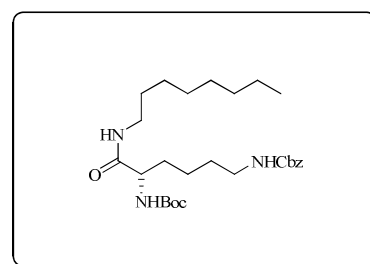
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 34.85 (t, $^2J_{\text{C,F}} = 21.2$ Hz, $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 34.44 (t, $^3J_{\text{C,F}} = 4.7$ Hz, $-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): -81.12 (t, 3 F, $J_{\text{F,F}} = 10.0$ Hz, $-\text{CF}_3$), -113.75- -113.93 (m, 2 F, $-\text{CF}_2\text{CH}_2-$), -121.90 (bs, 2 F), -122.13 (bs, 4 F), -122.94 (bs, 2 F), -123.83 (bs, 2 F), -126.33- -126.43 (m, 2 F, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$).

(S)-Benzyl[5-tert-butylcarbamoyl-6-(octylamino)-6-oxohexyl]-carbamate (68)

(Boc-Lys(Z)-O-Octyl)

Zur Darstellung des Aktivesters wurden 3.80 g (9.98 mmol, 1.1 Äquiv.) N_α -Boc- N_ϵ -Z-Lysin **66**, 3.50 g (10.89 mmol, 1.2 Äquiv.) TBTU und 1.47 g (10.89 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydroxybenzotriazol in 30 mL absol. Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert. Anschließend wurden 3.45 mL (20.87 mmol, 2.3 Äquiv.) Diisopropylethylamin zugesetzt und die Mischung wurde 60 min bei Raumtemp. unter einer Argonatmosphäre gerührt. Nachdem der nun klaren Reaktionslösung 1.5 mL (9.08 mmol, 1.0 Äquiv.) Octylamin **67** zugesetzt wurden, wurde diese 6 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden noch weitere 13 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Verdünnen mit 120 mL



Dichlormethan wurde zweimal mit je 150 mL 1 M Salzsäure-Lösung ausgeschüttelt, bevor mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt wurde. Das so erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH/EE, 3:1 → 1:1) und es wurden 4.42 g (8.99 mmol, 99%) Boc-Lys(Z)-O-Octyl **68** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert.

$R_f = 0.10$ (CH/EE, 3:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -9.51$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_5$ (M = 491.66 g/mol) [491.34].

ESI-MS (positiv), m/z : 514.33 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 514.32), 392.30 ($[\text{M}-\text{Boc}+2\text{H}]^+$, ber.: 392.29), 530.31 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 530.30), 492.36 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 492.34).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 514.3234 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 514.3257).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/ H_2O , 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 8.7$ min, $\lambda = 212$ nm).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 7.32-7.27 (m, 5 H, H_{Ar}), 6.49 (bs, 1 H, NH_{Amid}), 5.35 (d, 1 H, $J_{\text{NH,CH}} = 7.6$ Hz, NH_{Boc}), 5.10 (bs, 1 H, $\text{NH}_{\text{Carbamat}}$), 5.06 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.07-3.97 (bm, 1 H, $-\text{NHCHCO}$), 3.20-3.13 (m, 4 H, $2 \times -\text{NHCH}_2-$), 1.81-1.73 (m, 1 H, $-\text{NHCHCH}_2-$), 1.63-1.54 (m, 1 H, $-\text{NHCHCH}_2-$), 1.51-1.41 (m, 4 H, $2 \times -\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 1.40 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.35-1.33 (m, 2 H, $-\text{NHCHCH}_2\text{CH}_2-$), 1.23 (bs, 10 H, $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 0.85 (t, 3 H, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.86$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$).

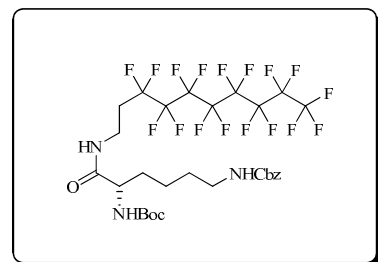
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , HSQC), δ (ppm): 172.09 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Amid}}$), 156.68, 155.94 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Carbamat}}$), 136.66 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$), 128.54, 128.12 ($5 \times \text{C}_{\text{Ar}}$), 79.92 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.63 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 54.40 ($-\text{NHCHCO}$), 40.50, 39.54 ($-\text{NHCH}_2-$), 32.09 ($-\text{NHCHCH}_2-$), 31.84 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29.56, 29.54 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 29.30, 29.25 ($-(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 28.38 ($3 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.93 ($-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 22.69, 22.62 ($-\text{NHCHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.15 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$).

(S)-Benzyl[5-tert-butylcarbamoyl-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluordecylamino)-6-oxohexyl]-carbamate (69)

(Boc-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇))

Zur Darstellung des Aktivesters wurden 4.52 g (11.88 mmol,

1.1 Äquiv.) $\text{N}_\alpha\text{-Boc-N}_\epsilon\text{-Z-Lysin 66}$, 4.16 g (12.96 mmol, 1.2 Äquiv.) TBTU und 1.98 g (12.96 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydroxybenzotriazol in 40 mL absol. Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert. Diese Suspension wurde daraufhin mit 3.9 mL (23.75 mmol, 2.3 Äquiv.)



Diisopropylethylamin versetzt und 60 min bei Raumtemp. unter einer Argonatmosphäre gerührt. Nachdem zu der nun klaren Reaktionslösung 5.0 g (10.80 mmol, 1.0 Äquiv.) 10-Amino-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptadecafluordecane **65**, gelöst in 20 mL absol. Dichlormethan, gegeben wurden, wurde diese 5 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden weitere 13 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Verdünnen mit 150 mL Dichlormethan wurde zweimal mit 200 mL 1 M Salzsäure-Lösung ausgeschüttelt, bevor mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert wurde. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt wurde und das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH/EE, 1:1). Dabei konnten 7.62 g (9.18 mmol, 85%) Boc-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇) **69** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert werden.

$R_f = 0.51$ (CH/EE, 1:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -4.16$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₂₉H₃₂F₁₇N₃O₅ (M = 825.55 g/mol) [825.21].

ESI-MS (positiv), m/z : 1673.46 ([2M+Na]⁺, ber.: 1673.40), 848.25 ([M+Na]⁺, ber.: 848.20), 826.30 ([M+H]⁺, ber.: 826.21), 864.27 ([M+K]⁺, ber.: 864.17).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 848.1983 ([M+Na]⁺, ber.: 848.1968).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 16.5$ min, $\lambda = 212$ nm).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 7.37-7.26 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.06 (s, 2 H, CH₂-Ar), 3.94 (dd, 1 H, $J_{CH,CH2a} = 8.8$ Hz, $J_{CH,CH2b} = 5.0$ Hz, -NHCHCO), 3.57-3.45 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.11 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 6.8$ Hz, -NHCH₂CH₂CH₂-), 2.50-2.33 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 1.75-1.68 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.63-1.56 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.54-1.47 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-), 1.43 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.41-1.34 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-).

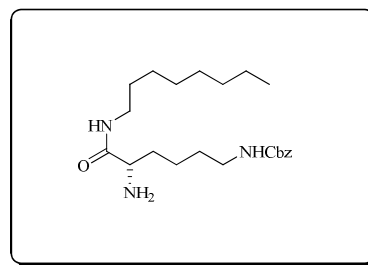
Die drei Signale der Amid- bzw. Carbamat-Protonen befinden sich aufgrund von Austauschprozessen unter dem MeOH-Signal.

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 175.59 (C=O_{Amid}), 159.00, 157.92 (C=O_{Carbamat}), 138.46 (CH₂-C_{Ar}), 129.45, 128.94, 128.76 (5× C_{Ar}), 80.66 (C(CH₃)₃), 67.34 (CH₂-Ar), 56.21 (-NHCHCO), 41.38 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 32.74 (-NHCHCH₂-, -NHCH₂CH₂CF₂-), 31.11 (t, ²J = 21.1 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 30.49 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 28.67 (3× C(CH₃)₃), 24.11 (-NHCHCH₂CH₂-).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CD₃OD), δ (ppm): -83.81 (t, 3 F, $J_{F,F} = 10.1$ Hz, -CF₃), -116.68- -116.76 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -124.10 (bs, 2 F), -124.34 (bs, 4 F), -125.18 (bs, 2 F), -126.12 (bs, 2 F), -128.69- -128.75 (m, 2 F, -CF₂CF₃).

**(S)-Benzyl[5-amino-6-(octylamino)-6-oxohexyl]-carbammat
(70)**

(H₂N-Lys(Z)-O-Octyl)



Nachdem 1.74 g (3.54 mmol, 1.0 Äquiv.) Boc-Lys(Z)-O-Octyl **68** in 30 mL Dichlormethan gelöst worden waren, wurden 0.5 mL Anisol zugegeben. Anschließend wurde mit 5 mL

Trifluoressigsäure versetzt und die Reaktionslösung wurde bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Es folgte das Einengen der Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer, wobei verbliebene Lösungsmittelreste durch nachfolgende zweimalige azeotrope Destillation mit Toluol entfernt wurden. Das Rohprodukt wurde im Eisbad gekühlt und mit 50 mL wässriger Ammoniaklösung versetzt. Die erhaltene Mischung wurde dreimal mit je 30 mL Diethylether/Dichlormethan (10:1) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden je einmal mit 40 mL Wasser und 40 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung mit Magnesiumsulfat, Filtration und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer konnten 1.37 g (3.50 mmol, 99%) H₂N-Lys(Z)-O-Octyl **70** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert werden, der ohne weitere Reinigungsschritte in der folgenden Reaktion eingesetzt wurde.

$R_f = 0.37$ (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -9.98$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₂₂H₃₇N₃O₃ (M = 391.55 g/mol) [391.28].

ESI-MS (positiv), m/z: 392.29 ([M+H]⁺, ber.: 392.29), 414.29 ([M+Na]⁺, ber.: 414.27).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 392.2925 ([M+H]⁺, ber.: 392.2913).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 3.4 min, λ = 212 nm).

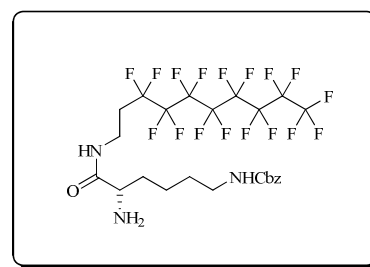
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.35-7.28 (m, 5 H, H_{Ar}), 7.26 (bs, 1 H, NH_{Amid}), 5.08 (s, 2 H, CH₂-Ar), 4.92-4.84 (m, 1 H, NH_{Carbammat}), 3.31 (dd, 1 H, J_{CH,CH2a} = 7.9 Hz, J_{CH,CH2b} = 4.3 Hz, -NHCHCO), 3.25-3.14 (m, 4 H, 2× -NHCH₂-), 1.87 (bs, 2 H, -NH₂), 1.89-1.76 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.57-1.45 (m, 5 H, 2× -NHCH₂CH₂- und -NHCHCH₂-), 1.45-1.33 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-), 1.33-1.20 (m, 10 H, -(CH₂)₅CH₃), 0.87 (t, 3 H, J_{CH₃,CH₂} = 6.9 Hz, -CH₂CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 174.85 (C=O_{Amid}), 156.60 (C=O_{Carbammat}), 136.76 (CH₂-C_{Ar}), 128.63, 128.20 (5× C_{Ar}), 68.70 (CH₂-Ar), 55.17 (-NHCHCO), 40.80, 39.16 (-NHCH₂-), 34.77 (-NHCHCH₂-), 31.91 (-CH₂CH₂CH₃), 29.91, 29.75 (-NHCH₂CH₂-), 29.37, 29.33 (-CH₂)₂(CH₂)₂CH₃), 27.07 (-CH₂(CH₂)₄CH₃), 22.95, 22.75 (-NHCHCH₂CH₂-, -CH₂CH₃) 14.21 (-CH₂CH₃).

(S)-Benzyl[5-amino-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluordecylamino)-6-oxohexyl]-carbamate (71)

(H₂N-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇))

Nachdem 7.00 g (8.48 mmol, 1.0 Äquiv.) Boc-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇) **69** in 100 mL Dichlormethan gelöst worden waren, wurden 1.0 mL Anisol zugegeben. Anschließend wurde mit



10 mL Trifluoressigsäure versetzt und die Reaktionslösung bei Raumtemp. über Nacht gerührt. Die Lösungsmittel wurden bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt, wobei verbliebene Lösungsmittelreste durch nachfolgende zweimalige azeotrope Destillation mit Toluol entfernt wurden. Das Rohprodukt wurde im Eisbad gekühlt und mit 100 mL wässriger Ammoniaklösung versetzt. Die erhaltene Mischung wurde dreimal mit je 75 mL Diethylether/Dichlormethan (5:1) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils mit 100 mL Wasser und 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknung mit Magnesiumsulfat, Filtration und Entfernen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer konnten 5.66 g (7.80 mmol, 92%) H₂N-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇) **71** als bräunliches Wachs isoliert werden, das ohne weitere Reinigungsschritte in der folgenden Reaktion eingesetzt wurde.

$R_f = 0.13$ (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 3.47$ (c = 1.00, MeOH).

C₂₄H₂₄F₁₇N₃O₃ (M = 725.44 g/mol) [725.15].

ESI-MS (positiv), m/z: 1451.39 ([2M+H]⁺, ber.: 1451.32), 726.17 ([M+H]⁺, ber.: 726.16).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 726.1623 ([M+H]⁺, ber.: 726.1624).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 5.7 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 7.35-7.30 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.06 (s, 2 H, CH₂-Ar), 3.62 (pt, 1 H, J_{CH,CH2} = 6.2 Hz, -NHCHCO), 3.55 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.9 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.12 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.9 Hz, -NHCH₂CH₂CH₂-), 2.54-2.37 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 1.84-1.65 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂-), 1.58-1.48 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-), 1.44-1.35 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-).

Die vier ¹H-Signale der Carbamat-Protonen bzw. der Amin-Protonen befinden sich aufgrund von Austauschprozessen unter dem MeOH-Signal.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 172.84 (C=O_{Amid}), 159.03 (C=O_{Carbamate}), 138.43 (CH₂-C_{Ar}), 129.46, 128.97, 128.75 (5× C_{Ar}), 67.37 (CH₂-Ar), 54.92 (-NHCHCO), 41.28

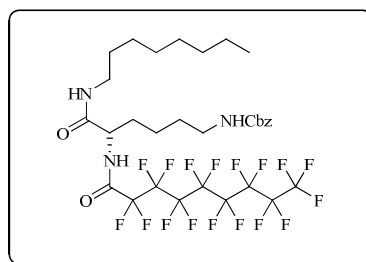
(-NHCH₂CH₂CH₂-), 33.37 (-NHCHCH₂-), 32.85 (t, ³J_{C,F} = 4.7 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 31.27 (t, ²J_{C,F} = 21.5 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 30.56 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 23.28 (-NHCHCH₂CH₂-).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CD₃OD), δ (ppm): -83.82 (t, 3 F, J_{F,F} = 10.2 Hz, -CF₃), -116.65- -116.73 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -124.13 (bs, 2 F), -124.34 (bs, 4 F), -125.18 (bs, 2 F), -126.06 (bs, 2 F), -128.68- -128.77 (m, 2 F, -CF₂CF₃).

(S)-Benzyl-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluorononanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylcarbammat (74)

(R_F-Lys(Z)-O-Octyl)

Zu 1.5 g (3.23 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Heptafluorononanansäure **72** wurden im Stickstoff-



gegenstrom 0.40 mL (5.49 mmol, 1.7 Äquiv.) Thionylchlorid und anschließend 0.08 mL (0.93 mmol, 0.3 Äquiv.) Pyridin gegeben. Nach 90minütigem Erhitzen des Ölbad auf 75 °C wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemp. abgekühlt. Nach Phasenseparation wurde die untere, fluorige Phase abgetrennt und am Rotationsverdampfer bei 100 mbar eingengt, so dass 1.40 g (2.91 mmol, 90%) Heptafluorononanansäurechlorid **73** als klare Flüssigkeit erhalten wurden.

Im Eisbad wurde eine Lösung von 1.00 g (2.55 mmol, 1.0 Äquiv.) H₂N-Lys(Z)-O-Octyl **70** in 30 mL absol. Dichlormethan gekühlt und mit 0.52 mL (3.06 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt, bevor tropfenweise 1.29 g (2.68 mmol, 1.05 Äquiv.) des frisch hergestellten 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Heptafluorononanansäurechlorids **73** zugegeben wurden. Unter langsamem Erwärmen auf Raumtemp. wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Anschließend entfernte man das Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer und reinigte das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (CH/EE, 2:1). So konnten 1.80 g (2.14 mmol, 84%) R_F-Lys(Z)-O-Octyl **74** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert werden.

R_f = 0.71 (CH/EE, 1:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -1.29$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₃₁H₃₆F₁₇N₃O₄ (M = 837.61 g/mol) [837.24].

ESI-MS (positiv), m/z: 1697.40 ([2M+H]⁺, ber.: 1697.48), 860.20 ([M+Na]⁺, ber.: 860.23), 838.23 ([M+H]⁺, ber.: 838.25), 876.23 ([M+K]⁺, ber.: 876.21).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 838.2523 ([M+H]⁺, ber.: 838.2513).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 18.7 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.46 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 7.4 Hz, NH_{Amid(F)}), 7.39-7.29 (m, 5 H, H_{Ar}), 6.13 (bs, 1 H, NH_{Amid}), 5.08 (s, 2 H, CH₂Ar), 4.88 (t, 1 H, J_{NH,CH2} = 5.9 Hz, NH_{Carbamat}), 4.40 (dd, 1 H, J_{CH,CH2a} = 12.7 Hz, J_{CH,CH2b} = 7.2 Hz, -NHCHCO), 3.31-3.11 (m, 4 H, 2× -NHCH₂-), 1.96-1.87 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.81-1.71 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.57-1.47 (m, 4 H, 2× -NHCH₂CH₂-), 1.38-1.30 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-), 1.30-1.26 (m, 10 H, -(CH₂)₅CH₃), 0.87 (t, 3 H, J_{CH3,CH2} = 6.6 Hz, -CH₂CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.73 (C=O_{Amid}), 156.86 (C=O_{Carbamat}), 136.62 (CH₂-C_{Ar}), 128.67, 128.29, 128.12 (5× C_{Ar}), 66.85 (-CH₂Ar), 53.72 (-NHCHCO), 40.24, 40.02 (2× -NHCH₂-), 32.02, 31.90 (-CH₂CH₂CH₃, -NHCHCH₂-), 29.46 (2× -NHCH₂CH₂-), 29.30 (2× -(CH₂)₂(CH₂)₂CH₃), 26.97 (-CH₂(CH₂)₄CH₃), 22.74, 22.14 (-NHCHCH₂CH₂-, -CH₂CH₃), 14.16 (-CH₂CH₃).

Das Signal des Carbonylkohlenstoffs der Perfluoralkylkette ist im ¹³C-NMR-Spektrum nicht zu sehen.

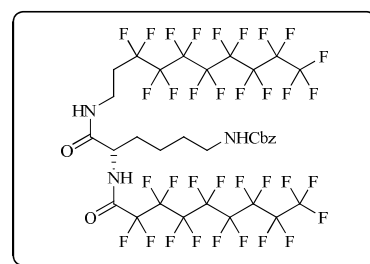
¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -81.12 (t, 3 F, J_{F,F} = 9.8 Hz, -CF₃), -119.92 (m, 2 F), -121.86 (bs, 2 F), -122.22 (bs, 4 F), -122.69 (bs, 2 F), -123.05 (bs, 2 F), -126.45 (m, 2 F, -CF₂CF₃).

(S)-Benzyl-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluorononanamido)-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluorodecylamino)-6-oxohexylcarbammat (75)

(R_F-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇))

Zu 4.0 g (8.62 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Heptafluorononansäure **72** wurden im Stickstoffgegenstrom 1.06 mL (14.65 mmol, 1.7 Äquiv.) Thionylchlorid und 0.21 mL (2.59 mmol, 0.3 Äquiv.) Pyridin gegeben. Nach 90minütigem Erhitzen des Ölbades auf 75 °C wurde die Reaktionsmischung abgekühlt. Daraufhin erfolgte eine Phasenseparation, wobei die untere, fluorige Phase abgetrennt und am Rotationsverdampfer bei 100 mbar eingengt wurde. Dabei wurden 2.98 g (6.18 mmol, 72%) Heptafluorononansäurechlorid **73** als klare Flüssigkeit erhalten.

Im Eisbad wurde eine Lösung von 2.55 g (3.51 mmol, 1.0 Äquiv.) H₂N-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇) **71** in 80 mL absol. Dichlormethan gekühlt und zunächst mit 0.7 mL (4.21 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt, bevor dann tropfenweise 2.056 g (4.22 mmol, 1.2 Äquiv.) frisch



hergestelltes 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Heptadecafluorononansäurechlorid **73** zugegeben wurden. Unter langsamem Erwärmen auf Raumtemp. wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Man entfernte anschließend das Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer und reinigte das Rohprodukt durch Umkristallisation aus Methanol. Es konnten so 3.01 g (2.57 mmol, 75%) R_F-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇) **75** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten werden.

$R_f = 0.24$ (CH/EE, 2:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -3.79$ (c = 1.00, MeOH).

C₃₃H₂₃F₃₄N₃O₄ (M = 1171.50 g/mol) [1171.11].

ESI-MS (positiv), m/z: 2365.46 ([2M+Na]⁺, ber.: 2365.22), 1194.25 ([M+Na]⁺, ber.: 1194.10).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1194.1053 ([M+H]⁺, ber.: 1194.1043).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 22.7 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 7.34-7.25 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.06 (s, 2 H, CH₂-Ar), 4.38 (dd, 1 H, J_{CH,CH2a} = 8.7 Hz, J_{CH,CH2b} = 6.1 Hz, -NHCHCO), 3.58 (dt, 1 H, J_{CH2a,CH2b} = 13.9 Hz, J_{CH2a/b,CH2} = 6.9 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.46 (dt, 1 H, J_{CH2b,CH2a} = 13.9 Hz, J_{CH2b/a,CH2} = 6.9 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.12 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 7.0 Hz, -NHCH₂-), 2.47-2.34 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 1.88-1.72 (m, 2 H, -NHCHCH₂-), 1.57-1.49 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-), 1.42-1.32 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, DEPT), δ (ppm): 172.86 (C=O_{Amid}), 159.32 (C=O_{Amid(F)}), 159.00 (C=O_{Carbamat}), 138.45 (CH₂-C_{Ar}), 129.43, 128.92, 128.72 (5× C_{Ar}), 67.39 (-CH₂Ar), 55.48 (-NHCHCO), 41.40 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 32.89 (-NHCH₂CH₂CF₂-), 31.89 (-NHCHCH₂-), 31.32 (t, ²J_{C,F} = 21.3 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 30.37 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 23.99 (-NHCHCH₂CH₂-).

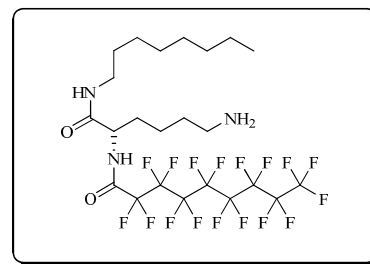
Das Signal des Carbonylkohlenstoffs der Perfluoralkylkette ist im ¹³C-NMR-Spektrum nicht zu sehen.

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -83.69 (t, 6 F, J_{F,F} = 10.2 Hz, 2× -CF₃), -116.37-116.54 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -121.77 (dt, 2 F, J_{F₂,NH} = 26.1 Hz, J_{F₂,F₂} = 12.7 Hz, R_F), -123.56 (bs, 2 F, R_F), -123.86 (bs, 2 F), -124.05 (bs, 8 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -124.72 (m, 2 H, R_F), -124.91 (bs, 4 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -125.94 (bs, 2 F), -128.45-128.50 (m, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

(S)-N-(6-Amino-1-(octylamino)-1-oxohexan-2-yl)-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluorononanamid (76)

(R_F-Lys-O-Octyl)

Nach der Aktivierung von 475 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) durch drei Vakuum-Wasserstoff-Zyklen, wurden 1.50 g (1.79 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys(Z)-O-Octyl **74**, gelöst in 25 mL Ethanol, zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemp. über Nacht unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Palladium wurde mittels Filtration durch *Hyflo Super Cel* entfernt, wobei mit 200 mL Ethanol nachgewaschen wurde. Abschließend wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt, so dass 1.25 g (1.77 mmol, 99%) R_F-Lys-O-Octyl **76** als farbloses, hochviskoses Öl gewonnen wurden.



$R_f = 0.06$ (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -10.34$ (c = 1.00, MeOH).

C₂₃H₃₀F₁₇N₃O₂ (M = 703.48 g/mol) [703.21].

ESI-MS (positiv), m/z: 1407.33 ([2M+H]⁺, ber.: 1407.42), 704.17 ([M+H]⁺, ber.: 704.21).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 704.2134 ([M+H]⁺, ber.: 704.2145).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeCN/H₂O, 20:80→100:0, 60 min, R_t = 25.3 min, λ = 212 nm).

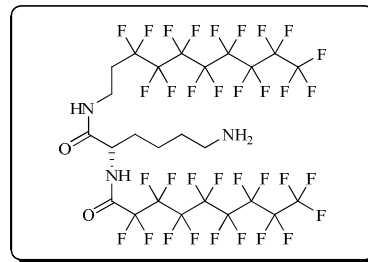
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.70 (t, 1 H, J_{NH,CH2} = 5.4 Hz, NH_{Amid}), 4.46 (t, 1 H, J_{CH,CH2} = 6.7 Hz, -NHCHCO), 3.30-3.15 (m, 2 H, -NHCH₂-), 2.81-2.63 (m, 2 H, -NH₂CH₂-), 1.96-1.82 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.79-1.69 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.57-1.44 (m, 4 H, 2× -NHCH₂CH₂-), 1.44-1.35 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-), 1.30-1.23 (m, 10 H, -(CH₂)₅CH₃), 0.86 (t, 3 H, J_{CH₃,CH₂} = 6.6 Hz, -CH₂CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.81 (C=O_{Amid}), 157.62 (C=O_F, ²J_{C,F} = 26.5 Hz), 53.77 (-NHCHCO), 41.37, 39.92 (2× -NHCH₂-), 32.27 (-NHCH₂CH₂-), 32.00, 31.89 (-CH₂CH₂CH₃, -NHCHCH₂-), 29.50 (-NHCH₂CH₂-), 29.31 (2× -(CH₂)₂(CH₂)₂CH₃), 27.00 (-CH₂(CH₂)₄CH₃), 22.73, 22.26 (-NHCHCH₂CH₂-, -CH₂CH₃), 14.15 (-CH₂CH₃).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -81.20 (t, 3 F, J_{F,F} = 9.7 Hz, -CF₃), -119.20 (m, 2 F), -120.06 (bs, 2 F), -121.91 (bs, 2 F), -122.23 (bs, 2 F), -122.76 (bs, 2 F), -123.09 (bs, 2 F), -126.50 (bs, 2 F, -CF₂CF₃).

(S)-N-(6-Amino-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamido)-1-oxohexan-2-yl)-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononanamid (77)

(R_F-Lys-O-Decyl(F₁₇))



Es wurden 200 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) durch drei Vakuum-Wasserstoff-Zyklen aktiviert und mit 1.00 g (0.85 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys(Z)-O-Decyl(F₁₇) **75**, gelöst in 150 mL Ethanol, versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemp. über Nacht unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Palladium wurde dann mittels Filtration durch *Hyflo Super Cel* entfernt, wobei mit 200 mL Ethanol nachgewaschen wurde. Abschließend wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt, so dass 843 mg (0.81 mmol, 95%) R_F-Lys-O-Decyl(F₁₇) **77** als farbloser, amorpher Feststoff gewonnen werden konnten.

R_f = 0.00 (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -5.40$ (c = 1.00, MeOH).

C₂₅H₁₇F₃₄N₃O₂ (M = 1037.37 g/mol) [1037.08].

ESI-MS (positiv), m/z: 2075.20 ([2M+H]⁺, ber.: 2075.16), 1038.09 ([M+H]⁺, ber.: 1038.09).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1038.0867 ([M+H]⁺, ber.: 1038.0856).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 13.3 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 4.39 (dd, 1 H, J_{CH,CH2a} = 8.9 Hz, J_{CH,CH2b} = 6.0 Hz, -NHCHCO), 3.58 (dt, 1 H, J_{CH2a,CH2b} = 13.8 Hz, J_{CH2a/b,CH2} = 6.8 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.48 (dt, 1 H, J_{CH2b,CH2a} = 14.0 Hz, J_{CH2b/a,CH2} = 6.9 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.68 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 7.3 Hz, -NHCH₂-), 2.48-2.35 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 1.88-1.73 (m, 2 H, -NHCHCH₂-), 1.57-1.50 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-), 1.48-1.31 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, HSQC), δ (ppm): 172.95 (C=O_{Amid}), 159.34 (C=O_{Amid(F)}), 55.46 (-NHCHCO), 41.84 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 32.82 (-NHCH₂CH₂CF₂-), 32.25 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 31.94 (-NHCHCH₂-), 31.12 (t, ²J_{C,F} = 20.7 Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 24.15 (-NHCHCH₂CH₂-).

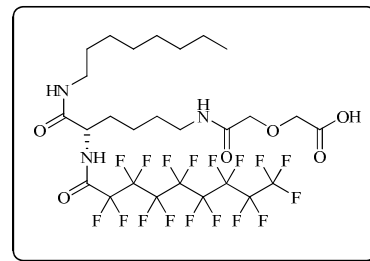
Das Signal des Carbonylkohlenstoffs der Perfluoralkylkette ist im ¹³C-NMR-Spektrum nicht zu sehen.

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -83.87 (t, 6 F, J_{F,F} = 10.1 Hz, 2× -CF₃), -116.78-116.95 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -122.10 (dt, 2 F, J_{F₂,NH} = 37.8 Hz, J_{F₂,F₂} = 12.9 Hz, R_F), -123.91

(bs, 2 F, R_F), -124.17 (bs, 2 F), -124.38 (bs, 8 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -125.08 (m, 2 H, R_F), -125.23 (bs, 4 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -126.26 (bs, 2 F), -128.73- -128.82 (m, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

(S)-2-(2-(5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluor-nonanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamino)-2-oxoethoxy)essigsäure (79)

(R_F-Lys(DG)-O-Octyl)



Zu einer im Eisbad gekühlten Lösung von 600 mg (0.853 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys-O-Octyl **76** in 25 mL absol. Dichlormethan wurden 99 mg (0.853 mmol, 1.0 Äquiv.) Diglykolsäureanhydrid **78** gegeben. Unter langsamen Erwärmen auf Raumtemp. wurden 3 d gerührt, bevor mit 25 mL Essigsäureethylester verdünnt wurde. Es wurde mit 25 mL 1 M Salzsäure und mit 30 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, es wurde filtriert und die Lösungsmittel wurden bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Dabei wurden 610 mg (0.744 mmol, 87%) R_F-Lys(DG)-O-Octyl **79** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten.

R_f = 0.12 (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -2.95$ (c = 1.00, Aceton).

C₂₇H₃₄F₁₇N₃O₆ (M = 819.55 g/mol) [819.22].

ESI-MS (positiv), m/z: 1661.39 ([2M+Na]⁺, ber.: 1661.42), 842.18 ([M+Na]⁺, ber.: 842.21), 820.22 ([M+H]⁺, ber.: 820.23).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 842.2075 ([M+Na]⁺, ber.: 842.2074).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 60 min, R_t = 15.6 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 8.47 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 8.1 Hz, NH_{Amid(F)}), 7.53 (t, 1 H, J_{NH,CH₂} = 6.2 Hz, NH_{Amid}), 7.46 (t, 1 H, J_{NH,CH₂} = 5.7 Hz, NH_{Amid}), 4.49-4.41 (m, 1 H, -NHCHCO), 4.21 (s, 2 H, -CH₂COOH), 4.08 (s, 2 H, -CH₂OCH₂COOH), 3.29-3.18 (m, 4 H, 2× -NHCH₂-), 1.91-1.80 (m, 2 H, -NHCHCH₂-), 1.57-1.47 (m, 4 H, 2× -NHCH₂CH₂-), 1.44-1.36 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-), 1.30-1.26 (m, 10 H, -(CH₂)₅CH₃), 0.87 (t, 3 H, J_{CH₃,CH₂} = 6.7 Hz, -CH₂CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 171.82 (-COOH), 170.63, 170.34 (2× C=O_{Amid}), 71.78, 69.46 (-CH₂OCH₂COOH), 54.69 (-NHCHCO), 39.86, 38.80 (2× -NHCH₂-), 32.55, 31.23 (-CH₂CH₂CH₃, -NHCHCH₂-), 30.16 (-NHCH₂CH₂-), 29.98 (2× -(CH₂)₂(CH₂)₂CH₃), 29.75

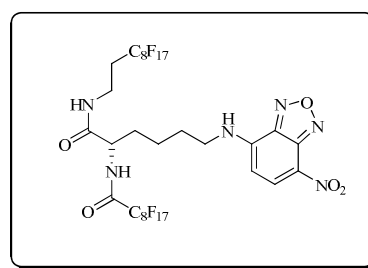
(-NHCH₂CH₂-), 27.54 (-CH₂(CH₂)₄CH₃), 23.44, 23.29 (-NHCHCH₂CH₂-, -CH₂CH₃), 14.31 (-CH₂CH₃).

Das Signal des Carbonylkohlenstoffs der Perfluoralkylkette ist im ¹³C-NMR-Spektrum nicht zu sehen.

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): -81.55 (t, 3 F, J_{F,F} = 10.0 Hz, -CF₃), -119.69 (m, 2 F), -121.93 (bs, 2 F), -122.29 (bs, 4 F), -122.86 (bs, 2 F), -123.14 (bs, 2 F), -126.63 (m, 2 F, -CF₂CF₃).

6.9 Synthese der Lysin-basierenden Konjugate

(S)-N-(1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluordecylamido)-2-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluornonanamido)-1-oxohexyl)-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (**82**)



(R_F-Lys(NBD)-O-Decyl(F₁₇))

Zu einer Lösung von 50 mg (0.048 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys-O-Decyl(F₁₇) **77** und 7.4 µL (0.053 mmol, 1.1 Äquiv.) Triethylamin in 5 mL absol. Tetrahydrofuran wurden unter Lichtausschluss 9.6 mg (0.048 mmol, 1.0 Äquiv.) des in 1 mL absol. Tetrahydrofuran gelösten 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazols **81** gegeben. Die Reaktionslösung wurde 15 h bei Raumtemp. gerührt und das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels semipräparativer RP-HPLC und lieferte 11.1 mg (0.009 mmol, 19%) R_F-Lys(NBD)-O-Decyl(F₁₇) **82** als gelben, amorphen Feststoff.

R_f = 0.89 (EE).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -8.4$ (c = 1.00, MeOH).

C₃₁H₁₈F₃₄N₆O₅ (M = 1200.46 g/mol) [1200.08].

ESI-MS (positiv), m/z: 1223.08 ([M+Na]⁺, ber.: 1223.07), 2423.20 ([2M+Na]⁺, ber.: 2423.15).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1223.0710 ([M+Na]⁺, ber.: 1223.0693).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 24.4 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂O), δ (ppm): 8.62 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 8.0 Hz, -NH_{Lys}), 8.52 (d, 1 H, J_{CH,CH} = 8.8 Hz, -CHCHCNO₂), 8.35 (bs, 1 H, -NH_{Lys(ε)}), 7.79 (t, 1 H, J_{NH,CH₂} = 5.6 Hz,

-NH_{Decyl(F17)}, 6.47 (d, 1 H, $J_{\text{NH,CH}} = 8.8$ Hz, -CHCHCNO₂), 4.56-4.51 (m, 1 H, -NHCHCO), 3.70-3.53 (m, 4 H, -NHCH₂CH₂CF₂-, -NHCH₂-), 2.55-2.42 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 1.91-1.83 (m, 4 H, -NHCHCH₂-, -NHCH₂CH₂CH₂-), 1.66-1.53 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-).

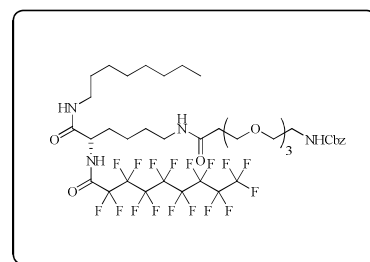
¹³C-NMR (100.6 MHz, (CD₃)₂O, HSQC), δ (ppm): 137.69 (-CHCHCNO₂), 98.69 (-CHCHCNO₂), 54.35 (-NHCHCO), 43.99 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 31.97 (-NHCH₂CH₂CF₂-), 31.31 (-NHCHCH₂-), 30.47 (-NHCH₂CH₂CF₂-), 28.41 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 23.67 (-NHCHCH₂CH₂-).

Die 6 quartären Kohlenstoffsignale sind im Spektrum nicht zu erkennen.

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, (CD₃)₂O), δ (ppm): -82.01 (t, 6 F, $J_{\text{F,F}} = 10.1$ Hz, 2× -CF₃), -114.91-115.09 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -120.13-120.25 (m, 2 F, R_F), -122.38 (bs, 2 F, R_F), -122.61 (bs, 2 F), -122.79 (bs, 8 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -123.32 (m, 2 H, R_F), -123.62 (bs, 4 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -124.57 (bs, 2 F), -127.04-127.14 (m, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

(S)-N-Benzyloxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluorononan-amido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamid (83)

(R_F-Lys(OEG-Cbz)-O-Octyl)



Nach **AAV1b** wurden 56 mg (0.156 mmol, 1.1 Äquiv.) CbzHN-OEG-COOH **29**, 71 mg (0.171 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 26 mg (0.171 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBt, 30 μ L (0.313 mmol, 2.2 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin und 100 mg (0.142 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys-O-Octyl **76** in insgesamt 15 mL einer 2:1 Mischung aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 103 mg (0.099 mmol, 70%) R_F-Lys(OEG-Cbz)-O-Octyl **83** als farbloses Lyophilisat.

$R_f = 0.66$ (EE).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -7.21$ ($c = 1.00$, MeOH).

C₄₀H₅₃F₁₇N₄O₈ (M = 1040.84 g/mol) [1040.36].

ESI-MS (positiv), m/z : 1063.38 ([M+Na]⁺, ber.: 1063.35), 1041.43 ([M+H]⁺, ber.: 1041.37), 1079.41 ([M+K]⁺, ber.: 1079.32), 2103.89 ([2M+Na]⁺, ber.: 2103.71).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1063.3468 ([M+Na]⁺, ber.: 1063.3490).

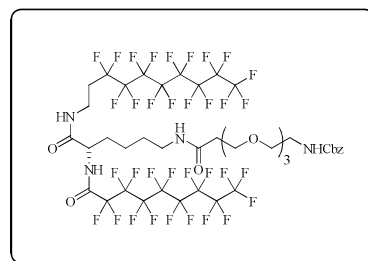
Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 60 min, R_t = 18.0 min, $\lambda = 212$ nm).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , COSY), δ (ppm): 7.35-7.28 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.07 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.37 (dd, 1 H, $J_{\text{CH,CH2a}} = 8.8$ Hz, $J_{\text{CH,CH2b}} = 6.1$ Hz, $\text{-NHCHCH}_2\text{-}$), 3.69 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz, $\text{H}_3\text{-OEG}$), 3.61-3.56 (m, 8 H, $\text{H}_5\text{-}$, $\text{H}_6\text{-}$, $\text{H}_8\text{-}$, $\text{H}_9\text{-OEG}$), 3.53 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 5.5$ Hz, $\text{H}_{11}\text{-OEG}$), 3.30-3.28 (m, 2 H, $\text{H}_{12}\text{-OEG}$), 3.24-3.10 (m, 4 H, $\text{-NH}_{\text{Octyl}}\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH}_{\text{Lysin}}\text{CH}_2\text{-}$), 2.40 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz, $\text{H}_2\text{-OEG}$), 1.88-1.71 (m, 2 H, $\text{-NHCHCH}_2\text{-}$), 1.56-1.48 (m, 4 H, $\text{-NH}_{\text{Octyl}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH}_{\text{Lysin}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1.40-1.33 (m, 2 H, $\text{-NHCHCH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 1.32-1.29 (m, 10 H, $\text{-(CH}_2)_5\text{CH}_3$), 0.89 (t, 3 H, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.9$ Hz, $\text{-CH}_2\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CD_3OD , HSQC), δ (ppm): 173.91, 172.56 ($2 \times \text{C=O}_{\text{Amid}}$), 159.12 ($\text{C=O}_{\text{Amid(F)}}$), 158.89 ($\text{C=O}_{\text{Carbamat}}$), 138.39 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$), 129.47, 128.99, 128.84 ($5 \times \text{C}_{\text{Ar}}$), 71.55, 71.46, 71.28 ($\text{C}_5\text{-}$, $\text{C}_6\text{-}$, $\text{C}_8\text{-}$, $\text{C}_9\text{-OEG}$), 70.93 ($\text{C}_{11}\text{-OEG}$), 68.27 ($\text{C}_3\text{-OEG}$), 67.43 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 55.51 ($\text{-NHCHCH}_2\text{-}$), 41.76 ($\text{C}_{12}\text{-OEG}$), 40.47, 39.98 ($\text{-NH}_{\text{Octyl}}\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH}_{\text{Lysin}}\text{CH}_2\text{-}$), 37.67 ($\text{C}_2\text{-OEG}$), 32.99 ($\text{-(CH}_2)_5\text{CH}_3$), 32.21 ($\text{-NHCHCH}_2\text{-}$), 30.38, 30.34, 29.88 ($\text{-NH}_{\text{Octyl}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-NH}_{\text{Lysin}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $2 \times \text{-(CH}_2)_5\text{CH}_3$), 27.93 ($\text{-(CH}_2)_5\text{CH}_3$), 24.19 ($\text{-NHCHCH}_2\text{CH}_2\text{-}$), 23.71 ($\text{-(CH}_2)_5\text{CH}_3$), 14.41 ($\text{-CH}_2\text{CH}_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, CD_3OD), δ (ppm): -83.78 (t, 3 F, $J_{\text{F,F}} = 10.1$ Hz, -CF_3), -121.99 (t, 2 F, $J_{\text{F,F}} = 12.8$ Hz, $\text{-OCCF}_2\text{-}$), -123.87 (bs, 2 F), -124.25 (bs, 4 F), -124.89 (bs, 2 F), -125.14 (bs, 2 F), -128.64- -128.73 (m, 2 F, $\text{-CF}_2\text{CF}_3$).

(S)-N-Benzoyloxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluor-nonanamido)-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamido)-6-oxohexylamid (84)
(R_F -Lys(OEG-Cbz)-O-Decyl(F_{17}))



Nach **AAV1b** wurden 38 mg (0.106 mmol, 1.1 Äquiv.) CbzHN-OEG-COOH **29**, 48 mg (0.116 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 18 mg (0.116 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBt, 20 μL (0.212 mmol, 2.2 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin und 100 mg (0.096 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F -Lys-O-Decyl(F_{17}) **77** in insgesamt 21 mL einer 2:1 Mischung aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 81 mg (0.099 mmol, 61%) R_F -Lys(OEG-Cbz)-O-Decyl(F_{17}) **84** als farbloses Lyophilisat.

$R_f = 0.63$ (EE).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -6.62$ ($c = 1.00$, MeOH).

$\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{F}_{34}\text{N}_4\text{O}_8$ ($M = 1374.73$ g/mol) [1374.23].

ESI-MS (positiv), m/z : 1397.11 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1397.22), 1375.22 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1375.24).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1397.2185 ($[M+Na]^+$, ber.: 1397.2275).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 60 min, $R_t = 22.1$ min, $\lambda = 212$ nm).

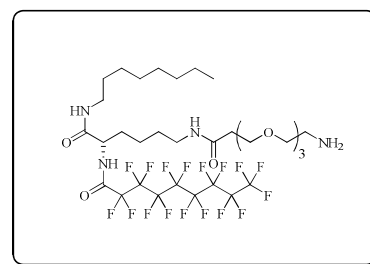
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 7.35-7.27 (m, 5 H, **H_{Ar}**), 5.07 (s, 2 H, **CH₂-Ar**), 4.37 (dd, 1 H, $J_{CH,CH2a} = 8.9$ Hz, $J_{CH,CH2b} = 5.6$ Hz, -NH**CHCH₂-**), 3.70 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 6.2$ Hz, H3-OEG), 3.67-3.56 (m, 8 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG), 3.54 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 5.6$ Hz, H11-OEG), 3.46 (td, 2 H, $J_{CH2a/b,CH2b/a} = 14.2$ Hz, $J_{CH2a/b,CH2} = 7.2$ Hz, -NH**CH₂CH₂CF₂-**), 3.30-3.28 (m, 2 H, H12-OEG), 3.21-3.11 (m, 2 H, -NH**CH₂CH₂CH₂-**), 2.46-2.36 (m, 2 H, -NH**CH₂CH₂CF₂-**), 2.41 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 6.2$ Hz, H2-OEG), 1.89-1.72 (m, 2 H, -NH**CHCH₂-**), 1.56-1.49 (m, 2 H, -NH**CH₂CH₂CH₂-**), 1.40-1.28 (m, 2 H, -NH**CHCH₂CH₂-**).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, HSQC), δ (ppm): 173.94, 172.88 (2× C=O_{Amid}), 159.28 (t, ²J_{C,F} = 26.4 Hz, C=O_{Amid(F)}), 158.90 (C=O_{Carbamat}), 138.40 (CH₂-C_{Ar}), 129.47, 128.98, 128.84 (5× C_{Ar}), 71.55, 71.47, 71.28 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.93 (C11-OEG), 68.28 (C3-OEG), 67.44 (CH₂-Ar), 55.43 (-NH**CHCH₂-**), 41.76 (C12-OEG), 39.95 (-NH**CH₂CH₂CH₂-**), 37.68 (C2-OEG), 32.85 (-NH**CHCH₂CF₂-**), 31.79 (-NH**CHCH₂-**), 31.16 (t, ²J_{C,F} = 21.2 Hz, -NH**CHCH₂CF₂-**), 29.88 (-NH**CH₂CH₂CH₂-**), 24.15 (-NH**CHCH₂CH₂-**).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CD₃OD), δ (ppm): -83.87 (t, 6 F, $J_{F,F} = 10.2$ Hz, 2× -CF₃), -116.77-116.94 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -122.07 (dt, 2 F, $J_{F2,NH} = 25.8$ Hz, $J_{F2,F2} = 12.5$ Hz, R_F), -123.89 (bs, 2 F, R_F), -124.17 (bs, 2 F), -124.37 (bs, 8 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -125.04 (m, 2 H, R_F), -125.22 (bs, 4 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -126.24 (bs, 2 F), -128.78 (bs, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

(S)-12-Amino-4,7,10-trioxadodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluorononanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamid (85)

(R_F-Lys(OEG-NH₂)-O-Octyl)



Nach **AAV2** wurden 50 mg (0.048 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys(OEG-Cbz)-O-Octyl **83** mit 10 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) in 10 mL Isopropanol umgesetzt. So konnten 43 mg (0.048 mmol, 99%) R_F-Lys(OEG-NH₂)-O-Octyl **85** als farbloser, amorpher Feststoff gewonnen werden.

$R_f = 0.05$ (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -8.10$ (c = 1.00, MeOH).

C₃₂H₄₇F₁₇N₄O₆ (M = 906.71 g/mol) [906.32].

ESI-MS (positiv), m/z : 907.25 ($[M+H]^+$, ber.: 907.33), 1813.57 ($[2M+H]^+$, ber.: 1813.65), 929.25 ($[M+Na]^+$, ber.: 929.31).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 907.3338 ($[M+H]^+$, ber.: 907.3302).

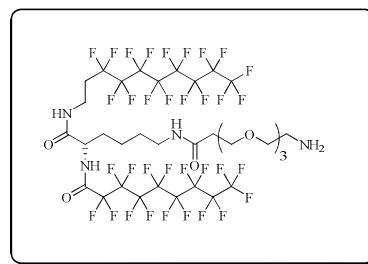
1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 4.37 (dd, 1 H, $J_{CH,CH2a} = 8.8$ Hz, $J_{CH,CH2b} = 6.0$ Hz, -NHCHCH₂-), 3.72 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz, H₃-OEG), 3.64-3.59 (m, 8 H, H₅-, H₆-, H₈-, H₉-OEG), 3.56 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 5.2$ Hz, H₁₁-OEG), 3.22-3.13 (m, 4 H, -NH_{Octyl}CH₂-, -NH_{Lysin}CH₂-), 2.87 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 5.2$ Hz, H₁₂-OEG), 2.43 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz, H₂-OEG), 1.89-1.73 (m, 2 H, -NHCHCH₂-), 1.55-1.48 (m, 4 H, -NH_{Octyl}CH₂CH₂-, -NH_{Lysin}CH₂CH₂-), 1.42-1.29 (m, 12 H, -NHCHCH₂CH₂-, -(CH₂)₅CH₃), 0.90 (t, 3 H, $J_{CH_3,CH_2} = 6.9$ Hz, -CH₂CH₃).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 173.89, 172.57 ($2 \times C=O_{Amid}$), 159.13 ($C=O_{Amid(F)}$), 71.99, 71.55, 71.45 (C₅-, C₆-, C₈-, C₉-OEG), 71.27 (C₁₁-CH₂), 68.30 (C₃-OEG), 55.52 (-NHCHCH₂-), 41.72 (C₁₂-OEG), 40.47, 39.99 (-NH_{Octyl}CH₂-, -NH_{Lysin}CH₂-), 37.63 (C₂-OEG), 32.99 (-(CH₂)₅CH₃), 32.21 (-NHCHCH₂-), 30.38, 30.34, 29.88 (-NH_{Octyl}CH₂CH₂-, -NH_{Lysin}CH₂CH₂-, $2 \times$ -(CH₂)₅CH₃), 27.93 (-(CH₂)₅CH₃), 24.19 (-NHCHCH₂CH₂-), 23.71 (-CH₂CH₃), 14.40 (-CH₂CH₃).

^{19}F -NMR (376.4 MHz, CD_3OD), δ (ppm): -81.15 (t, 3 F, $J_{F,F} = 10.0$ Hz, -CF₃), -119.74- -119.82 (t, 2 F, $J_{F,F} = 12.8$ Hz, -OCCF₂-), -121.90 (bs, 2 F), -122.24 (bs, 4 F), -122.62 (bs, 2 F), -123.09 (bs, 2 F), -126.49 (bs, 2 F, -CF₂CF₃).

(S)-12-Amino-4,7,10-trioxadodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononanamido)-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamino)-6-oxohexylamid (86)

(R_F-Lys(OEG-NH₂)-O-Decyl(F₁₇))



Nach **AAV2** wurden 60 mg (0.044 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys(OEG-Cbz)-O-Decyl(F₁₇) **84** mit 8 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) in 15 mL Isopropanol umgesetzt. So konnten 30.5 mg (0.025 mmol, 56%) R_F-Lys(OEG-NH₂)-O-Decyl(F₁₇) **86** als farbloser, amorpher Feststoff gewonnen werden.

$R_f = 0.02$ (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -5.28$ (c = 1.00, MeOH).

C₃₄H₃₄F₃₄N₄O₆ (M = 1240.60 g/mol) [1240.19].

ESI-MS (positiv), m/z : 2481.41 ($[2M+H]^+$, ber.: 2481.39), 1241.21 ($[M+H]^+$, ber.: 1241.20), 1263.22 ($[M+Na]^+$, ber.: 1263.18).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1241.2006 ($[M+H]^+$, ber.: 1241.2014).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 60 min, $R_t = 10.3$ min, $\lambda = 212$ nm).

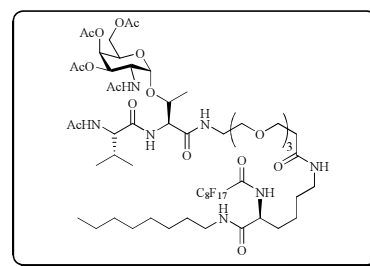
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 4.37 (dd, 1 H, $J_{CH,CH2a} = 8.9$ Hz, $J_{CH,CH2b} = 6.0$ Hz, -NHCHCH₂-), 3.72 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 6.2$ Hz, H3-OEG), 3.66-3.59 (m, 8 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG), 3.52 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 5.3$ Hz, H11-OEG), 3.46 (td, 2 H, $J_{CH2a/b,CH2b/a} = 13.9$ Hz, $J_{CH2a/b,CH2} = 6.9$ Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.22-3.14 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-), 2.81 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 5.3$ Hz, H12-OEG), 2.48-2.35 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.42 (t, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 6.2$ Hz, H2-OEG), 1.90-1.72 (m, 2 H, -NHCHCH₂-), 1.58-1.50 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-), 1.45-1.31 (m, 2 H, -NHCHCH₂CH₂-).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 173.92, 172.92 (2× C=O_{Amid}), 72.96 (C11-OEG), 71.54, 71.46, 71.29, 71.27 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 68.29 (C3-OEG), 55.44 (-NHCHCH₂-), 41.97 (C12-OEG), 39.95 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 37.66 (C2-OEG), 32.83 (-NHCHCH₂CF₂-), 31.79 (-NHCHCH₂-), 31.14 (t, ²J_{C,F} = 21.1 Hz, -NHCHCH₂CF₂-), 29.88 (-NHCH₂CH₂CH₂-), 24.16 (-NHCHCH₂CH₂-).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CD₃OD), δ (ppm): -83.86 (t, 6 F, $J_{F,F} = 10.2$ Hz, 2× -CF₃), -116.76-116.94 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -122.05 (dt, 2 F, $J_{F2,NH} = 26.0$ Hz, $J_{F2,F2} = 12.5$ Hz, R_F), -123.90 (bs, 2 F, R_F), -124.17 (bs, 2 F), -124.37 (bs, 8 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -125.04 (m, 2 H, R_F), -125.22 (bs, 4 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -126.24 (bs, 2 F), -128.77 (m, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamid (87)**

(AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-R_F-Lys-*O*-Octyl)



Nach **AAV1b** wurden 100 mg (0.126 mmol, 1.1 Äquiv.) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-OH **58**, 57 mg (0.138 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 21 mg (0.138 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBT, 30 μ L (0.273 mmol, 2.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin und 81 mg (0.115 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys(NH₂)-*O*-Octyl **76** in insgesamt 15 mL einer 2:1 Mischung aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC

lieferte 64 mg (0.043 mmol, 38%) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-R_F-Lys-*O*-Octyl **87** als farbloses Lyophilisat.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 10.50$ ($c = 1.00$, MeOH).

C₅₇H₈₄F₁₇N₇O₁₈ (M = 1478.29 g/mol) [1477.56].

ESI-MS (positiv), m/z : 1500.50 ([M+Na]⁺, ber.: 1500.55), 1516.52 ([M+K]⁺, ber.: 1516.52).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1500.5535 ([M+Na]⁺, ber.: 1500.5499).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 16.9 min, $\lambda = 212$ nm).

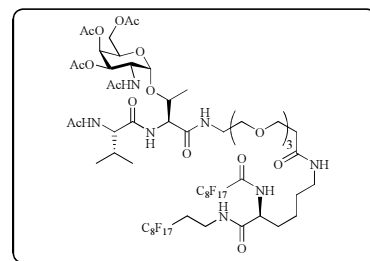
¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂O, COSY), δ (ppm): 8.71 (d, 1 H, J_{NH,CH} = 7.8 Hz, NH_{Amid(F)}), 7.74-7.69 (m, 2 H, NH_{OEG}, NH_T), 7.61-7.56 (m, 1 H, NH_V), 7.52 (t, 1 H, J_{NH,CH₂} = 5.0 Hz, NH_{Octyl}), 7.34 (t, 1 H, J_{NH,CH₂} = 5.3 Hz, NH_{Lys(ϵ)}), 7.00 (d, 1 H, J_{NH,H₂} = 9.4 Hz, NH_{GalNAc}), 5.36 (d, 1 H, J_{H₄,H₅} = 2.2 Hz, H₄), 5.04 (dd, 1 H, J_{H₃,H₂} = 11.5 Hz, J_{H₃,H₄} = 3.2 Hz, H₃), 4.99 (d, 1 H, J_{H₁,H₂} = 3.6 Hz, H₁), 4.60 (dd, 1 H, J_{T α ,NH} = 9.0 Hz, J_{T α ,T β} = 2.1 Hz, T ^{α}), 4.50-4.29 (m, 5 H, -HNCHCH₂- {4.45}, H₂ {4.43}, T ^{β} {4.39}, H₅ {4.36}, V ^{α} {4.30}), 4.13-4.03 (m, 2 H, H_{6a/b}), 3.73 (t, 2 H, J_{CH₂,CH₂} = 6.1 Hz, H₃-OEG), 3.60-3.57 (m, 8 H, H₅-, H₆-, H₈-, H₉-OEG), 3.55-3.49 (m, 3 H, H₁₁-OEG, H₁₂-OEG), 3.30-3.13 (m, 5 H, -HN_{Octyl}CH₂-, -HN_{Lysin}CH₂-, H₁₂-OEG), 2.41-2.39 (m, 2 H, H₂-OEG), 2.14-2.09 (m, 1 H, V ^{β}), 2.11 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 1.98 (s, 6 H, CH₃(NHAc), CH₃(Ac)), 1.90-1.80 (m, 2 H, -HNCHCH₂-), 1.90, 1.85 (s, 6 H, OAc), 1.53-1.41 (m, 4 H, -NH_{Lysin}CH₂CH₂-, -HN_{Octyl}CH₂CH₂-), 1.45-1.36 (m, 2 H, -HNCHCH₂CH₂-), 1.32-1.25 (m, 13 H, -(CH₂)₅CH₃, T ^{γ}), 0.96 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.9 Hz, V ^{γ}), 0.94 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.9 Hz, V ^{γ}), 0.87 (t, 3 H, J_{CH₃,CH₂} = 6.0 Hz, -CH₂CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, (CD₃)₂O, HSQC), δ (ppm): 172.84, 171.67, 171.10, 170.87, 170.82, 170.70, 170.59, 170.25 (9× C=O), 157.74 (t, ²J = 26.1 Hz, C=O_{Amid(F)}), 100.30 (C₁), 77.55 (T ^{β}), 71.17, 71.09, 70.93 (C₅-, C₆-, C₈-, C₉-OEG), 70.05 (C₁₁-OEG), 69.48 (C₃), 68.42 (C₄), 68.00 (C₃-OEG), 67.93 (C₅), 62.90 (C₆), 59.30 (V ^{α}), 57.51 (T ^{α}), 54.80 (-HNCHCH₂-), 48.18 (C₂), 40.13 (C₁₂-OEG), 39.97 (-HN_{Octyl}CH₂-), 39.19 (-HN_{Lysin}CH₂-), 37.51 (C₂-OEG), 32.54 (-(CH₂)₅CH₃), 32.20 (-HNCHCH₂-), 31.07 (V ^{β}), 27.93 (-(CH₂)₅CH₃), 23.39 (-HNCHCH₂CH₂-), 23.29 (-(CH₂)₅CH₃), 22.87, 22.74 (2× CH₃(NHAc)), 20.73, 20.64, 20.57 (3× CH₃(Ac)), 19.92 (V ^{γ}), 18.96 (T ^{γ}), 18.58 (V ^{γ}), 14.33 (-CH₂CH₃).

Die Signale der 4 Kohlenstoffe -HN_{Lysin}CH₂CH₂-, -HN_{Octyl}CH₂CH₂- und 2× -(CH₂)₅CH₃ liegen unter dem Lösungsmittelsignal.

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): -81.96 (t, 3 F, $J_{\text{F,F}} = 9.8$ Hz, $-\text{CF}_3$), -119.90- -120.20 (m, 2 F, $-\text{OCCF}_2$), -122.35 (bs, 2 F), -122.70 (bs, 4 F), -123.22 (bs, 2 F), -123.57 (bs, 2 F), -126.99- -127.09 (m, 2 F, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononanamido)-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamino)-6-oxohexylamid (88)**



(AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-R_F-Lys-*O*-Decyl(F₁₇))

Nach **AAV1b** wurden 100 mg (0.126 mmol, 1.1 Äquiv.) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH **58**, 57 mg (0.138 mmol, 1.2 Äquiv.) HCTU, 21 mg (0.138 mmol, 1.2 Äquiv.) HOBt, 30 μL (0.273 mmol, 2.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin und 119 mg (0.115 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Lys(OEG-NH₂)-*O*-Decyl(F₁₇) **77** in insgesamt 20 mL einer 1:1 Mischung aus Dichlormethan und *N,N'*-Dimethylformamid umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 43 mg (0.024 mmol, 21%) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG-R_F-Lys-*O*-Decyl(F₁₇) **88** als farbloses Lyophilisat.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 16.03$ ($c = 1.29$, Aceton).

$\text{C}_{59}\text{H}_{71}\text{F}_{34}\text{N}_7\text{O}_{18}$ (M = 1811.43 g/mol) [1812.17].

ESI-MS (positiv), m/z : 1834.51 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1834.42), 1850.54 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 1850.39).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1834.4187 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1834.4210).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 21.4$ min, $\lambda = 212$ nm).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, COSY), δ (ppm): 8.75 (d, 1 H, $J_{\text{NH,CH}} = 7.4$ Hz, NH_{Lys}), 7.88 (t, 1 H, $J_{\text{NH,CH}_2} = 5.6$ Hz, $\text{NH}_{\text{Decyl(F17)}}$), 7.72-7.68 (m, 2 H, NH_{T} , NH_{OEG}), 7.55 (d, 1 H, $J_{\text{NH,CH}} = 8.2$ Hz, NH_{V}), 7.33 (t, 1 H, $J_{\text{NH,CH}_2} = 5.6$ Hz, $\text{NH}_{\text{Lys(e)}}$), 7.04 (d, 1 H, $J_{\text{NH,CH}} = 9.3$ Hz, $\text{NH}_{\text{GalNAc}}$), 5.37 (d, 1 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 3.1$ Hz, H₄), 5.05 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 11.5$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.2$ Hz, H₃), 4.99 (d, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.6$ Hz, H₁), 4.59 (dd, 1 H, $J_{\text{T}\alpha,\text{NH}} = 8.9$ Hz, $J_{\text{T}\alpha,\text{T}\beta} = 2.1$ Hz, T ^{α}), 4.49-4.34 (m, 4 H, -HNCHCH₂- {4.47}, H₂ {4.42}, T ^{β} {4.40}, H₅ {4.36}), 4.31-4.27 (m, 1 H, V ^{α}), 4.13-4.03 (m, 2 H, H_{6a/b}), 3.73 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.3$ Hz, H₃-OEG), 3.61-3.58 (m, 10 H, H₅-, H₆-, H₈-, H₉-OEG, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.55-3.51 (m, 3 H, H₁₁-OEG, H₁₂-OEG), 3.32-3.24 (m, 1H, H₁₂-OEG), 3.20-3.13 (m, 2 H, -HN_{Lysin}CH₂-), 2.56-2.45 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.40 (t, 2 H,

$J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.1$ Hz, H2-OEG), 2.12-2.07 (m, 1 H, V^β), 2.11, 1.99, 1.98, 1.90 (s, 15 H, $5 \times \text{CH}_3(\text{Ac})$), 1.89-1.84 (m, 2 H, $-\text{HNCHCH}_2-$), 1.54-1.49 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.46-1.36 (m, 2 H, $-\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.27 (d, 3 H, $J_{\text{T}_\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$ Hz, T^γ), 0.96 (d, 3 H, $J_{\text{V}_\gamma,\text{V}\beta} = 6.9$ Hz, V^γ), 0.94 (d, 3 H, $J_{\text{V}_\gamma,\text{V}\beta} = 6.9$ Hz, V^γ).

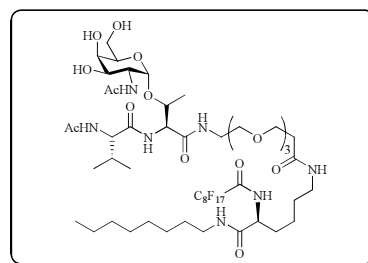
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, HSQC, HMBC), δ (ppm): 172.78 (C=O_V), 171.61 (C=O_{OEG}), 171.37 (C=O_{Lys}), 171.04 (C=O_{V(Ac)}), 170.88 (C=O_{H4(Ac)}), 170.81 (C=O_T), 170.66 (C=O_{H3(Ac)}), C=O_{GalNAc}), 170.59 (C=O_{H6(Ac)}), 157.96 (C=O_{Amid(F)}), 100.26 (C1), 77.35 (T^β), 71.15, 71.09, 70.92 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.06 (C11-OEG), 69.46 (C3), 68.43 (C4), 68.00 (C3-OEG), 67.94 (C5), 62.91 (C6), 59.38 (V^a), 57.54 (T^a), 54.88 ($-\text{HNCHCH}_2-$), 48.16 (C2), 40.13 (C12-OEG), 39.09 ($-\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 37.47 (C2-OEG), 32.54 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2-$), 31.69 ($-\text{HNCHCH}_2-$), 30.98 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2-$), 30.59 (V^β), 23.61 ($-\text{HNCHCH}_2\text{CH}_2-$), 23.19, 22.75 ($2 \times \text{CH}_3(\text{NHAc})$), 20.73, 20.63, 20.57 ($3 \times \text{CH}_3(\text{Ac})$), 19.92 (V^γ), 18.88 (T^γ), 18.61 (V^γ).

Das Signal des Kohlenstoffs $-\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ befindet sich unter dem Lösungsmittelsignal.

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$), δ (ppm): -81.60 (t, 6 F, $J_{\text{F},\text{F}} = 9.7$ Hz, $2 \times -\text{CF}_3$), -114.51-114.68 (m, 2 F, $-\text{CF}_2\text{CH}_2-$), -119.68 (t, 2 F, $J_{\text{F}_2,\text{F}_2} = 12.9$ Hz, R_F), -121.95 (bs, 2 F, R_F), -122.20 (bs, 2 F), -122.38 (bs, 8 F, R_F , Decyl(F_{17})), -122.90 (m, 2 H, R_F), -123.21 (bs, 4 F, R_F , Decyl(F_{17})), -124.14 (bs, 2 F), -126.69 (m, 4 F, $2 \times -\text{CF}_2\text{CF}_3$).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxa-dodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-hepta-decafluor-nonanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamid (**89**)**

(AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG- R_F -Lys-*O*-Octyl)



Es wurden 64 mg (0.043 mmol, 1.0 Äquiv.) AcVal-Thr(α Ac₃GalNAc)-OEG- R_F -Lys-*O*-Octyl **87**, gelöst in 20 mL Methanol, nach AAV3 umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC lieferte 22.7 mg (0.017 mmol, 39%) AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG- R_F -Lys-*O*-Octyl **89** als farbloses Lyophilisat.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 24.21$ ($c = 1.00$, MeOH).

$\text{C}_{51}\text{H}_{78}\text{F}_{17}\text{N}_7\text{O}_{15}$ (M = 1352.18 g/mol) [1351.53].

ESI-MS (positiv), m/z : 1374.51 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1374.52).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1374.5153 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1374.5182).

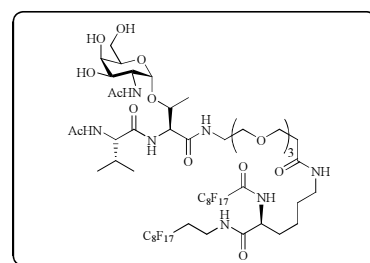
Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 14.4 min, λ = 212 nm).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 4.88 (s, 10 H, alle OH und NH), 4.84 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.8 Hz, H1), 4.52 (d, 1 H, J_{Tα,Tβ} = 2.3 Hz, T^α), 4.37 (dd, 1 H, J_{CH,CH2} = 8.8 Hz, J_{CH,CH2} = 6.1 Hz, -HNCHCH₂-), 4.26-4.22 (m, 2 H, V^α {4.24}, H2 {4.24}), 4.20-4.14 (m, 1 H, T^β), 3.91-3.89 (m, 2 H, H5 {3.90}, H4 {3.90}), 3.79 (dd, 1 H, J_{H3,H2} = 10.9 Hz, J_{H3,H4} = 3.0 Hz, H3), 3.74-3.70 (m, 4 H, H3-OEG {3.73}, H6a/b {3.71}), 3.64-3.57 (m, 8 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG), 3.55-3.51 (m, 2H, H11-OEG), 3.31 (m, 2H, H12-OEG), 3.20-3.13 (m, 4 H, -HNOctylCH₂-, -HNLysinCH₂-), 2.43 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.3 Hz, H2-OEG), 2.08 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 2.12-2.07 (m, 1 H, V^β), 2.01 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 1.87-1.72 (m, 2 H, -HNCHCH₂-), 1.57-1.41 (m, 4 H, -NHLysinCH₂CH₂-, -HNOctylCH₂CH₂-), 1.38-1.35 (m, 2 H, -HNCHCH₂CH₂-), 1.30 (m, 10 H, -(CH₂)₅CH₃), 1.26 (d, 3 H, J_{Tγ,Tβ} = 6.4 Hz, T^γ), 1.00 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.8 Hz, V^γ), 0.99 (d, 3 H, J_{Vγ,Vβ} = 6.8 Hz, V^γ), 0.90 (t, 3 H, J_{CH3,CH2} = 6.9 Hz, -CH₂CH₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, HSQC), δ (ppm): 174.25, 174.09, 173.88, 173.54, 172.58, 171.89 (6× C=O), 100.94 (C1), 78.24 (T^β), 72.92 (C5 o. C4), 71.54, 71.46, 71.30, 71.27 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.37, 70.37 (C3, C11-OEG), 70.29 (C4 o. C5), 68.30 (C3-OEG), 62.71 (C6), 60.71 (V^α), 58.02 (T^α), 55.54 (-HNCHCH₂-), 51.54 (C2), 40.49, 40.47, 40.01 (C12-OEG, -HNOctylCH₂-, -HNLysinCH₂-), 37.67 (C2-OEG), 32.99 (-(CH₂)₅CH₃), 32.21 (-HNCHCH₂-), 31.31 (V^β), 30.38, 30.37, 30.34, 29.90 (-HNLysinCH₂CH₂-, -HNOctylCH₂CH₂ und 2× -(CH₂)₅CH₃), 27.39 (-(CH₂)₅CH₃), 24.22 (-HNCHCH₂CH₂-), 23.71 (-(CH₂)₅CH₃), 23.22, 22.39 (2× CH₃(NHAc)), 19.94 (V^γ), 19.25 (T^γ), 18.97 (V^γ), 14.41 (-CH₂CH₃).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CD₃OD), δ (ppm): -82.69 (t, 3 F, J_{F,F} = 9.8 Hz, -CF₃), -120.88 (t, 2 F, J_{F,F} = 12.6 Hz, -OCCF₂), -122.78 (bs, 2 F), -123.18 (bs, 4 F), -123.80 (bs, 2 F), -124.06 (bs, 2 F), -127.55- -127.63 (m, 2 F, -CF₂CF₃).

N-Acetyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxa-dodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononanamido)-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamino)-6-oxohexylamid (90)
(AcVal-Thr(αGalNAc)-OEG-R_F-Lys-O-Decyl(F₁₇))



Nach AAV3 wurden 43 mg (0.024 mmol, 1.0 Äquiv.) AcVal-Thr(αAc₃GalNAc)-OEG-R_F-Lys-O-Decyl(F₁₇) **88**, gelöst in 25 mL Methanol, umgesetzt. Die abschließende Reinigung mittels

semipräparativer RP-HPLC lieferte 29 mg (0.017 mmol, 72%) AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG-R_F-Lys-*O*-Decyl(F₁₇) **90** als farbloses Lyophilisat.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 20.12$ ($c = 1.00$, MeOH).

C₅₃H₆₅F₃₄N₇O₁₅ (M = 1686.07 g/mol) [1685.40].

ESI-MS (positiv), m/z : 1708.41 ([M+Na]⁺, ber.: 1708.39).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1708.3900 ([M+Na]⁺, ber.: 1708.3893).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, R_t = 19.3 min, $\lambda = 212$ nm).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 4.88 (s, 10 H, alle OH und NH), 4.84 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.8 Hz, H1), 4.52 (d, 1 H, J_{T α ,T β} = 2.3 Hz, T ^{α}), 4.38 (dd, 1 H, J_{CH,CH2} = 8.9 Hz, J_{CH,CH2} = 6.2 Hz, -HNCHCH₂-), 4.26-4.21 (m, 2 H, H2, V ^{α}), 4.19 (qd, 1 H, J_{T β ,T γ} = 6.3 Hz, J_{T β ,T α} = 2.3 Hz, T ^{β}), 3.91-3.88 (m, 2 H, H4, H5), 3.79 (dd, 1 H, J_{H3,H4} = 10.9 Hz, J_{H3,H4} = 3.0 Hz, H3), 3.74-3.69 (m, 4 H, H3-OEG, H6a/b), 3.64-3.57 (m, 10 H, H5-, H6-, H8-, H9-OEG, H11-OEG), 3.53-3.51 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 3.49-3.42 (m, 1H, H12-OEG), 3.22-3.12 (m, 2 H, -HN_{Lysin}CH₂-), 2.47-2.34 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.43 (t, 2 H, J_{CH2,CH2} = 6.3 Hz, H2-OEG), 2.15-2.07 (m, 1 H, V ^{β}), 2.10 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 2.01 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 1.87-1.75 (m, 2 H, -HNCHCH₂-), 1.57-1.50 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CH₂-), 1.45-1.32 (m, 2 H, -HNCH₂CH₂CH₂-), 1.26 (d, 3 H, J_{T γ ,T β} = 6.4 Hz, T ^{γ}), 1.01 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.8 Hz, V ^{γ}), 0.99 (d, 3 H, J_{V γ ,V β} = 6.8 Hz, V ^{γ}).

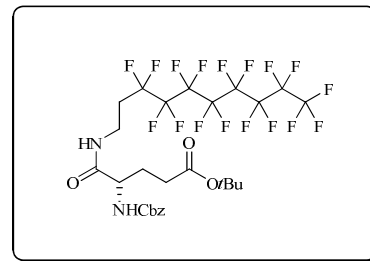
¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, HSQC), δ (ppm): 174.25, 174.09, 173.90, 173.54, 172.92, 171.89 (6× C=O), 100.95 (C1), 78.25 (T ^{β}), 72.93 (C5 o. C4), 71.51, 71.46, 71.30, 71.27 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 70.38 (C11-OEG, C3), 70.30 (C4 o. C5), 68.30 (C3-OEG), 62.72 (C6), 60.71 (V ^{α}), 58.02 (T ^{α}), 55.45 (-HNCHCH₂-), 51.51 (C2), 40.48 (C12-OEG), 39.98 (-HNCH₂CH₂CH₂-), 37.67 (C2-OEG), 32.84 (-NHCH₂CH₂CF₂-), 31.77 (-HNCHCH₂-), 31.30 (V ^{β}), 31.14 (-NHCH₂CH₂CF₂-), 29.89 (-HNCHCH₂CH₂-), 24.18 (-HNCHCH₂CH₂-), 23.21, 22.37 (2× CH₃(NHAc)), 19.93 (V ^{γ}), 19.25 (T ^{γ}), 18.96 (V ^{γ}).

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, CD₃OD), δ (ppm): -84.27 (t, 6 F, J_{F,F} = 10.2 Hz, 2× -CF₃), -117.17- -117.35 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -122.45 (dt, 2 F, J_{F₂,NH} = 25.6 Hz, J_{F₂,F₂} = 12.5 Hz, R_F), -124.30 (bs, 2 F, R_F), -124.57 (bs, 2 F), -124.78 (bs, 8 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -125.44 (m, 2 H, R_F), -125.62 (bs, 4 F, R_F, Decyl(F₁₇)), -126.64 (bs, 2 F), -129.14- -129.21 (m, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

6.10 Synthese des Glutaminsäureankersystems

(*S*)-*tert*-Butyl-4-(benzyloxycarbonylamino)-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluordecylamino)-5-oxopentansäureester (**92**)

(*Z*-Glu(*Or*Bu)-O-Decyl(F₁₇))



Zur Darstellung des Aktivesters wurden 1.61 g (4.77 mmol, 1.1 Äquiv.) *Z*-Glutaminsäure(*Or*Bu)-OH **91**, 1.66 g (5.17 mmol, 1.2 Äquiv.) *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluorborat und 0.79 g (5.17 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydroxybenzotriazol in 30 mL abs. Dichlormethan gelöst bzw. suspendiert. Diese Suspension wurde mit 1.57 mL (9.78 mmol, 2.2 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt und 60 min bei Raumtemp. unter einer Argonatmosphäre gerührt. Nachdem zu der nun klaren Reaktionslösung 2.0 g (4.32 mmol, 1.0 Äquiv.) 10-Amino-1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptafluordecan **65**, gelöst in 50 mL absol. Dichlormethan, gegeben wurde, wurde diese 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde 15 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Verdünnen mit 150 mL Dichlormethan wurde zweimal mit 200 mL 1 M Salzsäure-Lösung ausgeschüttelt, woraufhin mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt wurde. Das so erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH/EE, 3:1) und es konnten 2.50 g (3.19 mmol, 74%) *Z*-Glu(*Or*Bu)-O-Decyl(F₁₇) **92** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert.

$R_f = 0.28$ (CH/EE, 3:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -3.42$ ($c = 1.00$, Aceton).

$C_{27}H_{27}F_{17}N_2O_5$ (M = 782.49 g/mol) [782.16].

ESI-MS (positiv), m/z : 1587.10 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1587.32), 2369.28 ($[3M+Na]^+$, ber.: 2369.48), 805.08 ($[M+Na]^+$, ber.: 805.15).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 805.1561 ($[M+Na]^+$, ber.: 805.1546).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 14.3$ min, $\lambda = 212$ nm).

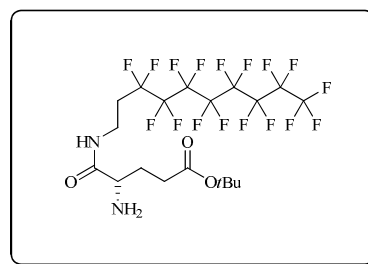
1H -NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 7.63 (t, 1 H, $J_{NH,CH_2} = 5.9$ Hz, NH_{Amid}), 7.39-7.30 (m, 5 H, H_{Ar}), 6.54 (d, 1 H, $J_{NH,CH} = 7.9$ Hz, NH_{Carbamat}), 5.09-5.06 (m, 2 H, CH₂-Ar), 4.18 (td, 1 H, $J_{CH,NH} = 8.4$ Hz, $J_{CH,CH_2} = 5.2$ Hz, -NHCHCO), 3.61-3.54 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.58-2.40 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.33 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 7.9$ Hz, -COCH₂-), 2.15-2.08 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.93-1.81 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.41 (s, 9 H, C(CH₃)₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 172.76, 172.51 ($2\times \text{C=O}$), 157.00 ($\text{C=O}_{\text{Carbamat}}$), 138.13 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$), 129.22, 128.69, 128.66 ($5\times \text{C}_{\text{Ar}}$), 80.51 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.89 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$), 55.27 (-NHCHCO), 32.40 (t, $^3\text{J}_{\text{C,F}} = 5.3$ Hz, $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2\text{-}$), 32.14 (COCH_2), 31.18 (t, $^2\text{J}_{\text{C,F}} = 21.3$ Hz, $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2\text{-}$), 28.38 ($\text{-NHCHCH}_2\text{-}$), 28.23 ($3\times \text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): -80.67 (t, 3 F, $\text{J}_{\text{F,F}} = 9.9$ Hz, -CF_3), -113.74- -113.91 (m, 2 F, $\text{-CF}_2\text{CH}_2\text{-}$), -121.56 (bs, 2 F), -121.82 (bs, 4 F), -122.62 (bs, 2 F), -123.46 (bs, 2 F), -125.98- -126.04 (m, 2 F, $\text{-CF}_2\text{CF}_3$).

(S)-tert-Butyl-4-amino-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10 heptadecafluordecylamino)-5-oxopentansäureester (93)

(H₂N-Glu(OtBu)-O-Decyl(F₁₇))



Es wurden 150 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) durch drei Vakuum-Wasserstoff-Zyklen aktiviert und mit 2.25 g

(2.88 mmol, 1.0 Äquiv.) Z-Glu(OtBu)-O-Decyl(F₁₇) **92**, gelöst in 100 mL Ethanol, versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemp. über Nacht unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Palladium wurde dann mittels Filtration durch *Hyflo Super Cel* entfernt, wobei mit 200 mL Ethanol nachgewaschen wurde. Abschließend wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt, so dass 1.85 g (2.85 mmol, 99%) H₂N-Glu(OtBu)-O-Decyl(F₁₇) **93** als farbloses Wachs gewonnen werden konnten.

$R_f = 0.32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -2.65$ (c = 1.00, Aceton).

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ (M = 648.35 g/mol) [648.13].

ESI-MS (positiv), m/z: 1297.26 ($[\text{2M}+\text{H}]^+$, ber.: 1297.26), 1319.29 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1319.25), 649.13 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 649.14).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 649.1338 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 649.1359).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 9.3$ min, $\lambda = 212$ nm).

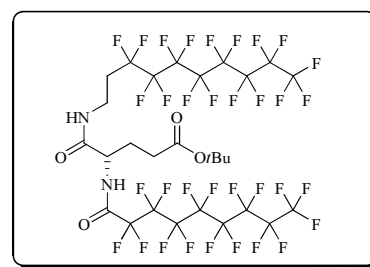
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 7.61 (t, 1 H, $\text{J}_{\text{NH,CH}_2} = 5.7$ Hz, NH_{Amid}), 3.95-3.91 (m, 1 H, -NHCHCO), 3.63-3.51 (m, 2 H, $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2\text{-}$), 2.82 (bs, 2 H, -NH_2), 2.59-2.41 (m, 2 H, $\text{-NHCH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2\text{-}$), 2.25-2.20 (m, 2 H, $\text{-COCH}_2\text{-}$), 1.99-1.92 (m, 1 H, $\text{-NHCHCH}_2\text{-}$), 1.90-1.82 (m, 1 H, $\text{-NHCHCH}_2\text{-}$), 1.41 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 173.45, 172.87 (2 \times C=O), 80.20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 63.59 (-NHCHCO), 31.83 (t, $^3J_{\text{C,F}} = 4.9$ Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 31.78 (COCH₂), 31.31 (t, $^2J_{\text{C,F}} = 21.3$ Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 28.25 (-NHCHCH₂-), 28.24 (3 \times C(CH₃)₃).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): -81.96- -82.02 (m, 3 F, -CF₃), -114.85- -114.95 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -122.56 (bs, 2 F), -122.76 (bs, 4 F), -123.59 (bs, 2 F), -124.52 (bs, 2 F), -127.02- -127.10 (m, 2 F, -CF₂CF₃).

(S)-tert-Butyl-4-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononamido-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecylamino)-5-oxopentansäureester (94)

(R_F-Glu(OtBu)-O-Decyl(F₁₇))



Zu 4.0 g (8.62 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Heptadecafluorononansäure **72** wurden im Stickstoffgegenstrom 1.06 mL (14.65 mmol, 1.7 Äquiv.) Thionylchlorid und 0.21 mL (2.59 mmol, 0.3 Äquiv.) Pyridin gegeben. Nach 90minütigem Erhitzen des Ölbades auf 75-80 °C wurde die Reaktionsmischung abgekühlt. Nach der Phasenseparation wurde die untere, fluorige Phase am Rotationsverdampfer bei 100 mbar eingengt, so dass 2.77 g (5.74 mmol, 67%) Heptadecafluorononansäurechlorid **73** als klare Flüssigkeit erhalten wurden.

Im Eisbad wurde nun eine Lösung von 1.70 g (2.62 mmol, 1.0 Äquiv.) H₂N-Glu(OtBu)-O-Decyl(F₁₇) **93** in 80 mL absol. Dichlormethan gekühlt und mit 0.52 mL (3.15 mmol, 1.2 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt, bevor tropfenweise 1.52 g (3.15 mmol, 1.2 Äquiv.) des frisch hergestellten 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-Heptadecafluorononansäurechlorids **73** zugegeben wurden. Unter langsamem Erwärmen auf Raumtemp. wurde die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Man entfernte anschließend das Lösungsmittel bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer und reinigte das Rohprodukt durch Umkristallisation aus Methanol. Es konnten so 2.06 g (1.89 mmol, 72%) R_F-Glu(OtBu)-O-Decyl(F₁₇) **94** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten werden.

$R_f = 0.69$ (CH/EE, 2:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -4.16$ (c = 1.00, Aceton).

C₂₈H₂₀F₃₄N₂O₄ (M = 1094.42 g/mol) [1094.09].

ESI-MS (positiv), m/z: 2211.01 ([2M+Na]⁺, ber.: 2211.17), 1117.07 ([M+Na]⁺, ber.: 1117.08), 3305.19 ([3M+Na]⁺, ber.: 3305.25).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1117.0795 ($[M+Na]^+$, ber.: 1117.0778).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 23.3$ min, $\lambda = 212$ nm).

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 8.69 (d, 1 H, $J_{NH,CH} = 8.3$ Hz, NH_{Amid}), 7.77 (t, 1 H, $J_{NH,CH_2} = 5.7$ Hz, NH_{Amid}), 4.55 (dt, 1 H, $J_{CH,NH} = 8.2$ Hz, $J_{CH,CH_2} = 5.1$ Hz, -NHCHCO), 3.65-3.57 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.59-2.41 (tt, 2 H, $J_{CH_2,CF_2} = 19.5$ Hz, $J_{CH_2,CH_2} = 7.2$ Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.35 (m, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 7.2$ Hz, -COCH₂-), 2.22-2.11 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 2.02-1.94 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 1.42 (s, 9 H, C(CH₃)₃).

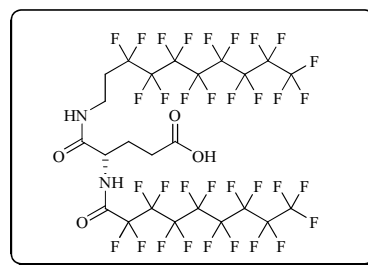
¹³C-NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 172.54, 170.66 (2× C=O), 80.84 (C(CH₃)₃), 54.15 (-NHCHCO), 32.59 (t, $^3J_{C,F} = 5.9$ Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 31.76 (COCH₂), 30.97 (t, $^2J_{C,F} = 21.3$ Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 28.14 (3× C(CH₃)₃), 27.49 (-NHCHCH₂-).

Das Signal des Carbonylkohlenstoffs der Perfluoralkylkette ist im ¹³C-NMR-Spektrum nicht zu sehen.

¹⁹F-NMR (376.4 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): -82.02- -82.08 (m, 6 F, 2× -CF₃), -114.95- -115.12 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -120.24- -120.39 (m, 2 F, R_F), -122.36 (bs, 2 F, R_F), -122.62 (bs, 2 F), -122.80 (bs, 8 F, R_F, Decyl), -123.39 (m, 2 H, R_F), -123.63 (bs, 4 F, R_F, Decyl), -124.61 (bs, 2 F), -127.08- -127.15 (m, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

(S)-4-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluor-nonanamido-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluordecylamino)-5-oxopentansäure (95)

(R_F-Glu(OH)-O-Decyl(F₁₇))



Nachdem 1.15 g (1.02 mmol, 1.0 Äquiv.) R_F-Glu(O_tBu)-O-Decyl(F₁₇) **94** in 100 mL Dichlormethan gelöst worden waren, wurden 2 mL Wasser zugegeben, und 20 mL Trifluoressigsäure zugetropft. Das Lösungsmittel wurde nach vierstündiger Reaktion bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Durch zusätzliche zweimalige azeotrope Destillation mit Toluol konnten auch die Reste der Trifluoressigsäure entfernt werden, so dass 1.05 g (1.01 mmol, 99%) R_F-Glu(OH)-O-Decyl(F₁₇) **95** als farbloser, amorpher Feststoff gewonnen wurden.

$R_f = 0.44$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -3.47$ (c = 2.75, Aceton).

C₂₄H₁₂F₃₄N₂O₄ (M = 1038.31 g/mol) [1038.03].

ESI-MS (positiv), m/z : 2098.94 ($[2M+Na]^+$, ber.: 2099.04), 1061.00 ($[M+Na]^+$, ber.: 1061.02), 3137.00 ($[3M+Na]^+$, ber.: 3137.07).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1061.0165 ($[M+Na]^+$, ber.: 1061.0152).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 20.7$ min, $\lambda = 212$ nm).

¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 8.73 (d, 1 H, $J_{NH,CH} = 7.7$ Hz, NH_{Amid}), 7.78 (t, 1 H, $J_{NH,CH_2} = 5.3$ Hz, NH_{Amid}), 4.60-4.53 (m, 1 H, -NHCHCO), 3.65-3.58 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.60-2.49 (m, 2 H, -NHCH₂CH₂CF₂-), 2.45 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 7.3$ Hz, -COCH₂-), 2.26-2.14 (m, 1 H, -NHCHCH₂-), 2.09-1.99 (m, 1 H, -NHCHCH₂-).

¹³C-NMR (75.5 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 174.11, 170.54 (2× C=O), 54.16 (-NHCHCO), 32.43 (-NHCH₂CH₂CF₂-), 30.96 (t, $^2J_{C,F} = 21.9$ Hz, -NHCH₂CH₂CF₂-), 30.59 (COCH₂), 27.36 (-NHCHCH₂-).

Das Signal des Carbonylkohlenstoffs der Perfluoralkylkette ist im ¹³C-NMR-Spektrum nicht zu sehen.

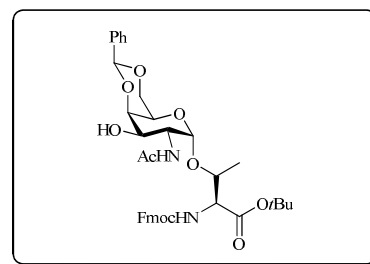
¹⁹F-NMR (376.4 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): -82.02- -82.08 (m, 6 F, 2× -CF₃), -115.01- -115.14 (m, 2 F, -CF₂CH₂-), -120.25- -120.37 (m, 2 F, R_F), -122.37 (bs, 2 F, R_F), -122.62 (bs, 2 F), -122.80 (bs, 8 F, R_F, Decyl), -123.39 (m, 2 H, R_F), -123.63 (bs, 4 F, R_F, Decyl), -124.60 (bs, 2 F), -127.07- -127.15 (m, 4 F, 2× -CF₂CF₃).

6.11 Synthese des T-Antigen-Threonin-Konjugats

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**96**)

(Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-OtBu)^[182]

Eine Lösung von 905 mg (1.51 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr(GalNAc)-OtBu **42** und 0.46 mL (3.02 mmol, 2.0 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal in 50 mL Acetonitril (HPLC grade) wurde bis zu einem pH von 4.5 mit *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Daraufhin wurde 3 h am Rotationsverdampfer bei 40 °C Badtemperatur und 200 mbar rotiert, bevor durch Zugabe von 0.06 mL Triethylamin die Reaktion beendet wurde. Nach Entfernung des Lösungsmittels i. Vak. und die Reinigung des Rückstandes durch Flashchromato-



graphie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 1:3) konnten 844 mg (1.23 mmol, 81%) Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu **96** als farbloser, amorpher Feststoff gewonnen werden.

$R_f = 0.29$ (CH/EE, 1:3).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 60.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[186] $[\alpha]_D^{23} = 61.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (M = 688.76 g/mol) [688.30].

ESI-MS (positiv), m/z : 1399.66 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1399.59), 1415.67 ($[2\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 1415.56), 2088.06 ($[3\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2087.89), 711.32 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 711.29).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.7$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.2$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.50-7.44 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.44-7.32 (m, 7 H, H2-, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{Ar-Bzn}}$), 6.50 (d, 1 H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.5$ Hz, $-\text{NH}_{\text{GalNAc}}$), 5.58 (s, 1 H, CH-Bzn), 5.45 (d, 1 H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.5$ Hz, $-\text{NH}_{\text{Carbamat}}$), 4.96 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.2$ Hz, H1), 4.54-4.45 (m, 3 H, H2, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.28-4.06 (m, 6 H, H5, H6a/b, H9-Fmoc, T^α , T^β), 3.87 (dd, 1 H, $J_{\text{H3,H2}} = 11.3$, $J_{\text{H3,H4}} = 2.7$ Hz, H3), 3.72 (s, 1 H, H4), 2.10 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 1.48 (s, 9 H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.30 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.6$ Hz, T^γ).

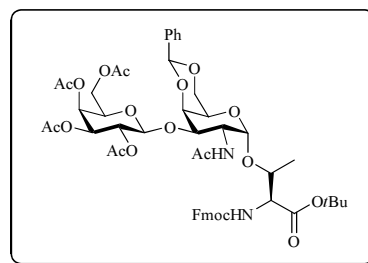
Das Proton der Hydroxygruppe tritt aufgrund von Austauschprozessen im Spektrum nicht auf.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 172.83 ($\text{C}=\text{O}_{\text{NHAc}}$), 170.86 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$), 156.64 ($\text{C}=\text{O}_{\text{Carbamat}}$), 143.83 (C1a- , C8a-Fmoc), 141.45, 141.43 (C4a- , C5a-Fmoc), 137.60 ($\text{C}_q\text{-Bzn}$), 129.23, 128.36 ($4\times \text{C}_{\text{Ar-Bzn}}$), 127.91, 127.89 (C3- , C6-Fmoc), 127.22 (C2- , C7-Fmoc), 126.50 ($\text{C}_{\text{Ar-Bzn}}$), 125.18 (C1- , C8-Fmoc), 120.12 (C4- , C5-Fmoc), 101.27 (CH-Bzn), 100.52 (C1), 83.46 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 75.62 (C3), 69.68 (C4), 69.27 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 67.35 (C6), 63.75 (C5), 59.07 (T^α), 50.44 (C2), 47.30 (C9-Fmoc), 28.19 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 23.17 ($\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 19.14 (T^γ).

Das Signal von (T^β) befindet sich unter dem Chloroform-Signal.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (97)**

(Fmoc-Thr([β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu)^[243]



Zu 1.0 g ausgeheiztem Molekularsieb (4 Å) wurden 600 mg (0.87 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu **86**, gelöst in 7.5 mL absol. Dichlormethan, und 1.07 g (2.61 mmol, 3.0 Äquiv.) des in ebenfalls 7.5 mL absol. Dichlormethan gelösten α Ac₄GalBr **35**

gegeben. Dieser Suspension wurden noch 10 mL absol. Nitromethan hinzugefügt, woraufhin 1 h bei Raumtemp. gerührt wurde. Nach der Zugabe von 440 mg (1.74 mmol, 2.0 Äquiv.) Quecksilbercyanid wurde das Reaktionsgemisch weitere 2.5 h bei Raumtemp. gerührt. Daraufhin erfolgte die erneute Zugabe von 440 mg Quecksilbercyanid und anschließendes Rühren für 16 h bei Raumtemperatur. Man verdünnte mit 40 mL Dichlormethan und filtrierte über *Hyflo Super Cel* in 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase noch einmal mit 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden schließlich mit 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die Lösung wurde anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Durch flashchromatographische Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:3) wurden 836 mg (0.82 mmol, 94%) Fmoc-Thr([βAc₄Gal-(1→3)]-α4,6-O-Bzn-GalNAc)-OrBu **97** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert.

$R_f = 0.35$ (CH/EE, 1:2).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 60.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[243] $[\alpha]_D^{23} = 63.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₅₂H₆₂N₂O₁₉ (M = 1019.05 g/mol) [1018.39].

ESI-MS (positiv), m/z : 1041.47 ([M+Na]⁺, ber.: 1041.38), 1057.47 ([M+K]⁺, ber.: 1057.36), 1019.52 ([M+H]⁺, ber.: 1019.40).

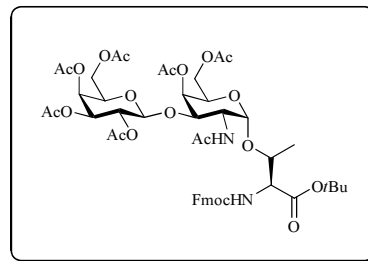
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.79 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.54 (dd, 2 H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.8$ Hz, $J_{H3,H1} = J_{H6,H8} = 1.8$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.44-7.30 (m, 7 H, H2-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bzn), 5.84 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.9$ Hz, -NH_{GalNAc}), 5.58 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 8.2$ Hz, -NH_{Carbamat}), 5.56 (s, 1 H, CH-Bzn), 5.39 (d, 1 H, $J_{H4',H3'} = 3.2$ Hz, H4'), 5.23-5.16 (m, 1 H, H2'), 5.00-4.94 (m, 2 H, H3', H1), 4.75-4.64 (m, 2 H, H1', H2), 4.55-4.43 (m, 3 H, T^α, CH₂-Fmoc), 4.28-4.21 (m, 5 H, H4, H6a, H6a', H9-Fmoc, T^β), 4.08-4.04 (m, 2 H, H6b, H6b'), 3.93-3.86 (m, 2 H, H3, H5), 3.73-3.68 (m, 1 H, H5'), 2.15 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 2.05 (s, 3 H, CH₃(NHAc)), 2.01 (s, 6 H, 2× CH₃(Ac)), 1.97 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.45 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.27 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 7.2$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.30, 170.58, 170.47, 170.35, 169.90, 169.64 (C=O_{NHAc}, 4× C=O_{Ac}, C=O_{Ester}), 156.62 (C=O_{Carbamat}), 143.82 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.50 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.70 (C_q-Bzn), 128.97, 128.28 (4× C_{Ar}-Bzn), 128.01, 127.97 (C3-, C6-Fmoc), 127.23 (C2-, C7-Fmoc), 126.36 (C_{Ar}-Bzn), 125.04 (C1-, C8-Fmoc), 120.24, 120.22 (C4-, C5-Fmoc), 101.42 (C1'), 100.84 (CH-Bzn), 100.56 (C1), 83.38 (-C(CH₃)₃), 76.30 (T^β), 75.75 (C4), 74.40 (C3), 71.02, 70.54 (C3', C5), 69.26 (C6), 68.86 (C2'), 67.14 (CH₂-Fmoc), 67.64 (C4').

63.85 (C5'), 61.47 (C6'), 59.23 (T^α), 47.98 (C2), 47.40 (C9-Fmoc), 28.23 (-C(CH₃)₃), 23.60 (CH₃(NHAc)), 20.91, 20.85, 20.70 (4× CH₃(Ac)), 19.13 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl]-2-desoxy-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**98**)**

(Fmoc-Thr([βAc₄Gal-(1→3)]-αGalAc₂Nac)-OtBu)^[145]



Zunächst wurden 687 mg (0.67 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr([βAc₄Gal-(1→3)]-α4,6-*O*-Bzn-GalNac)-OtBu **97** in 30 mL 80%iger Essigsäure gelöst und 60 min auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 50 mL Toluol versetzt und die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck entfernt. Nochmalige Kodestillation mit 50 mL Toluol lieferte das Rohprodukt. Dieses wurde ohne weitere Reinigung in 20 mL Pyridin gelöst, im Eisbad gekühlt und mit 8 mg Dimethylaminopyridin und 10 mL Essigsäureanhydrid versetzt. Unter langsamen Erwärmen auf Raumtemp. wurde 15 h gerührt, bevor mit 70 mL Dichlormethan verdünnt wurde. Zur Hydrolyse überschüssigen Essigsäureanhydrids wurde die Reaktionslösung auf 50 mL Eiswasser gegossen. Nach viermaligem Waschen mit je 40 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde mit 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Abschließend wurde die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer durch dreimalige Kodestillation mit Toluol, gefolgt von zweimaliger Destillation mit Dichlormethan, entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 2:1→0:1) und lieferte 475 mg (0.468 mmol, 70%) Fmoc-Thr([βAc₄Gal-(1→3)]-αGalAc₂Nac)-OtBu **98** als farblosen, amorphen Feststoff.

$R_f = 0.68$ (EE).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 44.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[183] $[\alpha]_D^{23} = 46.55$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂).

C₄₉H₆₂N₂O₂₁ (M = 1015.02 g/mol) [1014.38].

ESI-MS (positiv), m/z : 2051.96 ([2M+Na]⁺, ber.: 2051.76), 1037.44 ([M+Na]⁺, ber.: 1037.37), 1053.49 ([M+K]⁺, ber.: 1053.35), 1015.53 ([M+H]⁺, ber.: 1015.39).

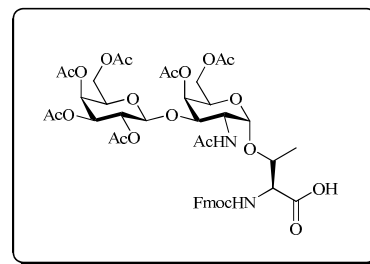
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.42-7.38 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.33-7.29 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 5.93 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.5$ Hz, -NH_{GalNac}), 5.50 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, -NH_{Carbamat}), 5.34 (m, 2 H, H4, H4'), 5.09-5.05 (m, 1 H, H2'), 4.92 (d, 1 H, $J_{H3',H2'} = 10.4$ Hz, H3'),

4.82 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 2.2$ Hz, H1), 4.56-4.46 (m, 5 H, H1', T^α, CH₂-Fmoc, H2), 4.26-4.20 (m, 2 H, H9-Fmoc, T^β), 4.17-4.10 (m, 4 H, H6a, H6a', H6b, H6b'), 4.00-3.95 (m, 1 H, H3), 3.86-3.77 (m, 2 H, H5, H5'), 2.14, 2.12, 2.05, 2.04, 2.02, 2.00, 1.95 (7× s, 21 H, CH₃(Ac)), 1.44 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 5.7$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.26, 170.55, 170.51, 170.29, 170.25, 169.61 (C=O_{NHAc}, 6× C=O_{Ac}, C=O_{Ester}), 156.50 (C=O_{Carbamat}), 143.71 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.43 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.95 (C3-, C6-Fmoc), 127.20 (C2-, C7-Fmoc), 124.94 (C1-, C8-Fmoc), 120.19, 120.17 (C4-, C5-Fmoc), 100.99 (C1'), 100.18 (C1), 83.36 (-C(CH₃)₃), 76.78 (T^β), 73.26 (C3), 70.80, 70.72 (C5', C5), 69.19, 68.69, 68.06 (C3', C4, C2'), 67.00 (CH₂-Fmoc), 66.80 (C4'), 63.08, 61.06 (C6', C6), 60.47 (T^α), 48.47 (C2), 47.31 (C9-Fmoc), 28.14 (-C(CH₃)₃), 23.47 (CH₃(NHAc)), 20.77 (6× CH₃(Ac)), 19.55 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl]-2-desoxy-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin (**99**)**

(Fmoc-Thr([βAc₄Gal-(1→3)]-αGalAc₂NAc)-OH)^[183]



In eine Lösung von 470 mg (0.463 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr([βAc₄Gal-(1→3)]-αGalAc₂NAc)-*O**t*Bu **98** in 10 mL Dichlormethan wurde 1 mL Wasser gegeben. Nach Zugabe von 10 mL Trifluoressigsäure wurde die Reaktionslösung 3 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend verdünnte man mit 30 mL Toluol und entfernte die Lösungsmittel destillativ bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer. Nach zweimaliger azeotroper Destillation mit jeweils 30 mL Toluol erfolgte die Reinigung des Rohproduktes mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1) und lieferte 408 mg (0.425 mmol, 92%) Fmoc-Thr(αAc₃GalNAc)-OH **99** als gelblichen, amorphen Feststoff.

$R_f = 0.22$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 54.7$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[178] $[\alpha]_D^{23} = 59.9$ (c = 1.00, CH₂Cl₂).

C₄₅H₅₄N₂O₂₁ (M = 958.91 g/mol) [958.32].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 981.29 ([M+Na]⁺, ber.: 981.31), 1939.68 ([2M+Na]⁺, ber.: 1939.63).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43-7.39 (m, 2 H, H3-, H6-Fmoc), 7.35-7.29 (m, 2 H, H2-, H7-Fmoc), 6.12 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 8.8$ Hz, -NH_{GalNAc}), 5.59 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 8.4$ Hz, -NH_{Carbamat}), 5.48-5.28 (m, 2 H, H4, H4'), 5.13-5.06 (m, 1 H, H2'), 5.01 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 2.8$ Hz,

H1), 4.94 (dd, 1 H, $J_{H3',H2'} = 10.4$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.0$ Hz, H3'), 4.58 (d, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.8$ Hz, H1'), 4.52 (d, 2 H, $J_{CH_2,CH} = 6.4$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.43-4.37 (m, 3 H, H3, H2, T^α), 4.25-4.09 (m, 4 H, H6a, H6a', H9-Fmoc, T^β), 4.04-3.96 (m, 2 H, H6b, H6b'), 3.88-3.79 (m, 2 H, H5, H5'), 2.15, 2.12, 2.06, 2.02, 2.00, 1.97, 1.95 (7× s, 21 H, CH₃(Ac)), 1.29 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 5.6$ Hz, T^γ).

Das Proton der Säure tritt aufgrund von Austauschprozessen im Spektrum nicht auf.

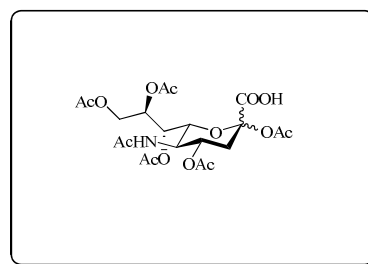
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.07 (C=O_{Säure}), 170.70, 170.59, 170.40, 170.20, 170.10, 169.71, 169.49 (7× (C=O(Ac))), 156.77 (C=O_{Carbamat}), 143.75 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.41 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.92 (C3-, C6-Fmoc), 127.20 (C2-, C7-Fmoc), 125.37 (C1-, C8-Fmoc), 120.17 (C4-, C5-Fmoc), 100.50 (C1'), 99.65 (C1), 76.23 (T^β), 72.69, 70.86 (C5, C5'), 70.75 (C3'), 68.93, 68.80, 67.82 (C3, C4, C2'), 67.01 (CH₂-Fmoc), 66.84 (C4'), 62.98, 61.19 (C6, C6'), 58.68 (T^α), 49.21 (C2), 47.31 (C9-Fmoc), 22.83 (CH₃(NHAc)), 20.77, 20.72, 20.67, 20.62, 20.58 (6× CH₃(Ac)), 18.44 (T^γ).

6.12 Synthese des Sialyl-T_N-Antigens

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (**101**)

(α,β Ac₅NeuNAcCOOH)^[244]

Zu einer Lösung von 20.0 g (64.7 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Acetylneuraminsäure **100** in 250 mL Pyridin wurden unter



Eiskühlung 120 mL Essigsäureanhydrid getropft. Daraufhin wurde 17 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend i. Vak. das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde noch dreimal mit Toluol und einmal mit Dichlormethan kodestilliert, so dass 33.5 g (64.5 mmol, 100%) α,β Ac₅NeuNAcCOOH **101** als gelblicher, amorpher Feststoff isoliert werden konnten, der ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

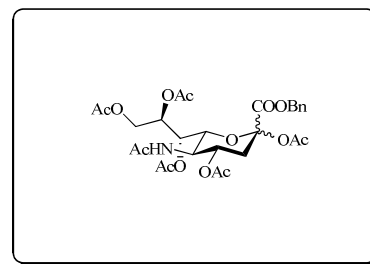
$R_f = 0.29$ (CHCl₃/EtOH, 1:3).

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

Weitere analytische Daten finden sich in der Literatur.^[245]

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α,β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (102**)**

(α,β Ac₅NeuNAcCOOBn)^[244]



Die in 100 mL Ethanol gelösten 33.5 g (64.5 mmol, 1.0 Äquiv.) α,β Ac₅NeuNAcCOOH **101** wurden mit 10.51 g (37.2 mmol, 0.5 Äquiv.) Cäsiumcarbonat, gelöst in 15 mL Wasser, versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wurden noch weitere 60 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde das Ethanol i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde zweimal mit Toluol kodestilliert, bevor am Hochvakuum letzte Reste des Lösungsmittels entfernt wurden. Daraufhin wurde der Rückstand in 150 mL *N,N'*-Dimethylformamid aufgenommen und langsam mit 77.0 mL (645 mmol, 10.0 Äquiv.) Benzylbromid versetzt. Nach 15stündigem Rühren bei Raumtemp. wurde das Lösungsmittel i. Hochvak. abdestilliert und der Rückstand wurde in 50 mL Essigsäureethylester aufgenommen. Das in Essigsäureethylester nicht lösliche Cäsiumbromid wurde durch Filtration entfernt werden und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer i. Vak. verdampft. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 1:5 → 0:1) und lieferte 27.5 g (45.1 mmol, 70%) α,β Ac₅NeuNAcCOOBn **102** als farblosen, amorphen Feststoff. Da in der folgenden Umsetzung beide Anomere eingesetzt werden können, wurde auf eine Trennung verzichtet. Die angegebenen analytischen Daten beziehen sich auf das deutlich im Überschuss entstandene β -Anomer.

$R_f = 0.24$ (CH/EE, 1:5), $R_f(\alpha\text{-Anomer}) = 0.34$ (CH/EE, 1:5).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -22.81$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[186] $[\alpha]_D^{23} = -24.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₂₈H₃₅NO₁₄ (M = 609.58 g/mol) [609.21].

ESI-MS (positiv), m/z : 632.17 ([M+Na]⁺, ber.: 632.20), 648.15 ([M+K]⁺, ber.: 648.17), 490.15 ([Neu2en5enAc₄COOBn]⁺, ber.: 490.16), 1241.41 ([2M+Na]⁺, ber.: 1241.40).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.35 (s, 5 H, H_{Ar}-Bn), 5.38-5.06 (m, 6 H, H^{4''}, H^{6''}, H^{7''}, H^{8''}, -OCH₂-Bn), 4.44 (dd, 1 H, J_{H^{9a''},H^{9b''}} = 12.4 Hz, J_{H^{9a''},H^{8''}} = 2.5 Hz, H^{9a''}), 4.16-4.08 (m, 2 H, H^{5''}, H^{9b''}), 2.54 (dd, 1 H, J_{H^{3eq''},H^{3ax''}} = 13.3 Hz, J_{H^{3eq''},H^{4''}} = 4.8 Hz, H^{3eq''}), 2.12, 2.11 (m, 7 H, 2× CH₃(Ac), H^{3ax''}), 2.02 (s, 9 H, 3× CH₃(Ac)), 1.89 (s, 3 H, CH₃(Ac)).

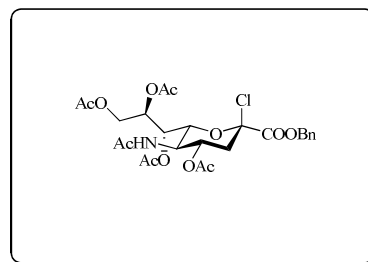
Das Amid-H ist im Spektrum nicht auszumachen.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.05, 170.62, 170.33, 170.27 (5× C=O), 168.35 (C^{1''}), 165.60 (C=O), 135.01 (C_q-Bn), 128.65, 128.57, 128.36 (5× C_{Ar}-Bn), 97.76 (C^{2''}), 72.97, 71.35, 68.41, 68.05, 67.90 (C^{4''}, C^{6''}, C^{7''}, C^{8''}, -OCH₂-Bn), 62.05 (C^{9''}), 49.44 (C^{5''}), 35.91 (C^{3''}), 23.26 (CH₃(NHAc)), 20.94, 20.87, 20.81 (5× CH₃(Ac)).

5-Acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chloro-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (103)

(β Ac₄NeuNAcCOOBnCl)^[244]

Zu 13.72 g (22.51 mmol, 1.0 Äquiv.) α,β Ac₅NeuNAcCOOBn **102** wurden 35.7 mL auf 0 °C abgekühltes und mit 0.35 mL



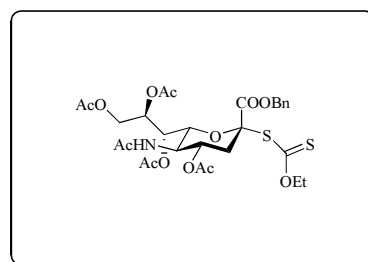
Wasser versetztes Acetylchlorid gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3 d bei Raumtemp. gerührt, woraufhin überschüssiges Acetylchlorid i. Vak. entfernt wurde. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol und einmal mit Dichlormethan kodestilliert, wobei 14.01 g (22.51 mmol, quant.) des leicht gelblichen, amorphen Feststoffs β Ac₄NeuNAcCOOBnCl **103** erhalten wurden, die ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt verwendet werden konnten.

$R_f = 0.57$ (EE).

C₂₆H₃₂ClNO₁₂ (M = 585.98 g/mol) [585.16].

O-Ethyl-S-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]dithiocarbonat (104)

(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)^[244]



Eine im Eisbad gekühlte Lösung von 14.0 g (23.89 mmol, 1.0 Äquiv.) β Ac₄NeuNAcCOOBnCl **103** in 170 mL absol. Ethanol wurde im Argongegenstrom mit 7.28 g (45.5 mmol, 1.9 Äquiv.) Kaliumethylxanthogenat versetzt. Es wurde nach 20 h Rühren unter Lichtausschluss bei Raumtemp. mit 200 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde zweimal mit je 150 mL halbges. Natriumchlorid-Lösung und zweimal mit je 150 mL ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat, Filtration und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erfolgte die flashchromatographische Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: CH/EE, 1:4), die 7.18 g (10.7 mmol, 45%) α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **104** als gelblichen, amorphen Feststoff lieferte.

$R_f = 0.17$ (CH/EE, 1:4).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 30.3$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[244] $[\alpha]_D^{23} = 34.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₂₉H₃₇NO₁₃S₂ (M = 671.73 g/mol) [671.17].

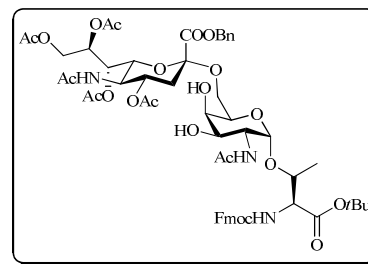
ESI-MS (positiv), m/z: 694.15 ([M+Na]⁺, ber.: 694.16), 490.15 ([Neu2en5enAc₄COOBn]⁺, ber.: 490.16), 1365.33 ([2M+Na]⁺, ber.: 1365.33), 710.13 ([M+K]⁺, ber.: 710.13).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.34 (s, 5 H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$), 5.33-5.17 (m, 3 H, $\text{H7}''$, $\text{H8}''$, NH), 5.22 (s, 2 H, $-\text{OCH}_2\text{-Bn}$), 4.84 (td, 1 H, $J_{\text{H4}'',\text{H3ax}''} = J_{\text{H4}'',\text{H5}''} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H4}'',\text{H3eq}''} = 4.4$ Hz, $\text{H4}''$), 4.56 (dd, 1 H, $J_{\text{H6}'',\text{H5}''} = 10.8$ Hz, $J_{\text{H6}'',\text{H7}''} = 1.7$ Hz, $\text{H6}''$), 4.47-3.98 (m, 5 H, $\text{H5}''$, $\text{H9a/b}''$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 2.66 (dd, 1 H, $J_{\text{H3eq}'',\text{H3ax}''} = 13.2$ Hz, $J_{\text{H3eq}'',\text{H4}''} = 4.6$ Hz, $\text{H3eq}''$), 2.13-2.07 (m, 7 H, $2 \times \text{CH}_3(\text{Ac})$, $\text{H3ax}''$), 2.01 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3(\text{Ac})$), 1.88 (s, 3 H, $\text{CH}_3(\text{Ac})$), 1.21 (t, 3 H, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 207.10 (C=S), 170.76, 170.57, 170.47, 170.27, 170.17 ($5 \times \text{C=O}$), 167.93 ($\text{C1}''$), 134.96 ($\text{C}_q\text{-Bn}$), 128.83, 128.67, 128.00 ($5 \times \text{C}_{\text{Ar-Bn}}$), 86.60 ($\text{C2}''$), 75.39, 70.69, 70.63, 68.88, 68.00, 67.97 ($\text{C4}''$, $\text{C6}''$, $\text{C7}''$, $\text{C8}''$, $-\text{OCH}_2\text{-Bn}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 62.16 ($\text{C9}''$), 49.17 ($\text{C5}''$), 37.18 ($\text{C3}''$), 23.20 ($\text{CH}_3(\text{NHAc})$), 21.13, 20.85, 20.82 ($4 \times \text{CH}_3(\text{Ac})$), 13.07 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

***N*-(9*H*-Fluoren-9*yl*)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -*D*-galactopyranosyl}-*L*-threonin-*tert*-butylester (107)**

(Fmoc-Thr($\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn}$ -(2 \rightarrow 6)- αGalNAc)-*Ot*Bu)^[143,244]**



Herstellung einer 1.6 M Lösung von Methylsulfonylbromid in 1,2-Dichlorethan: Zu einer Lösung von 709 μL (7.99 mmol, 1.0 Äquiv.) Dimethyldisulfid in 10 mL absol. 1,2-Dichlorethan wurden 410 μL (7.99 mmol, 1.0 Äquiv.) Brom getropft. Es wurde 15 h unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.

Glycosylierungsreaktion: Eine Lösung von 537 mg (0.89 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr(αGalNAc)-*O**t*Bu **42** und 1.5 g (2.23 mmol, 2.5 Äquiv.) $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBnXan} **107** in einer Mischung aus 30 mL absol. Acetonitril und 15 mL absol. Dichlormethan wurde zusammen mit 2.5 g ausgeheiztem, pulverisiertem Molekularsieb (4Å) unter Argon und Feuchtigkeitsausschluss 1 h gerührt. Daraufhin wurden 573 mg (2.23 mmol, 2.5 Äquiv.) trockenes Silbertriflat hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde auf -65 °C abgekühlt, bevor über einen Zeitraum von 30 min 1.44 mL (2.23 mmol, 2.5 Äquiv.) einer auf 0 °C vorgekühlten Lösung von Methylsulfonylbromid in 1,2-Dichlorethan zugetropft wurden. Man ließ weitere 3.5 h bei -65 °C rühren und gab dann zur Neutralisierung der Reaktion 0.37 mL (2.23 mmol, 2.5 Äquiv.) Diisopropylethylamin hinzu. Nach 15 min ließ man die Reaktionslösung langsam auf 10 °C erwärmen und verdünnte diese mit 100 mL Dichlormethan. Filtration über *Hyflo Super Cel* und Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer lieferte das$

Rohprodukt, welches durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EE/EtOH, 40:1) gereinigt wurde. So konnten 292 mg (0.25 mmol, 29%) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-OtBu **107** als farbloser, amorpher Feststoff isoliert werden.

$R_f = 0.15$ (EE/EtOH, 40:1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 8.9$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[244] $[\alpha]_D^{23} = 6.27$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

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

ESI-MS (positiv), m/z : 1172.44 ([M+Na]⁺, ber.: 1172.44).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.1$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.45-7.28 (m, 9 H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 6.72 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 7.3$ Hz, -NH_{GalNAc}), 5.45 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, -NH_{Carbamat}), 5.39-5.13 (m, 5 H, H7'', H8'', -NH_{NeuNAc}, -OCH₂-Bn), 4.89-4.82 (m, 1 H, H4''), 4.80 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, H1), 4.48 (d, 2 H, $J_{CH_2,H9} = 6.8$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.36 (dd, 1 H, $J_{H9a'',H9b''} = 12.3$ Hz, $J_{H9a'',H8''} = 2.3$ Hz, H9a''), 4.28-4.02 (m, 7 H, H2, T ^{α} , H6'', H9-Fmoc, H9b'', T ^{β} , H5''), 3.93 (dd, 1 H, $J_{H6a,H6b} = 9.9$ Hz, $J_{H6a,H5} = 7.0$ Hz, H6a), 3.75-3.64 (m, 3 H, H3, H4, H5), 3.51 (dd, 1 H, $J_{H6b,H6a} = 10.2$ Hz, $J_{H6b,H5} = 4.0$ Hz, H6b), 2.61 (dd, 1 H, $J_{H3eq'',H3ax''} = 12.7$ Hz, $J_{H3eq'',H4''} = 4.6$ Hz, H3_{eq}''), 2.13-2.09 (m, 10 H, 3 \times CH₃(Ac), H3_{ax}''), 2.02 (s, 6 H, 2 \times CH₃(Ac)), 1.87 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.47 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.29 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T ^{γ}).

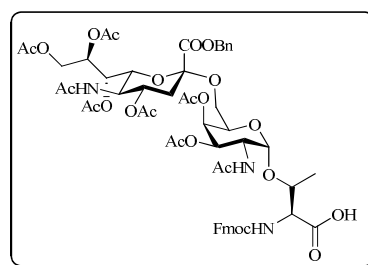
Die zwei Protonen der Hydroxygruppen treten im Spektrum nicht auf.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.58, 171.18, 171.12, 170.90, 170.62, 170.41, 170.21 (7 \times C=O), 167.64 (C1''), 156.69 (C=O_{Carbamat}), 143.90, 143.79 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.41 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.90 (C_q-Bn), 128.97, 128.88, 128.74 (5 \times C_{Ar}-Bn), 127.87 (C3-, C6-Fmoc), 127.19 (C2-, C7-Fmoc), 125.12 (C1-, C8-Fmoc), 120.12 (C4-, C5-Fmoc), 99.84 (C1), 98.87 (C2''), 83.24 (-C(CH₃)₃), 76.95 (T ^{β}), 72.97 (C6''), 70.87 (C3), 69.61, 69.38 (C5, C7''), 69.09 (C4''), 68.80 (C4), 67.96 (-OCH₂-Bn), 67.64 (C8''), 67.27 (CH₂-Fmoc), 64.75 (C6), 62.62 (C9''), 59.21 (T ^{α}), 50.67 (C2), 49.25 (C5''), 47.29 (C9-Fmoc), 37.55 (C3''), 28.15 (-C(CH₃)₃), 23.23, 23.04, 21.18, 20.92, 20.87, 20.85 (6 \times CH₃(Ac)), 18.83 (T ^{γ}).

1.88 (m, 1 H, H_{3ax}"), 1.86 (s, 3 H, CH₃(Ac)), 1.45 (s, 9 H, -C(CH₃)₃), 1.30 (d, 3 H, J_{T_γ,T_β} = 6.2 Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.35, 171.09, 170.96, 170.72, 170.56, 170.46, 170.39, 170.28, 169.79 (9× C=O), 167.46 (C1"), 156.70 (C=O_{Carbamat}), 143.98, 143.84 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.45 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.82 (C_q-Bn), 129.19, 128.99, 128.82 (5× C_{Ar}-Bn), 127.91 (C3-, C6-Fmoc), 127.25 (C2-, C7-Fmoc), 125.24 (C1-, C8-Fmoc), 120.19 (C4-, C5-Fmoc), 100.23 (C1), 98.70 (C2"), 83.23 (-C(CH₃)₃), 77.36 (T^β), 72.71 (C6"), 69.09, 69.02 (C3, C4), 68.59 (C5), 68.11, 68.01 (C7", C8"), 67.72 (-OCH₂-Bn), 67.43 (C4"), 67.19 (CH₂-Fmoc), 64.01 (C6), 62.49 (C9"), 59.28 (T^α), 49.27 (C5"), 47.38, 47.34 (C2, C9-Fmoc), 37.74 (C3"), 28.23 (-C(CH₃)₃), 23.42, 23.32, 21.20, 20.97, 20.86, 20.78, 20.74 (8× CH₃(Ac)), 18.74 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9*yl*)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonin (109)**



(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OH)^[244]

In eine Lösung von 181 mg (0.147 mmol, 1.0 Äquiv.) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OtBu **108** in 5 mL Dichlormethan wurden 0.5 mL Wasser gegeben. Es wurden 5 mL Trifluoressigsäure hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend verdünnte man mit 15 mL Toluol und entfernte die Lösungsmittel destillativ bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer. Nach zweimaliger azeotroper Destillation mit jeweils 20 mL Toluol erfolgte die Reinigung des Rohproduktes mittels Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1), wodurch 157 mg (0.133 mmol, 91%) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-OH **109** als farbloser, amorpher Feststoff erhalten wurden.

$R_f = 0.16$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 19:1:0.1).

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = 33.6$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[244] $[\alpha]_D^{23} = 29.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

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

ESI-MS (positiv), m/z: 1200.41 ([M+Na]⁺, ber.: 1200.40).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.74 (d, 2 H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.37-7.27 (m, 9 H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc,

H_{Ar}-Bn), 6.18 (d, 1 H, J_{NH,Tα} = 8.9 Hz, -NH_{Carbamat}), 5.97 (bs, 1 H, -NH_{GalNAc}), 5.36-5.28 (m, 3 H, H7", H8", -CH₂-Bn_a), 5.23-5.09 (m, 3 H, H4, -CH₂-Bn_b, -NH_{NeuNAc}), 5.04-4.96 (m, 2 H, H3, H1), 4.87-4.78 (m, 1 H, H4"), 4.55-4.50 (m, 1 H, H2), 4.48-4.37 (m, 3 H, CH₂-Fmoc, T^α), 4.28-4.17 (m, 3 H, T^β, H9-Fmoc, H9a"), 4.10-4.04 (m, 3 H, H6", H5", H9b"), 4.00-3.97 (m, 1 H, H5), 3.81 (pt, 1 H, J_{H6a,H6b} = J_{H6a,H5} = 8.3 Hz, H6a), 3.14 (dd, 1 H, J_{H6b,H6a} = 10.7 Hz, J_{H6b,H5} = 3.9 Hz, H6b), 2.57 (dd, 1 H, J_{H3eq,H3ax} = 11.3 Hz, J_{H3eq,H4} = 2.5 Hz, H3_{eq}"), 2.11, 2.09, 2.02, 2.00, 1.96, 1.85 (6× s, 25 H, CH₃(Ac), CH₃(NHAc), H3_{ax}"), 1.27 (d, 3 H, J_{Tγ,Tβ} = 6.1 Hz, T^γ).

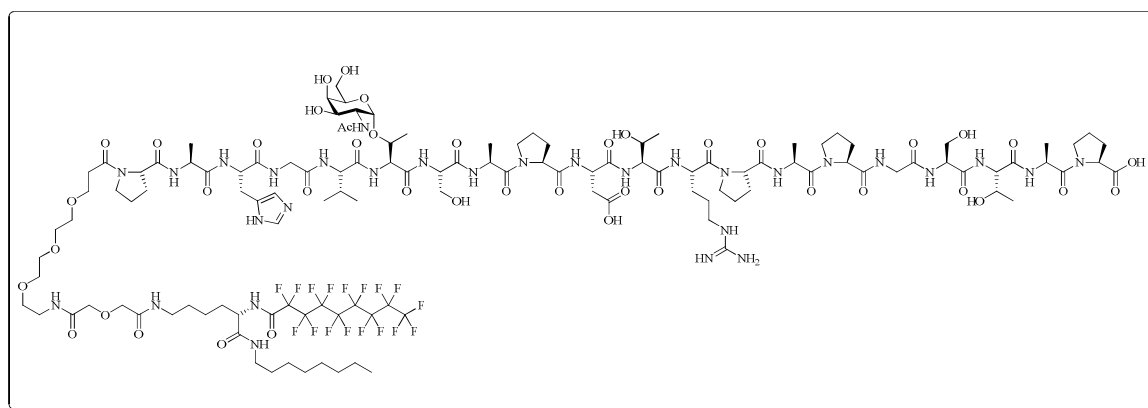
Das Proton der Säure tritt aufgrund von Austauschprozessen im Spektrum nicht auf.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.24, 170.98, 170.96, 170.74, 170.59, 170.51, 170.28, 169.82 (9× C=O), 167.40 (C1"), 156.82 (C=O_{Carbamat}), 143.71, 143.47 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.40 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.80 (C_q-Bn), 129.08, 128.92, 128.73 (5× C_{Ar}-Bn), 127.88 (C3-, C6-Fmoc), 127.25 (C2-, C7-Fmoc), 125.22 (C1-, C8-Fmoc), 120.13 (C4-, C5-Fmoc), 99.75 (C1), 98.71 (C2"), 77.36 (T^β), 72.67 (C6"), 69.14, 69.02 (C3, C4), 68.48 (C5), 68.27, 67.97 (C7", C8"), 67.77 (-OCH₂-Bn), 67.33 (C4"), 67.22 (CH₂-Fmoc), 63.95 (C6), 62.48 (C9"), 58.79 (T^α), 49.27 (C5"), 47.92, 47.34 (C2, C9-Fmoc), 37.72 (C3"), 23.21, 22.98, 21.10, 20.91, 20.90, 20.89, 20.81, 20.73, (8× CH₃(Ac)), 18.36 (T^γ).

6.13 Synthese der MUC1-Glycolipopeptide

(*S*)-2-(2-(5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptafluornonanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamino)-2-oxoethoxy)ethylamido-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-l-prolyl-l-alanyl-l-histidyl-l-glycyl-l-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -d-galactopyranosyl)-l-threonyl-l-seryl-l-alanyl-l-prolyl-l-aspartyl-l-threonyl-l-arginyl-l-prolyl-l-alanyl-l-prolyl-l-glycyl-l-seryl-l-threonyl-l-alanyl-l-prolin (111)

(R_F -Lys(DG)-*O*-Octyl-OEG-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 455 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-*O*-Trt vorbeladenen Tentagel-S-Harzes (Rapp-Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgte die Glycopeptidsynthese am Peptidsyntheser nach dem Fastmoc-Standardprotokoll. Zur Kupplung der glycosylierten Aminosäure wurde eine Lösung aus 168 mg (0.25 mmol, 2.5 Äquiv.) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH **41**, 105 mg (0.275 mmol, 2.75 Äquiv.) HATU, 36 mg (0.275 mmol, 2.75 Äquiv.) HOAt und 60 μ L (0.55 mmol, 5.5 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin eingesetzt. Die Kupplungszeit betrug 8 h (je 30 s Vortex und 30 s Pause), wobei eventuell verbliebene Aminogruppen mit dem Capping-Reagenz acetyliert wurden. Nach anschließender Fmoc-Abspaltung erfolgte neben der Anbindung der verbleibenden Aminosäuren auch die Kupplung der Oligoethyleneinheit FmocHN-OEG-COOH **27** mit finaler Fmoc-Deblockierung nach dem Standardprotokoll. Die Membranankereinheit R_F -Lys(DG)-*O*-Octyl **79** wurde ebenfalls semi-automatisch gekuppelt, so eine Lösung aus 164 mg (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) R_F -Lys(DG)-*O*-Octyl **79**, 84 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HATU, 30 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HOAt und 45 μ L (0.44 mmol, 4.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin eingesetzt wurden. Nach achtstündiger Reaktionszeit wurde zur Abspaltung des Peptides vom Harz und gleichzeitigem Entfernen der säurelabilen Schutzgruppen diese in einen Merrifield-Reaktor überführt und dreimal mit Dichlormethan gewaschen, bevor eine Lösung aus 10 mL Trifluoressigsäure, 1 mL

Triisopropylsilan und 1 mL Wasser zugesetzt wurde. Die Mischung wurde 3 h geschüttelt und filtriert. Das Harz wurde noch dreimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen und das Filtrat wurde nach Verdünnen mit 15 mL Toluol i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde anschließend dreimal mit je 15 mL Toluol kodestilliert und nach Zugabe von 10 mL entionisiertem Wasser lyophilisiert.

$C_{130}H_{195}F_{17}N_{30}O_{45}$ (M = 3221.09 g/mol) [3219.36].

ESI-MS (positiv), m/z: 1611.16 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1610.69), 1081.78 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1081.46), 1622.15 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1621.68).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1610.6884 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1610.6889).

Deacetylierung:

Das rohe Glycopeptid **110** wurde nach **AAV3** in 40 mL Methanol (HPLC-grade) bei einem pH-Wert von 9 deacetyliert. Die Reinigung erfolgte durch zweimaliges Ausfällen des in 0.5 mL Methanol gelösten Rohproduktes aus 40 mL kaltem Diethylether. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde die überstehende Lösung dekantiert, wobei 110 mg (0.036 mmol, 36%) des Glycopeptids **111** isoliert werden konnten.

Drehwert: $[\alpha]_D^{23} = -52.73$ (c = 1.00, H₂O+TFA).

$C_{124}H_{189}F_{17}N_{30}O_{42}$ (M = 3094.98 g/mol) [3093.33].

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z: 3094.08 ($[M+H]^+$, ber.: 3094.34).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD+TFA-d₁, COSY), δ (ppm): 8.79 (d, 1 H, J_{He,Hδ} = 1.3 Hz, H^ε), 7.43 (s, 1 H, H^δ), 5.02 (d, 1 H, J_{H1,H2} = 3.6 Hz, H1), 4.71-4.23 (m, 22 H, R^α {4.69}, H^α {4.67}, D^α {4.62}, A₄^α {4.61}, A_(2,3)^α {4.57}, S₁^α {4.52}, S₂^α {4.47}, -HNCHCH₂- {4.40}, T_{Tn}^α, V^α {4.39}, P₍₁₋₅₎^α {4.36}, T_(1,2)^α {4.35, 4.32}, A₁^α {4.31}, T_{Tn}^β {4.30}, T₂^β {4.29}, T₁^β {4.25}), 4.18 (dd, 1 H, J_{H2,H3} = 3.6 Hz, J_{H2,H1} = 3.6 Hz, H2), 4.09-4.04 (m, 5 H, G₁^{aa} {4.08}, 2× -C_qCH₂O- {4.05}), 3.98-3.56 (m, 34 H, G₁^{ab} {3.96}, H5 {3.94}, S₂^β {3.89}, H3 {3.83}, H6a/b {3.81}, P₍₁₋₂₎^δ {3.80}, G₂^α {3.79}, S₁^β {3.77}, H4 {3.69}, H3-OEG {3.68}, P₍₃₋₅₎^δ {3.65}, H5-, H6-, H8-, H9-OEG {3.62}, H11-OEG {3.58}), 3.45 (t, 2H, J_{CH2,CH2} = 5.3 Hz, H12-OEG), 3.39 (d, 1 H, J_{Hβ,Hα} = 5.1 Hz, H^{βa}), 3.28-3.14 (m, 8 H, -HN_{Lysin}CH₂- {3.24}, H^{βb} {3.21}, R^δ {3.20}, -HN_{Octyl}CH₂- {3.19}), 2.95-2.92 (m, 3 H, D^{βa} {2.94}, H2-OEG {2.93}), 2.72-2.68 (m, 1 H, D^{βb}), 2.29-1.83 (m, 25 H, P₍₁₋₅₎^{βa} {2.25}, V^β (2.13), CH₃(NHAc) {2.08}, P₍₁₋₅₎^γ {2.03, 1.99}, P₍₁₋₅₎^{βb} {1.97}, R^{βa} {1.90}), 1.82-1.77 (m, 2 H, -HNCHCH₂-), 1.74-1.68 (m, 3 H, R^{βb} {1.72}, R^γ {1.68}), 1.61-1.55 (m, 2 H, -NH_{Lysin}CH₂CH₂-), 1.53-1.45 (m, 2 H, -HN_{Octyl}CH₂CH₂-), 1.42 (d, 6 H, J_{A2/3β,A2/3α} = 6.9 Hz, A_(2,3)^β), 1.38-1.26 (m, 21 H, A_(1,4)^β {1.37}, -HNCHCH₂CH₂- {1.35}, -(CH₂)₅CH₃) {1.29}, T_{Tn}^γ

{1.27}), 1.20 (d, 6 H, $J_{T_{1/2\gamma}, T_{1/2\beta}} = 6.4$ Hz, $T_{(1,2)^\gamma}$), 1.00 (d, 3 H, $J_{V_{\gamma a}, V_{\beta}} = 6.5$ Hz, $V^{\gamma a}$), 0.98 (d, 3 H, $J_{V_{\gamma b}, V_{\beta}} = 6.6$ Hz, $V^{\gamma b}$), 0.89 (t, 3 H, $J_{CH_3, CH_2} = 6.9$ Hz, $-CH_2CH_3$).

Die 34 Protonensignale der Amide, Amine, Alkohole und Säuren treten aufgrund von Austauschprozessen mit dem Lösungsmittel im Spektrum nicht auf.

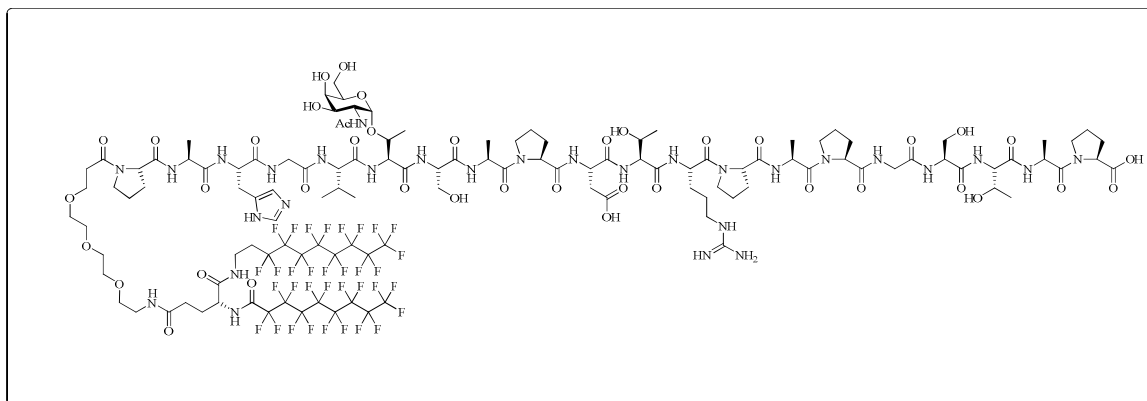
^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CD_3OD+TFA-d_1$, HSQC, HMBC), δ (ppm): 174.10, 174.01, 173.98, 173.95, 173.23, 172.95, 172.86, 172.67, 172.40, 172.33, 172.20, 172.15, 171.69, 171.66, 171.39, 171.17, 170.98, 170.70, 170.67, 170.60, 170.51, 170.47, 170.23 (26 \times C=O), 157.14 (C=NH), 133.65 (H^{δ}), 129.41 (H^{γ}), 117.46 (H^{δ}), 99.14 (C1), 76.40 (T_{Tn}^{β}), 71.41 (C5), 69.99 (2 \times $-C_qCH_2O-$), 69.85 (C3), 69.77 (C4), 69.64 (C5-, C6-, C8-, C9-OEG), 69.10 (C11-OEG), 69.01 (C3-OEG), 66.91, 66.37 ($T_{(1,2)}^{\beta}$), 61.86 (S_1^{β}), 61.71 (C6), 61.62 (S_2^{β}), 61.58, 61.46, 61.42, 61.10, 60.89 ($P_{(1-5)}^{\alpha}$), 59.37 (T_2^{α}), 59.05 (V^{α}), 58.99 (T_1^{α}), 58.83 (T_{Tn}^{α}), 55.84 (S_2^{α}), 55.23 (S_1^{α}), 54.15 ($-HNCHCH_2-$), 52.38 (R^{α}), 50.79 (H^{α}), 50.53 (D^{α}), 50.03 (C2), 42.40 (G_2^{α}), 42.40 (G_1^{α}), 40.71 ($-HN_{Lysin}CH_2-$), 39.08 ($-HN_{Octyl}CH_2-$), 38.44 (C12-OEG), 34.44 (C2-OEG), 34.34 (D^{β}), 31.53 ($-(CH_2)_5CH_3$), 30.78 ($-HNCHCH_2-$), 29.98 (V^{β}), 29.41, 29.19 (2 \times $P_{(1-5)}^{\beta}$), 29.12, 28.99 (2 \times $-(CH_2)_5CH_3$), 28.93, 28.88 (3 \times $P_{(1-5)}^{\beta}$), 28.67 ($-HN_{Octyl}CH_2CH_2$), 28.48 ($-HN_{Lysin}CH_2CH_2-$), 27.78 (R^{β}), 26.49 ($-(CH_2)_5CH_3$), 26.39 (H^{β}), 24.88, 24.74, 24.60, 24.47, 24.43 ($P_{(1-5)}^{\gamma}$), 24.29 (R^{γ}), 22.75 ($-HNCHCH_2CH_2-$), 22.25 ($-(CH_2)_5CH_3$), 21.83 ($CH_3(NHAc)$), 18.78, 18.82 ($T_{(1,2)}^{\gamma}$), 18.44 ($V^{\gamma a}$), 17.93 (T_{Tn}^{γ}), 17.60 ($V^{\gamma b}$), 15.53, 15.32, 15.14 ($A_{(1-4)}^{\beta}$), 12.94 ($-CH_2CH_3$).

Das Signale Kohlenstoffatome der Perfluoralkylkette sind im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht zu sehen und die neun Signale von $A_{(1-4)}^{\alpha}$ und $P_{(1-5)}^{\delta}$ befinden sich unter dem Lösungsmittelsignal.

^{19}F -NMR (376.4 MHz, $CD_3OD+TFA-d_1$), δ (ppm): -84.26 (t, 3 F, $J_{F,F} = 10.2$ Hz, $-CF_3$), -122.43 (t, 2 F, $J_{F,F} = 13.0$ Hz, $-OCCF_2$), -124.32 (bs, 2 F), -124.71 (bs, 4 F), -125.32 (bs, 2 F), -125.60 (bs, 2 F), -129.11- -129.22 (m, 2 F, $-CF_2CF_3$).

(S)-4-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9,9-heptafluorononanamido-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10,10-heptafluorodecylamino)-5-oxopentylamido-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (115)

(R_F -Glu-O-Decyl(F_{17})-OEG-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 455 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-*O*-Trt vorbeladenen Tentagel-S-Harzes (Rapp-Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgte die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Fastmoc-Standardprotokoll. Zur Kupplung der glycosylierten Aminosäure wurde eine Lösung aus 168 mg (0.25 mmol, 2.5 Äquiv.) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OH **41**, 105 mg (0.275 mmol, 2.75 Äquiv.) HATU, 36 mg (0.275 mmol, 2.75 Äquiv.) HOAt und 60 μ L (0.55 mmol, 5.5 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin eingesetzt. Die Kupplungszeit betrug 8 h (je 30 s Vortex und 30 s Pause), wobei eventuell verbliebene Aminogruppen mit dem Capping-Reagenz acetyliert wurden und die nachfolgende Aminosäure Valin einer Doppelkupplung unterzogen wurde. Nach anschließender Fmoc-Abspaltung erfolgte neben der Anbindung der verbleibenden Aminosäuren auch die Kupplung der Oligoethyleneinheit FmocHN-OEG-COOH **27** einschließlich finaler Fmoc-Deblockierung nach dem Standardprotokoll. Zur manuellen Kupplung der Membranankereinheit R_F-Glu(OH)-*O*-Decyl(F₁₇) **95** wurde das Harz in einen Merrifield-Glasreaktor überführt und dreimal mit 10 mL Dichlormethan gewaschen. Für die Peptidkupplung wurde eine Lösung aus 208 mg (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) R_F-Glu(OH)-*O*-Decyl(F₁₇) **95**, 84 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HATU, 30 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HOAt und 45 μ L (0.44 mmol, 4.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in einer Mischung aus 10 mL *N*-Methylpyrrolidin, 10 mL *N,N'*-Dimethylformamid und 10 mL Dioxan gegeben und diese 2 d bei 30 °C geschüttelt. Danach wurde die Kupplungs-Lösung abfiltriert und das Harz dreimal mit je 10 mL Dichlormethan gewaschen. Zur Abspaltung des Peptides vom Harz und gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde das Harz nun in einer Lösung aus 10 mL Trifluoressigsäure, 1 mL Triisopropylsilan und 1 mL Wasser für 3 h geschüttelt. Nach Filtration wurde das Harz noch dreimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen und nach Verdünnen mit 15 mL Toluol i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde anschließend dreimal mit je 15 mL Toluol kdestilliert und nach Zugabe von 10 mL entionisiertem Wasser lyophilisiert.

C₁₂₇H₁₇₃F₃₄N₂₉O₄₃ (M = 3439.85 g/mol) [3438.17].

ESI-MS (positiv), m/z: 1720.54 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1720.09), 1154.71 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1154.39).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1720.1021 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1720.0928).

Analytische RP-HPLC (Luna PFP, MeOH/H₂O, 80:20→100:0, 20 min, $R_t = 23.9$ min, $\lambda = 212$ nm).

Deacetylierung:

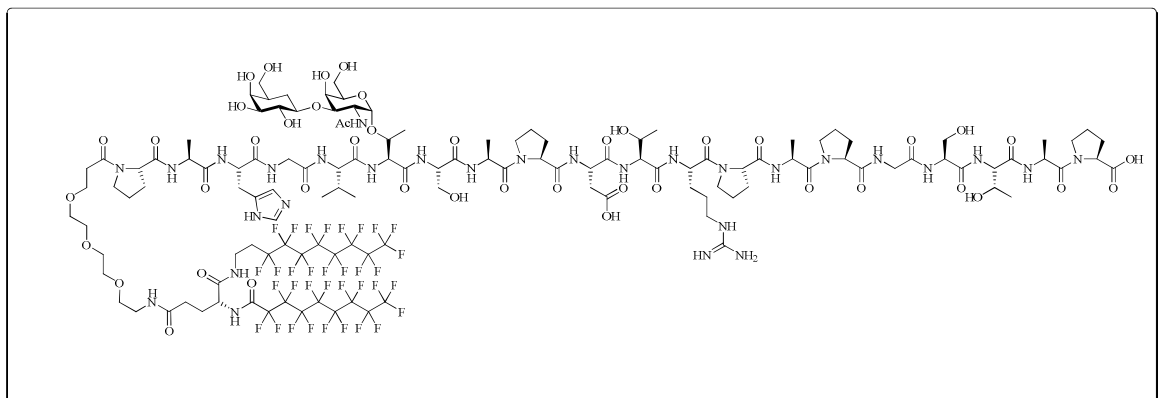
Das rohe Glycopeptid **112** wurde nach **AAV3** in 40 mL Methanol (HPLC-grade) bei einem pH-Wert von 9 deacetyliert. Die Reinigung erfolgte durch zweimaliges Ausfällen des in 0.5 mL Methanol gelösten Rohproduktes mit 40 mL kaltem Diethylether. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde die überstehende Lösung dekantiert. Es konnten 119 mg (0.036 mmol, 36%) des Glycopeptids **115** isoliert werden.

C₁₂₁H₁₆₇F₃₄N₂₉O₄₀ (M = 3313.74 g/mol) [3312.14].

MALDI-TOF-MS (dhh, positiv), m/z: 3313.33 ($[M+H]^+$, ber.: 3313.15).

(S)-4-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-hepta-decafluorononanamido-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-hepta-decafluordecylamino)-5-oxopentylamido-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-2-desoxy-α-d-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (116)

(R_F-Glu-O-Decyl(F₁₇)-OEG-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr([βGal-(1→3)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 455 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-S-Harzes (Rapp-Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgte die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Fastmoc-Standardprotokoll. Zur Kupplung der glycosylierten Aminosäure wurde eine

Lösung aus 192 mg (0.2 mmol, 2.0 Äquiv.) Fmoc-Thr($[\beta\text{Ac}_4\text{Gal}-(1\rightarrow3)]-\alpha\text{GalAc}_2\text{NAc}$)-OH **99**, 84 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HATU, 30 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HOAt und 45 μL (0.44 mmol, 4.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin eingesetzt. Die Kupplungszeit betrug 8 h (je 30 s Vortex und 30 s Pause), wobei eventuell verbliebene Aminogruppen mit dem Capping-Reagenz acetyliert wurden und die nachfolgende Aminosäure Valin einer Doppelkupplung unterzogen wurde. Nach anschließender Fmoc-Abspaltung erfolgte neben der Anbindung der verbleibenden Aminosäuren auch die Kupplung der Oligoethyleneinheit FmocHN-OEG-COOH **27** einschließlich finaler Fmoc-Deblockierung nach dem Standardprotokoll. Zur manuellen Kupplung der Membranankereinheit $\text{R}_F\text{-Glu(OH)-O-Decyl(F}_{17})$ **95** wurde das Harz in einen Merrifield-Glasreaktor überführt und dreimal mit 10 mL Dichlormethan gewaschen. Für die Peptidkupplung wurde eine Lösung aus 208 mg (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) $\text{R}_F\text{-Glu(OH)-O-Decyl(F}_{17})$ **95**, 84 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HATU, 30 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HOAt und 45 μL (0.44 mmol, 4.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in einer Mischung aus 10 mL Tetrahydrofuran, 5 mL *N,N'*-Dimethylformamid und 5 mL Chloroform gegeben und diese 3 d bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde die Kupplungs-Lösung abfiltriert und das Harz dreimal mit je 10 mL Dichlormethan gewaschen. Zur Abspaltung des Peptides vom Harz und gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde das Harz nun in einer Lösung aus 10 mL Trifluoressigsäure, 1 mL Triisopropylsilan und 1 mL Wasser für 3 h geschüttelt. Nach Filtration wurde das Harz noch dreimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen und nach Verdünnen mit 15 mL Toluol i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde anschließend dreimal mit je 15 mL Toluol kodestilliert und nach Zugabe von 10 mL entionisiertem Wasser lyophilisiert.

$\text{C}_{140}\text{H}_{191}\text{F}_{34}\text{N}_{29}\text{O}_{50}$ (M = 3726.12 g/mol) [3724.28].

ESI-MS (positiv), m/z : 1864.65 ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1863.15), 1250.81 ($[\text{M}+2\text{H}+\text{Na}]^{3+}$, ber.: 1249.43).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1864.1301 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1864.1532).

Deacetylierung:

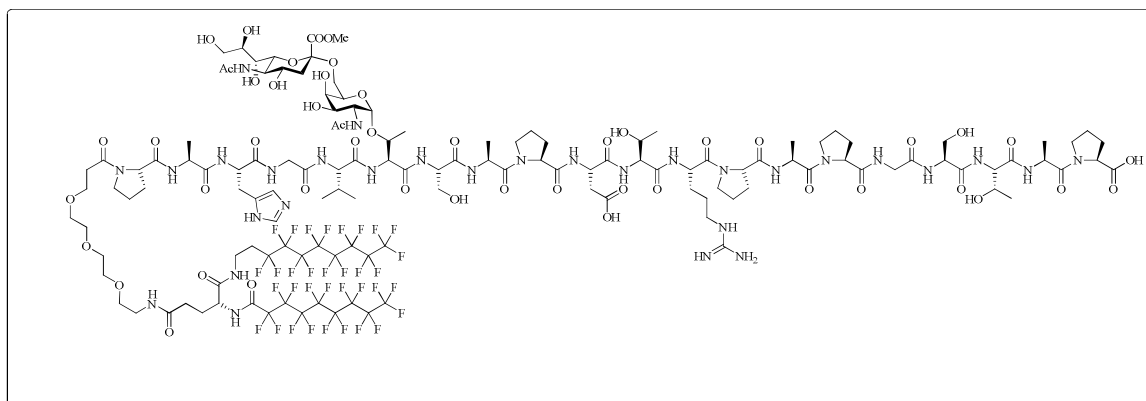
Das rohe Glycopeptid **113** wurde nach **AAV3** in 40 mL Methanol (HPLC-grade) bei einem pH-Wert von 9 deacetyliert. Die Reinigung erfolgte durch zweimaliges Ausfällen des in 0.5 mL Methanol gelösten Rohproduktes mit 40 mL kaltem Diethylether. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde die überstehende Lösung dekantiert. Es konnten 149 mg (0.043 mmol, 43%) des Glycopeptids **116** isoliert werden konnten.

$\text{C}_{128}\text{H}_{179}\text{F}_{34}\text{N}_{29}\text{O}_{44}$ (M = 3473.90 g/mol) [3472.21].

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), m/z : 3475.38 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 3473.22).

(S)-4-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluorononanamido-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamino)-5-oxopentylamido-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(α NeuNAcCOOMe-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-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 (117)

(R_F-Glu-O-Decyl(F₁₇)-OEG-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOMe-(2 \rightarrow 6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)



Ausgehend von 455 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt vorbeladenen Tentagel-S-Harzes (Rapp-Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) erfolgte die Glycopeptidsynthese am Peptidsynthesizer nach dem Fastmoc-Standardprotokoll. Zur Kupplung der glycosylierten Aminosäure wurde zweimal eine Lösung aus 75 mg (0.064 mmol, 0.64 Äquiv.) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OH **109**, 30 mg (0.077 mmol, 0.77 Äquiv.) HATU, 11 mg (0.077 mmol, 0.77 Äquiv.) HOAt und 15.5 μ L (0.14 mmol, 1.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin eingesetzt. Die Kupplungszeit betrug bei der ersten Kupplung 5 h und bei der zweiten 8 h (je 30 s Vortex und 30 s Pause), wobei eventuell verbliebene Aminogruppen mit dem Capping-Reagenz acetyliert wurden und die nachfolgende Aminosäure Valin einer Doppelkupplung unterzogen wurde. Nach anschließender Fmoc-Abspaltung erfolgte neben der Anbindung der verbleibenden Aminosäuren auch die Kupplung der Oligoethyleneinheit FmocHN-OEG-COOH **27** mit finaler Fmoc-Deblockierung nach dem Standardprotokoll. Zur manuellen Kupplung der Membranankereinheit R_F-Glu(OH)-O-Decyl(F₁₇) **95** wurde das Harz in einen Merrifield-Glasreaktor überführt und dreimal mit 10 mL Dichlormethan gewaschen. Für die Peptidkupplung wurde eine Lösung aus 208 mg (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) R_F-Glu(OH)-O-Decyl(F₁₇) **95**, 84 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HATU, 30 mg (0.22 mmol, 2.2 Äquiv.) HOAt und 45 μ L (0.44 mmol, 4.4 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin in einer Mischung aus 10 mL Tetrahydrofuran, 5 mL *N,N'*-Dimethylformamid und 5 mL Chloroform gegeben und diese 3 d bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde die Kupplungs-Lösung abfiltriert und das Harz dreimal mit

je 10 mL Dichlormethan gewaschen. Zur Abspaltung des Peptides vom Harz und gleichzeitigem Entfernen der säurelabilen Schutzgruppen wurde eine Lösung aus 10 mL Trifluoressigsäure, 1 mL Triisopropylsilan und 1 mL Wasser zugesetzt. Die Mischung wurde 3 h geschüttelt und filtriert. Das Harz wurde dreimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen und das Filtrat wurde nach Verdünnen mit 15 mL Toluol i. Vak. eingeengt. Der Rückstand wurde anschließend dreimal mit je 15 mL Toluol kodestilliert und nach Zugabe von 10 mL entionisiertem Wasser lyophilisiert.

$C_{151}H_{202}F_{34}N_{30}O_{54}$ (M = 3947.33 g/mol) [3945.34].

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1974.20 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1973.68), 1323.83 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 1323.45).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1973.6715 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1973.6798).

Hydrierung:

Nach Lösen des Lyophilisats **114** in 5 mL Methanol wurde dieses unter Argon mit 10 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) versetzt. Anschließend wurde der Kolben dreimal evakuiert und mit Wasserstoff gespült. Man rührte 24 h unter einer Wasserstoffatmosphäre, bevor man mit einem Spritzenfilter (PTFE) das Palladium auf Aktivkohle entfernte und zweimal mit 5 mL Methanol nachspülte. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt.

Deacetylierung:

Das rohe Glycopeptid wurde nach **AAV3** in 40 mL Methanol (HPLC-grade) bei einem pH-Wert von 9.5 deacetyliert. Die Reinigung erfolgte durch zweimaliges Ausfällen des in 0.5 mL Methanol gelösten Rohproduktes aus 40 mL kaltem Diethylether. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurde die überstehende Lösung dekantiert, wobei 136 mg (0.038 mmol, 38%) des Glycopeptids **117** isoliert werden konnten.

$C_{133}H_{186}F_{34}N_{30}O_{48}$ (M = 3619.02 g/mol) [3617.25].

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv), *m/z*: 3617.84 ($[M+H]^+$, ber.: 3618.26).

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Kiaris, *Understanding Carcinogenesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [2] G. Husmann, P. Kaatsch, A. Katalinic, J. Bertz, J. Haberland, K. Kraywinkel, U. Wolf, *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends* (Hrsg.: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.), 7. Ausgabe, Berlin, **2010**.
- [3] Homepage des statistischen Bundesamtes:
http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/GestorbeneAnzahl,templateId=renderPrint_psml; Zugriff am 03.01.2011
- [4] J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200-205.
- [5] Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289-294.
- [6] J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oj, I. M. Belayakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, J. C. Morris, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1515-1525.
- [7] I. Espinoza-Delgado, *The Oncologist* **2002**, *7*, 20-33.
- [8] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-911.
- [9] M. S. Mitchell, *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 1051-1059.
- [10] P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305-1326.
- [11] E. Jäger, D. Jäger, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 817-820.
- [12] T. M. Kündig, C. Renner, A. Knuth, *Therapeutische Umschau* **2006**, *6*, 262-266.
- [13] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- [14] J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, T. Plunkett, R. Graham, I. Correra, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 209-221.
- [15] S. M. Barratt-Boyes, *Cancer Immunol. Immunother.* **1996**, *43*, 142-151.
- [16] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [17] S. Yonezawa, M. Goto, N. Yamada, M. Higashi, M. Nomoto, *Proteomics* **2008**, *8*, 3329-3341.
- [18] J. R. Gum, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 795-799.
- [19] I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 214-219.
- [20] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gentler, C. Gillett, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 1072-1076.

- [21] J. Hilkens, M. J. L. Lightenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359-363.
- [22] S. Wittrock, H. Kunz, *Rot-Grün-Weiss* **2006**, 2-5.
- [23] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell. Biol.* **2008**, *182*, 531-542.
- [24] D. M. Swallow, S. Gendler, B. Griffith, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell, *Nature* **1987**, *328*, 82-84.
- [25] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355-364.
- [26] I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 67-95.
- [27] F.-G. Hanisch, G. Uhlenbruck, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 872-883.
- [28] F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, *7*, 525-543.
- [29] I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 318-325.
- [30] S. Wilkie, G. Picco, J. Foster, D. M. Davies, S. Julien, L. Cooper, A. Arif, S. J. M Mather, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, J. Maher, *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4901-4909.
- [31] S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26103-26112.
- [32] I. Brockhausen, J. M. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- [33] T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 491-517.
- [34] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691-696.
- [35] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montenegro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386-5394.
- [36] S. Dziadek, C. Griesinger, J. Kunz, U. M. Reinscheidt, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.
- [37] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662-7667.
- [38] M. A. Trap, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197-209.
- [39] T. Pfitzner, S. Barth, A. Engert, *Der Onkologe* **2000**, *6*, S31-S35.
- [40] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354-355.
- [41] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366-369.
- [42] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803-7808.
- [43] O Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243-246.

- [44] S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Dériaud, C. Leclerc, P. Dumy, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1149-1159.
- [45] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, *8*, 1355-1369.
- [46] M.-G. Baek, K. Rittenhouse-Olson, R. Roy, *Chem. Commun.* **2001**, 257-258.
- [47] R. Ojeda, J. L. de Paz, A. G. Barrientos, M. Martin-Lomas, S. Penadés, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 448-459.
- [48] A. Sundgren, J. J. Barchi, Jr., *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1594-1604.
- [49] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4254-4287.
- [50] S. Ingale, T. Buskas, G.-J. Boons, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5785-5788.
- [51] S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 455-463.
- [52] T. Buskas, P. Thompson, G.-J. Boons, *Chem. Commun.* **2009**, 5335-5349.
- [53] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, A.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772-3776.
- [54] C. Gege, M. F. Schneider, G. Schumacher, L. Limozin, U. Rothe, G. Bendas, M. Tanaka, R. R. Schmidt, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 216-224.
- [55] G. Schumacher, U. Bakowsky, C. Gege, R. R. Schmidt, U. Rothe, G. Bendas, *Biochemistry* **2006**, *45*, 2894-2903.
- [56] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- [57] U. S. Department of Health and Human Services, *Inside the Cell*, **2005**.
- [58] K. Simons, G. van Meer, *Biochemistry* **1988**, *27*, 6197-6202.
- [59] L. J. Pike, *J. Lip. Res.* **2003**, *44*, 655-667.
- [60] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569-572.
- [61] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31-41.
- [62] S. Mañes, G. del Real, C. Martinez-A, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 557-569.
- [63] M. Kirkham, R. G. Parton, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1745*, 273-286.
- [64] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703.
- [65] K. Simons, R. Ehehalt, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 597-603.
- [66] P. S. Kabouridis, E. C. Jury, *FEBS Letters* **2008**, *582*, 371-3718.
- [67] N. C. Yoder, D. Yüksel, L. Dafik, K. Kumar, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 576-583.
- [68] P. Kirsch, *Modern Fluoroorganic Chemistry: Synthesis, Reactivity, Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [69] C. W. Bunn, E. R. Howells, *Nature* **1954**, *174*, 549-551.
- [70] J. A. Fournier, R. K. Bohn, J. A. Montgomery, Jr., M. Onda, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 1118-1122.

- [71] P. J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Interscience Publications, New York, **1969**.
- [72] V. M. Sadler, F. Giulieri, M. P. Krafft, J. G. Riess, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1952-1956.
- [73] J. G. Riess, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 294-304.
- [74] M. P. Krafft, J. G. Riess, *Biochimie* **1998**, *80*, 489-514.
- [75] M. C. Petty, *Langmuir-Blodgett films*, Cambridge University Press, Cambridge, **1996**.
- [76] M. P. Krafft, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *47*, 209-228.
- [77] X. Li, J. Turánek, P. Knötigová, H. Kudláčková, J. Mašek, S. Parkin, S. E. Rankin, B. L. Knutson, H.-J. Lehmler, *Colloid Surface B* **2009**, *73*, 65-74.
- [78] J. L. de Paz, P. H. Seeberger, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 1027-1032.
- [79] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967-7968.
- [80] J. L. de Paz, C. Noti, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2766-2767.
- [81] X.-L. Sun, C. L. Stabler, C. S. Cazalis, E. L. Chaikof, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 52-57.
- [82] S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011-1017
- [83] J. Zhang, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, J.-P. Praly, E. Souteyrand, J.-J. Vasseur, F. Morvan, Y. Chevolut, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2515-2521.
- [84] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162-13163.
- [85] F. A. Jaipuri, B. Y. M. Collet, N. L. Pohl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1731-1734.
- [86] A. J. Vegas, J. E. Bradner, W. Tang, O. M. McPherson, E. F. Greenberg, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7960-7964.
- [87] R. L. Nicholson, M. L. Ladlow, D. R. Spring, *Chem. Commun.* **2007**, 3906-3908.
- [88] N. L. Pohl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3930-3932.
- [89] E.-H. Song, N. L. Pohl, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 889-896.
- [90] J. M. Schnur, *Science* **1993**, *262*, 1669-1676.
- [91] T. Kunitake, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 692-710.
- [92] R. Katoch, G. K. Trivedi, R. S Phadke, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2753-2758.
- [93] J. Kuszmann, E. Tomori, I. Meerwald, *Carbohydrate Res.* **1984**, *128*, 87-99.
- [94] H. Eibl, *Chem. Phys. Lip.* **1981**, *28*, 1-5.
- [95] F. S. Gibson, M. S. Park, H. Rapoport, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7503-7507.
- [96] Q. Chen, X-L. Qiu, F.-L. Qing, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3762-3767.
- [97] R. Díez, R. Badorrey, M. D. Díaz-de-Villegas, J. A. Gálvez, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2114-2120.

- [98] U. Kazmaier, S. Pähler, R. Endermann, D. Häbicht, H.-P. Knoll, B. Riedl, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3905-3913.
- [99] B. J. Albert, A. Sivaramakrishnan, T. Naka, K. Koide, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2792-2793.
- [100] S. Paul, M. Müller, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 128-137.
- [101] T. Konosu, S. Oida, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2212-2215.
- [102] R. van Rijsbergen, M. J. O. Anteunis, A. De Bruyn, *J. Carbohydrate Chemistry* **1983**, *2*, 395-404.
- [103] G. W. Breton, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8952-8954.
- [104] G. Mahender, R. Ramu, C. Ramesh, B. Das, *Chemistry Letters* **2003**, *32*, 734-735.
- [105] T. Umemoto, Y. Kuriu, H. Shuyama, O. Miyano, S.-I. Nakayama, *J. Fluorine Chem.* **1982**, *20*, 695-698.
- [106] J. L. Howell, B. J. Muzzi, N. L. Rider, E. M. Aly, M. K. Abuelmagd, *J. Fluorine Chem.* **1995**, *72*, 61-68.
- [107] H. Meinert, A. Knoblich, J. Mader, H. Brune, *J. Fluorine Chem.* **1992**, *59*, 379-385.
- [108] K. Goto, M. Mizuno, *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 5605-5608.
- [109] M. Mizuno, S. Kitazawa, K. Goto, *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 955-960.
- [110] B. Hungerhoff, H. Sonnenschein, F. Theil, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1781-1785.
- [111] L. J. Alvey, D. Rutherford, J. J. J. Juliette, J. A. Gladysz, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6302-6308.
- [112] N. O. Brace, *J. Fluorine Chem.* **1999**, *93*, 1-25.
- [113] N. O. Brace, *J. Fluorine Chem.* **1999**, *96*, 101-127.
- [114] N. O. Brace, *J. Fluorine Chem.* **2001**, *108*, 147-175.
- [115] G. G. Furin, *Russian Chemical Reviews* **2000**, *69*, 491-522.
- [116] F. Fache, O. Piva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 139-143.
- [117] Z.-F. Wang, J.-C. Xu, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12597-12608.
- [118] M. Hein, R. Miethchen, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 6679-6682.
- [119] M. Hein, R. Miethchen, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2429-2432.
- [120] P. Beier, D. O'Hagan, C. Pearson, M. C. Petty, A. M. Z. Slawin, *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 673-682.
- [121] G. Gambaretto, L. Conte, G. Fornasieri, C. Zarantonello, D. Tonei, A. Sassi, R. Bertani, *J. Fluorine Chem.* **2003**, *121*, 57-63.
- [122] J. Bayardon, D. Maillard, G. Pozzi, D. Sinou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2633-2640.
- [123] R. Kaplánek, T. Bříza, M. Havlík, P. Martásek, V. Král, *J. Fluorine Chem.* **2007**, *128*, 179-183.

- [124] G. Foulard, R. Brigaud, C. Portella, *Tetrahedron* **1996**, 52, 6187-6200.
- [125] E. Rogalska, R. Bilewicz, T. Brigaud, C. El Moujahid, G. Foulard, C. Portella, M.-J. Stébé, *Chem. Phys. Lip.* **2000**, 105, 71-91.
- [126] L. Delon, P. Laurent, H. Blancou, *J. Fluorine Chem.* **2005**, 126, 1487-1492.
- [127] D. P. Curran, *Synlett* **2001**, 1488-1496.
- [128] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813-826.
- [129] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 901-904.
- [130] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 976-980.
- [131] P. B. W. Kortenaar, B. G. van Dijk, J. M. Peters, B. J. Raaben, P. J. H. M. Adams, G. I. Tesser, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, 27, 398-400.
- [132] H. Kunz, in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker, New York **1997**, 265.
- [133] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymm.* **1993**, 4, 1205-1220.
- [134] B. Liebe, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1997**.
- [135] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 863-870.
- [136] C. Santaella, P. Vierling, J. G. Riess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 103, 584-586.
- [137] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry*, 2 ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [138] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1251.
- [139] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Deutsche Patentanmeldung* **1978**, AZ: P 2816340.8.
- [140] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89-107.
- [141] H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1995**, 268, 17-34.
- [142] B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8777-8778.
- [143] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473-1482.
- [144] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1996**, 1, 985-993.
- [145] C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [146] G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1705-1710.
- [147] E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 606-631.
- [148] N. Sewald, H. D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, 1. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [149] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 268-274.
- [150] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.
- [151] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525-2528.

- [152] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [153] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-1222.
- [154] A. M. Felix, E. P. Heimer, C. T. Wang, T. J. Lambros, A. Fournier, T. F. Mowles, S. Maines, R. M. Campbell, B. b. Wegrzynski, V. Toome, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32*, 441-454.
- [155] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [156] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [157] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1269-1272.
- [158] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441-445.
- [159] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [160] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [161] John Jones, *Synthese von Aminosäuren und Peptiden*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [162] S. Lin, Z.-Q. Yang, B. H. B. Kwok, M. Koldosbiy, C. M. Crews, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6347-6355.
- [163] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed. Wiley-Interscience, New York, **2007**.
- [164] K. Wakabayashi, W. Pigman, *Carbohydr. Res.* **1974**, *35*, 3-14.
- [165] H. G. Garg, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1976**, *49*, 482-488.
- [166] M. C. Petty, *Langmuir-Blodgett films. An Introduction*, Cambridge University Press, Cambridge, **1996**.
- [167] P. Scheibe, *Diplomarbeit*, Universität Mainz, **2007**.
- [168] D. Möbius, *Curr. Opin. Colloid In.* **1998**, *3*, 137-142.
- [169] J. A. DeRose, R. M. Leblanc, *Surf. Sci. Rep.* **1995**, *22*, 73-126.
- [170] Skript zum Versuch *Filmwaage*, Biophysik Praktikum, LMU München, **2008**.
- [171] S. Ortial, G. Durand, B. Poeggeler, A. Polidori, M. A. Pappolla, J. Böker, R. Hardeland, B. Pucci, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2812-2820.
- [172] H. Trabelsi, F. Szönyi, N. Michelangeli, A. Cambon, *J. Fluorine Chem.* **1994**, *69*, 115-117.
- [173] B. Pucci, C. Guedj, A. A. Pavia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1003-1006.
- [174] B. Charpentier, C. Durieux, I. Menant, B. P. Roques, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 962-968.
- [175] J. Afzal, B. M. Fung, E. A. O'Rear, *J. Fluorine Chem.* **1987**, *34*, 385-393.

- [176] K. L. Kees, T. M. Smith, M. L. McCaleb, D. H. Prozialeck, R. S. Cheeseman, T. E. Christos, W. C. Patt, K. E. Steiner, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 944-953.
- [177] S. D. Larsen, T. Barf, C. Liljebris, P. d. May, D. Ogg, T. J. O'Sullivan, B. J. Palazuk, H. J. Schostarez, F. C. Stevens, J. E. Bleasdale, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 598-622.
- [178] A. Kaiser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2009**.
- [179] S. Taliani, F. Simorini, V. Sergianni, C. La Motta, F. Da Settimo, B. Cosimelli, E. Abignente, G. Greco, E. Novellino, L. Rossi, V. Gremigni, F. Spinetti, B. Chelli, C. Martini, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 404-407.
- [180] G. L. Gains Jr., *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Wiley-Interscience, New York, **1966**.
- [181] P. Scheibe, unveröffentlichte Resultate.
- [182] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2001**, 880-885.
- [183] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525-542.
- [184] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *563*, 139-145.
- [185] T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, 2487-2502.
- [186] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [187] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4539-4565.
- [188] T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 16-25.
- [189] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35-42.
- [190] S. Dziadek, C. G. Espínola, H. Kunz, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 519-543.
- [191] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. I. Lee, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 480-483.
- [192] H. Anso, M. Kiso, *Glycoscience* **2008**, *Part 5*, 1313-1359.
- [193] A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1991**, *212*, 277-281.
- [194] P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 179-205.
- [195] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13-c17.
- [196] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115-116.
- [197] I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. du Penhoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 23-41.
- [198] O. Kani, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501-506.
- [199] R. R. Schmidt, E. Rücker, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1421-1424.
- [200] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [201] R. B. Merrifield, *Biochemistry* **1964**, *3*, 1385-1390.
- [202] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812.

- [203] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- [204] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451-454.
- [205] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.
- [206] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [207] J. M. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055-3056.
- [208] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [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] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 98-101.
- [212] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [213] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
- [214] A. J. Mort, D. T. Lamport, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 289-309.
- [215] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246-249.
- [216] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *13*, 35-42.
- [217] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [218] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [219] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939-1944.
- [220] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64.
- [221] M. Rothe, J. Mazanek, *Angew. Chem.* **1972**, *84*, 290-291.
- [222] M. Rothe, J. Mazanek, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 439-459.
- [223] P. M. Fischer, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 9-35.
- [224] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117-133.
- [225] Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thornqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689-9692.
- [226] R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353-6370.
- [227] C. G. Fields, G. B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6661-6664.
- [228] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688-7692.
- [229] A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlizki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676-8681.
- [230] R. Bourbonnais, D. Leech, M. G. Paice, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1379*, 381-390.
- [231] D. D. Perrin, W. L.F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3 ed., Pergamon press, Oxford, **1988**.
- [232] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.

- [233] G. Szepesi, *Reverse-Phase HPLC*, Wiley-VCH, Weinheim, **1992**.
- [234] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [235] X. Li, M. Tansova, C. Vasileiou, B. Borhan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1885-1893.
- [236] U. Schmidt, R. Meyer, V. Leitenberger, F. Staebler, A. Lieberknecht, *Synthesis* **1991**, *5*, 409-413.
- [237] T. Sato, T. Mizutani, Y. Okumura, T. Fujisawa, *Tet. Let.* **1989**, *30*, 3701-3702.
- [238] S. F. Martin, Y.-L. Wong, A. S. Wagman, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4821-4831.
- [239] D. Baeckström, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11503-11509.
- [240] Z. Zhang, G. Magnussen, *Carbohydr. Res.* **1996**, *295*, 41-55.
- [241] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129-132.
- [242] B. K. Shull, Z. Wu, M. Koreeda, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 955-964.
- [243] N. Bézay, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [244] S. Keil, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [245] N. Sugiyama, K. Sugai, N. Yamada, H. Ogura, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1147-1152.

8 SPEKTROSKOPISCHER ANHANG

1-Azido-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridecafluor-2-iodnonoxyloxy)propan (**19**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F III

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**40**)

^1H , ^{13}C IV

N-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**57**)

^1H , ^{13}C , COSY, HSQC V

N-Benzoyloxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluorundecyloxy)propylamid (**48**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F VII

N-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecan-2,3-bis(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluorundecyloxy)propylamid (**61**)

^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, ^{19}F IX

(*S*)-*N*-(6-Amino-1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamido)-1-oxohexan-2-yl)-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluornonanamid (**77**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F XI

(*S*)-2-(2-(5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluor-nonanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamino)-2-oxoethoxy)essigsäure (**79**)

^1H , ^{13}C , ^{19}F XIII

(*S*)-12-Amino-4,7,10-trioxadodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluornonan-amido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamid (**83**)

¹H, ¹³C, ¹⁹F

XIV

N-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-12-amido-4,7,10-trioxa-dodecan-5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluornonanamido)-6-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamino)-6-oxohexylamid (**90**)

¹H, ¹³C, COSY, HSQC, ¹⁹F

XVI

(*S*)-*tert*-Butyl-4-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluornonanamido)-5-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecylamino)-5-oxopentansäureester (**94**)

¹H, ¹³C, ¹⁹F

XVIII

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**98**)

¹H, ¹³C

XX

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonin-*tert*-butylester (**108**)

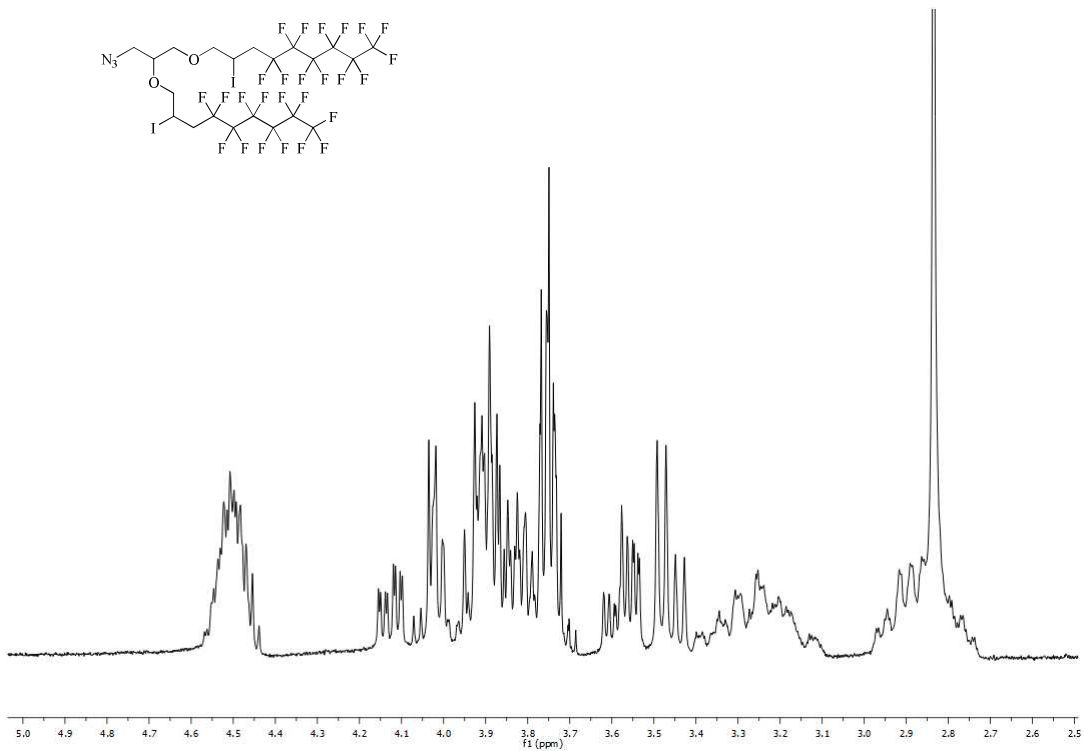
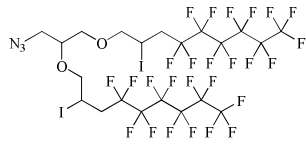
¹H, ¹³C, COSY, HSQC

XXI

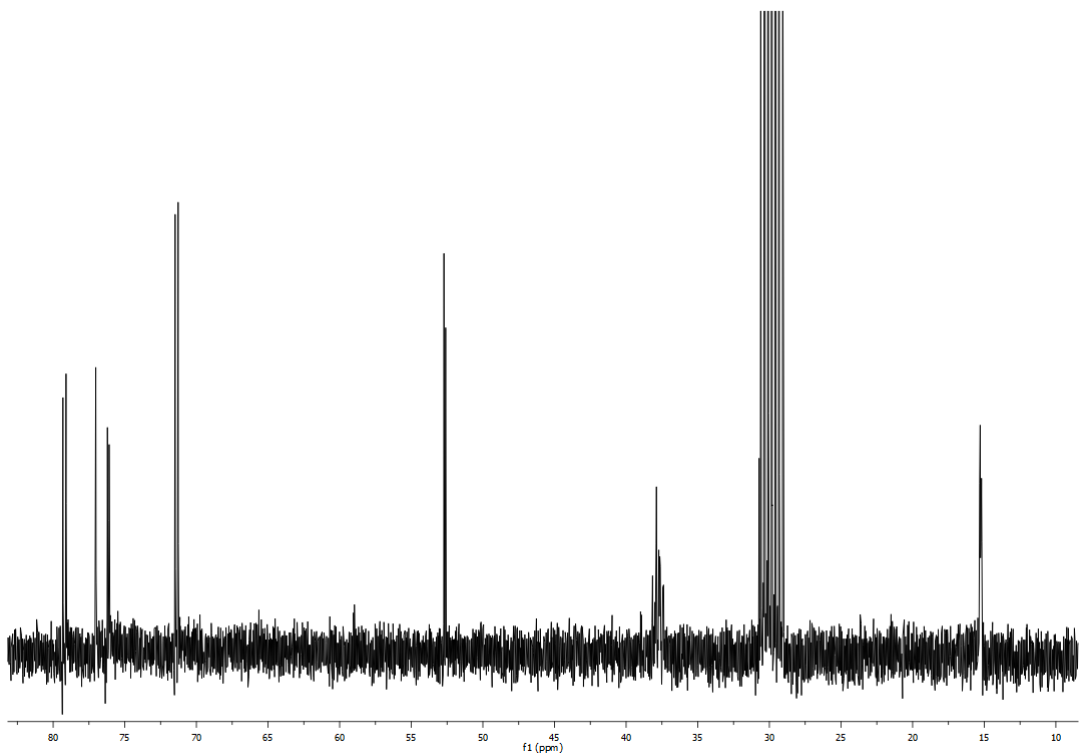
(*S*)-2-(2-(5-(2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-heptadecafluornonanamido)-6-(octylamino)-6-oxohexylamino)-2-oxoethoxy)ethylamido-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-*N*-l-prolyl-l-alanyl-l-histidyl-l-glycyl-l-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-l-threonyl-l-seryl-l-alanyl-l-prolyl-l-aspartyl-l-threonyl-l-arginyl-l-prolyl-l-alanyl-l-prolyl-l-glycyl-l-seryl-l-threonyl-l-alanyl-l-prolin (**111**)

¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC ¹⁹F

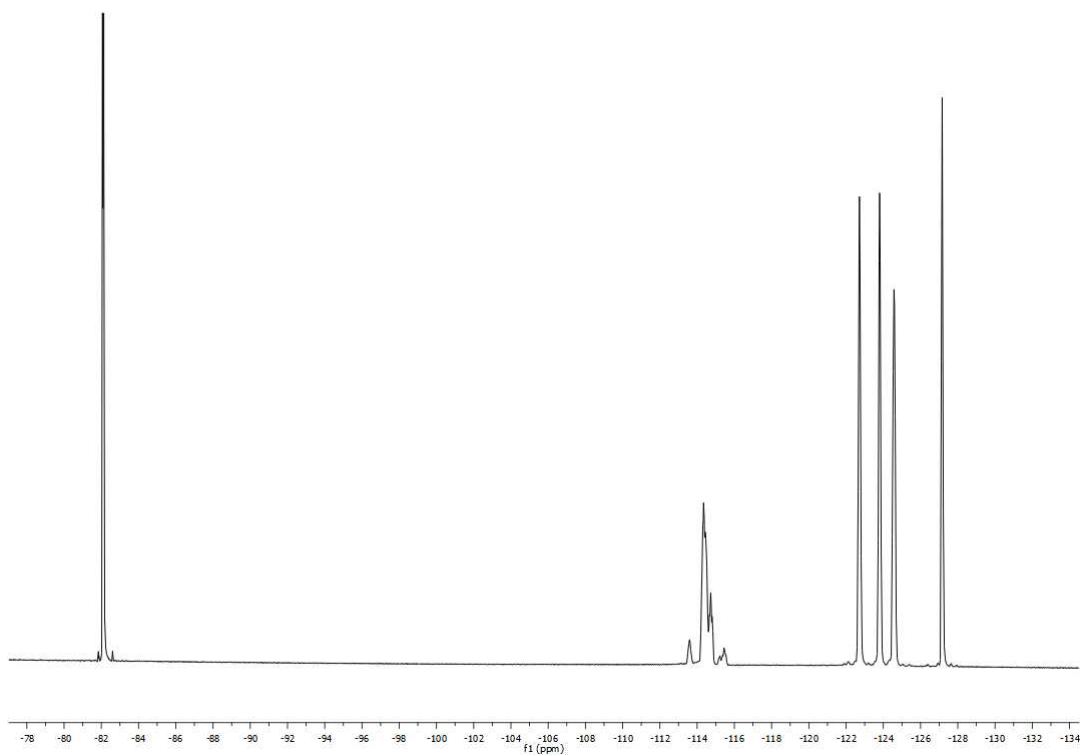
XXIII

N₃-GlycF₂₆ (19)

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, (CD₃)₂O)

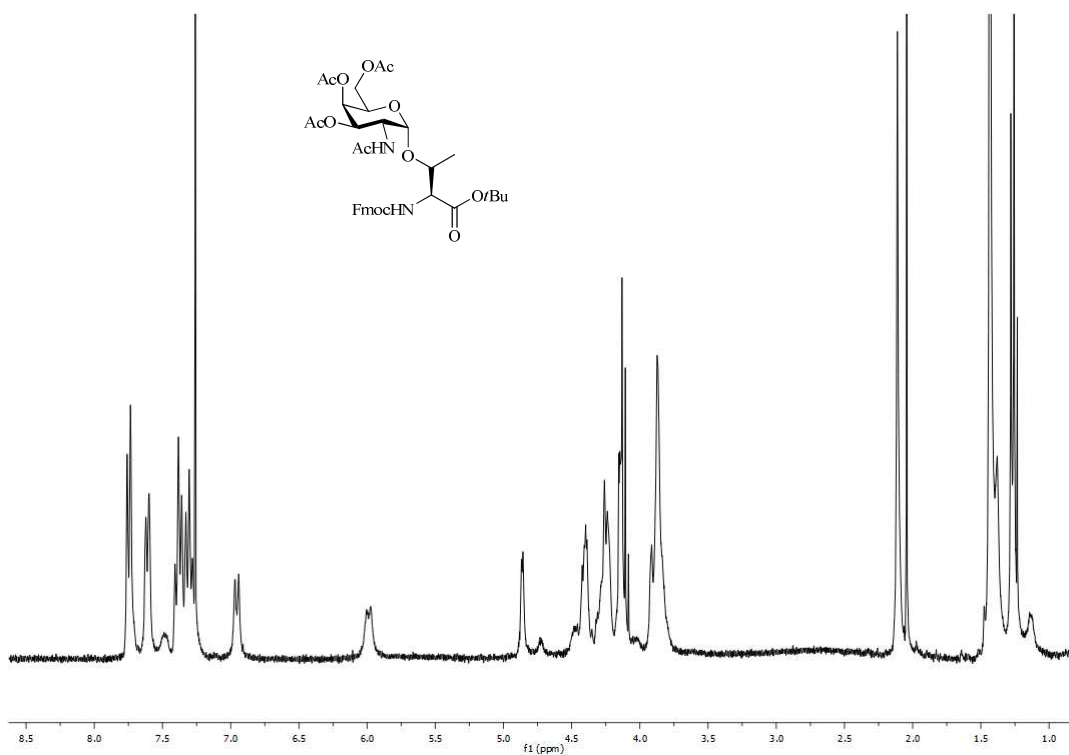


¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, (CD₃)₂O)

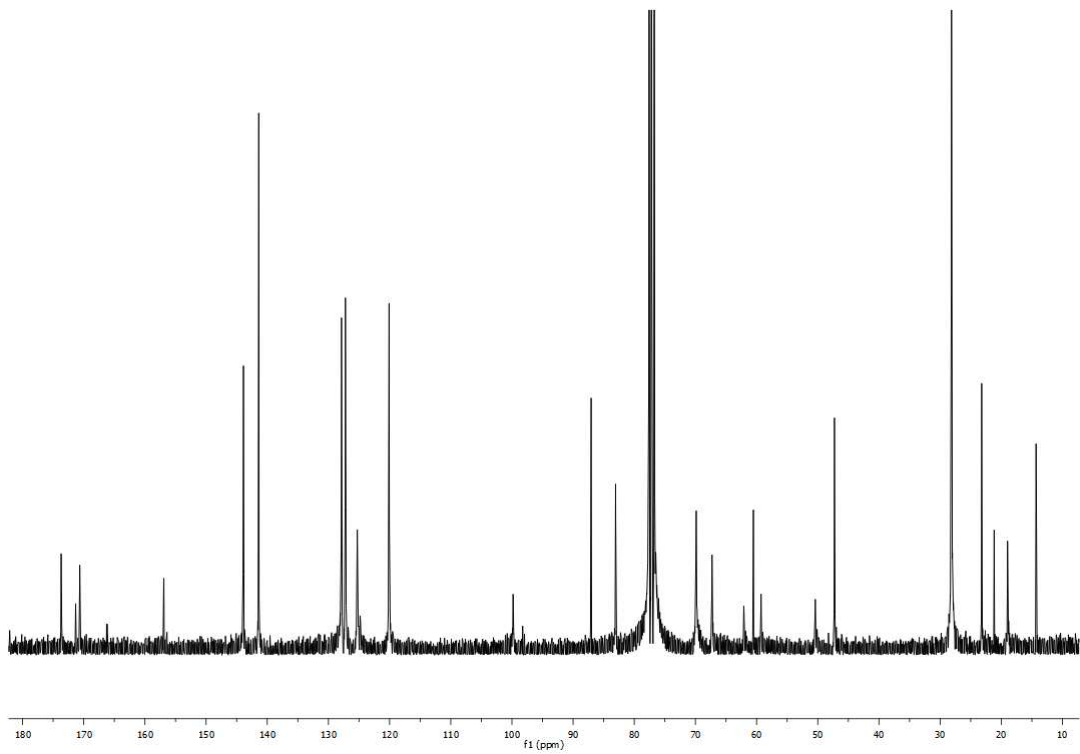


^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$)

Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu (40)

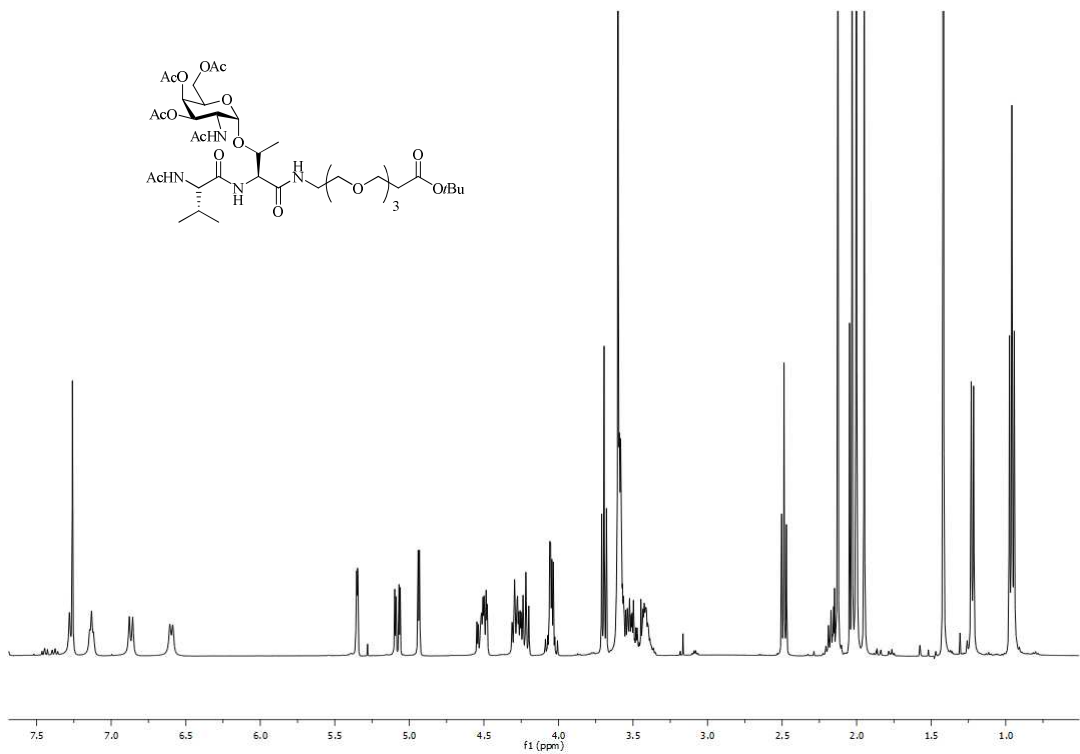


^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3)

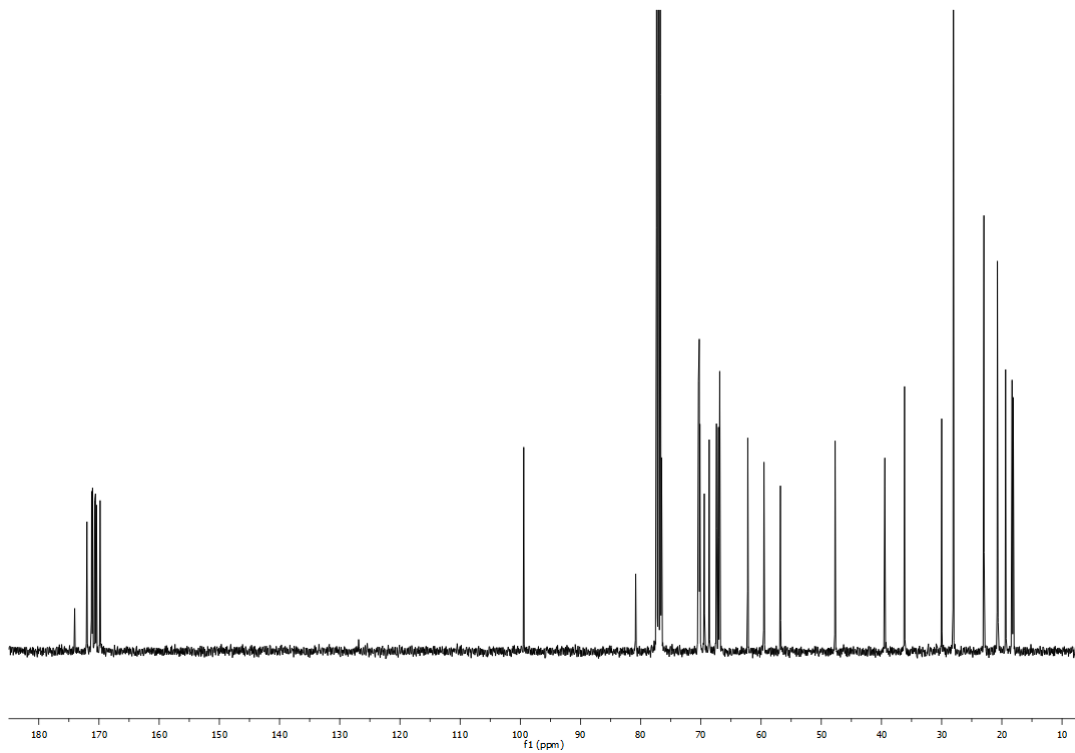


^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl_3)

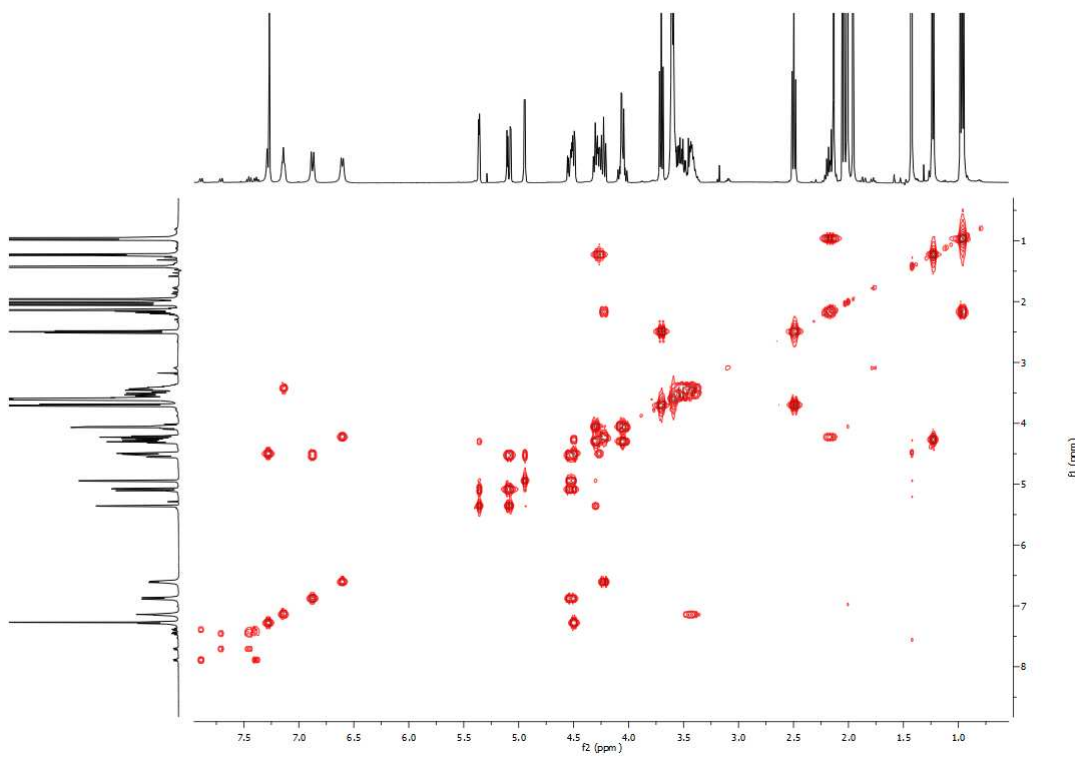
AcVal-Thr($\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$)-OEG-OfBu (57)



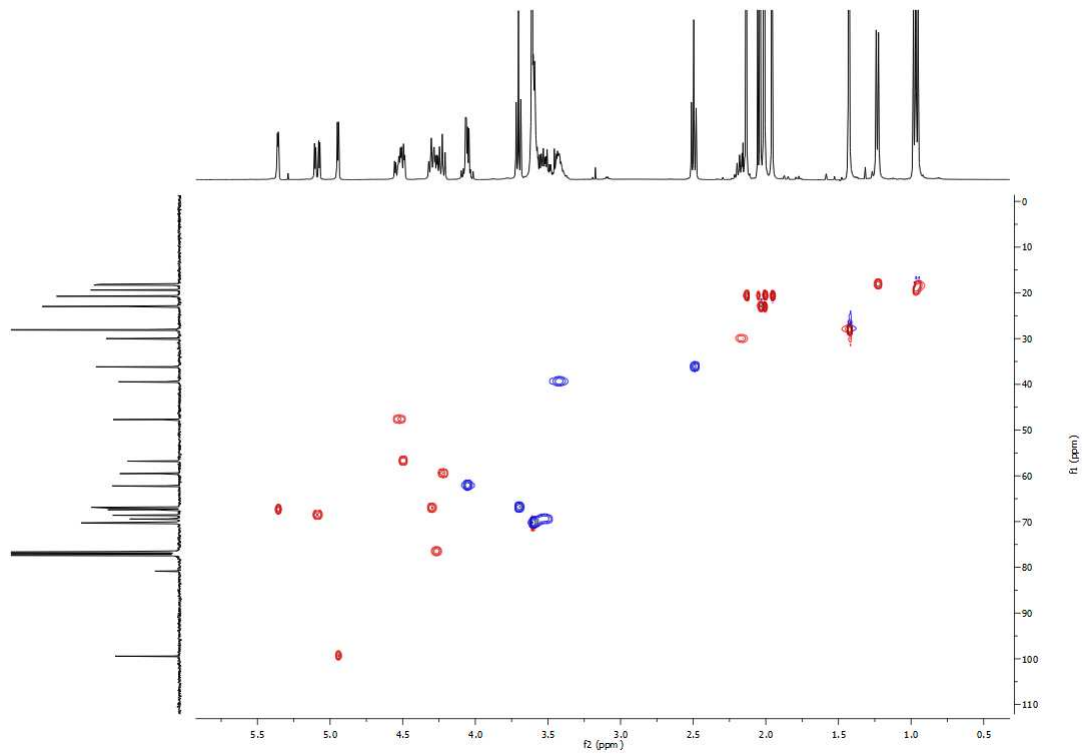
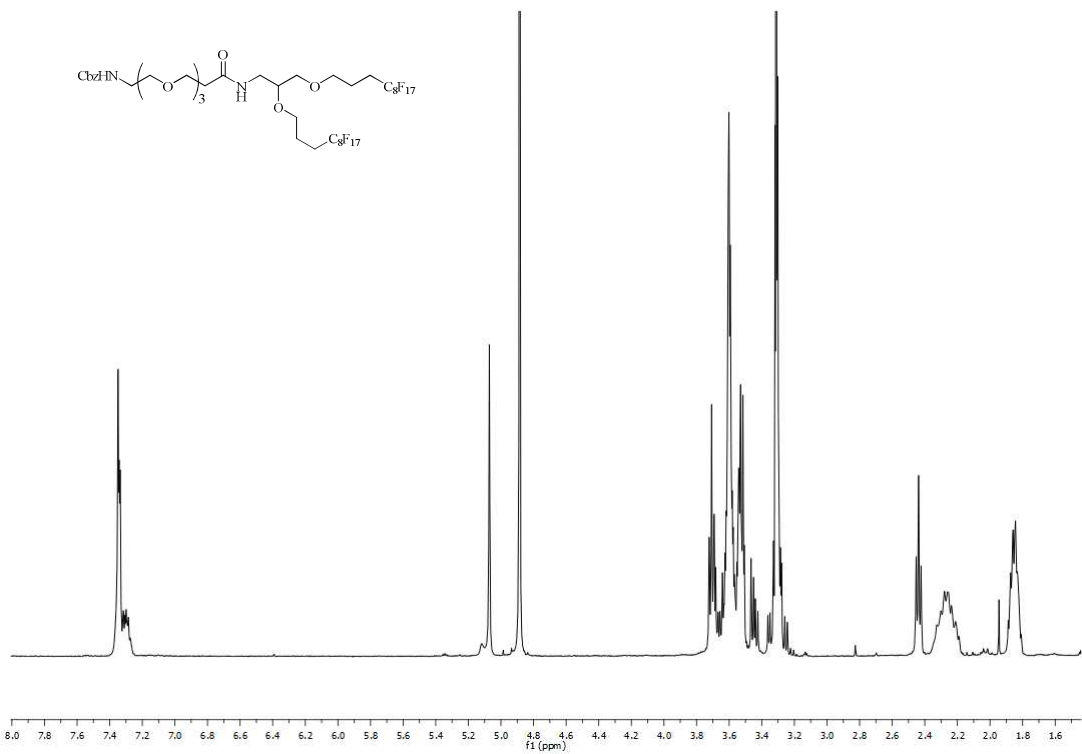
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)

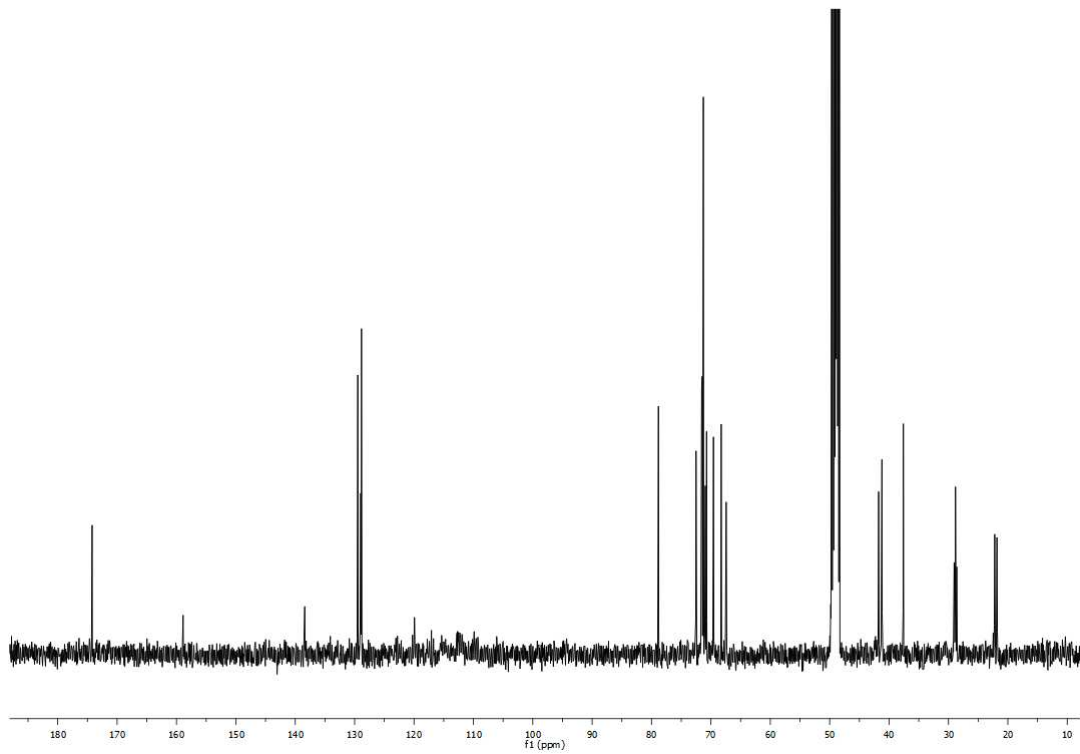


^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)

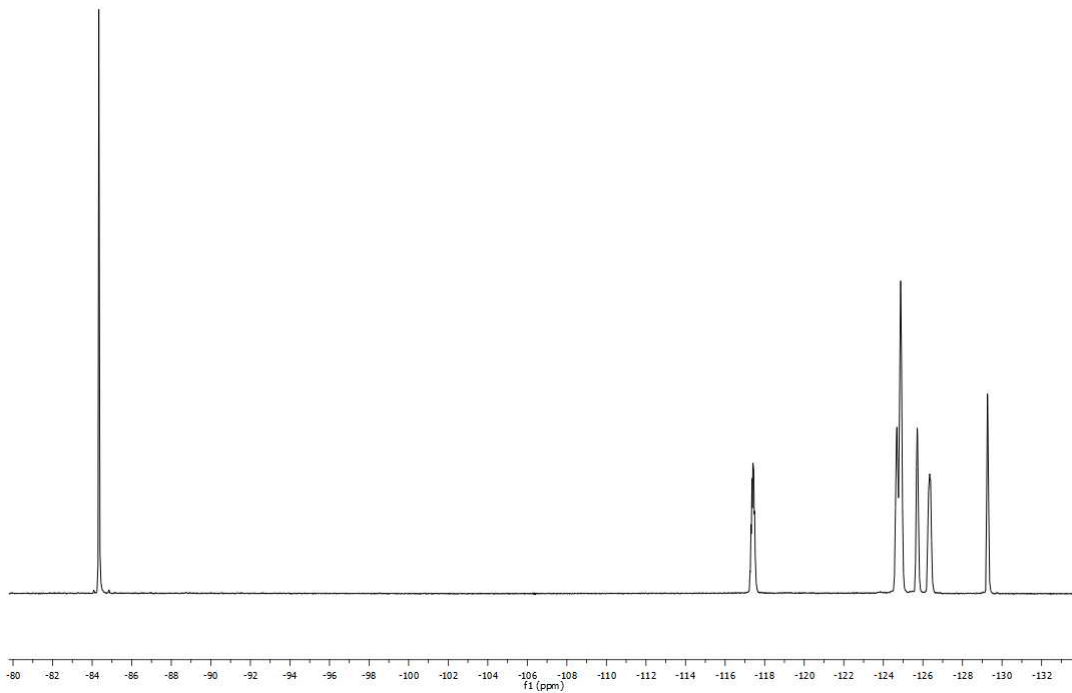


^1H - ^1H -COSY

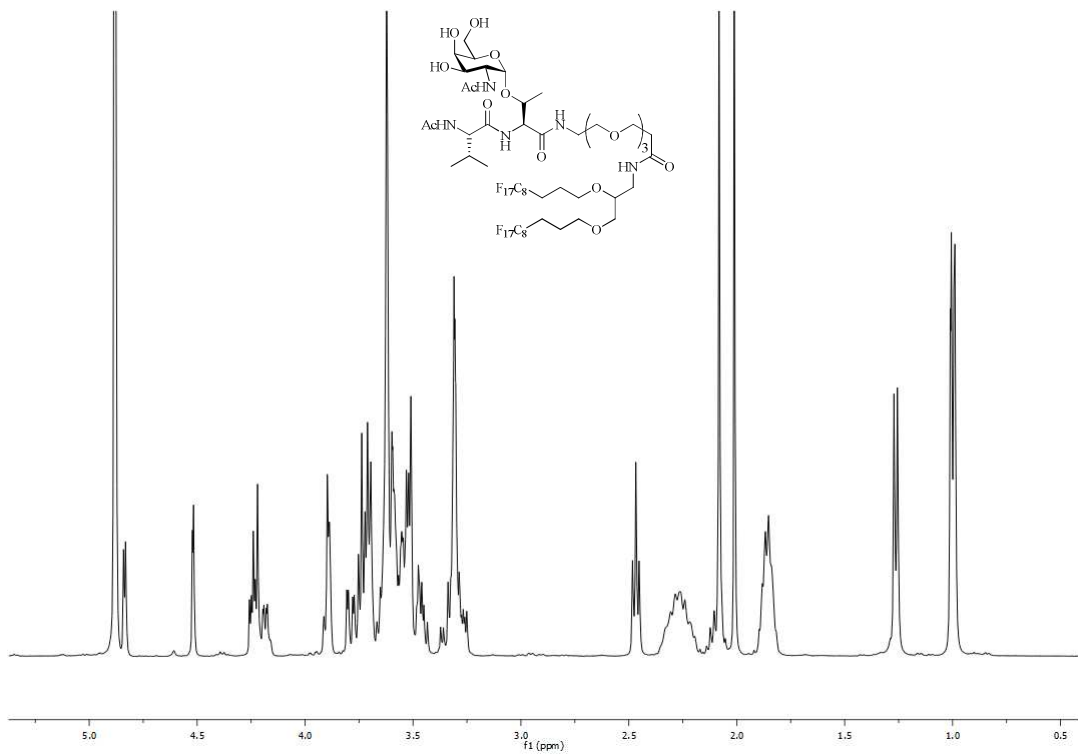
 $^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HSQC}$ **Cbz-OEG-GlycF₃₄ (48)** $^1\text{H}\text{-NMR}\text{-Spektrum (400 MHz, CD}_3\text{OD)}$



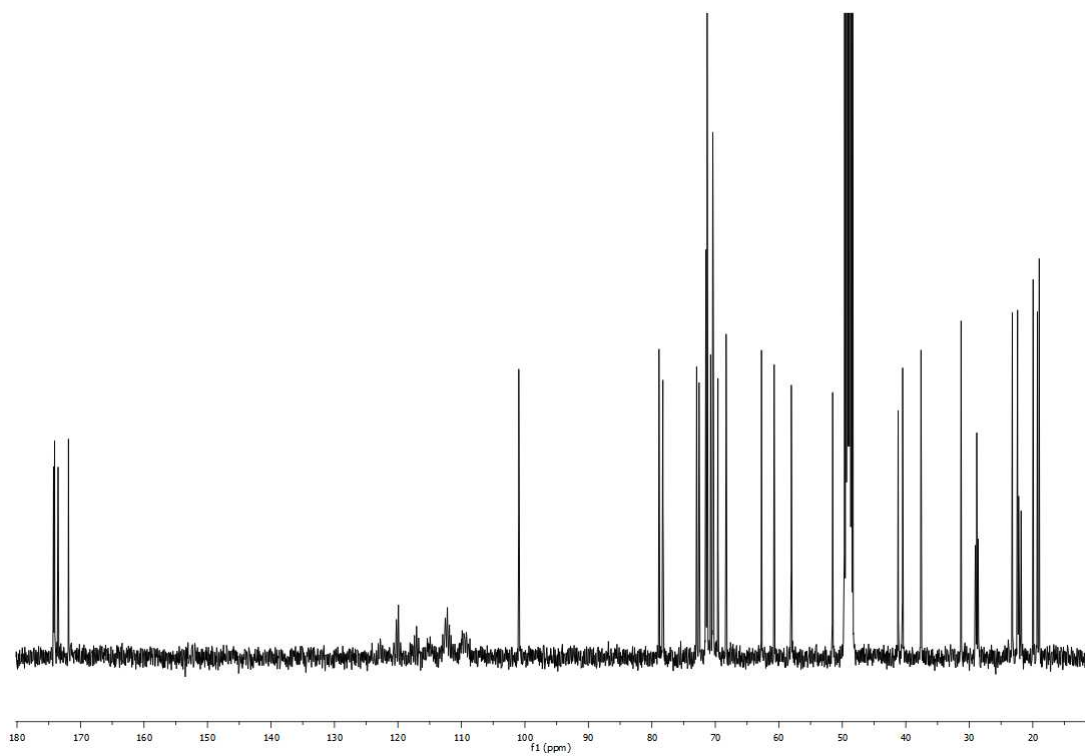
^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CD_3OD)



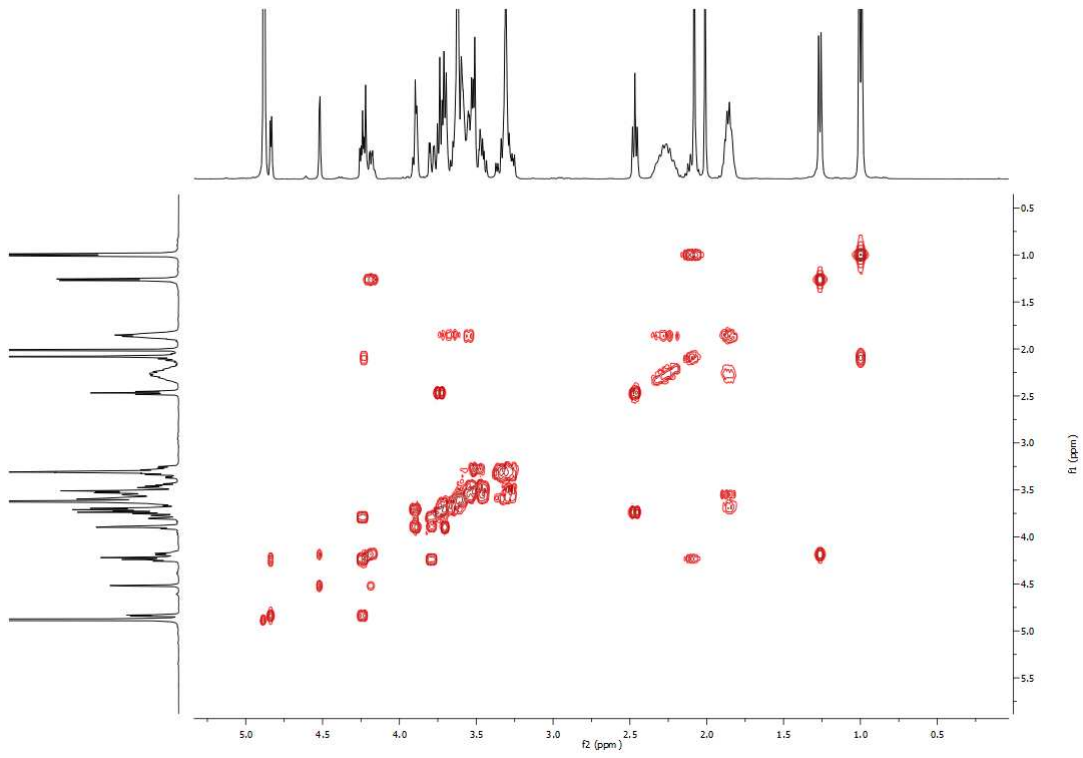
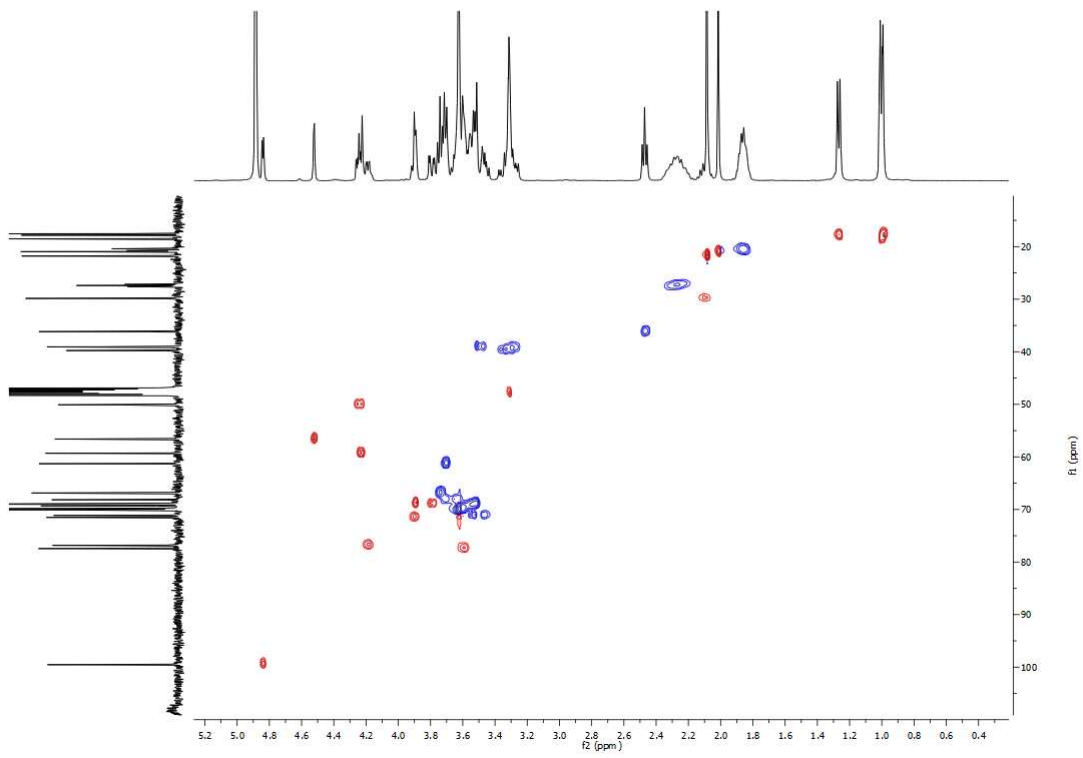
^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, CD_3OD)

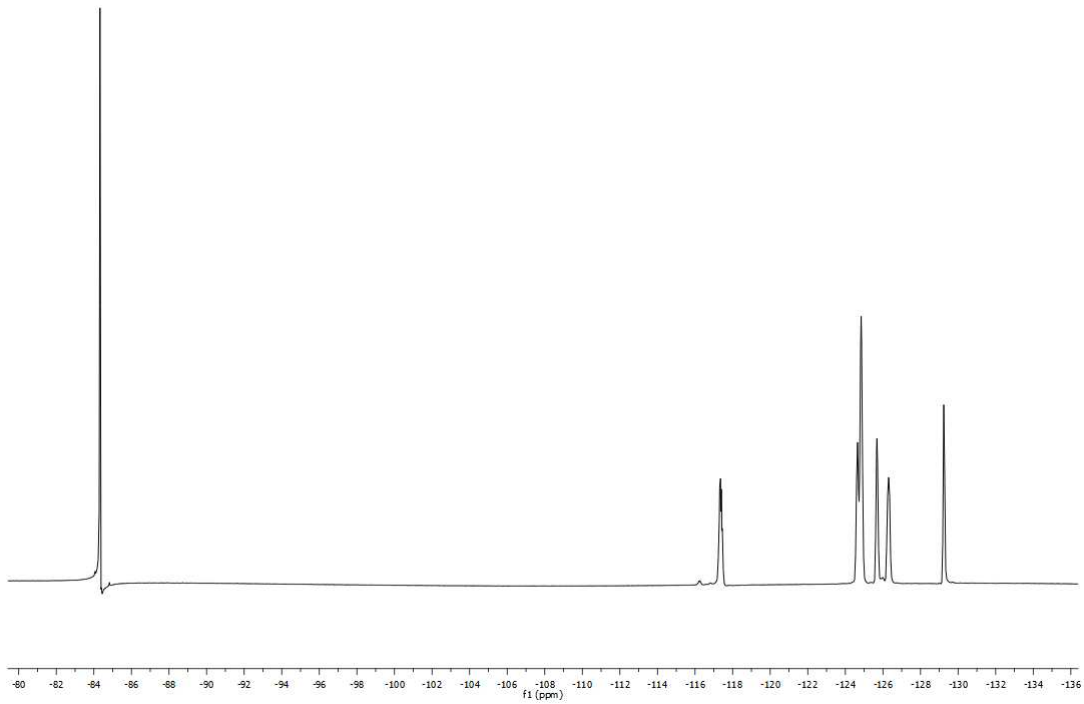
AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG-GlycF₃₄ (61)

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃OD)



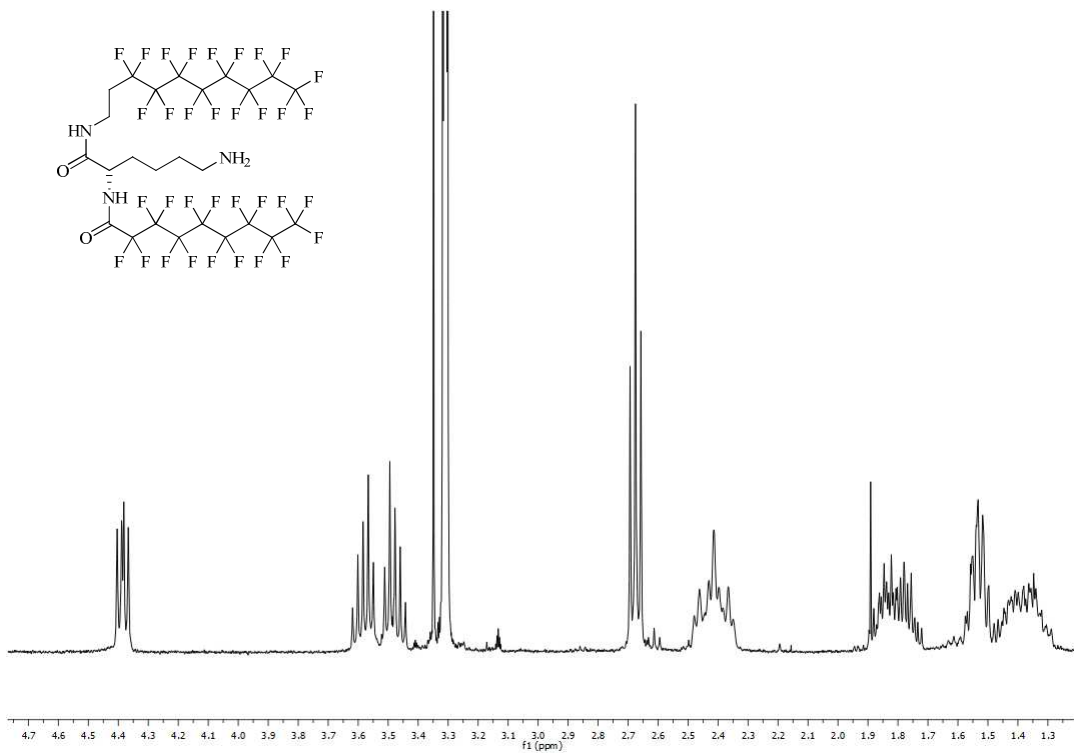
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CD₃OD)

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HSQC

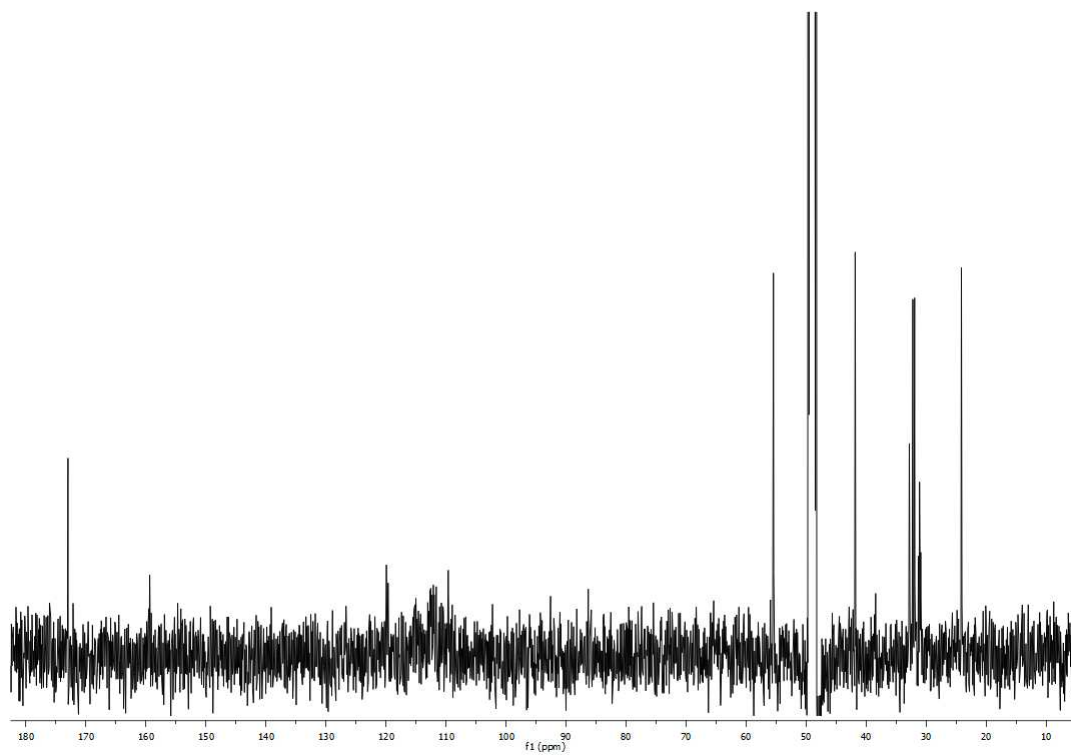


^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, CD_3OD)

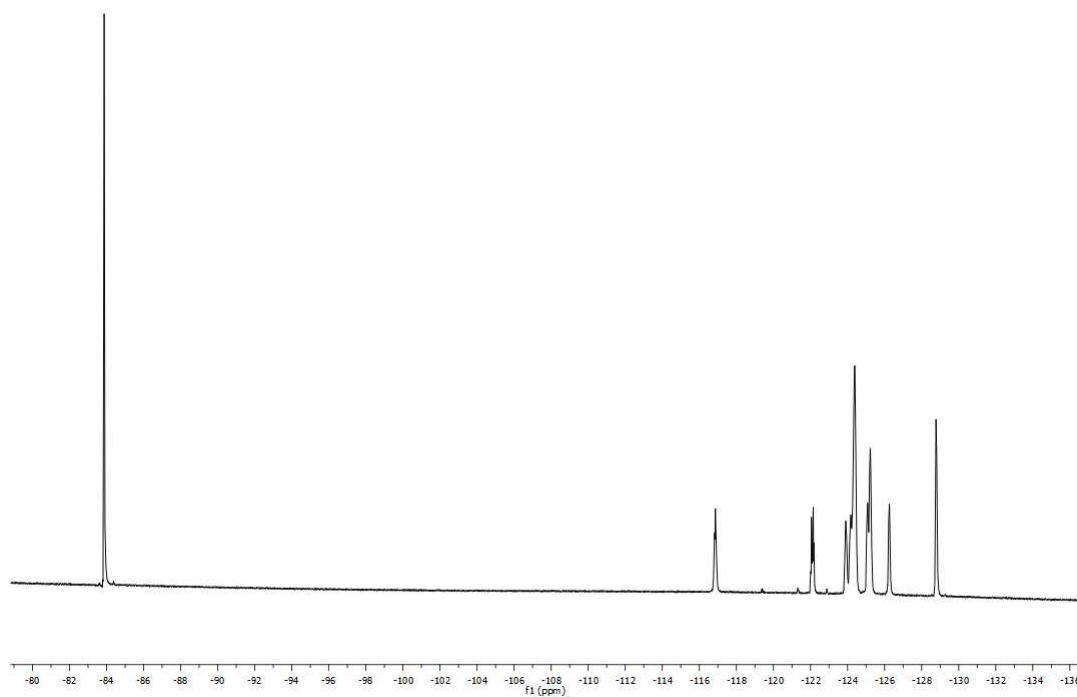
$\text{R}_F\text{-Lys-O-Decyl}(\text{F}_{17})$ (77)



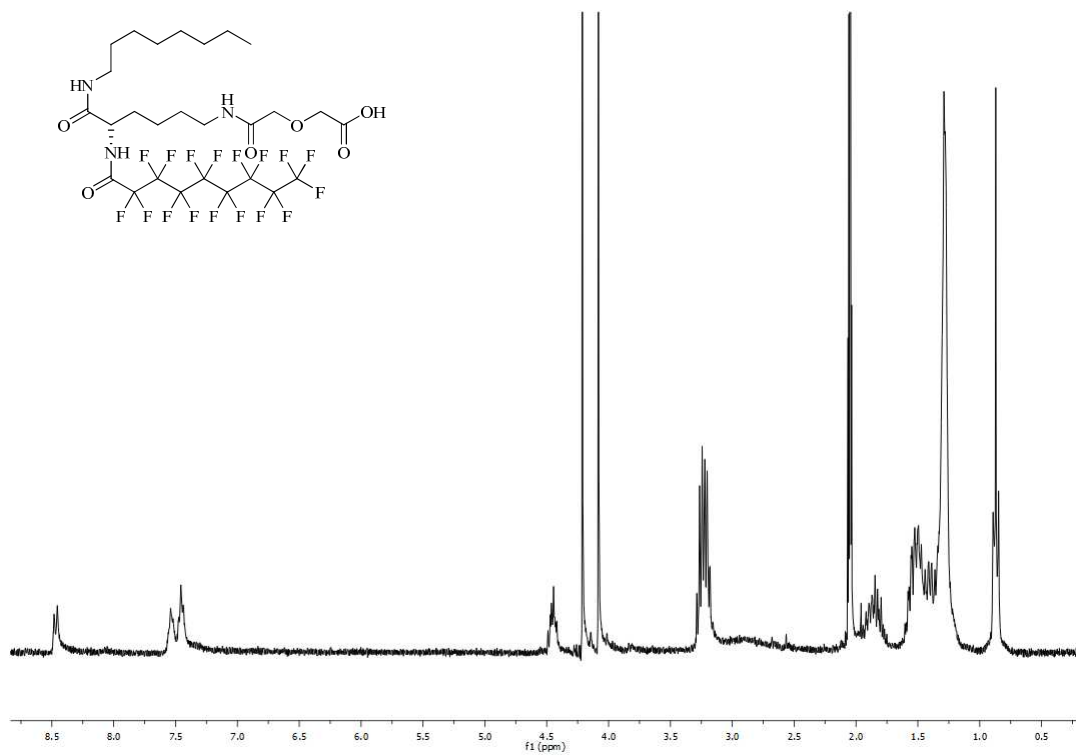
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CD_3OD)



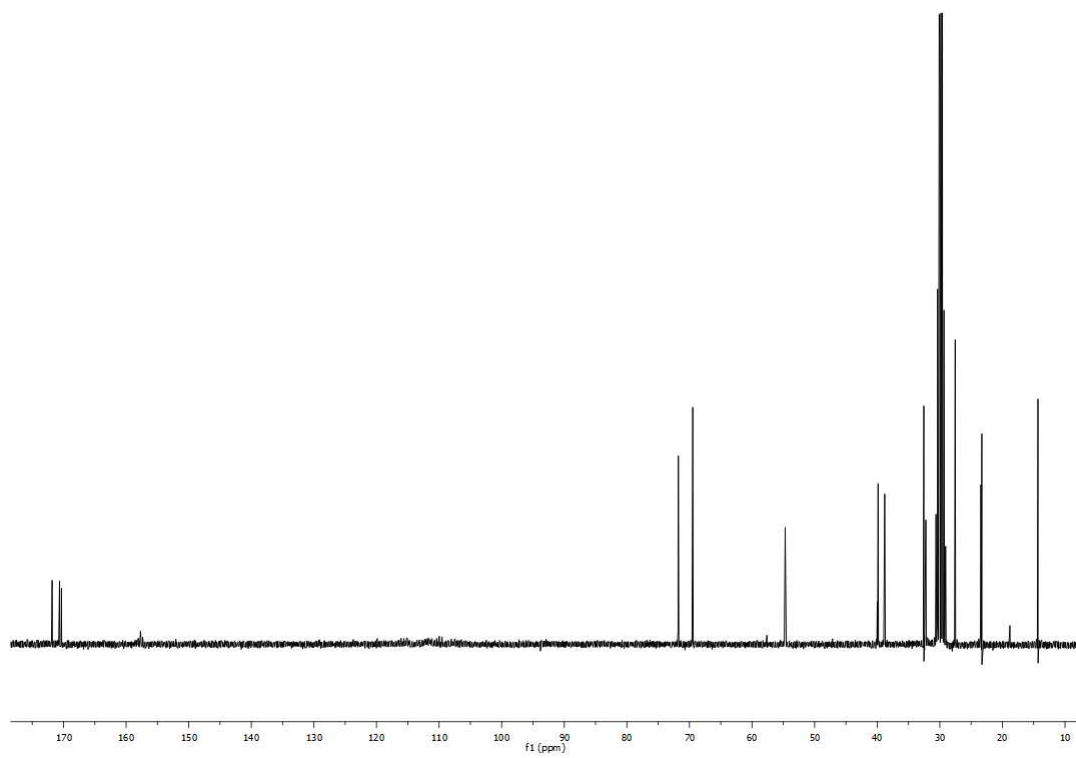
^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CD_3OD)



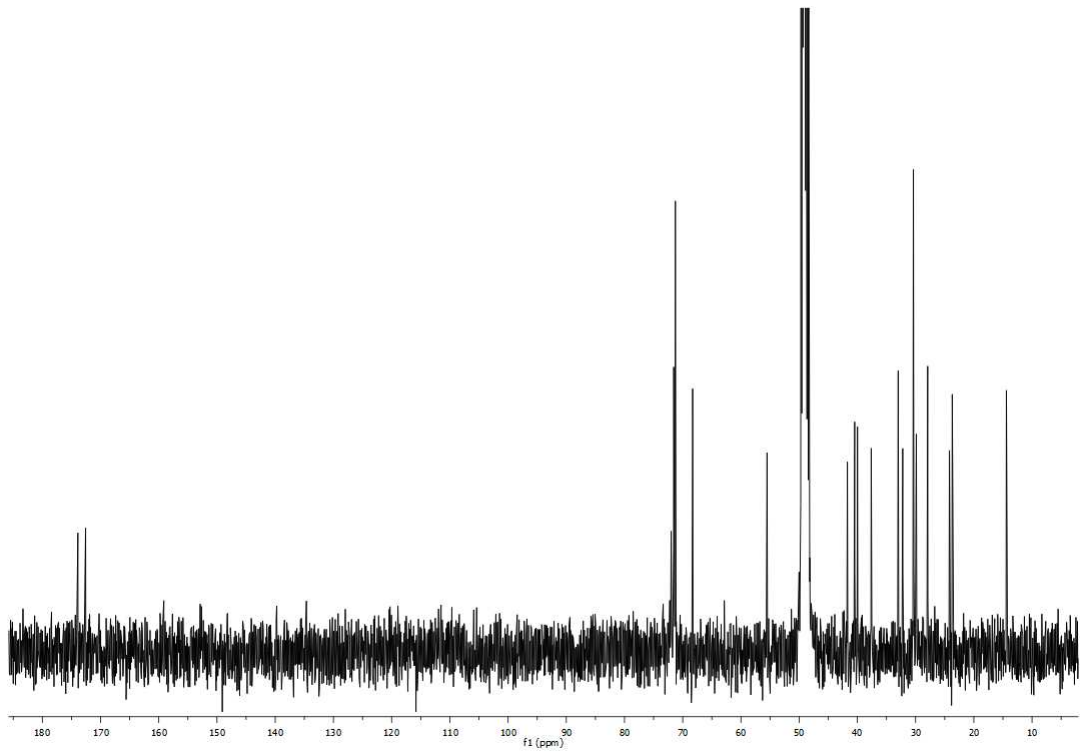
^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, CD_3OD)

R_F-Lys(DG)-O-Octyl (79)

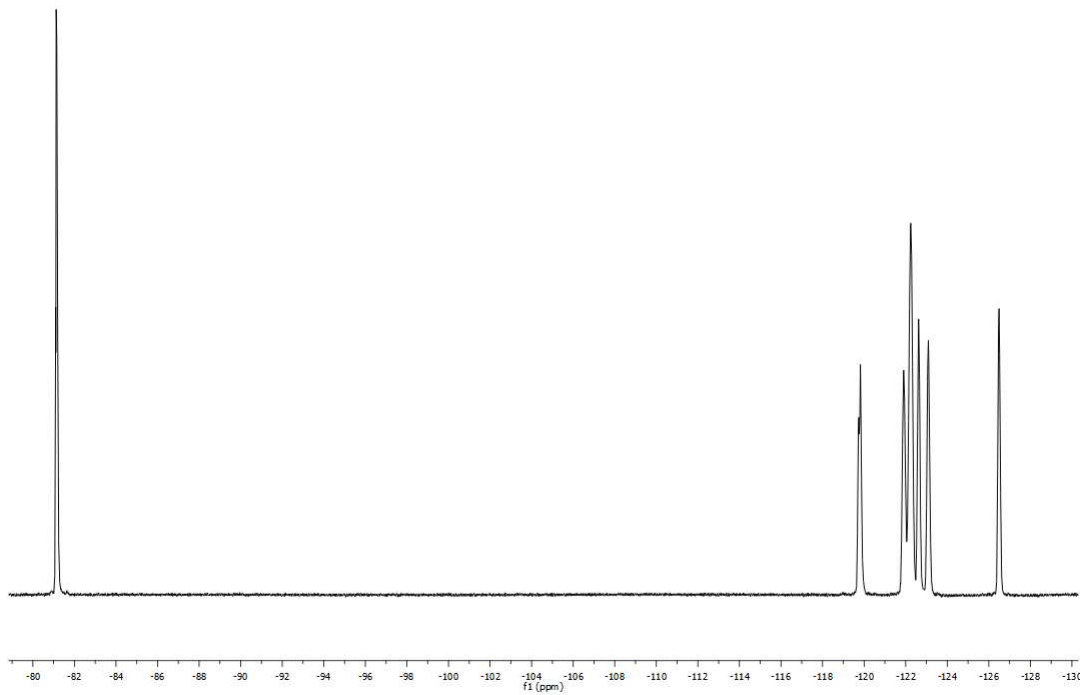
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, (CD₃)₂O)



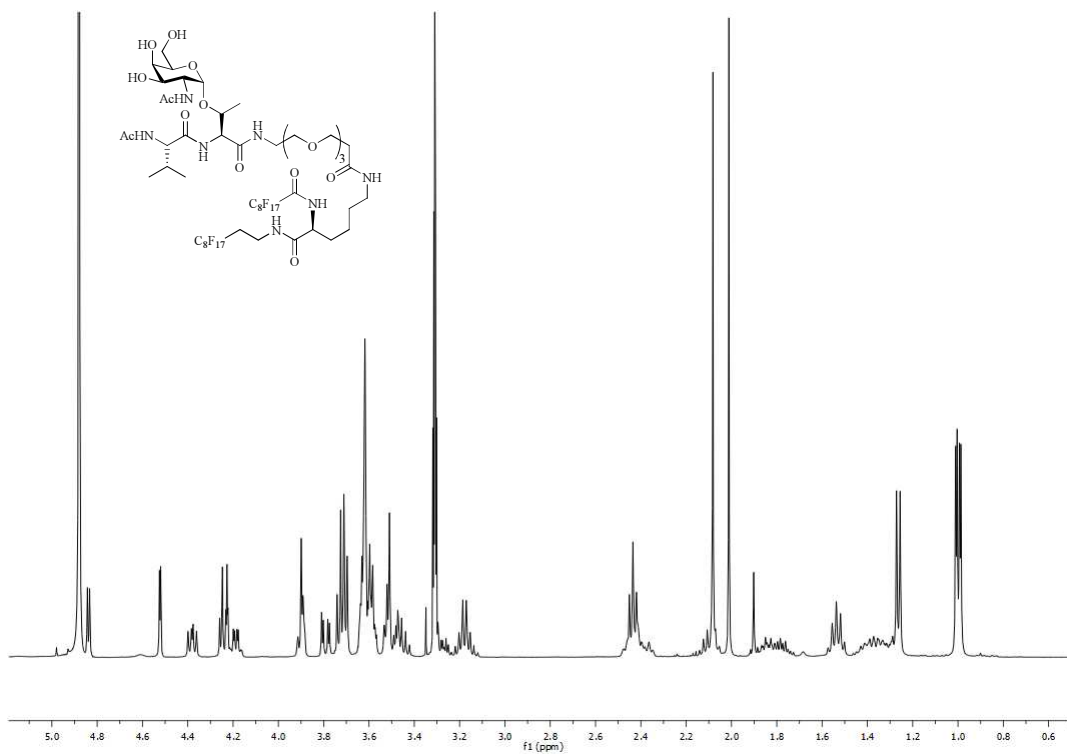
¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, (CD₃)₂O)



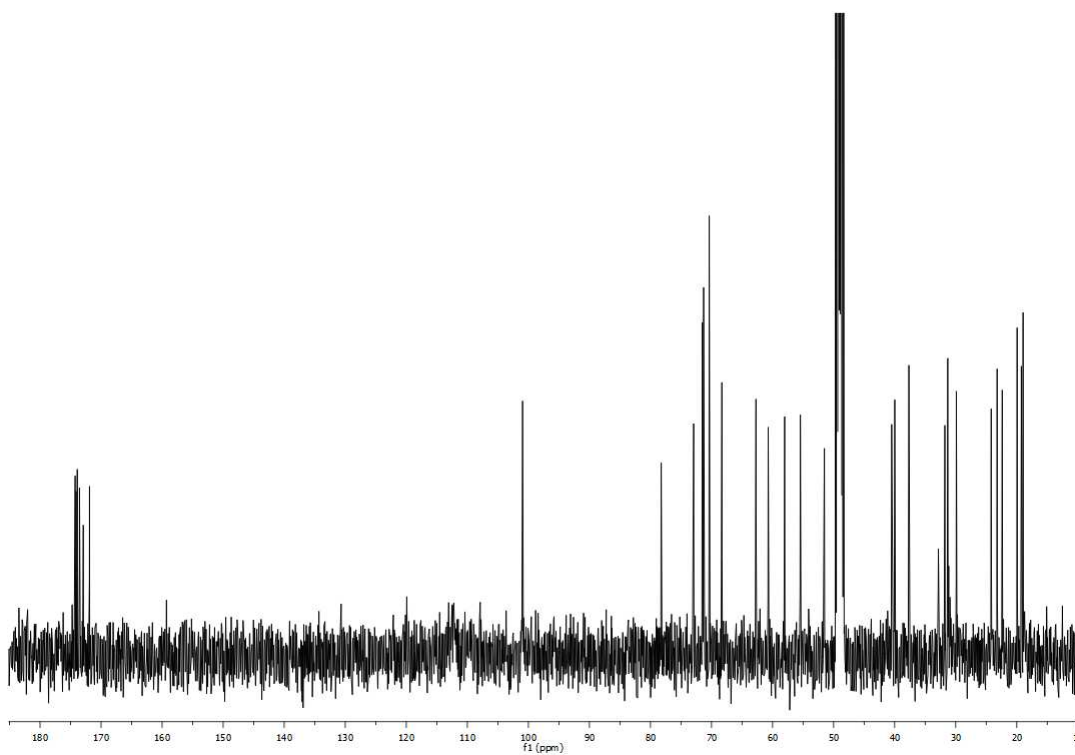
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, CD_3OD)



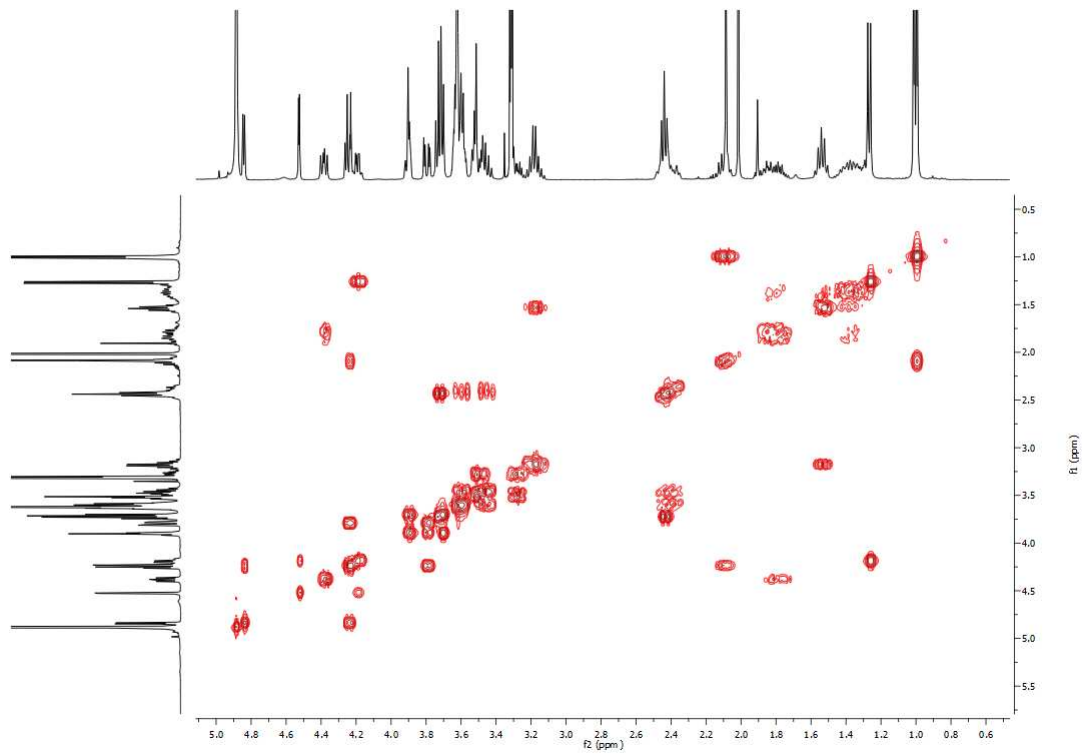
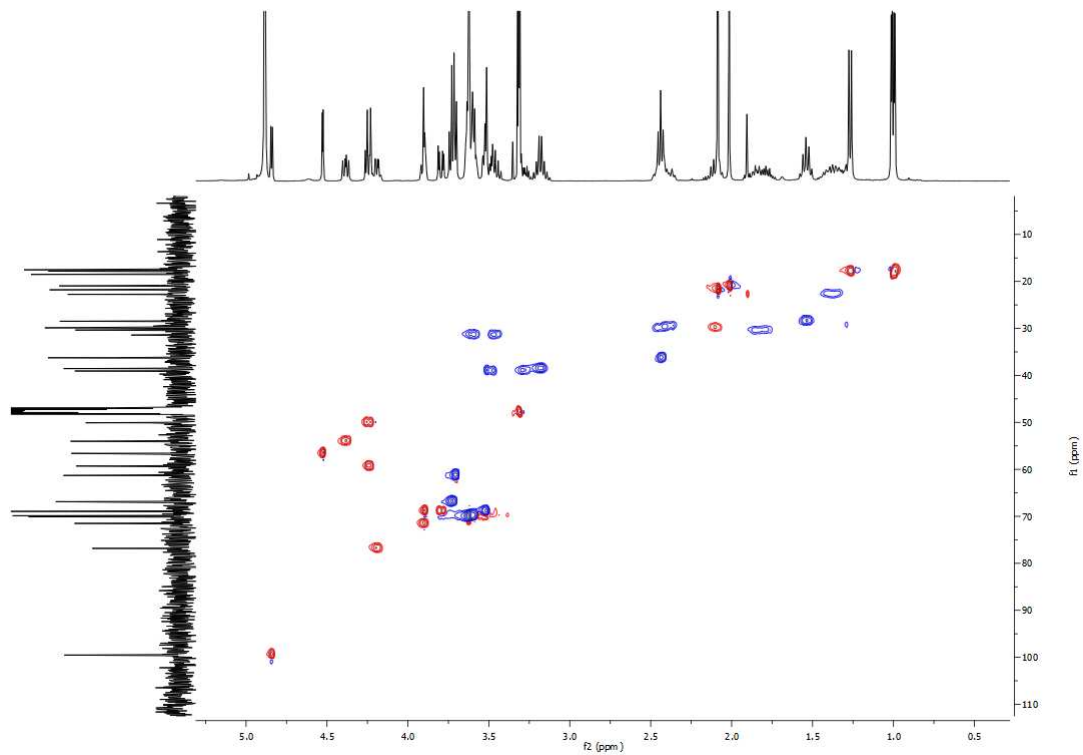
^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, CD_3OD)

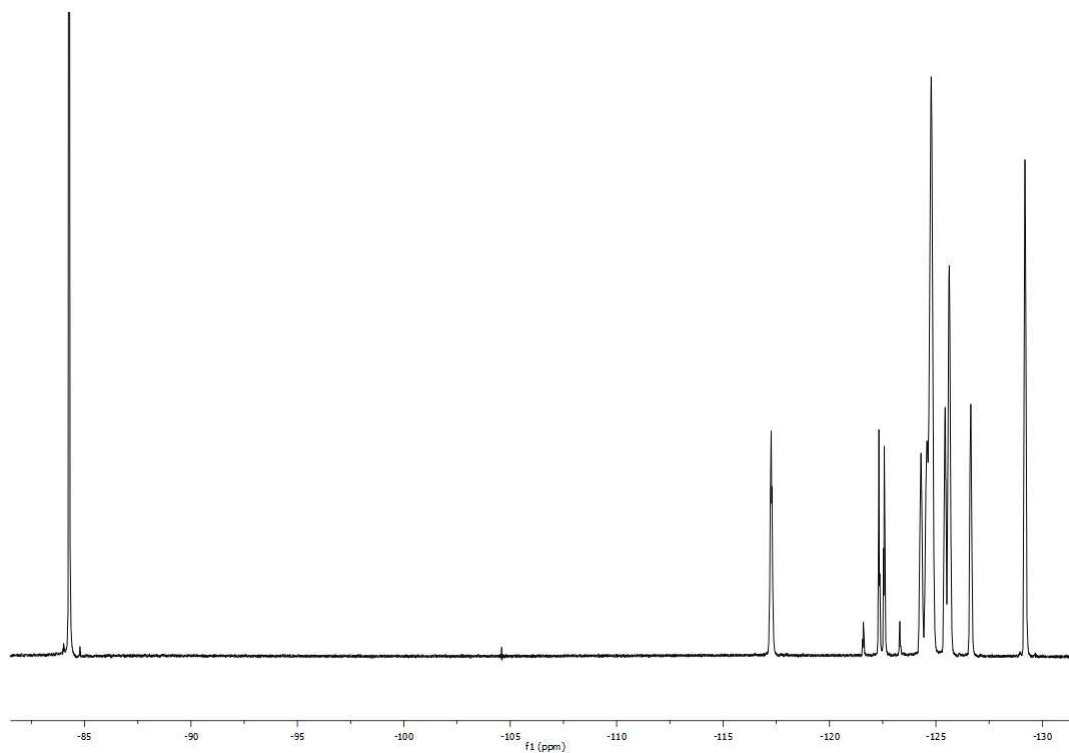
AcVal-Thr(α GalNAc)-OEG-R_F-Lys-O-Decyl(F₁₇) (90)

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃OD)



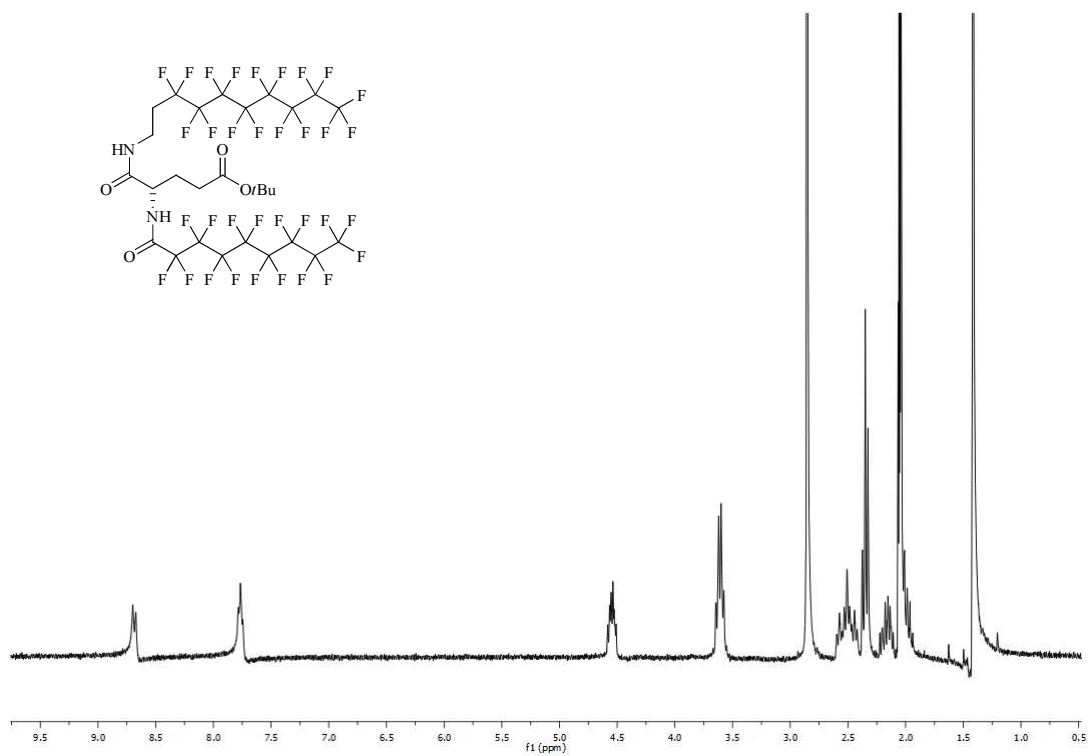
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CD₃OD)

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HSQC

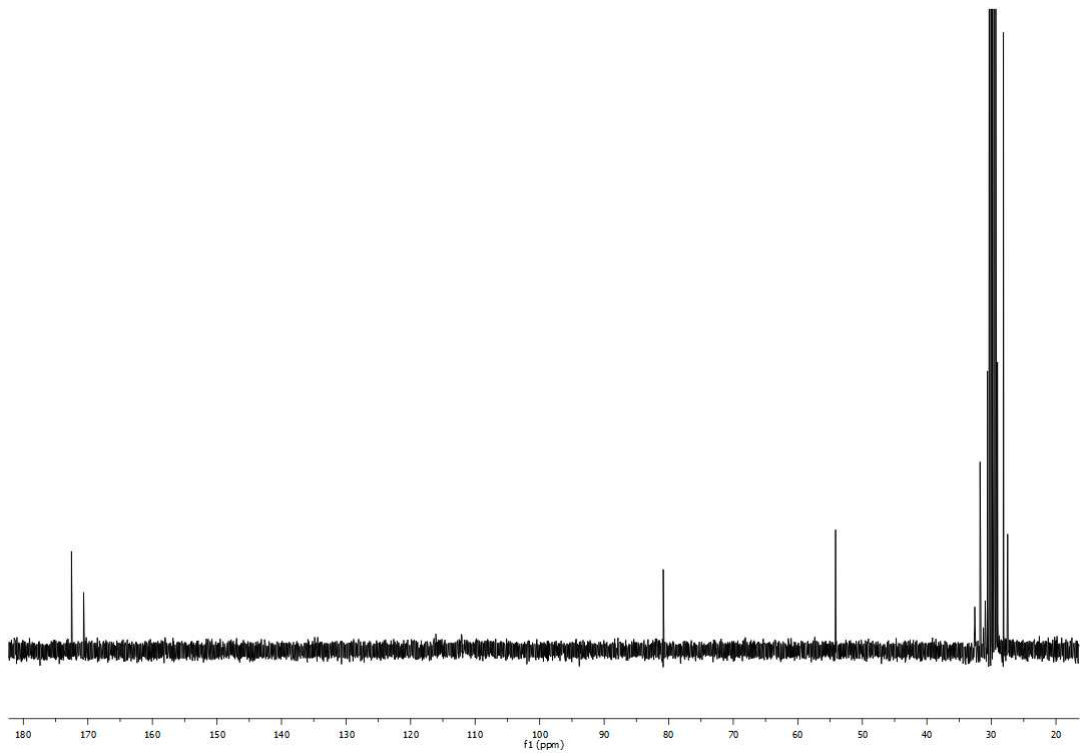


^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, CD_3OD)

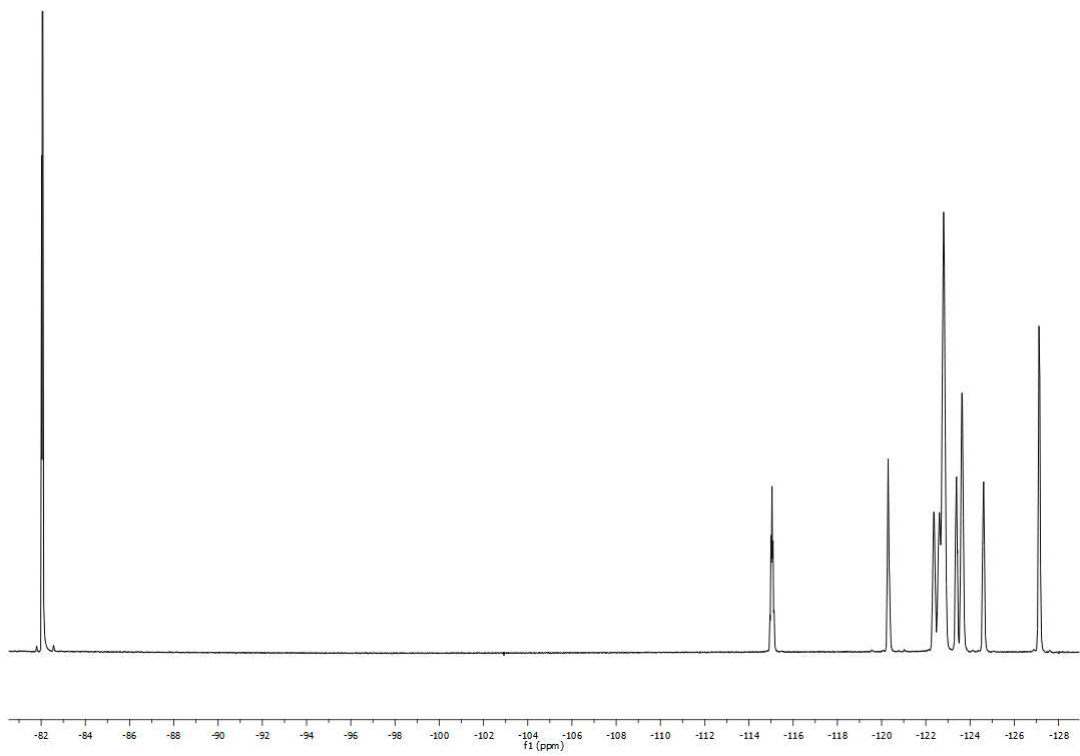
R_F -Glu(OtBu)-O-Decyl(F_{17}) (94)



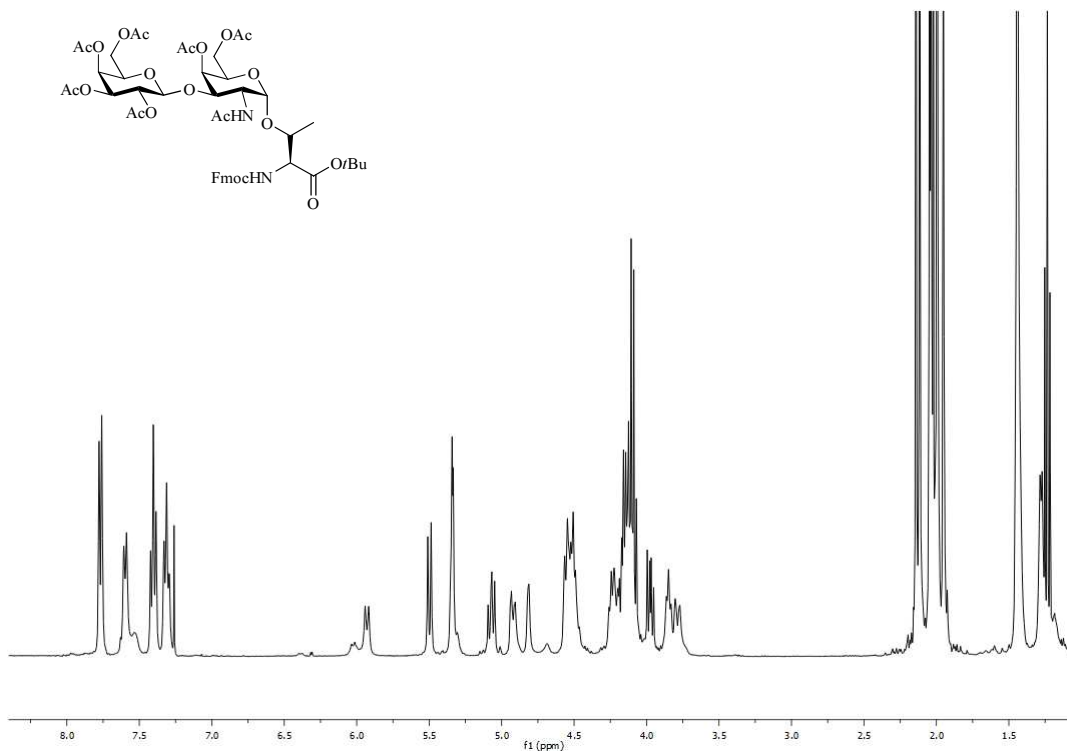
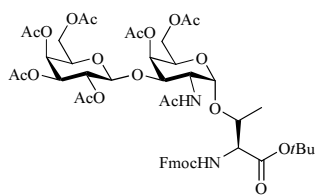
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$)



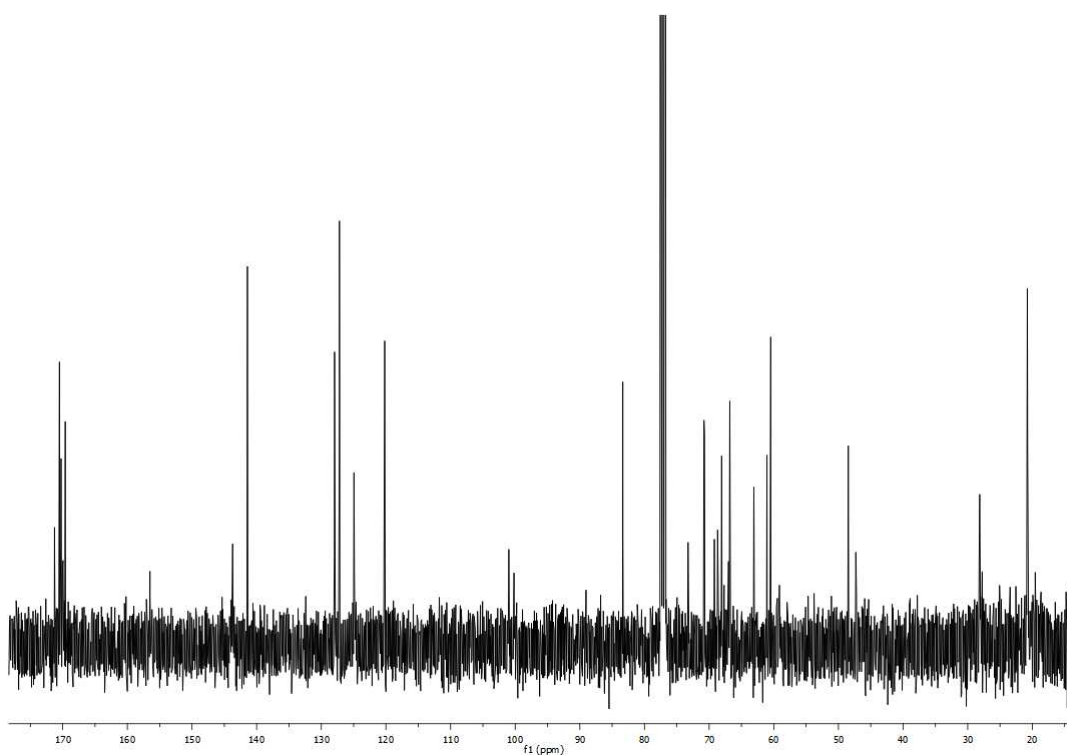
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$)



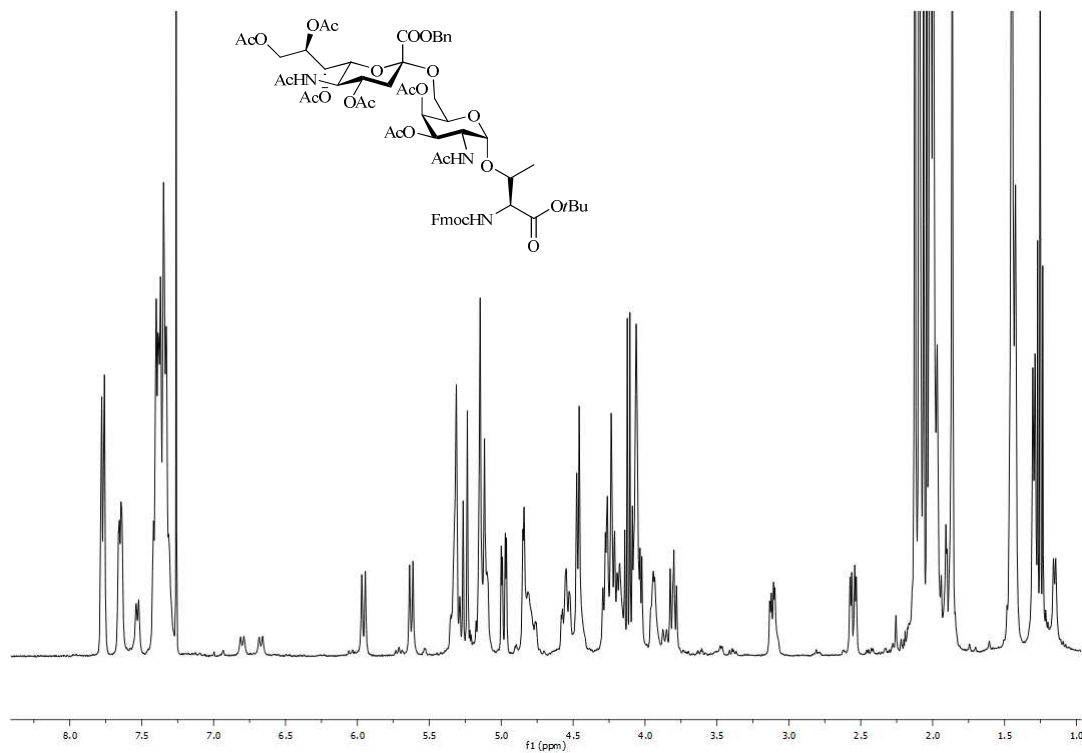
^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$)

Fmoc-Thr([β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α GalAc₂NAc)-OtBu (98)

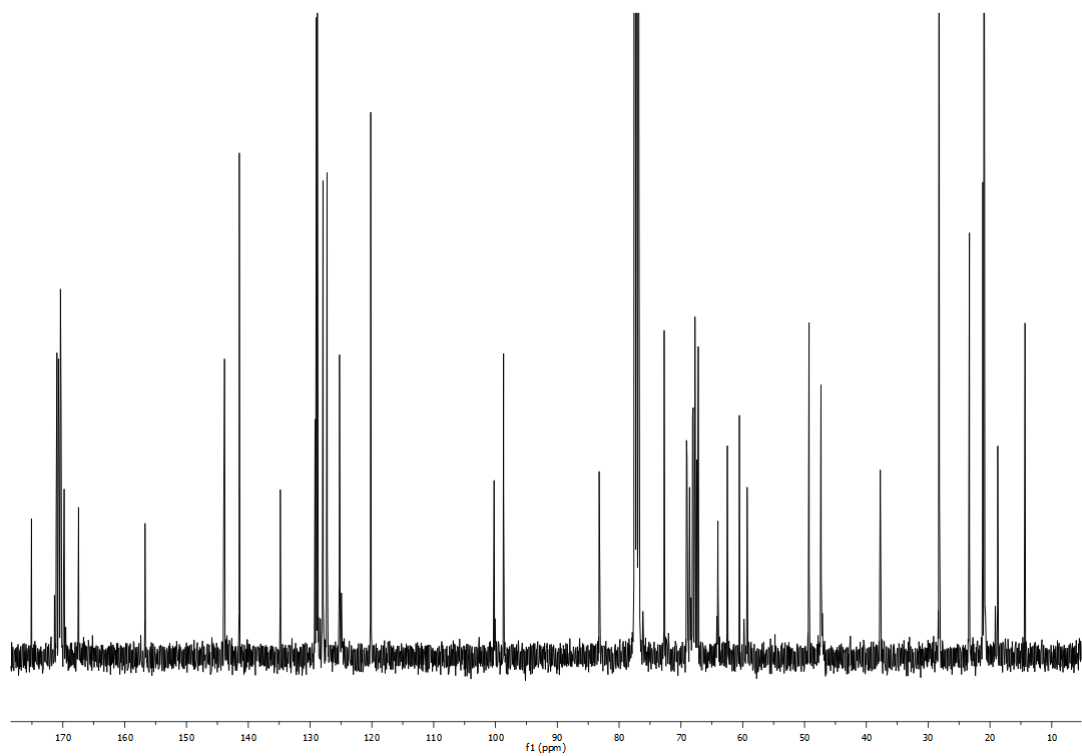
¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



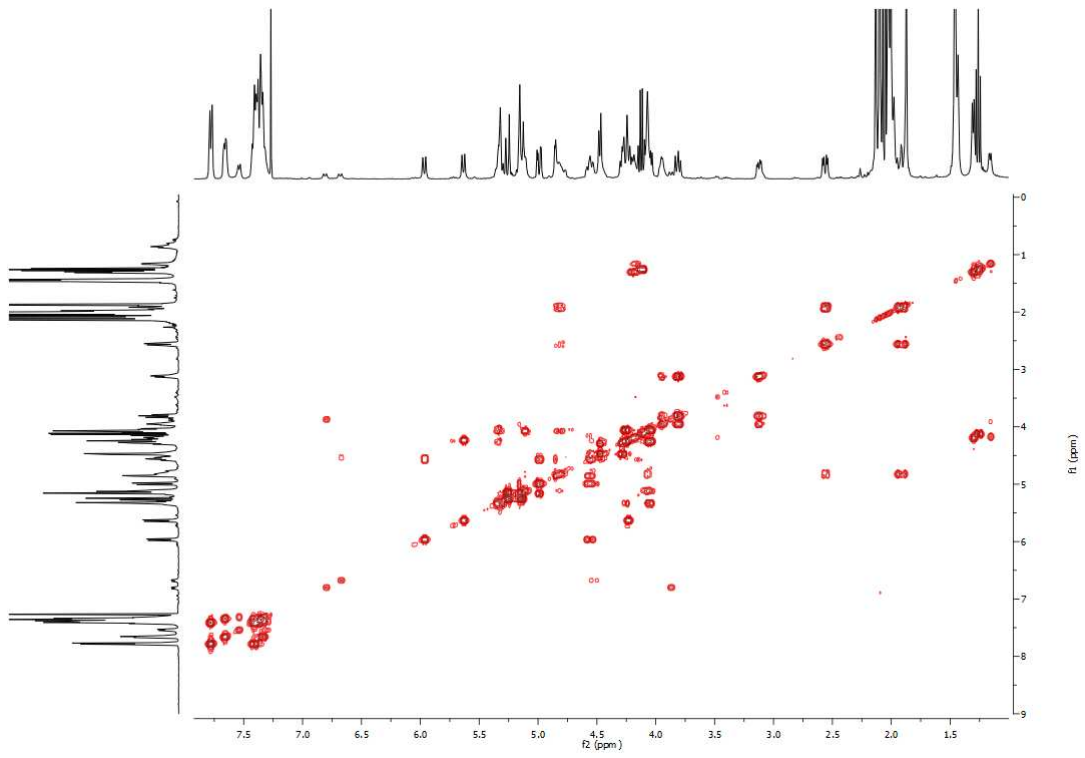
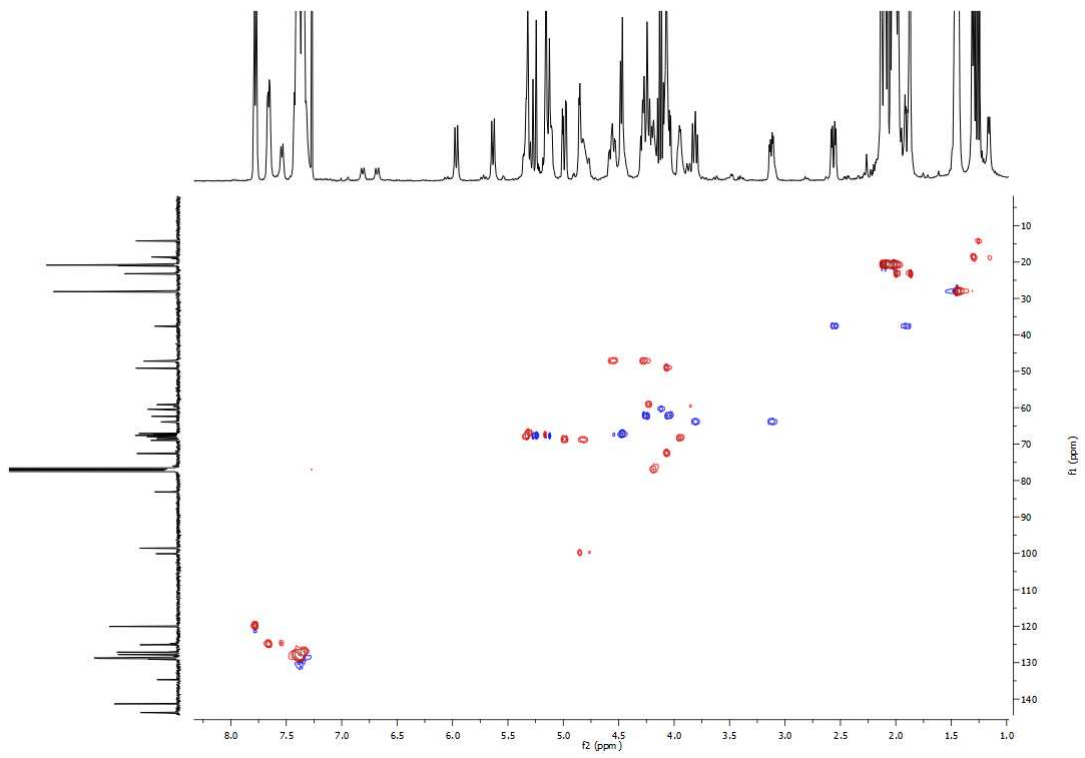
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)

Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OrBu (108)

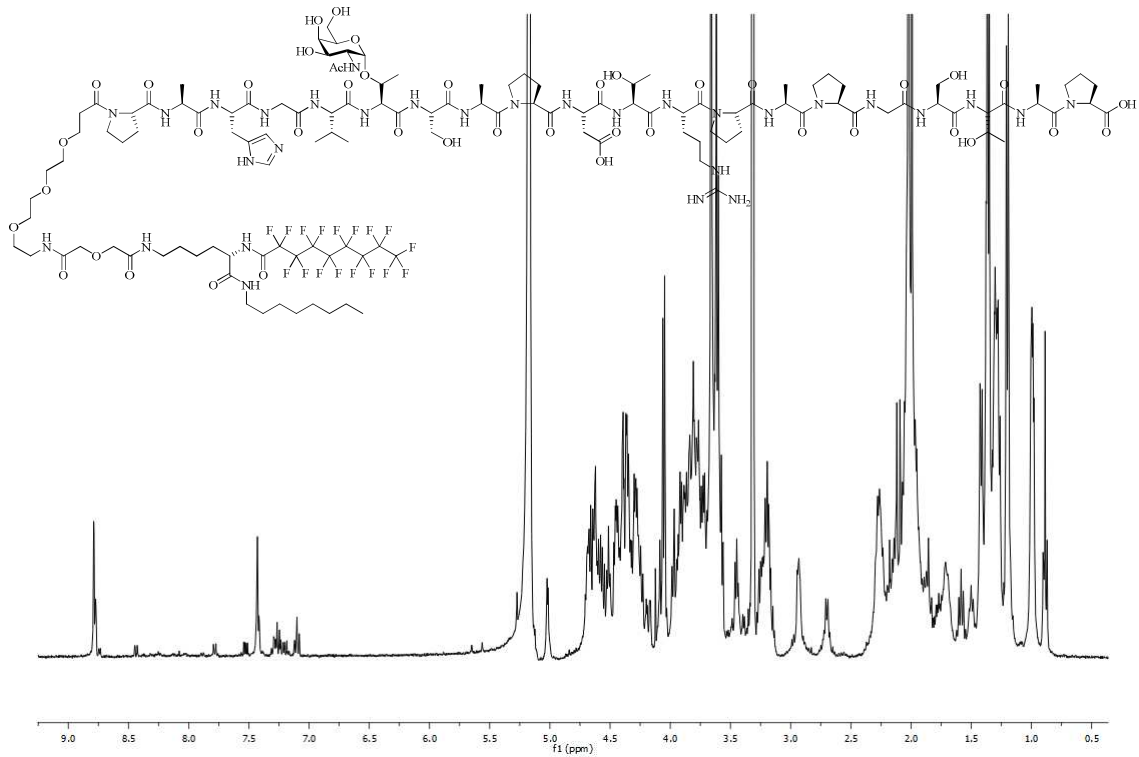
¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



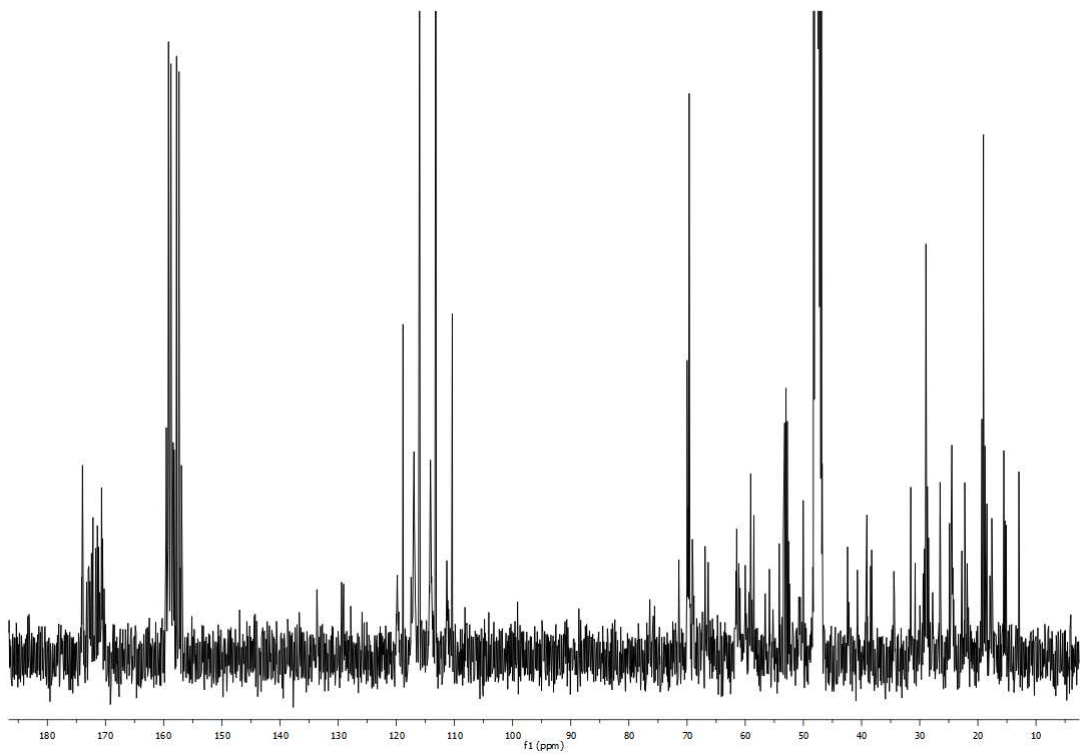
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HSQC

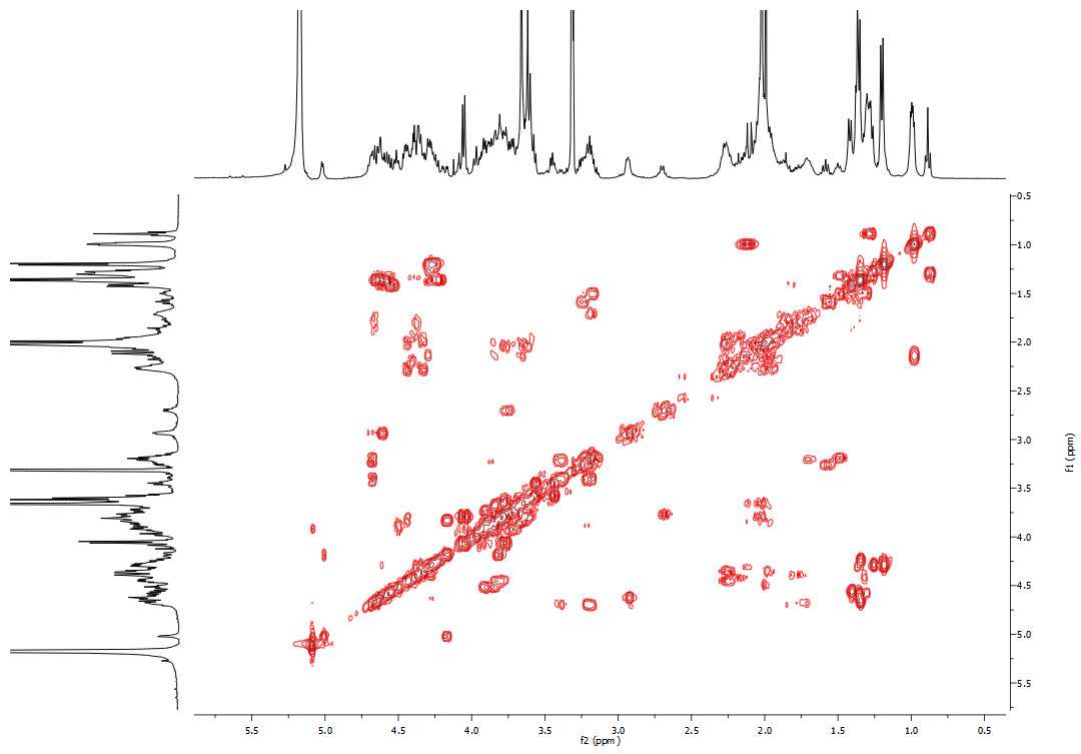
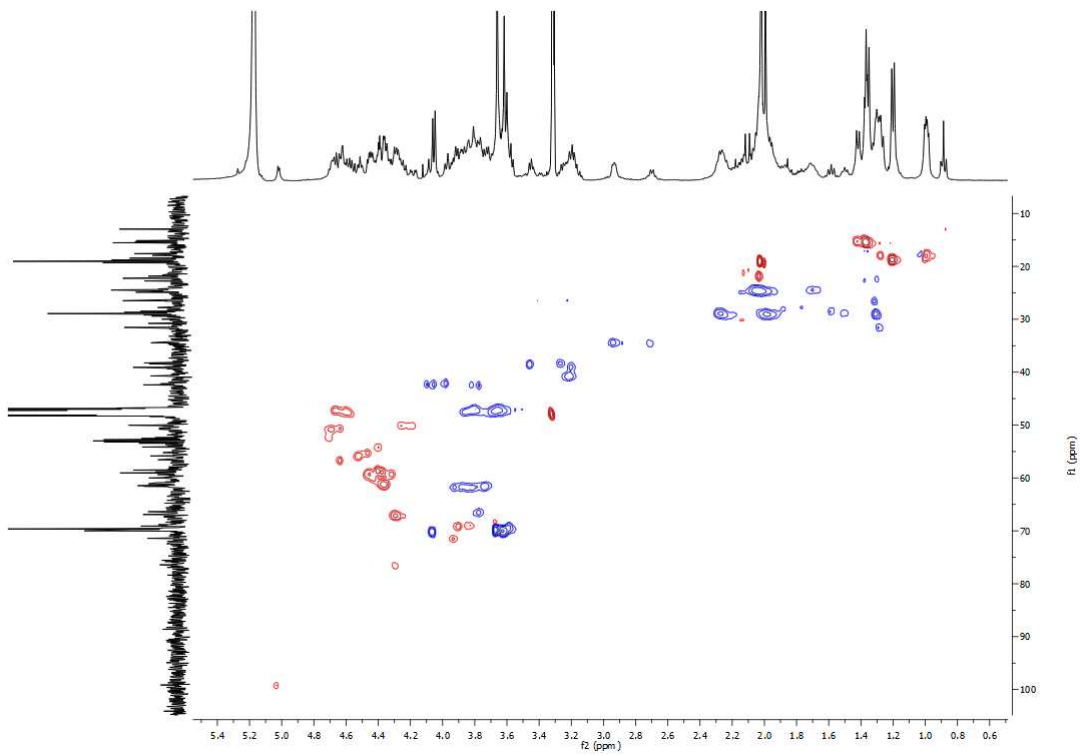
(R_F-Lys(DG)-O-Octyl-OEG-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH) (111)

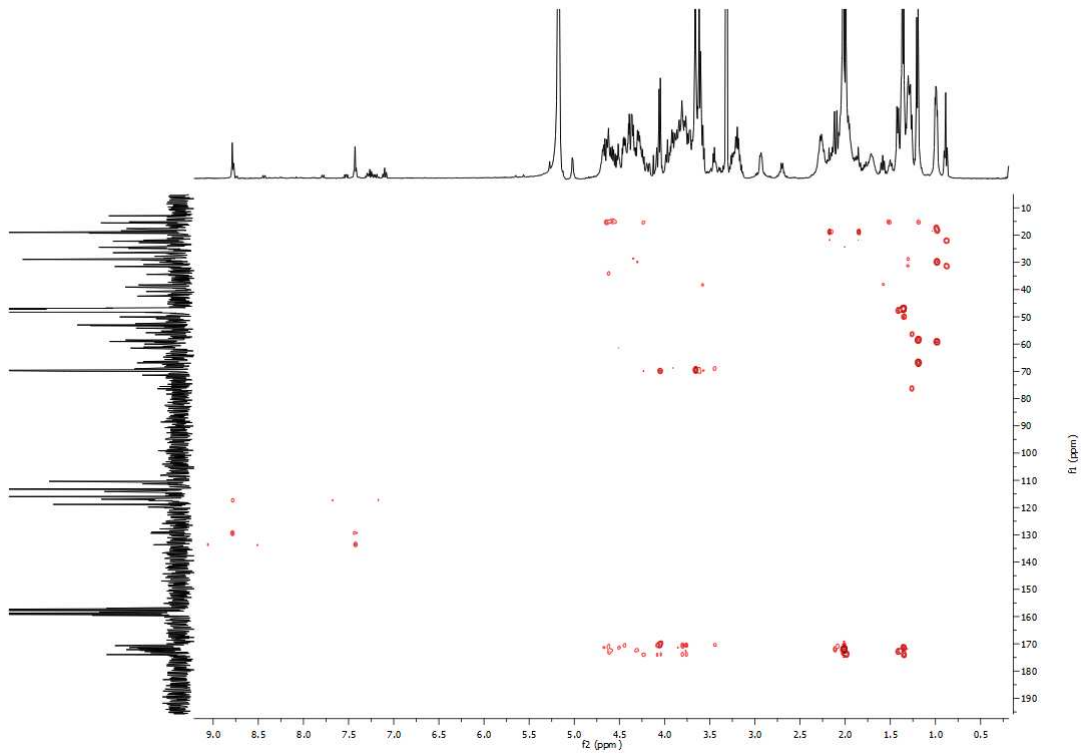
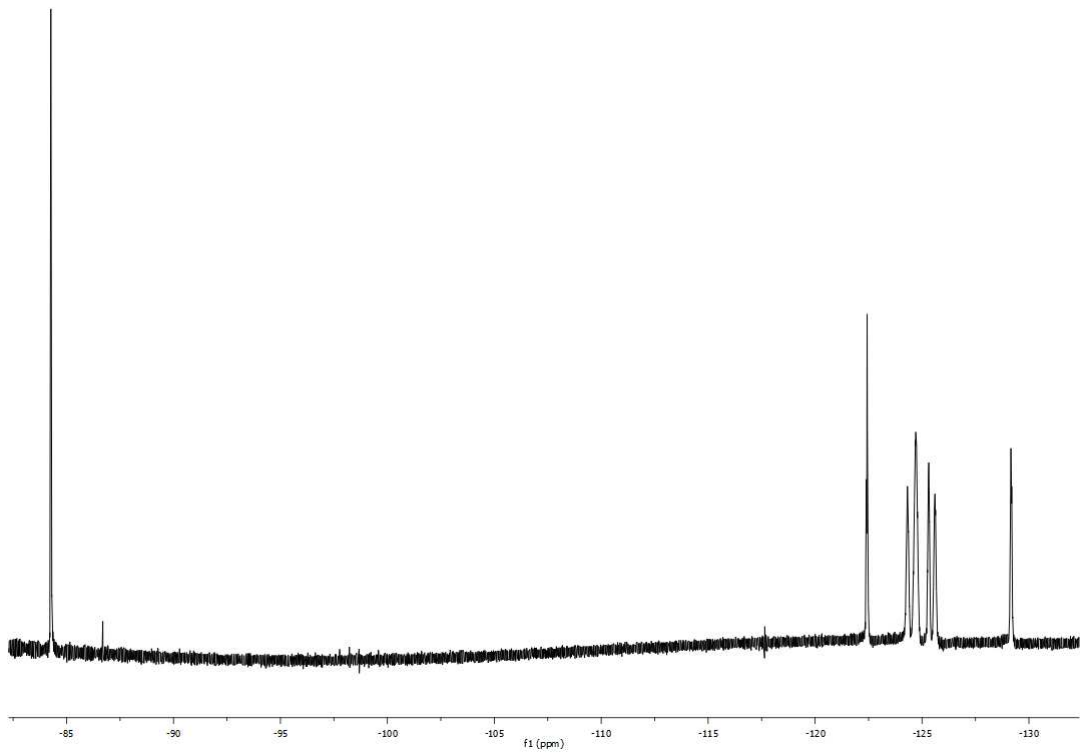


¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CD₃OD+TFA-d₁)



¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CD₃OD+TFA-d₁)

 ^1H - ^1H -COSY ^1H - ^{13}C -HSQC

 ^1H - ^{13}C -HMBC ^{19}F -NMR-Spektrum (376.4 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{TFA}-d_1$)

