

**Synthese von MUC1-Glycopeptid-
Konjugaten mit fluorierten Analoga des
Thomsen-Friedenreich Antigens**

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

Christian Mersch
geboren in Saarburg
Mainz, im Januar 2011

Dekan: Prof. Dr. D.Sc. h.c. W. Hofmeister

1. Berichterstatter: Jr. Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kunz

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2011

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- [1] C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Röder, Synthesis of Fluorinated Analogues of Tumor-Associated Carbohydrate and Glycopeptide Antigens, *Synlett* **2009**, 2167-2170.
- [2] S. Wagner, C. Mersch, A. Hoffmann-Röder, Fluorinated Glycosyl Amino Acids for Mucin-like Glycopeptide Antigen Analogues, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7319-7330.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von Januar 2007 bis Januar 2011
am Institut für Organische Chemie
an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
unter der Betreuung von Jr. Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder durchgeführt.

*"So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.
Man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und
den Umständen das Möglichste getan hat."*

Johann Wolfgang von Goethe, „Italienreise“ (1787)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Immunbiologie von Krebs	1
1.2	Epitheliales Mucin MUC1	3
1.3	MUC1 als Tumorassoziertes Antigen und potentiell Ziel einer Antikörpertherapie	8
1.4	Fluor in biologisch aktiven Verbindungen	11
2	ZIELSETZUNG	15
3	ALLGEMEINER TEIL	19
3.1	Synthese der natürlichen tumorassozierten Glycosylaminosäure-Bausteine	19
3.1.1	Synthese des zentralen <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Threonin Konjugates (T _N -Antigen)	19
3.1.2	Synthese des TF-Antigens	23
3.1.3	Synthese des 2,6-Sialyl-T-Antigens	25
3.1.4	Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigens	30
3.2	Synthese der fluorierten Glycosylaminosäure-Bausteine	34
3.2.1	Synthese der acetylgeschützten Donoren und Glycosylierungsreaktionen	34
3.2.2	Synthese der benzyl- und <i>para</i> -methoxybenzylgeschützten Donoren und deren Glycosylierungsreaktionen	42
3.2.2.1	Synthese des fluorierten 2,6-ST-Antigens	57
3.2.2.2	Synthese der bisfluorierten Verbindungen	60
3.3	Synthese von Glycopeptiden der TR-Domäne des MUC1	65
3.3.1	Allgemeines Protokoll zur Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese	65
3.3.2	Allgemeines Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptide	72
3.3.3	Synthese von MUC1-Eicosapeptiden	75
3.3.4	Synthese von fluorierten Glycopeptiden	79
3.4	Konjugation von MUC1-Glycopeptid-Konjugaten an Carrierproteinen	84
3.4.1	Immunologische Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen	89
4	ZUSAMMENFASSUNG	95
5	EXPERIMENTELLER TEIL	104

5.1	Allgemeines und Messgeräte	104
5.2	Synthesen zu Kapitel 3.1	109
5.3	Synthesen zu Kapitel 3.2	142
5.4	Synthese der fluorierten Disaccharide aus Kap. 3.3	162
5.5	Festphasensynthesen zu Kapitel 3.3.3 und 3.3.4	203
5.5.1	Synthese der unfluorierten Glycopeptide	205
5.5.2	Synthese der fluorierten Glycopeptide von Kap. 3.3.4	213
5.6	Synthesen zu Kapitel 3.4	225
5.7	Daten für die ELISA bzw. Neutralisations-ELISA Experimente	233
6	LITERATUR	237
7	SYNTHESEPROTOKOLLE DER FESTPHASENSYNTHESE VON MUC1-GLYCOPEPTIDEN	I
8	SPEKTROSKOPISCHER ANHANG	VIII

Abkürzungsverzeichnis

[α]	Spezifischer Drehwert	Fmoc	<i>N</i> -9- <i>H</i> -Fluoren-9-yl-methoxy-carbonyl
absol.	absolut	Gal	D-Galactose
Ac	Acetyl	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
Ac ₂ O	Acetanhydrid	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
AS	Aminosäure	HBUTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
ber.	berechnet	[°] Hex	Cyclohexan
Bn	Benzyl	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)	HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
Bzn	Benzylidenacetal	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
c	Konzentration	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
COSY	Correlated Spectroscopy	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
δ	chemische Verschiebung	Hz	Hertz
DAST	(Diethylamino)- schwefeltrifluorid	<i>i</i> Pr	Isopropyl
DBU	1,8-iazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	J	Kopplungskonstante
DC	Dünnschichtchromatographie	kat.	Katalytisch
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	konz.	konzentriert
DDQ	2,3-Dichlor-5,6- dicyanobenzochinon	λ	Wellenlänge
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>	Lit.	Literaturangabe
Dest.	Destilliert	M	Molarität Molare Masse
dhb	2,5-Dihydroxybenzoesäure	MALDI	<i>Matrix Assited Laser Desorption Ionisation</i>
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin	mbar	Millibar
DMAP	4-Dimethylaminoschwefeltrifluorid	Me	Methyl
DMSO	Dimethylsulfoxid	min	Minuten
EE/EtOAc	Ethylacetat	MS	Molekularsieb Massenspektrometrie
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>		
eq	Äquivalente		
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>		
Et	Ethyl		

NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OD	Optische Dichte
OTf	Trifluormethansulfonat, Triflat
<i>p</i>	<i>para</i>
p.a.	pro analysi
Ph	Phenyl
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6- sulfonyl
ppm	<i>parts per million</i>
quant.	quantitativ
R_f	Retentionsfaktor
R_t	Retentionszeit
RP	<i>Reversed Phase</i>
SG	Schutzgruppe
Su	Succinimidyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
Trt	Trityl
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure

1 Einleitung

1.1 Immunbiologie von Krebs

Jeder vierte Todesfall in Deutschland wird durch Krebserkrankungen verursacht, so dass Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen hierzulande bereits die zweithäufigste Todesursache darstellt.^[1] Derzeit gibt es in Deutschland ca. vier bis fünf Millionen Krebskranke, wobei jährlich etwa weitere 330000-380000 Neuerkrankungen hinzukommen (weltweit ca. 10.9 Millionen).^[2] Während die häufigste bei Frauen auftretende Krebserkrankung Brustkrebs darstellt, ist dies bei Männern neben dem Lungenkrebs vor allem der Prostatakrebs, sowie der Dickdarm- und Mastdarmkrebs. Die Abb. 1.1.1 spiegelt die Verteilung der Krebstodesursachen in Deutschland für das Jahr 2007 wider, wobei der Lungenkrebs bei den Männern und der Brustkrebs bei den Frauen am häufigsten zum Tode führten.

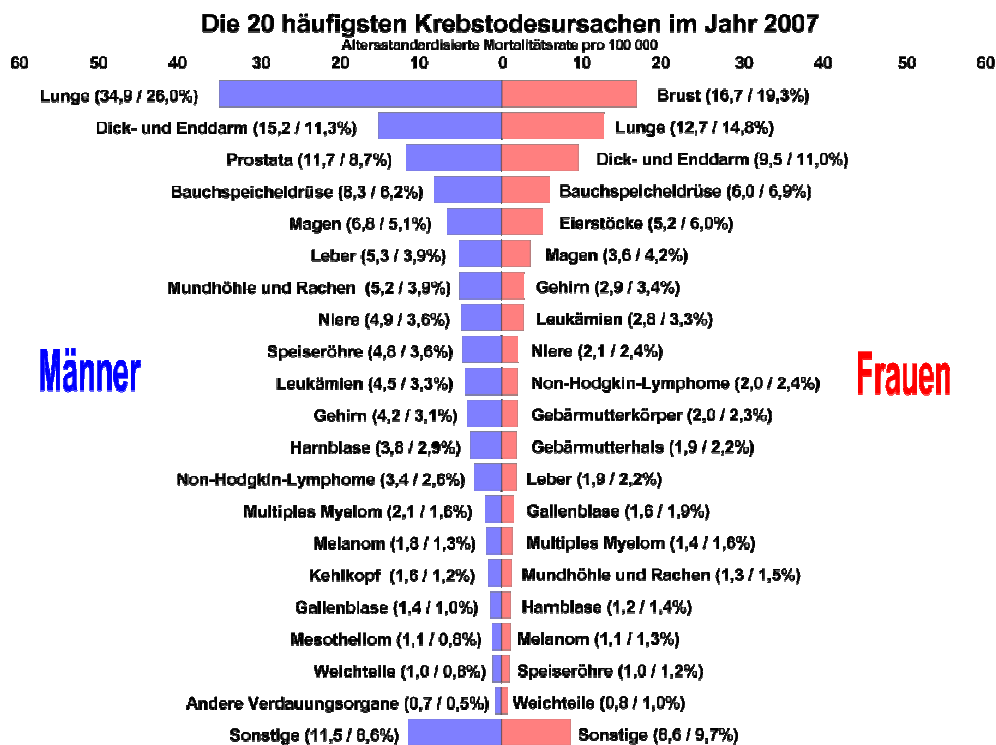


Abb. 1.1.1: Krebstodesursachen in Deutschland 2007

Um Krebserkrankungen erfolgreich behandeln zu können, ist es notwendig, selektiv alle malignen Zellen abzutöten, ohne dass dabei gesundes Gewebe beschädigt bzw. zerstört wird. Entgegen aller bisherigen Forschungsbemühungen ist es jedoch noch nicht möglich, gezielt das Auftreten von bösartigen Tumoren zu verhindern oder diese zurückzudrängen.

Nach der Diagnose „Krebs“ bedient sich die heutige moderne Medizin mit der operativen Entfernung der Tumore, der Strahlen- und der Chemotherapie im Wesentlichen dreier Therapieformen, die für einen bestmöglichen Behandlungserfolg häufig kombiniert werden. Allen diesen Behandlungsformen ist jedoch gemeinsam, dass es ihnen an der notwendigen Selektivität bei der Tumorbekämpfung fehlt. Krebsbehandlungen stellen meist erhebliche Eingriffe in den Organismus mit zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen dar, weshalb neben der kontinuierlichen Verbesserung der bereits bestehenden Behandlungsmethoden insbesondere die Entwicklung einer möglichst schonenden Therapie ein wesentliches Ziel der modernen Krebsmedizin ist.^[3,4] So könnte durch das Verabreichen eines geeigneten nicht-toxischen Tumorimpfstoffs das Immunsystem derart aktiviert werden, dass nicht nur der Tumor selbst, sondern auch frei zirkulierende (Mikro-)Metastasen vom Immunsystem selektiv angegriffen werden. Eine solchermaßen gezielte Tumorimmuntherapie^[5,6] würde dabei insbesondere als Subsidiärtherapie, d.h. nach Verringerung der Tumorlast durch konventionelle Behandlungsmethoden, für die Patienten von großem Nutzen sein und diese durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses vor einem erneuten Ausbruch der Krankheit schützen. Vor allem aber böte die hohe Spezifität des Immunsystems die Möglichkeit, selektiv maligne Zellen anzugreifen, ohne dabei gesundes Gewebe zu zerstören. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung geeigneter Antigenstrukturen, die eine Tumorzelle eindeutig von gesunden Zellen unterscheiden. Damit der Körper gegen diese (tumorassoziierten) Antigene eine effiziente Immunantwort auslösen kann, muss jedoch die vorhandene immunologische Toleranzschwelle gegen diese körpereigenen Strukturen durchbrochen werden.

Eine geeignete Zielstruktur zur Entwicklung von Tumorstoffen für die aktive Immuntherapie stellt das tumorassoziierte MUC1-Glycoprotein dar, das auf Karzinomen in erheblichem Maße überexprimiert vorliegt und im Vergleich zum MUC1 gesunder Zellen charakteristisch veränderte Oberflächenstrukturen aufweist.^[7,8,9]

1.2 Epitheliales Mucin MUC1

Mucine (lat. mucus = Schleim) sind polymorphe, hochmolekulare Glycoproteine,^[10] deren Glycosylierungsgrad bis zu 50-90 Gewichtsprozent beträgt.^[11] Sie werden von den epithelialen Geweben des Verdauungs- und Bronchialtraktes sowie der Genitalregion exprimiert und dienen dort hauptsächlich dem Schutz der Zelloberfläche,^[12] die externen Angriffen wie der Einwirkung von Mikroorganismen, proteolytischen Enzymen und Säuren, ausgesetzt ist. Membrangebundene Mucine wie das MUC1 werden ausschließlich auf der apicalen Zelloberfläche exprimiert und reichen mit ihrer extrazellulären Domäne weit ins Lumen hinein. Der Struktur und Funktion entsprechend, unterscheidet man bislang etwa zwanzig bekannte humane Mucine, die sich grob in sekretorische Vertreter (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC15, MUC18, MUC19) und membrangebundene Mucine (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17, MUC20) einteilen lassen.^[13] Dabei bilden die sekretorischen Mucine ein hochviskoses, über intermolekulare Disulfidbrücken verknüpftes, oligomeres Skelett (mit Ausnahme von MUC7,^[14] das keine cysteinreichen Peptidabschnitte enthält), während die membrangebundenen Mucine über ein lipophiles Proteinfoamsegment fest in der Plasmamembran verankert vorliegen.

Neben ihrem Kohlenhydratanteil weisen Mucine, mit Ausnahme von MUC15 und MUC18, im zentralen Bereich einen repetitiven Proteinteil auf. Da die Anfangsaminosäure dieser Domäne zugleich auch deren End-Aminosäure darstellt, spricht man hierbei von einer sog. *tandem repeat*-Einheit. Anhand der Sequenz dieser Domäne und der Anzahl der jeweiligen Wiederholungseinheiten (*variable number of tandem repeats*, VNTR)^[15] lassen sich die verschiedenen Mucinarten unterscheiden. Allen Mucinen gemein ist jedoch, dass die VNTR-Domänen reich an den Aminosäuren Prolin, Serin und Threonin sind. Die beiden letztgenannten Aminosäuren stellen zudem potentielle *O*-Glycosylierungsstellen dar, von denen im Fall des MUC1 mit zwei Serin- und drei Threoninresten insgesamt fünf Glycosylierungsstellen pro Wiederholungseinheit vorliegen. Obwohl der Grad der Glycosylierung gewebsspezifisch ist und vom Entwicklungsstand der Zelle abhängt, lassen sich die verschiedenen Glycosylierungsmuster der Mucine auf insgesamt acht verschiedene Kernstrukturen zurückführen (Core1 bis Core8, vgl. Abb. 1.2.1).^[15,16]

Core1:	β Gal-(1,3)- α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr
Core2:	β Gal-(1,3)-[β GlcNAc-(1,6)-] α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr
Core3:	β GlcNAc-(1,3)- α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr
Core4:	β GlcNAc-(1,3)-[β GlcNAc-(1,6)-] α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr
Core5:	α GalNAc-(1,3)- α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr
Core6:	β GlcNAc-(1,6)- α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr
Core7:	α GalNAc-(1,6)- α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr
Core8:	α Gal-(1,3)- α GalNAc- <i>O</i> -Ser/Thr

Abb. 1.2.1: Die Core-Strukturen der *O*-Glycane bei Mucinen

Das Mucin MUC1^[17,18] wurde als erstes Mucin unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern aus humaner Milch isoliert^[19,20] und zählt zu den am besten untersuchten Mucinen. Seine extrazelluläre Domäne ist durch Wiederholungssequenzen charakterisiert, die aus 20 Aminosäuren der Sequenz **AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA** (Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala)^[21,22] bestehen und deren Anzahl mit 25-125 Wiederholungseinheiten stark aufgrund eines vererbten Polymorphismus des codierenden Genabschnittes variiert.^[23] Bedingt durch den hohen Prolinanteil und die große Zahl an komplexen Kohlenhydrat-Seitenketten (bis zu fünf pro *tandem repeat*-Einheit) nimmt der extrazelluläre Proteinteil des MUC1 eine starre, langgestreckte Konformation ein, die etwa 200-500 nm weit in das Lumen hineinragt (vgl. Abb. 1.2.2).^[24]

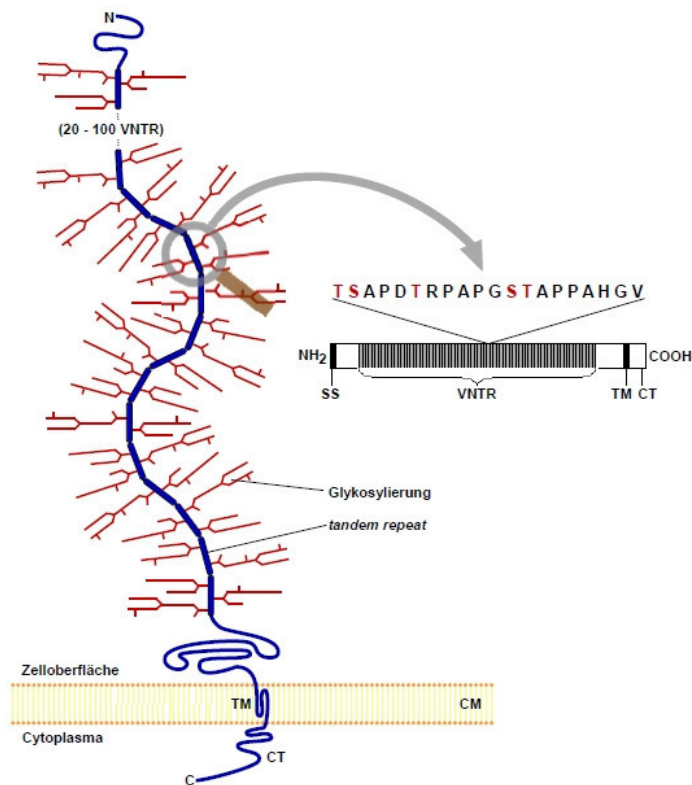


Abb. 1.2.2: VNTR-Domäne des MUC1^[25]

Das Mucin MUC1 auf neoplastischem Gewebe unterscheidet sich erheblich vom dem, welches von gesunden Zellen exprimiert wird. Bei normalen Epithelzellen tritt MUC1 ausschließlich auf der apicalen Seite der Zelle, d.h. der dem Lumen zugewandten Seite auf, wohingegen diese Polarisation in malignen Zellen verloren geht und das Protein auf der gesamten Zelloberfläche verstärkt exprimiert wird. Des Weiteren sind in den gesunden Zellen durchschnittlich 50% der potentiellen *O*-Glycosylierungsstellen belegt, wohingegen bei Brustkrebszelllinien eine fast vollständige Glycosylierung auftritt. Dieser unterschiedliche Glycosylierungsgrad und die dabei auftretenden charakteristisch veränderten Kohlenhydratstrukturen resultieren aus der fehlerhaften Aktivität verschiedener Glycosyltransferasen.^[8,26]

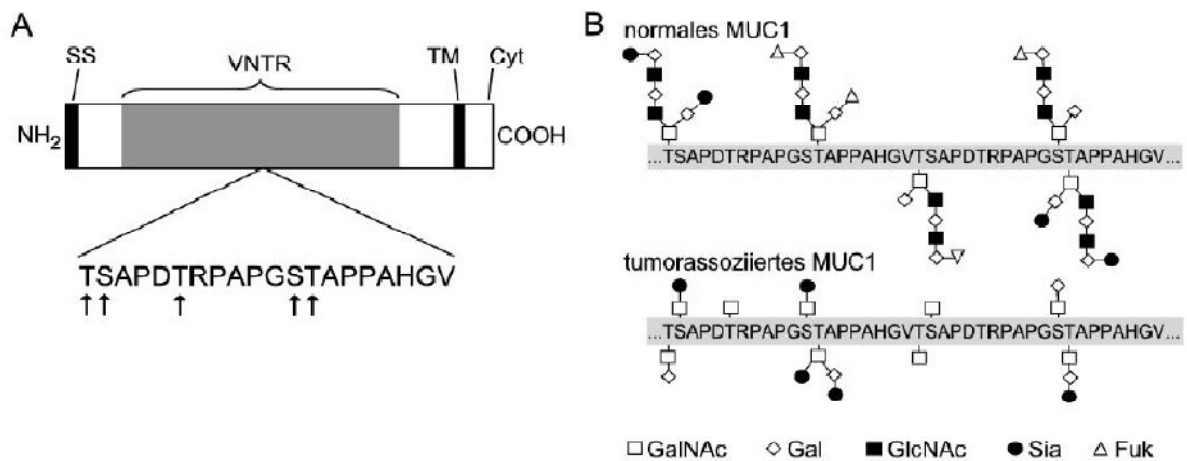


Abb. 1.2.3: VNTR-Domäne des MUC1 und Vergleich zwischen normalem und tumorassoziiertem MUC1. **A:** Abkürzungen: SS: Signalsequenz; VNTR: variable number of tandem repeats; TM: transmembrane Domäne; Pfeile: Aminosäurereste, die potentielle O-Glycosylierungsstellen darstellen. **B:** Glycosylierung der VNTR-Domäne von normalem MUC1 und dem tumorassoziierten MUC1. Abkürzungen: GalNAc: N-Acetylgalactosamin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Sia: Sialinsäure; Fuk: Fucose^[9]

In gesunden Zellen ist das Glycosylierungsmuster auf Enzyme im Golgi-Apparat zurückzuführen, die aus N-Acetylgalactosamin, Fucose, Galactose, N-Glucosamin und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) schrittweise die Kohlenhydrat-Seitenketten aufbauen (Abb. 1.2.3). Beispielsweise resultiert die Core1-Struktur (T-Antigen) aus einer Kettenverlängerung des N-Acetylgalactosamins (T_N-Antigen^[7]) mithilfe der β-(1,3)-Galactosyltransferase. Der erhaltene zentrale Disaccharid-Baustein dient wiederum als Substrat für verschiedene Glycosyltransferasen, wie z. B. für die β-(1,6)-Glucosaminyltransferase (C2GnT-I), die die Core1-Struktur in die Core2-Struktur überführt, bevor durch verschiedene weitere Glycosyltransferasen schließlich die komplexen N-Acetylactosaminketten erhalten werden. Während in gesunden Zellen also die Oligosaccharidstrukturen auf der Core2-Einheit basieren, kommt es in malignen Zellen aufgrund der stark verminderten Aktivität der β-(1,6)-Glucosaminyltransferase zu einem fast vollständigen Erliegen der Bildung von komplexen, auf der Core2-Struktur basierenden Oligosaccharide. Darüber hinaus werden im trans-Golgi von Tumorzellen spezifische α-3-Sialyltransferasen sowie mehrere GalNAc-spezifische β-6-Sialyltransferasen überexprimiert, die zu einer vorzeitigen Sialylierung der akkumulierenden Core1-Struktur führen (ST_N- und ST-Antigene) und damit ein weiteres Wachstum der Glycanketten unterbinden (Abb. 1.2.4).^[26,27]

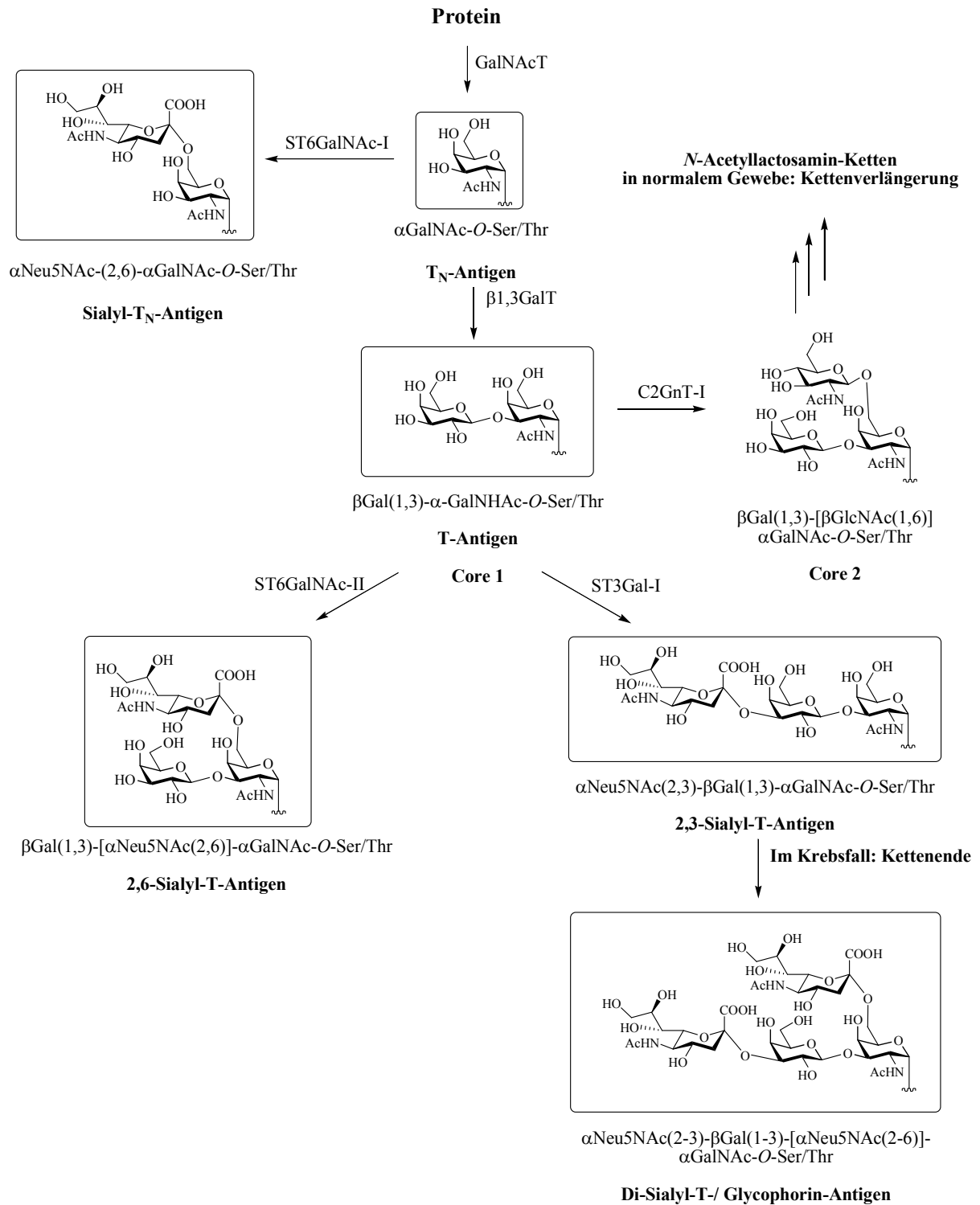


Abb. 1.2.4: Biosynthese von *O*-Glycanen in Krebszellen^[14,22]

Beteiligte Schlüsselenzyme GalNAcT: UDP-*N*-Acetyl- α -D-galactosamin: Polypeptid-*N*-Acetylgalactosaminyltransferasen;
 β 1,3GalT: Core1- β 1,3-Galactosyltransferase; C2GnT-I: Core2- β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase-I; ST6GalNAc-I:
 CMP-NeuNAc:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-I; ST6GalNAc-II: CMP-NeuNAc:GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-II.

1.3 MUC1 als Tumorassoziiertes Antigen und potentielles Ziel einer Antikörpertherapie

In der Regel lösen tumorassoziierte Antigene als körpereigene Strukturen keine starke Immunreaktion aus. Sie ermöglichen jedoch eine Differenzierung zwischen malignen und normalen Zellen, was eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer selektiven Immuntherapie ist.^[9] Ein in diesem Sinne vielversprechendes Zielmolekül stellt das tumorassoziierte MUC1 dar, auf dessen Grundlage in letzter Zeit die Entwicklung von effizienten, auf Kohlenhydraten basierenden Krebsvakzinen vorangetrieben wird.

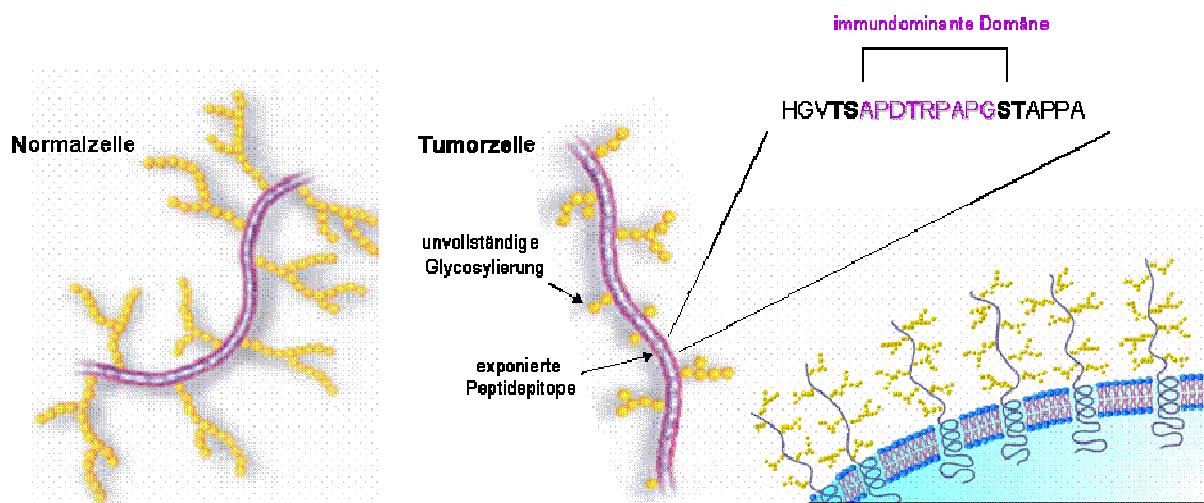


Abb. 1.3.1: Vergleich zwischen normaler und maligner Zelle

Seit etwa 20 Jahren werden mit Hilfe der Hybridom-Technologie monoklonale Maus-Antikörper gegen das tumorassoziierte Antigen MUC1 hergestellt.^[28] Diese Antikörper richten sich aufgrund der verkürzten Glycanseitenketten und der damit verbundenen ungenügenden Abschirmung des Peptidgerüsts^[29] primär gegen Peptid-Epitope aus der VNTR-Domäne. So stellt beispielsweise die Sequenz PDTRPAP aus der TR-Domäne des MUC1 ein bevorzugtes Bindungsmotiv^[30] für mehrere solcher monoklonalen Antikörper dar (Abb. 1.3.2).^[31,32,33]

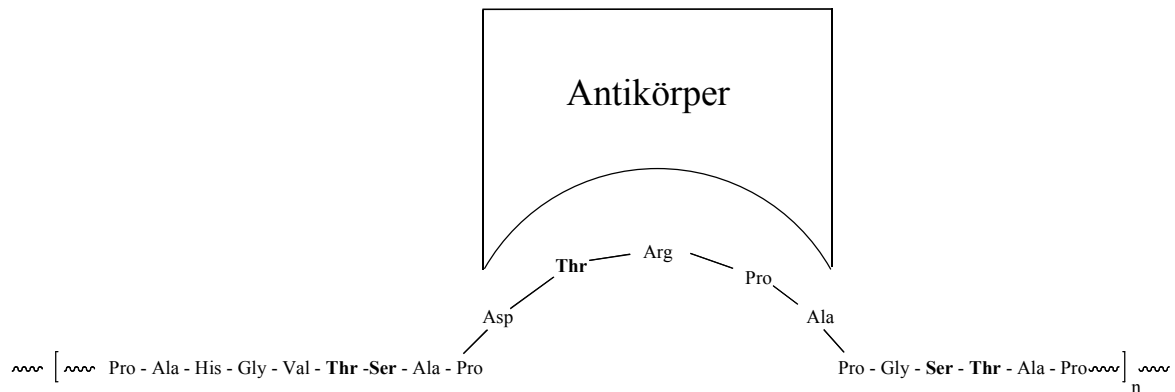


Abb. 1.3.2: Immundominantes PDTRPAP-Bindungsmotiv

Ogleich die tumorassoziierte Form des MUC1 vom Immunsystem erkannt werden kann, verhindern Toleranz- und immunsuppressive Mechanismen einen effizienten Angriff auf MUC1-exprimierenden Krebszellen.^[34] Der Grad der MUC1-Expression und das verstärkte Auftreten der tumorassoziierten Zellen lassen sich daher häufig mit einem aggressiven Voranschreiten der Krankheit und einer deutlich verringerten Heilungschance des Patienten korrelieren.^[35]

Das Ziel der aktiven Immuntherapie ist nicht nur, die Immunreaktion des Patienten gegen den Primärtumor zu stimulieren, sondern auch einem Wiederaufflackern der Krankheit durch Metastasierung zu begegnen. Dazu müssen im Wesentlichen drei grundsätzliche Voraussetzungen erfüllt sein.^[14]

- Es müssen qualitative bzw. quantitative Unterschiede zwischen den Oberflächenstrukturen von gesunden Zellen und Tumorzellen bestehen.
- Das Immunsystem muss die prinzipielle Fähigkeit zur Erkennung dieser Unterschiede besitzen.
- Die Lernfähigkeit und Stimulierbarkeit des Immunsystems muss eine effiziente Eliminierung von Tumorzellen auch bei einem erneuten Krankheitsausbruch ermöglichen.

Wie oben schon erwähnt wurde, sind tumorassoziierte Antigene körpereigene Strukturen und werden daher nicht als fremd erkannt. Um diese Selbsttoleranz zu brechen, müssen daher eine starke T-Helferzell-vermittelte Antikörperproduktion und eine starke cytotoxische T-Zellantwort initiiert werden.

In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen gezeigt, dass tumorassoziierte Oligosaccharid-Strukturen in Form von Glycokonjugaten erfolgreich in Vakzinierungsstudien eingesetzt werden können. Dabei stellen neben den mucinanalogen T_N-, T-, ST_N- und ST-

Antigenen, auch komplexere Vertreter wie das Lewis^Y-Antigen interessante Vakzin-Bausteine dar (siehe Abb. 1.3.3), wobei erst der Einsatz eines kombinierten B-Zell-Epitops bestehend aus der antigenen Saccharideinheit und der zugrundeliegenden MUC1-Peptidsequenz eine starke und spezifische Immunantwort ermöglicht.^[36]

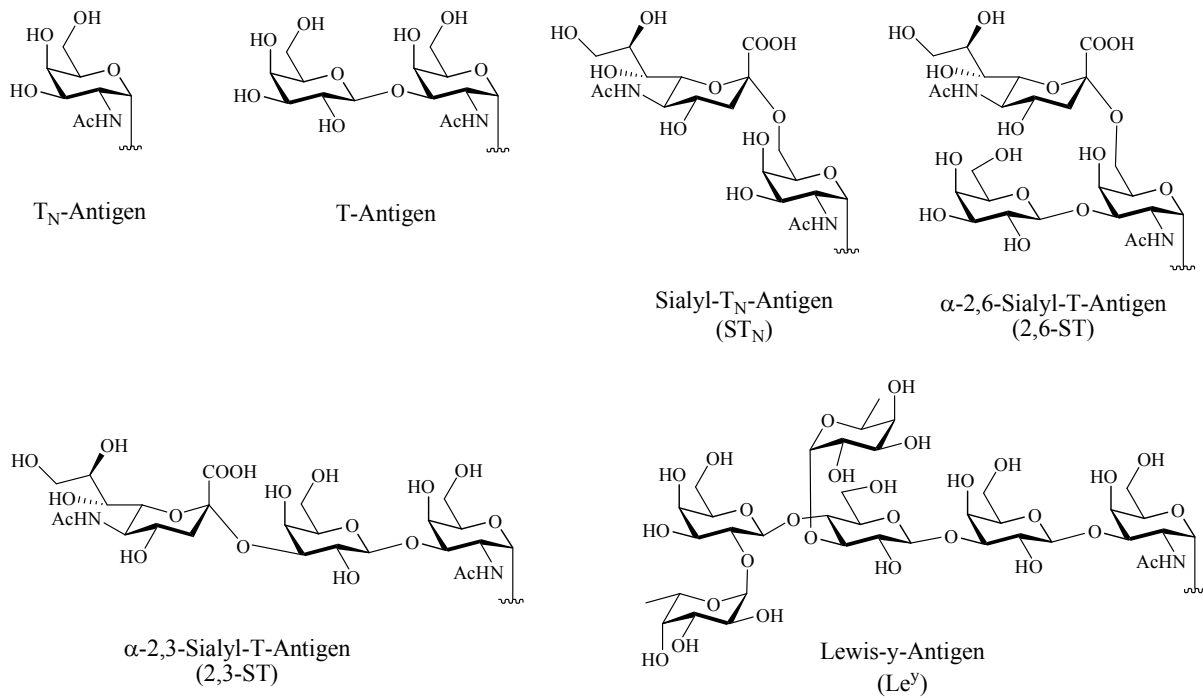


Abb. 1.3.3: Übersicht über tumorassoziierte Kohlenhydrat-Antigene

Ausgehend von den in Abb. 1.3.3 gezeigten tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigenen wurden in den letzten Jahren bereits mehrere Vakzinkandidaten entwickelt.^[37] So gelangen erst kürzlich *A. Kaiser et al.*^[38] mit der Herstellung eines tumorselektiven MUC1-Glycopeptid-Impfstoffs unter Verwendung von Tetanus Toxoid, der ggf. auch beim Menschen eingesetzt werden könnte, ein wesentlicher Durchbruch.

Neben den natürlichen, auf Zelloberflächen auftretenden Kohlenhydrat-Antigenen, wurden in jüngerer Zeit auch Strukturanaloga, wie z.B. Kohlenhydrat-Mimetika mit C- bzw. S-glycosidischer Bindung,^[39,40,41,42] für die Entwicklung von auf Kohlenhydraten basierenden Krebsvakzinen eingesetzt. So wurden beispielsweise erste Konjugate eines C-Glucopyranosyl-Serinanalogons^[43] und eines C-Glycosids des T_N-Antigens^[44,45,46] dargestellt und ersten immunologischen Studien unterworfen. Dabei erwiesen sich diese Konstrukte nicht nur als immunogen, sondern zeichneten sich vor allem auch durch eine verbesserte (metabolische)

Stabilität aus. Ähnliche Überlegungen sollten auch für fluoriierte Antigenanaloga gelten, wobei es jedoch zunächst zu klären gilt, ob und in wie weit derartige Strukturmodifikationen die Tumorspezifität der resultierenden Antikörper negativ beeinflussen.

1.4 Fluor in biologisch aktiven Verbindungen

Das elektronegativste Element des Periodensystems ist das Fluor, das aufgrund seiner geringen Polarisierbarkeit und dem kleinen Atomradius besondere physikalische und chemische Eigenschaften besitzt. Die gute Überlappung von 2s und 2p Orbitalen des Fluors mit denen von Kohlenstoff ergeben starke Fluor-Kohlenstoff-Bindungen^[47] weshalb mit Blick auf die ähnlichen Größen von F zu H und O(H) letztere leicht gegen Fluor ausgetauscht werden können. Durch die Entwicklung moderner Fluorierungsmethoden (elektrophile und nucleophile Fluorierung) wurden in den letzten Jahren zunehmend Fluoratome in organische Verbindungen eingebaut,^[48,49,50] die eine bedeutende Rolle in den Bereichen Medizin, Pharmazie, Landwirtschaft und Technik spielen.^[51] Durch den Einbau von Fluor in organische Verbindungen kann man beispielsweise deren elektronische und lipophile Eigenschaften ändern, was insbesondere für pharmazeutische Anwendungen von Interesse ist. So kann der strategische Einbau von Fluoratomen z.B. eine Änderung der metabolischen Stabilität bewirken und damit die Bioverfügbarkeit dieser Verbindung beeinflussen.^[49] Des Weiteren ist durch die selektive Fluorierung und die damit einhergehende Änderung der Elektronendichteverteilung im Molekül eine Modulation der chemischen Reaktivität von funktionellen Gruppen möglich, die Auswirkungen auf die molekulare Erkennung der Verbindung, z.B. bei Enzym-Substrat-Wechselwirkungen, besitzt.^[52,53] Häufig zeigen fluoriierte Verbindungen dabei sogar höhere Bindungsaffinitäten als ihre nicht fluoriierten Vorläufer.^[54] Aufgrund der besonderen Eigenschaften, die der Einbau eines Fluoratoms in einem Molekül bewirken kann, ist das Interesse an fluoriierten Verbindungen in den letzten Jahren stark gestiegen, so dass fluororganische Verbindungen mittlerweile eine zentrale Rolle in der Entwicklung von biologisch und pharmazeutisch wirksamen Substanzen spielen.^[53,55]

Auch in der Kohlenhydrat-Chemie findet der strategische Einbau von Fluoratomen vermehrt Anwendung, so z.B. beim Austausch einer Hydroxylgruppe gegen Fluor, mit dessen Hilfe beispielsweise der Wirkmechanismus von Enzymen untersucht werden kann. Dabei können fluorierten Kohlenhydrate sowohl als Substratanaloga, als auch in Form von Inhibitoren in Enzymreaktionen eingesetzt werden, wodurch Hinweise auf die benötigten strukturellen Bindungsmotive^[56] der aktiven Zentren resultieren. Zudem stellen fluorierte Kohlenhydrate spektroskopisch gut zu verfolgende Sonden dar, die es erlauben, Stoffwechselwege und Enzymaktivitäten zu studieren bzw. aufzuklären.^[57] Vor dem Hintergrund, dass gerade Kohlenhydrate eine essentielle Bedeutung für den (korrekten) Verlauf einer Vielzahl von biologischen Prozessen einnehmen,^[58,59,60,61] ist die Suche nach geeigneten spezifischen Enzyminhibitoren und das Verständnis der zugrunde liegenden Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen mit Blick auf therapeutische Anwendungen essentiell. *Withers* und Mitarbeiter konnten beispielsweise zeigen, dass 2-Desoxy-2-fluorglycoside mit guten Abgangsgruppen am anomeren Zentrum (z.B. Fluor, Phosphat, 2,4-Dinitrophenyl) äußerst wertvolle sog. "mechanism based"-Inhibitoren für Glycosidasen darstellen,^[62,63] da sie kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden werden.^[64] So führt der elektronegative Fluorsubstituent an C-2 nach der anfänglichen Bindung an das Enzym zu einer starken Destabilisierung des im Übergangszustand vorliegenden Oxocarbeniumions, wodurch die Transglycosylierung drastisch verlangsamt wird (siehe Abb. 1.4.1).^[65,66] Die damit verbundene Anreicherung des Glycosyl-Enzym-Komplexes bewirkt eine zweizeitige kovalente (kompetitive) Enzyminhibierung.

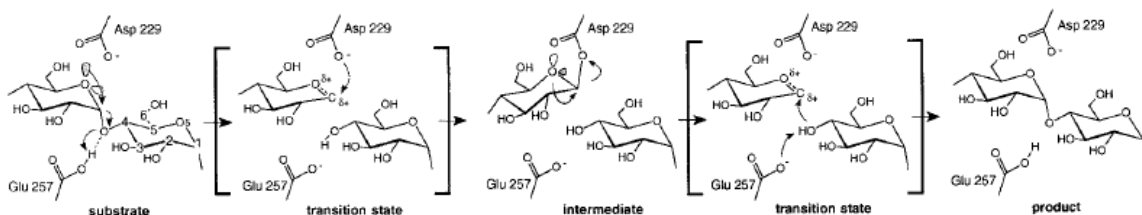


Abb. 1.4.1: Schema des Cyclodextrin-Glycosyltransferase-Mechanismus zur Beschreibung der Inhibitorwirkung von 2-Fluorzuckern^[67]

Ein weiteres Beispiel stellen die kürzlich von *Xue et al.*^[68] auf Basis von *Core2* und *Core6*-Strukturen synthetisierten fluoridierte mucinanaloge Kohlenhydrate dar, die erfolgreich in mechanistischen Studien zur Biosynthese von *O*-Glycanen an Glycosyl- und Sulfotransferasen zum Einsatz kamen (Abb. 1.4.2).

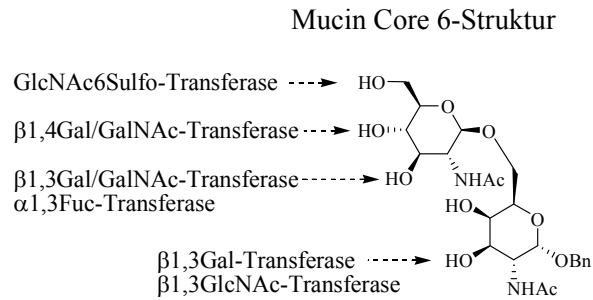


Abb. 1.4.2: Mucin Core6-Struktur

Von Interesse ist zudem die Tatsache, dass geeignete fluoridierte Kohlenhydratvorläufer *in vivo* in komplexe *O*-Glycane eingebaut werden können, die ihrerseits wieder als Inhibitoren wirken können. So konnten *Marathe et al.*^[69] zeigen, dass ein peracetylierter 4-Fluor-GalNAc-Baustein in HL-60 Zellen metabolisch wirksam ist und von entsprechenden Glycosyltransferasen in *O*-Glycane, z.B. des P-Selectin bindenden Glycoproteinliganden-1 (PSGL-1), eingebaut werden kann. Die dabei resultierenden veränderten Glycanstrukturen zeigen ihrerseits eine abweichende metabolische Aktivität, wodurch die Ausbildung wichtiger Bindungs-Epitope drastisch reduziert oder sogar unterdrückt werden kann. Beispielsweise verringerte der Einbau des 4-Fluor-GalNAc-Bausteins den Glycangehalt von PSGL-1 um 20%, wobei der Anteil der N-Acetyllactosaminketten sogar um 70-85% sank. Eine solche Veränderung der Bindungsepitope von Glycoproteinen, die in der Selektin-vermittelten Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielen, ist als Therapieansatz z.B. für die Behandlung von chronischen Entzündungsprozessen von Interesse.

Neben einfach fluoridierten Monosacchariden wurden auch Bindungsstudien mit mehrfach fluoridierten Vertretern durchgeführt.^[70,71] So konnte am Beispiel des Enzyms Glycogenphosphorylase gezeigt werden, dass die erhöhte polare Hydrophobizität von 2-Desoxy-2-fluor- α -D-glycosylfluorid **A** im Vergleich zu den beiden unfluorierten bzw. monofluorierten Vertretern **B** und **C** auch zu einer wesentlich höheren Bindungsaffinität führt^[72] (Abb. 1.4.3).

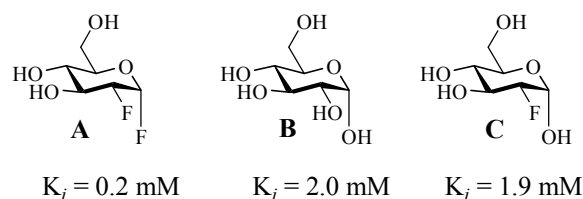


Abb. 1.4.3: Inhibitoren von Glycogenphosphorylasen

Neben den bisher bereits genannten Enzymen wurde in einigen Fällen auch die Erkennung von fluorierten Kohlenhydrat-Haptenen durch entsprechende Antikörper untersucht.^[56] So wurden von *Glaudemans et al.*^[73] fluorierte Analoga der α -D-Glucose **D** synthetisiert, bei denen jeweils die Hydroxylgruppe in Position 2,3,4 und 6 gegen Fluor ausgetauscht wurde (**E-H**). In Bindungsstudien mit dem monoklonalen Antikörper W3129 (bindet an das nichtreduzierende Ende von Isomaltose-Oligomeren) erwies sich dabei das 3F-Glucosid **F** als die Verbindung mit der höchsten Affinität, während die beiden 4-Fluor- und 6-Fluor-Analoga nicht vom Antikörper erkannt werden. (Abb. 1.4.4).

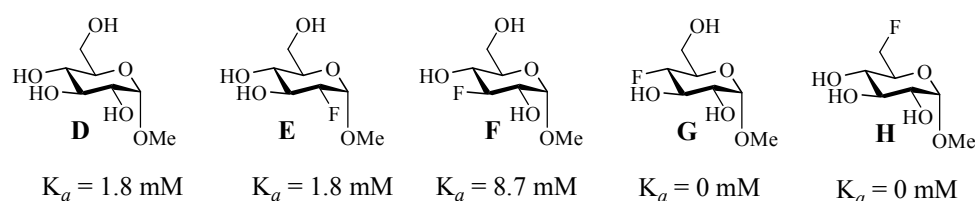


Abb. 1.4.4: α -D-Glucose und fluorierte Derivate zur Untersuchung der Bindungsaffinität an den monoklonalen Antikörper W3129

Ein erstes Beispiel für die Bindung eines modifizierten Glycopeptid-Antigens an einen entsprechenden Antikörper präsentierten schließlich *Holm et al.*^[74] in Modellstudien für rheumatische Arthritis. An Glycopeptid-Partialstrukturen des Kollagens Typ II (CII259-273) konnte dabei gezeigt werden, dass ein fluoriertes Glycopeptid, das anstelle eines galactosylierten Hydroxylysins einen Kohlenhydrat-Baustein mit einem 4-Fluorsubstituenten trug, eine vergleichbare Bindungsaffinität zum Antikörper aufweist.

2 Zielsetzung

Das zur Gruppe der membranständigen Mucine gehörende Glycoprotein MUC1 stellt ein interessantes Zielmolekül für die Entwicklung einer aktiven Tumorummuntherapie zur spezifischen Behandlung von Adenokarzinomen dar. Dabei sind es vor allem zwei wesentliche Eigenschaften, die dieses Protein als Tumorantigen und Vakzin-Baustein interessant machen: Zum einen wird MUC1 von epithelialen Tumorzellen auf deren gesamten Zelloberfläche stark überexprimiert und zum anderen weist es durch eine veränderte Enzymaktivität verkürzte und hochgradig sialylierte Kohlenhydrat-Seitenketten auf. Um diese Strukturelemente in Form von Glycopeptidvakzinen zur Erzeugung einer tumorspezifischen Immunantwort ausnutzen zu können, müssen die selbst nur schwach immunogen wirkenden MUC1-Antigene chemoselektiv über einen nicht immunogenen Spacer mit einem geeigneten Trägerprotein verbunden werden (Abb. 2.1). Dabei führt das kovalent angebundene Carrierprotein nach der Prozessierung und Präsentation von geeigneten T-Zell-Epitopen im MHCII-Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle zur Aktivierung von T_H2 -Zellen, die letztlich in eine humorale und cytotoxische Immunantwort mündet.



Abb. 2.1: Schematisches Beispiel eines synthetischen Glycopeptid-Vakzins

Vor diesem Hintergrund sollte mit der vorliegenden Arbeit ein synthetischer Zugang zu strukturell einheitlichen Antitumorvakzinen auf Basis von mucinanalogen Glycopeptid-Konjugaten des MUC1 und Carrierproteinen (hier Tetanus-Toxoid und Rinderserumalbumin) geschaffen werden. Da es aufgrund der Mikroheterogenität der tumorassoziierten Glycoproteinstrukturen in Tumorzellisolaten nicht möglich ist, diese in Impfstudien bzw. zur Antikörpergewinnung einzusetzen, müssen stattdessen vollsynthetische (d.h. exakt definierte) Glycopeptid-Antigene als Vakzin-Bausteine hergestellt werden. Um zudem die Bioverfügbarkeit der kombinierten B-Zellepitope, bestehend aus dem tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigen und der MUC1-TR-Sequenz, zu erhöhen, sollen anstelle der natürlichen TF-Kohlenhydrat-Antigene modifizierte Strukturen, bei denen sich Fluorsubstituenten in Position 2 bzw. 6 des terminalen Galactoserestes befinden, eingesetzt werden. Insbesondere bei Einbau eines Fluoratoms in der 2'-Position des TF-Antigens wird eine metabolische Stabilisierung der interglycosidischen Bindung erwartet, da der starke Elektronenzug des 2'-Fluor-

substituenten eine deutliche Destabilisierung des bei der Hydrolyse auftretenden intermediären Oxocarbeniumions bewirkt. Neben einer erhöhten Aktivierungsbarriere für die Hydrolyse besitzen 2-Fluorglycoside zudem die Eigenschaft, als kompetitive Enzyminhibitoren (zeitweilig) vom aktiven Zentrum des Enzyms gebunden zu werden, was ebenfalls zu einem verringerten Abbau durch β -Galactosidasen führen sollte. Entsprechende Studien, scheinen dies derzeit zu bestätigen.¹

Um jedoch genaue Aussagen bezüglich des Einflusses der Fluorsubstitution auf die Immunogenität und Stabilität der Glycopeptidanaloga treffen zu können, sollen auch die jeweiligen natürlichen Glycosylaminosäuren bzw. Glycopeptid-Bausteine nach bereits bekannten Synthesestrategien hergestellt werden. Der Einbau der Fluorsubstituenten in die jeweiligen TF-Antigen-Derivate sollte zudem bereits zu einem recht frühen Zeitpunkt in der Synthese, d.h. vor dem Aufbau des zentralen Disaccharid-Threonin-Konjugats erfolgen, um von gemeinsamen Vorläufermolekülen aus möglichst rasch sämtliche Glycosylaminosäuren aufbauen zu können. Vor diesem Hintergrund stellt beispielsweise der literaturbekannte T_N -Baustein **A** ein zentrales Synthese-Intermediat dar, das nach der Verknüpfung mit geeigneten fluorierten Galactosyl-Donoren sowohl das TF-Analogon mit einem Fluorsubstituenten in 2'-Position **B**, als auch das analoge 2',6'-bisfluorierte Derivat **C** liefern sollte. Ersteres stellt zudem das Ausgangsprodukt zur Herstellung der beiden fluorierten 2,6-ST- bzw. 2,3-ST-Antigen-Analoga **D** und **E** dar (siehe Abb. 2.2).

¹ M. Johannes, Arbeitsgruppe Jun.-Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder Johannes Gutenberg-Universität Mainz, unveröffentlichte Ergebnisse.

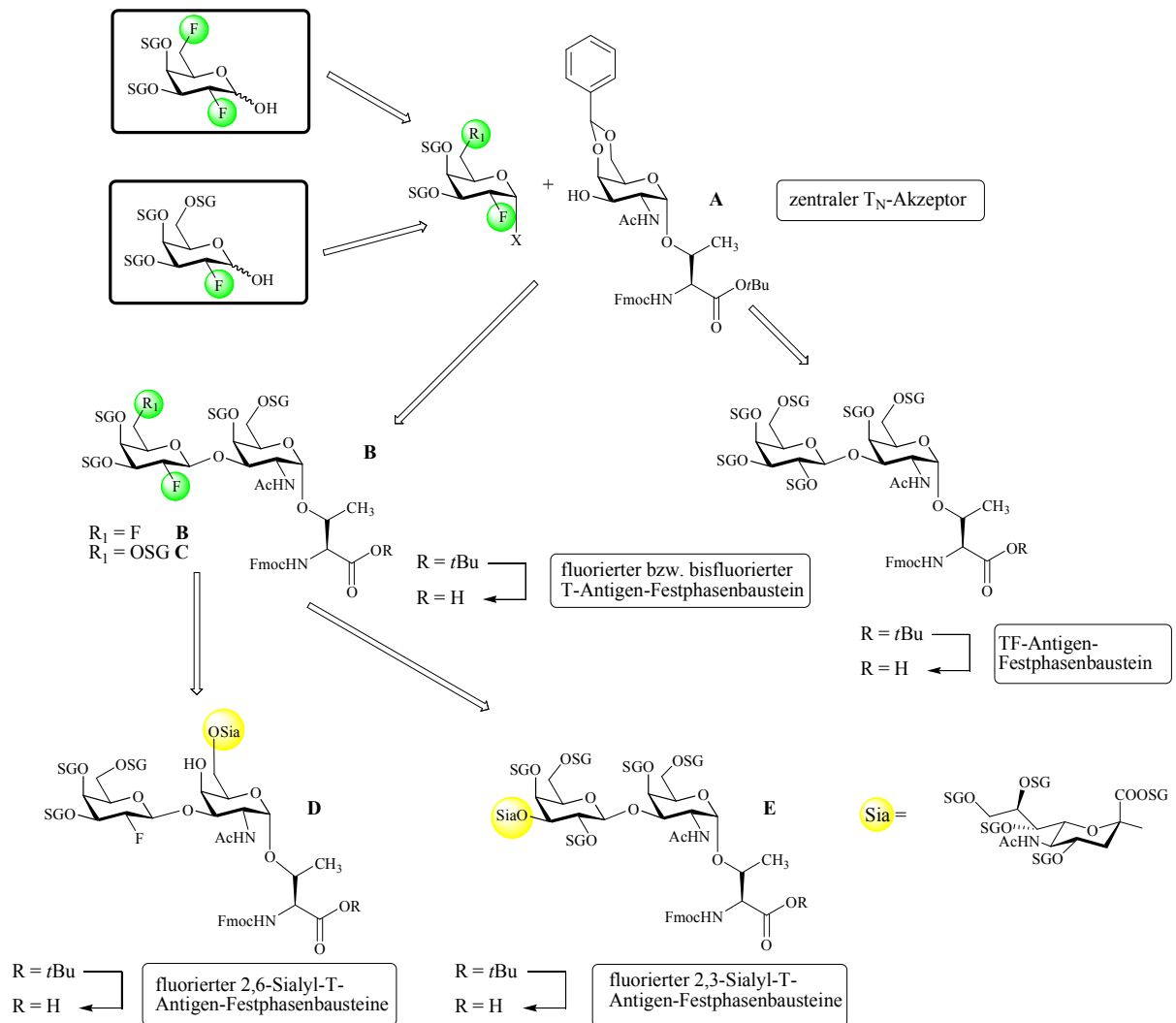


Abb. 2.2: Retrosynthetische Analyse der fluorierten Antigen-Threonin-Konjugate für die Festphasenglycopeptidsynthese

Wichtige Schlüsselschritte in der Synthese der fluorierten Glycosylaminosäuren, von denen bislang nur sehr wenige Beispiele in der Literatur bekannt sind, sind neben den α -selektiven Sialylierungen vor allem auch die 3- β -Galactosylierungsreaktionen, deren Stereoselektivität nicht durch eine partizipierende Gruppe in 2'-Position gesteuert werden kann. Folglich müssen zunächst für den Aufbau der fluorierten Disaccharide geeignete Reaktionsbedingungen zur Glycosylierung mit 2-Fluorgalactosyldonoren erarbeitet werden. Die hierfür notwendigen fluorierten Donoren sollen mithilfe literaturbekannter nucleophiler und elektrophiler Fluorierungsmethoden unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Reagenzien wie DAST und Selectfluor[®] hergestellt werden (s. Abb. 2.3).

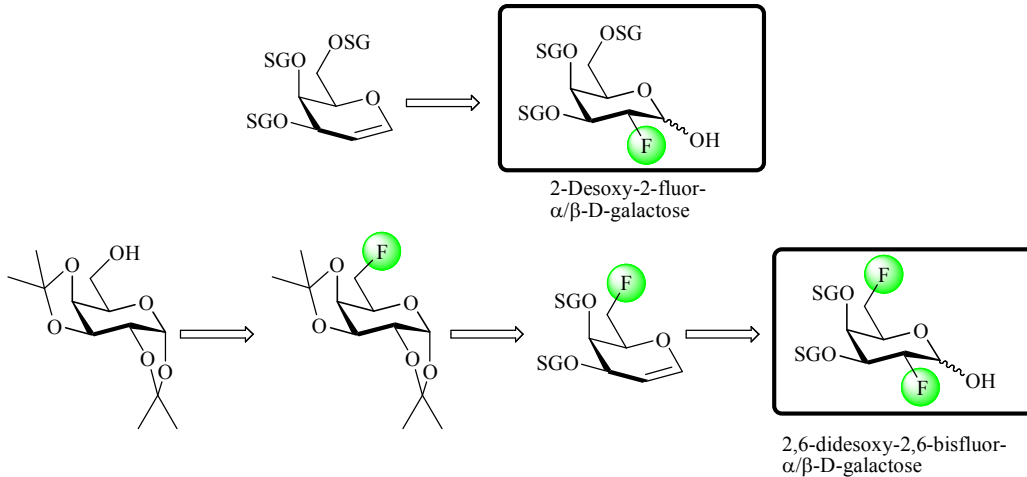


Abb. 2.3: Allgemeine Synthesestrategie zur Herstellung der fluorierten Galactosyldonoren

Um die Auswirkungen der modifizierten Kohlenhydrat-Antigene auf die humorale Immunantwort zu untersuchen, sollen die hergestellten Glycosylaminosäuren schließlich durch Festphasen-Peptidsynthese in eine vollständige *tandem repeat*-Sequenz des Glycoproteins MUC1 eingebaut werden. Die dabei resultierenden Glycopeptide könnten so nach Anbindung eines immunkompatiblen Triethylenglycol-Spacers und unter Verwendung der Quadratsäurediethylester-Methode selektiv an die beiden Carrier-Proteine Tetanus-Toxoid und Rinderserumalbumin konjugiert werden, um für Impfstudien bzw. ELISA-Analysen zur Verfügung zu stehen (Abb. 2.4).

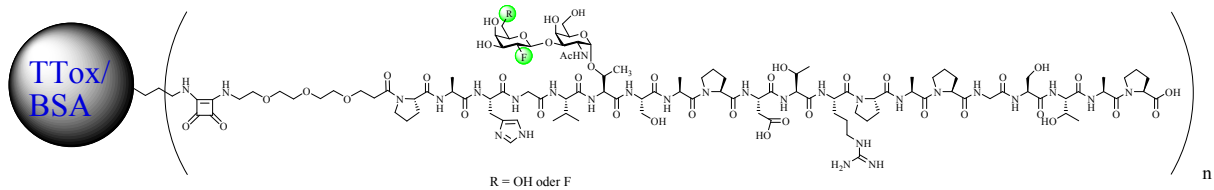


Abb. 2.4: Konjugation der fluorierten Glycopeptide an Träger-Proteine

3 Allgemeiner Teil

3.1 Synthese der natürlichen tumorassoziierten Glycosylaminosäure-Bausteine

3.1.1 Synthese des zentralen *N*-Acetylgalactosamin-Threonin Konjugates (T_N -Antigen)

Der zur Darstellung des T_N -Threonin-Konjugates benötigte Donor-Baustein wurde nach einer literaturbekannten Strategie^[75,76] ausgehend von D-Galactose (**1**) in fünf Stufen erhalten. Dazu wurde zunächst die peracetylierte Galactose **2** durch Umsetzung mit Pyridin/Acetanhydrid dargestellt und durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig ($w = 33\%$) selektiv in das, durch den anomeren Effekt begünstigte, α -Bromid überführt (Abb. 3.1.1).^[77] Anschließend wurden der Bromsubstituent und die 2-Acetoxygruppe durch aktiviertes Zink in Gegenwart von *N*-Methylimidazol zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylalactal (**4**) eliminiert.^[77,78]

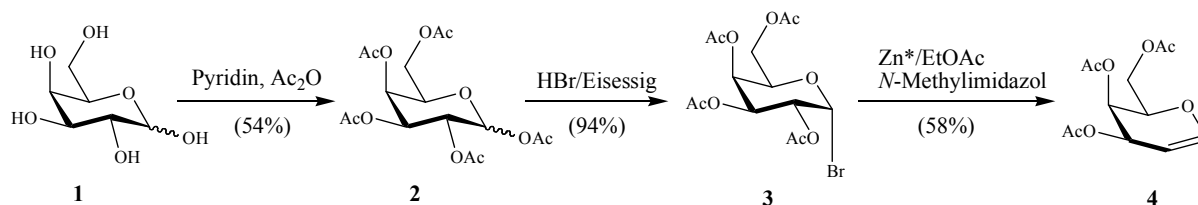


Abb. 3.1.1: Synthese des 3,4,6-Tri-*O*-acetylalactals (**4**)

Für den stereoselektiven Aufbau eines α -konfigurierten *N*-Acetylgalactosylaminosäure-Bausteins ist es wichtig, einen geeigneten Vorläufer für die β -dirigierende *N*-Acetylaminofunktion einzubauen. Hierzu wurde auf ein Verfahren von Lemieux^[79] zurückgegriffen, bei dem zunächst eine Azid-Funktion eingeführt wird, welche sich auf einer späteren Stufe durch Reduktion in die gewünschten *N*-Acetylaminofunktion umwandeln lässt. Folglich wurde 3,4,6-Tri-*O*-acetylalactal (**4**) durch Umsetzung mit Natriumazid und Cer(IV)-ammoniumnitrat in Acetonitril in das 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (**5**) mit einer Ausbeute von 45% überführt (Abb. 3.1.2).

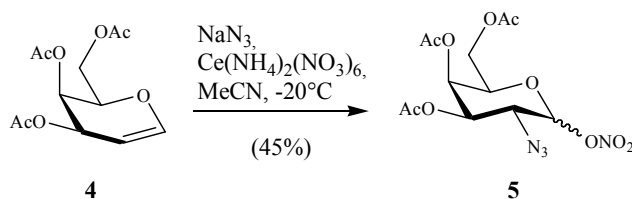


Abb. 3.1.2: Synthese des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosenitrats (5)

Von Lemieux wurde ein radikalischer Verlauf für diese Reaktion vorgeschlagen,^[80] bei dem Cer(IV) als starkes Oxidationsmittel ein Elektron aus dem Azidanion abstrahiert und gleichzeitig zu Cer(III) reduziert wird (Abb. 3.1.3). Das entstehende Azidradikal greift nun elektrophil die Doppelbindung an, wobei die energetisch günstigere äquatoriale Position bevorzugt wird. Durch ein weiteres Äquivalent Cer(IV)ammoniumnitrat wird das anomere Radikal zum Oxocarbeniumion oxidiert und schließlich unter Addition eines Nitratanions an der 1-Position zum gewünschten Azidonitrat abgefangen, wobei letzteres als Anomerenmisch anfällt.

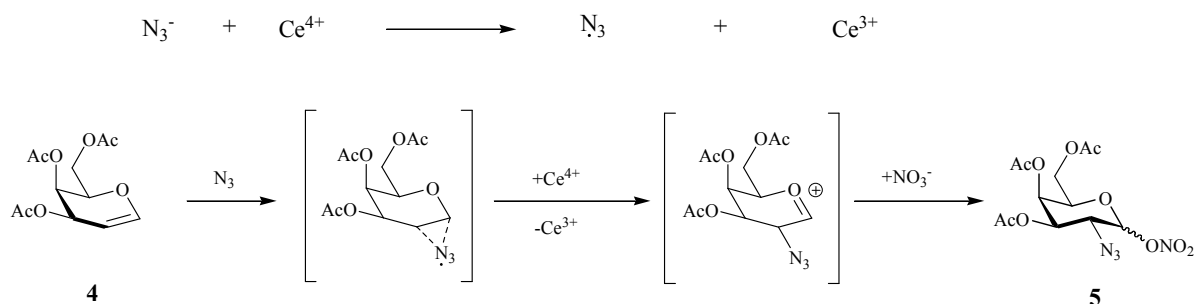


Abb. 3.1.3: Möglicher Mechanismus der Azido-Nitratisierung nach Lemieux.

Nachfolgende Umsetzung des Anomerenmischs von 5 mit wasserfreiem Lithiumbromid in Acetonitril ermöglichte die nucleophile Substitution des Nitrates durch einen Bromsubstituenten, wobei erneut nahezu ausschließlich das α -Anomer gebildet wurde.

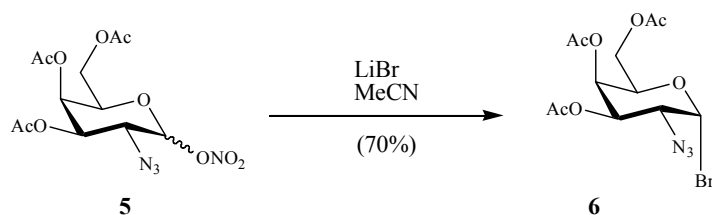


Abb. 3.1.4: Synthese des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromids (6)

Als Glycosylakzeptor diente *N*- und *C*-terminal geschütztes L-Threonin. Da die Peptid-synthese nach der Fmoc-Strategie erfolgen sollte, wurde die Aminfunktion des Threonins zunächst mit *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxycarbonylsuccinimid (FmocOSu) blockiert.^[81,82] Der *C*-Terminus von **8** wurde anschließend mit *tert*-Butanol nach einem von G. Braum^[83] entwickelten Cu(I)-katalysierten Verfahren unter Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als *tert*-Butylester **9** geschützt (Abb. 3.1.5). Bei dieser Reaktion ist eine genaue Reaktionskontrolle wichtig, da ein Überschuss an *tert*-Butanol verwendet werden muss und als Nebenreaktion die unerwünschte Alkylierung der β -Hydroxyfunktion auftreten kann.

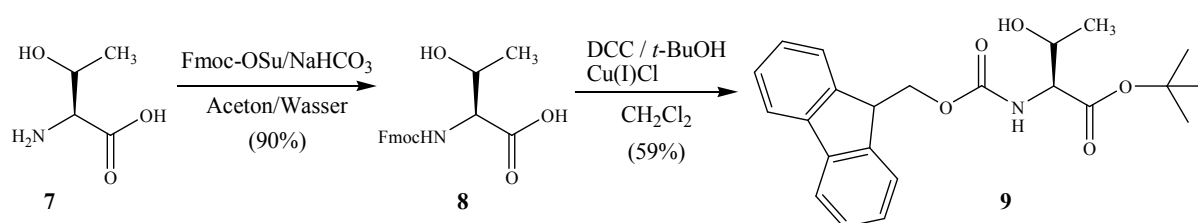


Abb. 3.1.5: Synthese des Galactosylakzeptors **9**

Die Glycosylierung zum *N*-Acetyl-galactosamin-Threonin-Konjugat **10** erfolgte, wie bei C. Brocke^[84] beschrieben, mithilfe einer von Paulsen und Hölck^[85,86] eingeführten Variante der Koenigs-Knorr-Glycosylierung (Abb. 3.1.6).^[87,88]

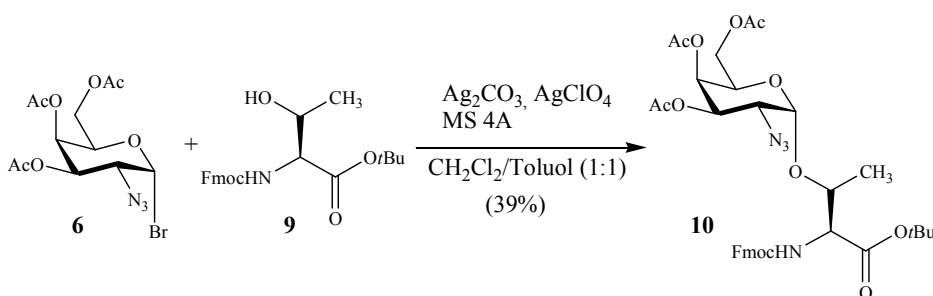


Abb. 3.1.6: Koenigs-Knorr-Glycosylierung zum T_N-Vorläufer **10**

Hierbei wurde das 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromid (**6**) in einer Mischung aus Dichlormethan und Toluol (1:1) durch Silber(I)-carbonat und wasserfreies Silber(I)-perchlorat als Promotoren aktiviert und mit Fmoc-Thr-OrBu **9** umgesetzt. Aufgrund des fehlenden Nachbargruppeneffektes der Azid-Gruppe wurde mit hoher Selektivität das α -anomere Produkt **10** gebildet.^[89,90] Die säulenchromatographische Abtrennung geringer

Mengen des β -Konjugates gestaltete sich jedoch schwierig und es konnte auf dieser Stufe im Wesentlichen nur der nichtglycosylierte Akzeptor, nicht jedoch das β -Konjugat, vollständig abgetrennt werden.

Das erhaltene Glycosylierungs-Produkt **10** wurde daher zunächst durch Behandlung mit aktiviertem Zinkstaub in einer Mischung aus THF/Ac₂O/AcOH (3:2:1) reduziert und gleichzeitig *N*-acetyliert (Abb. 3.1.7).^[91] Aufgrund der veränderten Polarität des Moleküls gelang es auf dieser Stufe problemlos, das Produkt säulenchromatographisch von allen verbleibenden Verunreinigungen, einschließlich des β -Konjugates, abzutrennen.^[92] Um das erhaltene T_N-Threonin-Konjugat **10** als Galactosylakzeptor für den Aufbau von fluorierten T-Antigen-Bausteinen nutzen zu können, sollte durch Schutzgruppenmanipulationen die 3-OH-Gruppe selektiv deblockiert werden. Hierzu wurden zunächst alle *O*-Acetyl-Schutzgruppen nach *Zemplén*^[93] durch Umesterung mit katalytischen Mengen an Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 8.5 abgespalten^[89] (Abb. 3.1.7), bevor die 4- und 6-Hydroxylfunktionen erneut durch ein Benzylidenacetal blockiert wurden. Bei der Durchführung der *Zemplén*-Umesterung ist es wichtig, dass der pH-Wert der Reaktionslösung genau eingestellt und kontrolliert wird, da bei zu hohem pH-Wert eine Abspaltung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe eintreten kann. Da diese Nebenreaktion jedoch in der Regel nicht vollständig verhindert werden konnte, wurde das freie Amin nach der Aufarbeitung isoliert und durch Umsetzung mit FmocOSu und Hünigs-Base (DIPEA) bei pH 9.5 in Dichlormethan wieder in das Fmoc-geschützte Produkt **12** überführt.

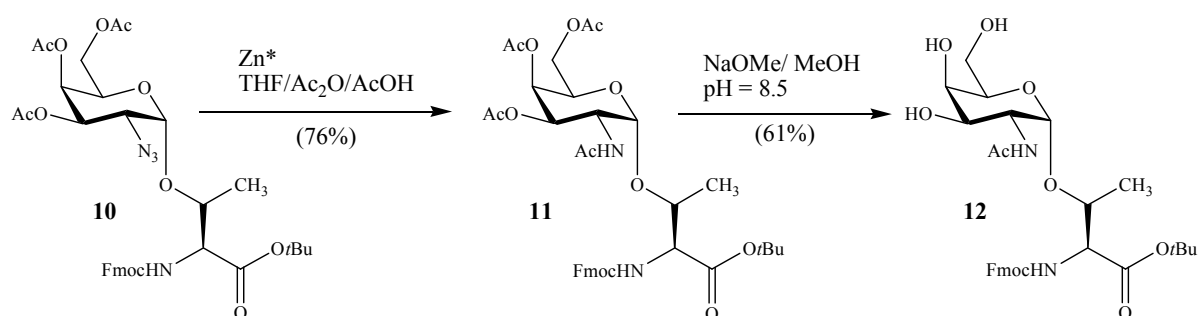


Abb. 3.1.7: Reduktive *N*-Acetylierung und anschließende Deacetylierung nach *Zemplén*

Die Einführung des Benzylidenacetals in das zentrale Intermediat **12** erfolgte durch Umsetzung des *N*-Acetylgalactosaminakzeptors **12** mit Benzaldehyddimethylacetal in Acetonitril unter Verwendung von katalytischen Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure (pH = 4) (Abb. 3.1.8).^[84,94]

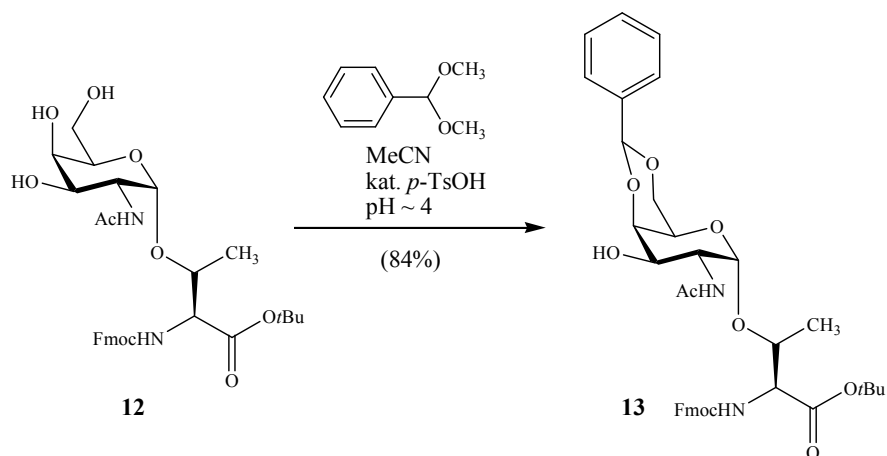


Abb. 3.1.8: Synthese des Benzylidenacetal-geschützten Galactosylakzeptors **13**

3.1.2 Synthese des TF-Antigens

Um die Eigenschaften der fluorinierten Antigen-Analoga in den biologischen Untersuchungen adäquat beurteilen zu können, sollten als Referenzverbindung auch das natürlich vorkommende (nicht-modifizierte) T-Antigen-Threonin-Konjugat, sowie dessen sialylierte Vertreter hergestellt werden. Die hierzu notwendige β -*O*-glycosidische Verknüpfung des T_N-Konjugates **13** mit einem geschützten Galactoserest ließ sich nach der von C. Brocke^[84] beschriebenen Route mithilfe einer *Helferich*-Glycosylierung^[95] unter Verwendung des entsprechenden anomeren Bromids **3** erreichen (Abb. 3.1.9).^[84]

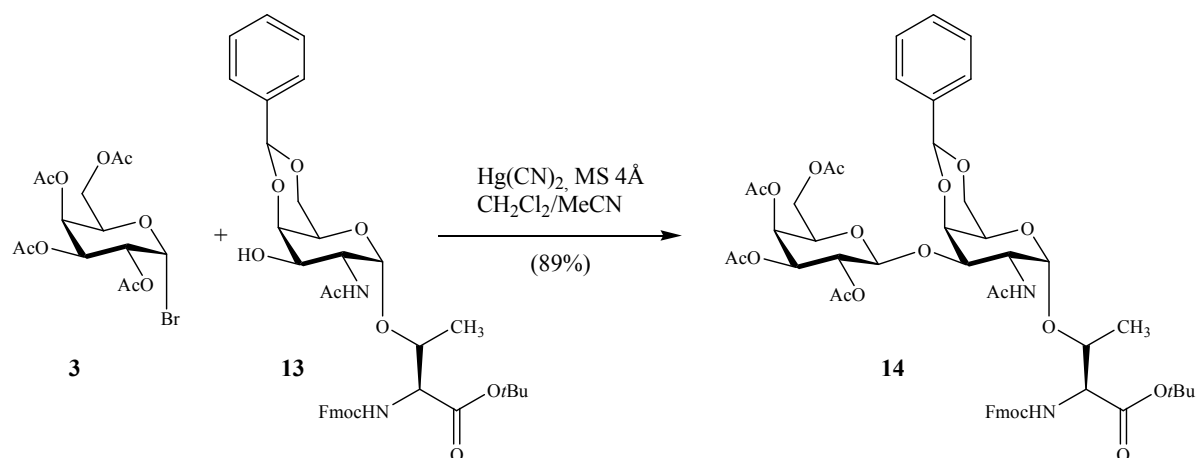


Abb. 3.1.9: 3- β -Galactosierung nach der *Helferich*-Methode

Bei dieser Methode, bei der die Aktivierung des Bromids durch Quecksilber(II)cyanid erfolgt, wird die als Nebenreaktion auftretende Orthoesterbildung wirkungsvoll vermieden, da vermutlich eine vorübergehende Anbindung des Cyanidions an den Dioxolenium-Kohlenstoff eintritt (Abb. 3.1.10). Über diese Koordination ist zudem nur ein *trans*-Angriff des Nucleophils möglich, wodurch ausschließlich das β -konfigurierte Produkt gebildet wird.

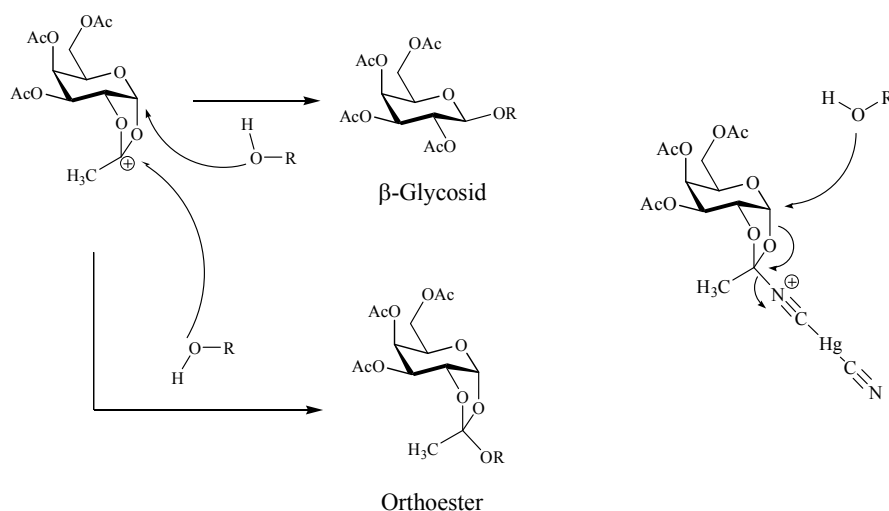


Abb. 3.1.10: Steuerung der Regioselektivität bei Glycosylierungsreaktionen nach der Helferich-Methode

Um eine selektive Deblockierung des C-Terminus der Glycosylaminosäure **17** unter Beibehaltung sämtlicher Hydroxyl-Schutzgruppen zu ermöglichen, musste zunächst die Benzylidenacetalschutzgruppe gegen die stabileren Acetyl-Schutzgruppen ausgetauscht werden. Hierzu wurde die Verbindung **14** in einer 4:1-Mischung aus Dichlormethan und Methanol gelöst, und die beiden 4- und 6-OH-Gruppen wurden durch Behandlung mit einem saueren Kieselgel-Katalysator^[96] freigesetzt (Abb. 3.1.11). Nachfolgende Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin führte zu Verbindung **16**, dessen *tert*-Butylester durch Behandlung mit TFA/Anisol (10:1) unter Bildung des gewünschten Glycosylaminosäure-Bausteins **17** für die Festphasensynthese gespalten wurde (Abb. 3.1.11).

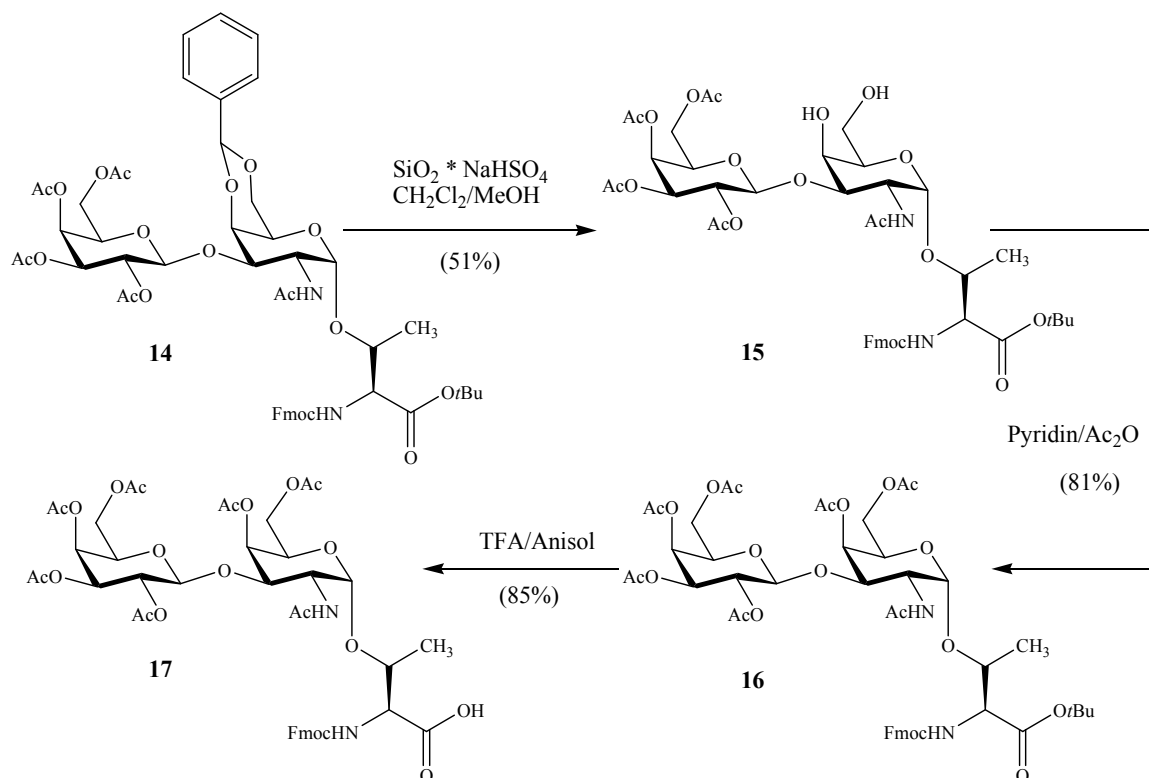


Abb. 3.1.11: Schutzgruppenmanipulationen in der Synthese des T-Bausteins für die Festphasensynthese

3.1.3 Synthese des 2,6-Sialyl-T-Antigens

Für die direkte chemische Sialylierung^[97] wurden in der Literatur verschiedene effektive Donoren wie z.B. Phosphite,^[98] Xanthogenate^[99] und Thioglycoside beschrieben. Auf diesen Arbeiten aufbauend wurde hier der ins Xanthogenat **22** überführte Neuraminsäurebenzylester als Sialinsäure-Donor für die Herstellung des 2,6-ST-Antigens verwendet.

Die Synthese eines Sialinsäurexanthogenat-Donors beruht auf den Arbeiten von *Marra* und *Sinay*,^[99] die erstmals Ethylxanthogenat (Ethoxydithiocarbonat) in die Neuraminsäure einführten. Als Schutzgruppe für die Carboxylgruppe in C1-Position wurde hier jedoch analog zu den Arbeiten von *B. Liebe*^[89] der Benzylester verwendet, der im Gegensatz zu dem oft eingesetzten Methyl ester unter milderen, d. h. neutralen Bedingungen hydrolytisch abspaltbar ist^[100,101] und folglich nicht zu einer Epimerisierung von Aminosäuren bzw. β -Eliminierung des Glycanrestes führt.

Für die Darstellung des Donors wurde zunächst die Neuraminsäure mit einer Mischung aus Acetanhydrid und Pyridin vollständig acetyliert. Um die Carboxylfunktion als Benzylester blockieren zu können, wurde anschließend das Anomerengemisch **19** mit Cäsiumcarbonat in das entsprechende Cäsiumsalz überführt.^[102] Aus diesem lässt sich durch Umsetzung mit Benzylbromid in einer nucleophilen Substitutionsreaktion der Benzylester **20**^[103] erhalten. Durch Umsetzen mit *in situ* aus Acetylchlorid und kat. Mengen an Wasser hergestelltem Chlorwasserstoff entsteht das anomere Chlorid **21**, welches direkt mit Kaliummethylxanthogenat in Ethanol stereoselektiv zu dem gewünschten α -Xanthogenat-Donor **22** umgesetzt wurde (Abb. 3.1.12).

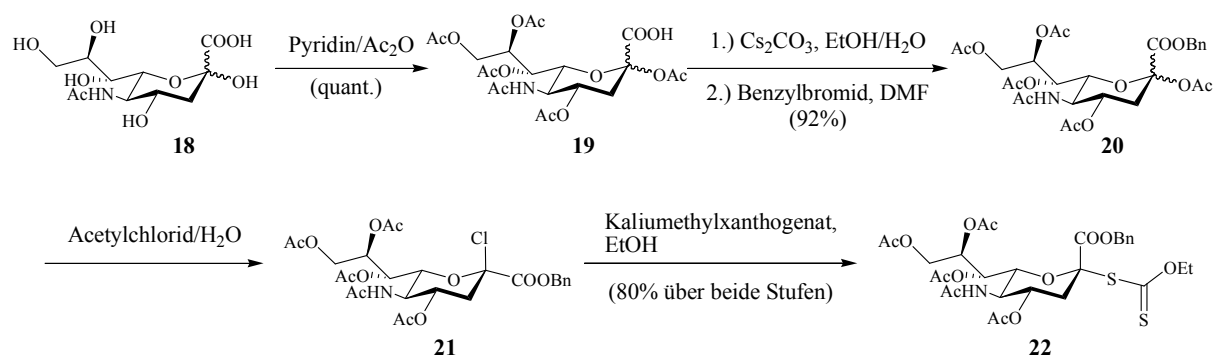


Abb. 3.1.12: Synthese des Neuraminsäurexanthogenat-Donors **22**

Stereoselektive α -Sialylierungen gelten aufgrund der besonderen Struktur der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure generell als schwierig.^[104,105] So besitzt die Neuraminsäure an ihrem anomeren Zentrum ein tertiäres Kohlenstoff-Atom, wodurch nach der Aktivierung ein sterisch gehindertes und damit weniger gut zugängliches Oxocarbeniumion **23** resultiert (Abb. 3.1.13). Weiterhin müssen die Donoren im Überschuss eingesetzt werden, da während der Sialylierung das auftretende Glycosylkation **23** durch die elektronenziehende Carboxylfunktion am anomeren Zentrum destabilisiert wird und zu einer 2,3-Eliminierung unter Ausbildung des Glycals **24** neigt.

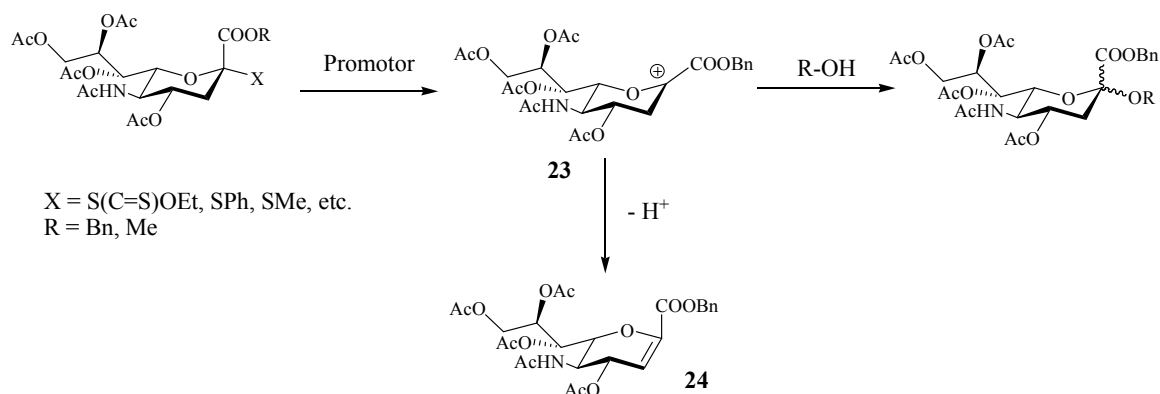


Abb. 3.1.13: Allgemeines Schema der Sialylierung und Glycalbildung

Desweiteren erschwert das Fehlen eines nachbargruppenaktiven Substituenten in der 3-Position die stereochemische Kontrolle während der Sialylierung, so dass ebenfalls die Bildung des ungewünschten β -Glycosids auftritt.

In vorangegangenen Arbeiten des Arbeitskreises Kunz haben sich für den Aufbau α -sialylierten Glycopeptiden neben Thioglycosid-Donoren^[106] insbesondere die Xanthogenat-Donoren als gut geeignet erwiesen.^[78,92,106] Beide Donortypen lassen sich relativ leicht handhaben und in Gegenwart äquimolarer Mengen thiophiler Promotoren aktivieren, wobei Methylsulfenyltriflat (MeSOTf),^[107] Phenylsulfenyltriflat (PhSOTf),^[108] Dimethyl-(methylthio)sulfoniumtrifluormethansulfonat (DMTST)^[109,110] und eine Kombination aus *N*-Iodsuccinimid (NIS) und Trifluormethansulfonsäure häufig verwendete Aktivatoren darstellen.^[111,112,113] Um das entsprechende Sialyl-T-Antigen-Konjugat zu erhalten, wurde zur Aktivierung des Xanthogenat-Donors Methylsulfenyltriflat als Promotor verwendet.^[114] Dieses stark thiophile Reagenz wird *in situ* aus einer Methylsulfenylbromid-Lösung und Silbertriflat erhalten, wobei erstere durch den Umsatz äquimolarer Mengen an Brom und Dimethyldisulfid in 1,2-Dichlorethan frisch hergestellt werden muss. Die Aktivierung des Donors wird durch den nucleophilen Angriff des Thiocarbonat-Schwefels an das Methylsulfenylbromid unter Ausbildung einer Disulfidbindung eingeleitet (Abb. 3.1.14).

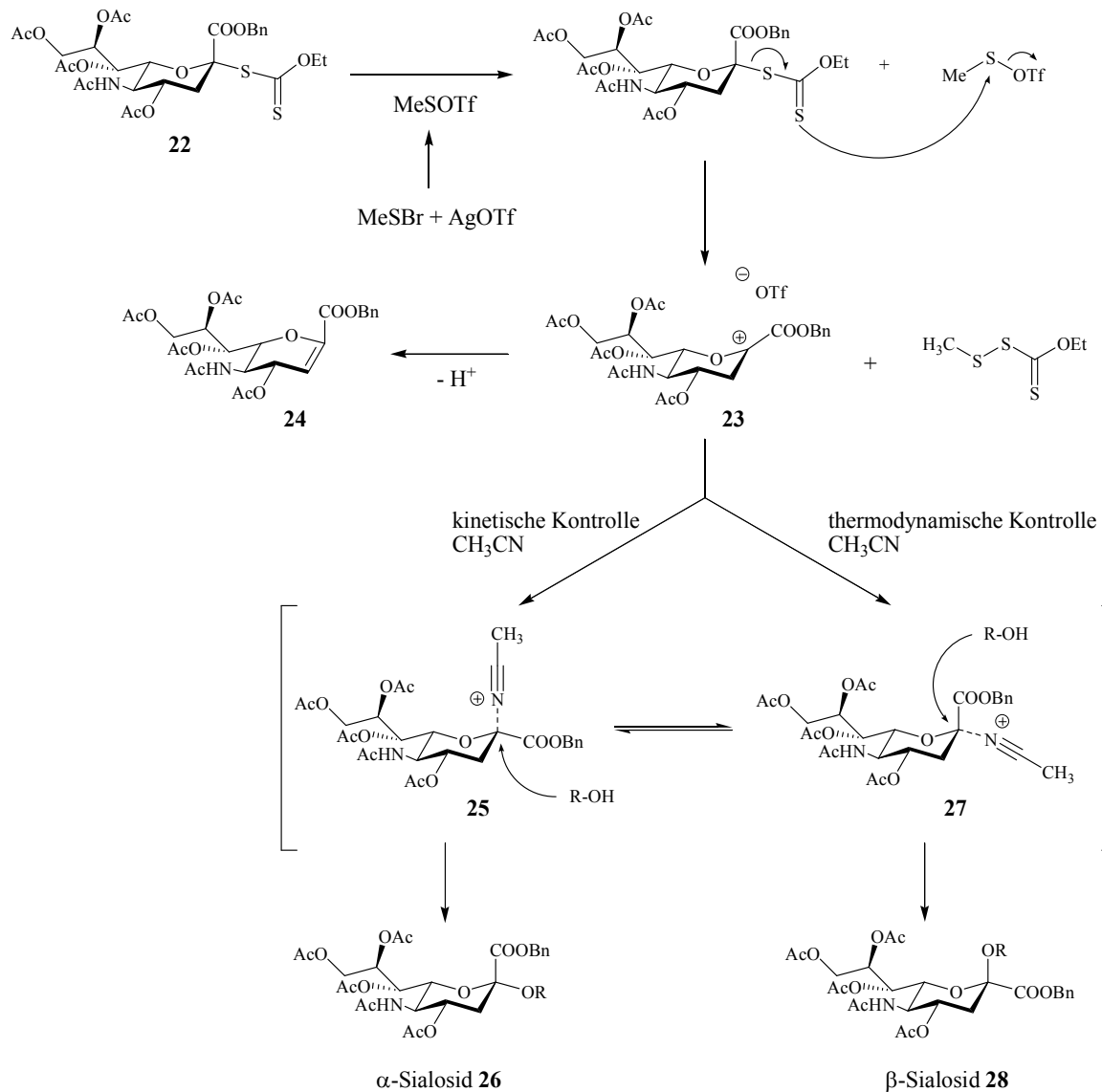


Abb. 3.1.14: Aktivierung des Sialinsäurexanthogenats und stereochemische Kontrolle der Sialylierung durch Temperatur- und Lösungsmiteleinflüsse

Die damit verbundene formale Oxidation erhöht die Abspaltungstendenz des Xanthogenats und es bildet sich ein Sialylkation **23**, welches entweder durch den Glycosylakzeptor abgefangen wird oder in einer Nebenreaktion eine Eliminierung zum Glycol **24** erleidet. Der stereochemische Verlauf der Sialylierung kann durch die Wahl geeigneter Lösungsmittel und Reaktionstemperaturen beeinflusst werden.^[115,116,117] Bei der Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel koordiniert die Nitrilgruppe an das intermediär gebildete Oxocarbeniumion **23**,^[118] wobei sowohl ein axiales- **25**, als auch äquatoriales Nitrilium-Addukt **27** gebildet wird (Nitrileffekt^[119]). Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Addukten kann durch geeignete Temperaturwahl verschoben und damit in die gewünschte Richtung gelenkt werden.^[116] Bei

tiefen Reaktionstemperaturen kommt es zur Bildung des kinetisch bevorzugten axialen β -Nitrilium-Addukts **25**, das vom Alkohol stereoselektiv nur von der α -Seite angegriffen wird. Die Glycosylierung in der Kälte führt daher bevorzugt zum kinetisch kontrollierten α -konfigurierte Sialosid **26**, wohingegen bei höheren Temperaturen bevorzugt das thermodynamisch stabilere äquatorial orientierte Addukt **27** und damit schlussendlich das β -Sialosid **28** gebildet wird. Da die Verwendung von reinem Acetonitril jedoch nur eine Reaktionstemperatur von $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ zulässt, ist die Zugabe von Dichlormethan für tiefere Reaktionstemperaturen erforderlich.

Die α -Sialylierung des T-Threonin-Konjugates **15** erfolgte unter Verwendung von 2.5 Äquivalenten des Neuraminsäure-Donors **22** in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Dichlormethan (3:2) und bei einer Temperatur von $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$.^[76,89,100] Dabei wurde nach Zugabe des Silbertriflats langsam eine vorgekühlte Methylsulfonylbromid-Lösung (1.6 M in 1,2-Dichlorethan) zugetropft (Abb. 3.1.15). Neben dem α -Anomer **29** entstand in großen Mengen das durch β -Eliminierung resultierende Sialinsäureglycal **24**,^[84] welches jedoch gut chromatographisch vom Produkt abgetrennt werden konnte. Die Abtrennung des ebenfalls auftretenden β -sialylierten Nebenprodukts (7%) erfolgte hingegen erst durch semi-präparative RP-HPLC.

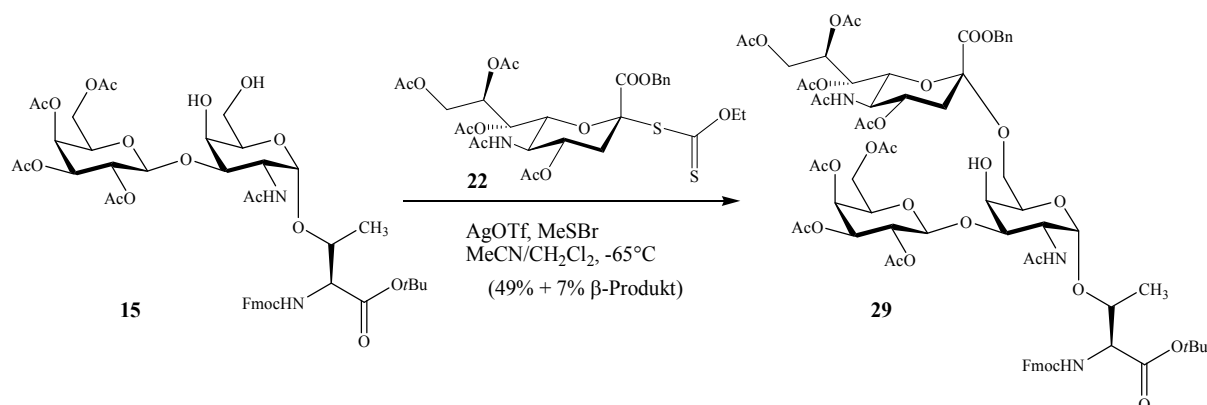


Abb. 3.1.15: Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Antigens **29**

Im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen T-Antigen-Derivat **15** wurde im vorliegenden Fall die durch den Sialinsäurerest sterisch gut abgeschirmte 4-OH-Gruppe der Galactosamin-Einheit vor der Glycopeptidsynthese nicht zusätzlich acetyliert, um Problemen bei der späteren Deblockierung der Glycanseitenkette vorzubeugen.^[120] Folglich wurde als letzter Schritt vor der Festphasensynthese die *tert*-Butylschutzgruppe vom C-Terminus mittels TFA

und Anisol (10:1) abgespalten (Abb. 3.1.16) und der gewünschte Glycosylaminosäure-Baustein **30** durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt.

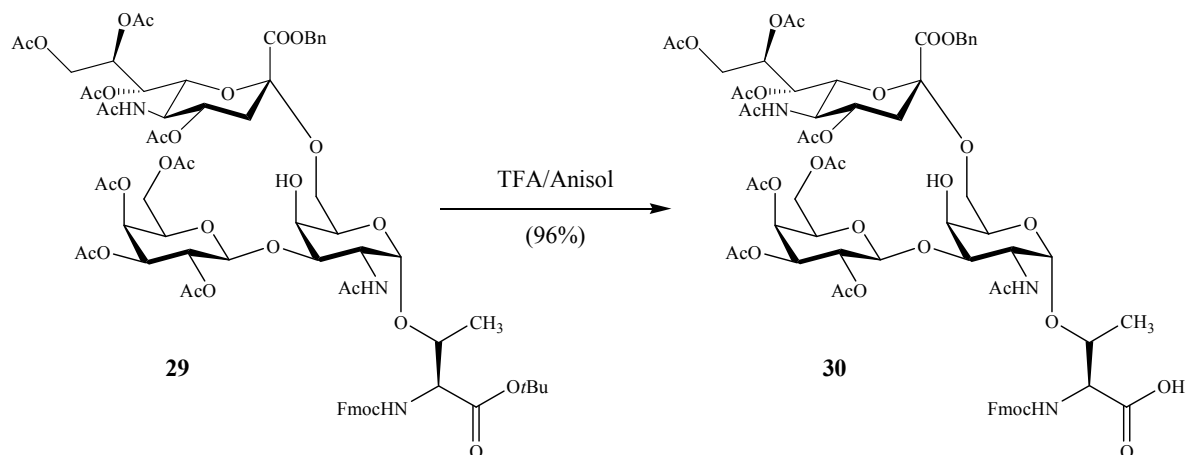


Abb. 3.1.16: Synthese des (2,6)-Sialyl-T-Bausteines **30** für die Festphasensynthese

3.1.4 Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigens

Für die Synthese eines regioisomeren 2,3-Sialyl-T-Threonin-Konjugates ist eine Blockierung der 6-Hydroxyl-Funktion des Galactose-Bausteins notwendig, da die primäre Hydroxyl-Gruppe gegenüber der 3-Position in einer Sialylierungsreaktion bevorzugt angegriffen würde. In vorangegangenen Arbeiten^[78,121] hat sich hierfür ein T-Antigen-Derivat bewährt, dessen Galactoserest durch einen 6-*O*-Benzylether geschützt wurde. Ausgehend von dem oben beschriebenen T_N-Threonin-Konjugat **13** und D-Galactose **1** ließ sich dieser Baustein wie folgt aufbauen: Zunächst wurde D-Galactose **1** in einer säurekatalysierten Reaktion mit Aceton in Gegenwart von wasserfreiem Kupfersulfat in die 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**31**) überführt. Anschließend Deprotonierung mit Natriumhydrid in DMF und Umsetzung mit Benzylbromid lieferte den 6-*O*-Benzylether **32**,^[122] dessen Isopropyliden-Schutzgruppen schließlich mit wässriger Essigsäure (75%) verkocht wurden. Die freien Hydroxylgruppen wurden durch Umsetzung mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert, bevor die Überführung von **33** in das anomere α -Bromid **34** mit Bromwasserstoff in Eisessig ($w = 33\%$) erfolgte. Im Vergleich zur analogen Umsetzung der peracetylierten Galactose **2** (Abb.

3.1.1) musste bei dieser Reaktion bei niedriger Temperatur gearbeitet werden, weil sonst sehr schnell Hydrolyse bzw. Debenzylierung eintritt. Es wurde daher 30 min bei 0 °C gerührt und nach anschließender Reinigung mittels Flashchromatographie der Galactosyl-Donor **34**^[123] in moderater Ausbeute erhalten.

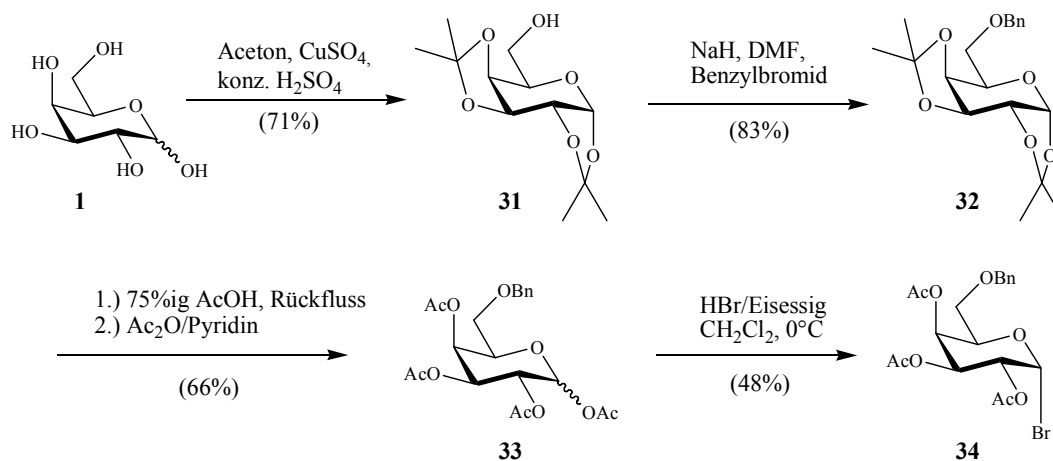


Abb. 3.1.17: Synthese des Galactosyl-Donors **34**

Die selektive 3 β -Galactosylierung des Akzeptors **13** mit Donor **34** wurde wie zuvor unter *Helferich*-Bedingungen erreicht (Abb. 3.1.18),^[95] das heißt durch Aktivierung bei Raumtemperatur mit Hg(CN)₂ in einer Mischung aus Dichlormethan und Nitromethan (3:2), wobei das Disaccharid **35** in guter Ausbeute und als reines β -Isomer (bedingt durch den Nachbargruppeneffekt der 2-OAc-Gruppe) anfiel.^[84]

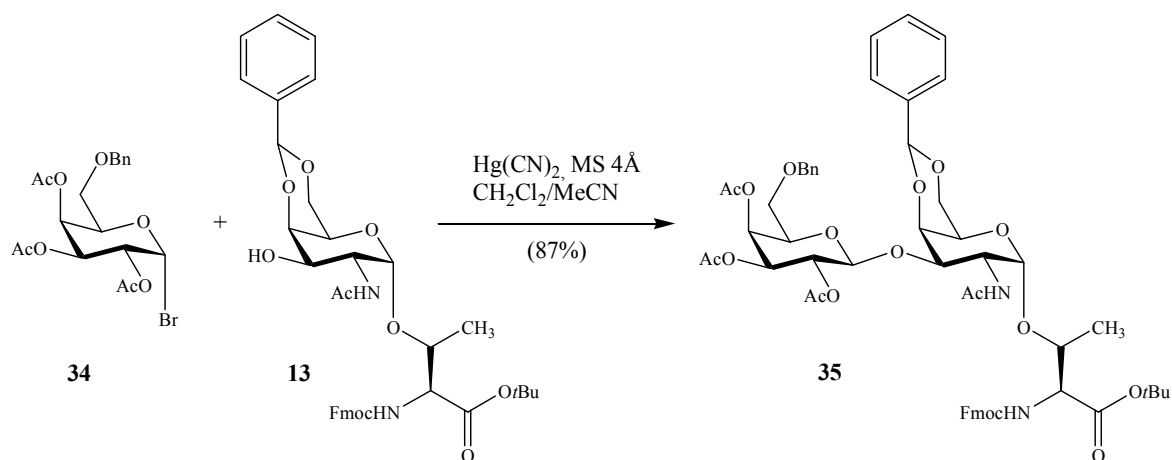


Abb. 3.1.18: Synthese des T-Konjugates **35**

Um den erhaltenen Baustein für die Synthese des 2,3-Sialyl-T-Antigen-Threonin-Konjugats nutzen zu können, mussten erneut die Acetyl-Schutzgruppen selektiv unter *Zemplén*-Bedingungen^[93] entfernt werden. Da diese Reaktion allerdings weniger glatt als bei dem T_N-Baustein **12** verläuft, scheint die Blockierung der primären 6'-OH-Gruppe als Benzylether die Deacetylierung zu erschweren. Bei freier 6-OH-Gruppe wird häufig eine Wanderung des Acetylrestes zu dieser Position beobachtet, die es erlaubt, die reaktivere primäre OH-Funktion zu deacetylieren. Dies ist jedoch bei dem Konjugat **35** nicht mehr möglich, bei dem somit nur die erschwerte Deacetylierung sekundärer Hydroxyl-Gruppen eintritt. Um daher eine vollständige Deacetylierung von **35** zu erreichen, musste ein erhöhter pH-Wert von 8.5-9 eingestellt werden, der dazu führte, dass die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe ebenfalls teilweise abgespalten wurde.

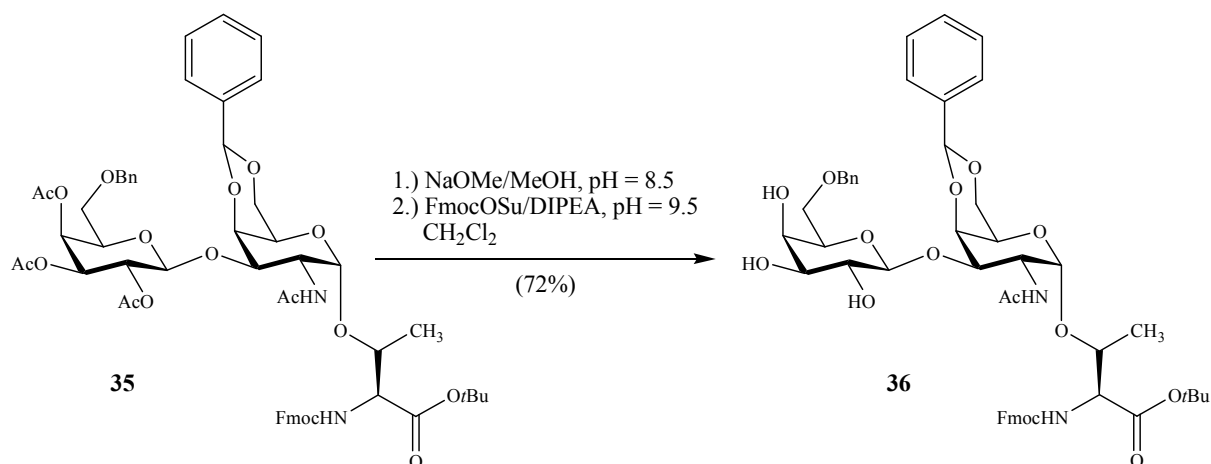


Abb. 3.1.19: De-O-Acetylierung zum Galactosylakzeptor **36**

Deren erneute Einführung durch Behandlung des Rohproduktes mit FmocOSu und DIPEA in Dichlormethan bei pH 9.5, erlaubte jedoch die Darstellung der vollständig deacetylierten Verbindung **36** in einer guten Ausbeute von insgesamt 72% (Abb. 3.1.19).

Zur Synthese des 2,3-ST-Antigens wurde nicht der zuvor beschriebene Xanthogenat-Donor **23**, sondern ein Thiophenol-Donor **39** verwendet in der Anlehnung an den von *C. Brocke* beschriebenen Ethanthiol-Donor.^[106] Dazu wurde die *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**18**) zunächst durch Rühren mit dem sauren Ionentauscher Dowex[®] 50WX8-200 in Methanol quantitativ in den Methylester **37** überführt,^[124] welcher in der nächsten Stufe mit einer Mischung aus Acetanhydrid und Pyridin vollständig zu **38** acetyliert wurde. Letzterer wurde anschließend mit Thiophenol und Bortrifluorid-Etherat als Lewis-Säure in den entsprechenden Thiophenol-Donor **39**^[125] überführt (Abb. 3.1.20). Da für die weitere

Umsetzung das Anomerengemisch von **39** verwendet werden konnte, wurden die entstandenen Anomere lediglich für die Charakterisierung mittels semi-präparativer RP-HPLC getrennt.

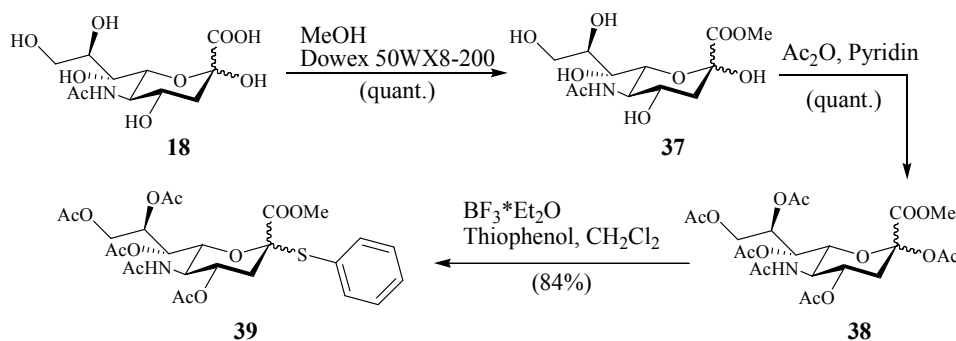


Abb. 3.1.20: Synthese des Neuraminsäure-Bausteins **39**

Die Sialylierung von **36** mit **39** zum 2,3-Sialyl-T-Antigen-Baustein **40** erfolgte ebenfalls in einer Mischung aus Acetonitril und Dichlormethan bei einer Temperatur von -65 °C bis -25°C. Durch Reaktionskontrolle mittels analytischer RP-HPLC konnte analog zu C. Brocke^[106] eine regioselektive Sialylierung an der 3'-Position, die aufgrund von stereochemischen und elektronischen Effekten die höchste Reaktivität besitzt, nachgewiesen werden. Das entsprechende 2,3-ST-Antigen **40** (Abb. 3.1.21) konnte allerdings nur in einer sehr geringen Ausbeute von 12% nach semi-präparativer RP-HPLC isoliert werden. Zudem verhinderte die erhaltene geringe Menge an **40** deren weiteren Einsatz in der Festphasen-Glycopeptidsynthese.

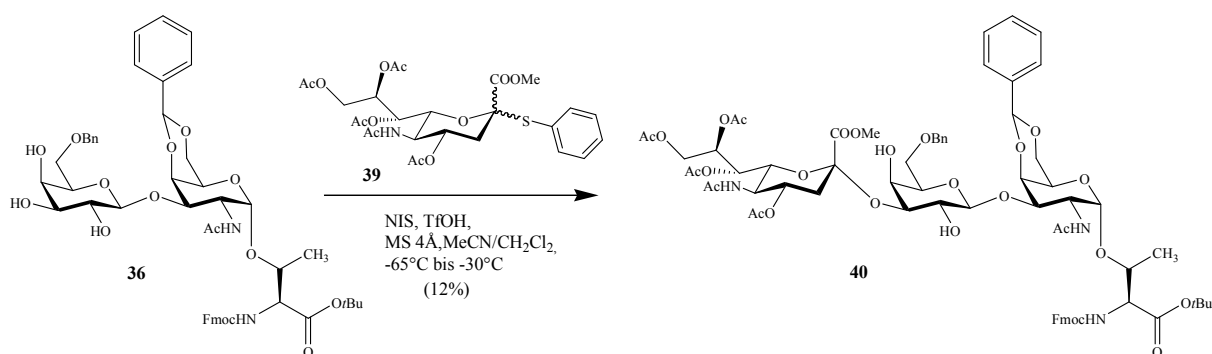


Abb. 3.1.21: Synthese des regioisomeren (2,3)-Sialyl-T-Antigens **40**

3.2 Synthese der fluorierten Glycosylaminosäure-Bausteine

3.2.1 Synthese der acetylgeschützten Donoren und Glycosylierungsreaktionen

Der Einbau der 2-Fluorsubstituenten in die T-Antigen-Threonin-Konjugate sollte zu einem frühen Zeitpunkt in der Synthese erfolgen, um die Zahl der Schutzgruppentransformationen auf das notwendige Mindestmaß zu beschränken und von möglichst vielen gemeinsamen Vorläufermolekülen ausgehen zu können. Mit Blick auf die in der *Diplomarbeit*^[126] ausgearbeitete Syntheseroute stellt beispielsweise 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactose (**4**)^[127,128] einen solchen zentralen Baustein dar, mit dessen Hilfe in dieser Arbeit verschiedene fluorierte Galactosyl-Donoren und T-Antigen-Derivate hergestellt werden konnten.

Wie in Abb. 3.2.1 gezeigt wird, lässt sich **41** bequem und in guten Ausbeuten durch eine elektrophile Fluorierung von 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**4**) mit Selectfluor[®], (1-Chlormethyl-4-fluor-diazonia-bicyclo[2.2.2]octan-bis-(tetrafluoroborat),^[129,130,131,132] unter Einsatz von Mikrowellenstrahlung herstellen.^[126]

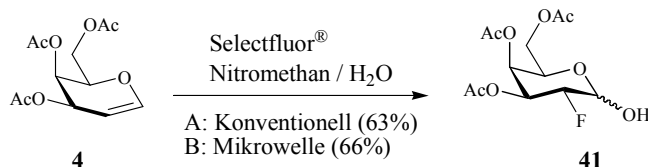


Abb. 3.2.1: Synthese des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (**41**)

Diese Fluorierung verläuft zunächst über ein intermediäres α -anomerer *N*-Glycosid **42a**, das aus der *syn*-selektiven Addition von Selectfluor[®] an das Glycal **4** resultiert und langsam zu dem thermodynamisch stabileren Zwischenprodukt **42b** anomerisiert.^[133] Während letzteres in Abwesenheit eines geeigneten Nucleophils in guten Ausbeuten isoliert und für Folgereaktionen eingesetzt werden kann,^[134] wird in Gegenwart von Wasser die entsprechende 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactose^[134,135] (**41**) als Anomerengemisch erhalten (Abb. 3.2.2). Ausgehend von diesem Derivat können dann, wie später gezeigt wird, weitere Glycosyl-Donoren hergestellt werden.

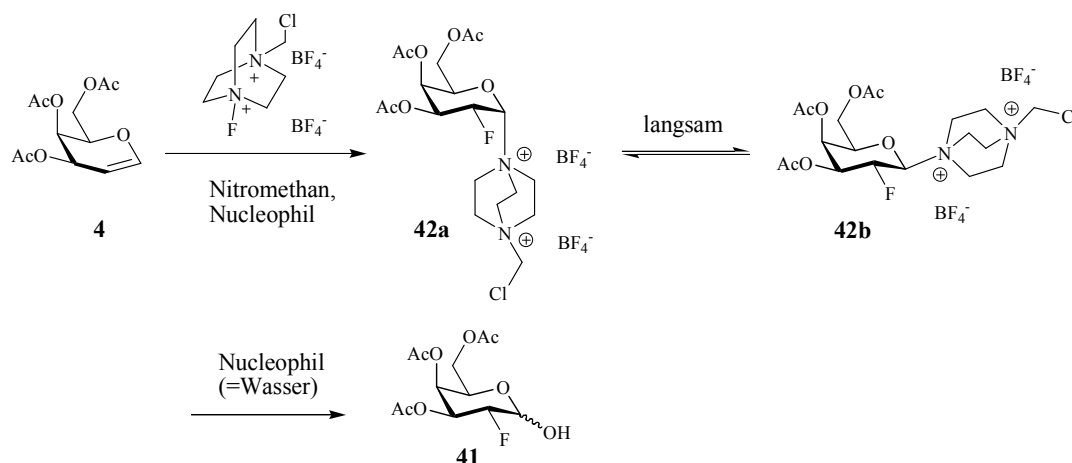


Abb. 3.2.2: Mechanismus der Fluorierung von Glycanen mit Selectfluor[®][111]

Im Vergleich zu den in der Literatur zuvor beschriebenen Synthesen^[127,128] bietet die Reaktionsführung unter Mikrowelleneinstrahlung den Vorteil einer raschen und gleichmäßigen Erwärmung der Reaktionspartner. Dadurch wird nicht nur eine lokale Überhitzung vermieden, die zu einer verstärkten Zersetzung bzw. Nebenproduktbildung führen kann, sondern die kurzen strahlungsbedingten Hitzepulse führen in der Regel auch zu verbesserten Umsätzen und deutlich kürzeren Reaktionszeiten. So verlief z.B. die Umsetzung des Galactals **4** mit 1.5 Äquiv. Selectfluor[®] in einem Gemisch aus Nitromethan und Wasser (5:1) bereits innerhalb von 2 min vollständig und unter Bildung des gewünschten Produktes **41**, während die konventionelle Darstellung von **41** (analoger Ansatz) zunächst eine mehrstündige Rührzeit bei Raumtemperatur (ca. 6 h), gefolgt von etwa halbstündigem Erhitzen unter Rückfluss, erforderte (s. Tabelle1).^[134,135]

Versuchsart	Stoffmenge in mmol	Volumen in mL MeNO ₃ /H ₂ O (5:1)	Temperatur in °C	Druck max. in bar	Leistung in Watt	Zeit [t] in min	Ausbeute in%
Mikrowelle	1.51	5.0	108	5.0	150	1 ² + 1	66
Konventionell	1.60	5.0	Raumtemp., Rückfluss	Atmosphäre		360 ³ + 30	63

Tabelle 1: Vergleich der beiden Fluorierungsmethoden

² Gibt die Aufheizphase an.

³ Rühren bei Raumtemperatur.

Damit stellt dieses neue mikrowellenunterstützte Syntheseprotokoll eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem konventionellen Verfahren bei der Herstellung größerer Mengen von **41** dar, obwohl zunächst nur geringfügig höhere Ausbeuten pro Ansatz erhalten werden. Allerdings führt die Fluorierung größerer Mengen an Galactal **4** ohne Mikrowelleneinstrahlung verstärkt zur Bildung von Nebenprodukten wie z.B. dem analogen 2-Fluor-Talosederivat, während das mikrowellenunterstützte Verfahren durch die sukzessive Reaktionsführung kleinerer, besser kontrollierbarer Ansätze (typischerweise 1-1.5 mmol) auch die Bildung größerer Mengen des gewünschten Fluorzuckers **41** in relativ kurzer Zeit erlaubt. Zudem gelang es, die Ansatzgröße auch in der Mikrowelle ohne nennenswerte Ausbeuteverluste auf 10 mmol bei einer Reaktionszeit von 10 min zu steigern.

Im Rahmen der *Diplomarbeit*^[126] konnte bereits gezeigt werden, dass sich durch eine *Schmidt-Glycosylierung*^[136] des Akzeptors **13** mit dem aus **41** hergestellten Trichloracetimidat **43**^[128,137] und unter Einsatz von Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure (TMSOTf) als Promoter der gewünschte 2'-Fluor-T-Antigen-Vorläufer herstellen lässt (Abb. 3.2.3). Da diese Glycosylierung jedoch aufgrund des fehlenden Nachbargruppeneffektes des 2-Fluorsubstituenten sowie des anomeren Effektes bevorzugt das unerwünschte α -Anomer von **44** erzeugt, und dieses nur durch präparative RP-HPLC vom gewünschten Produkt β -**44** getrennt werden konnten, sollten alternative 2-Fluor-Galactosyl-Donoren in dieser Reaktion hinsichtlich Ausbeute und Anomerenverhältnis (α/β) untersucht werden.

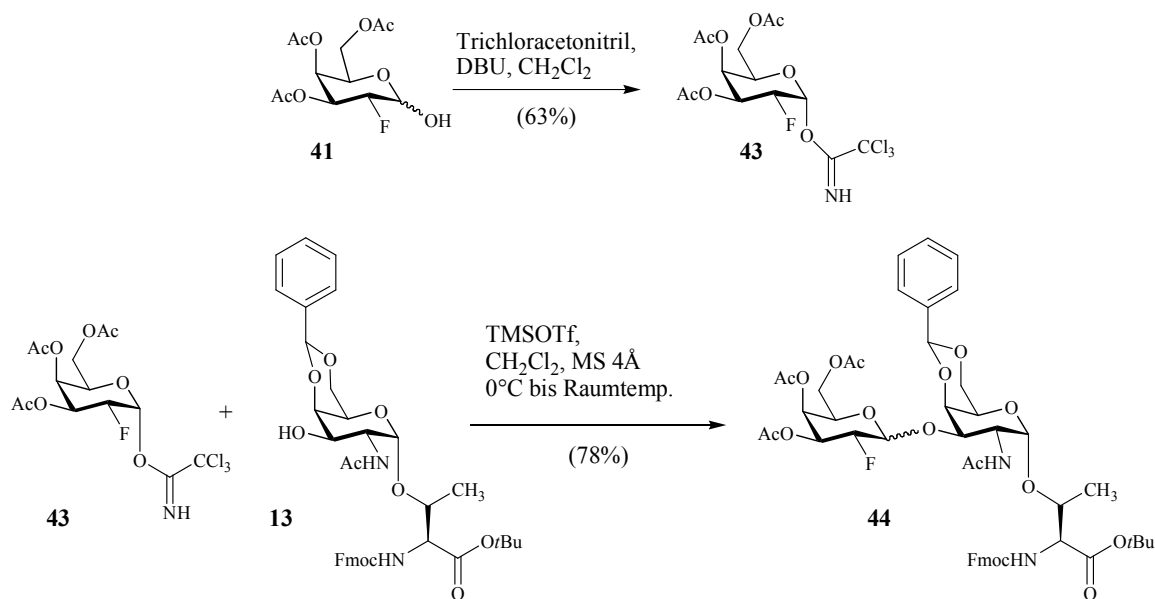


Abb. 3.2.3: Schmidt-Glycosylierung zum fluorierten T-Antigen Derivat **44**

In Anlehnung an die Synthese der natürlichen (unfluorierten) T-Antigen-Bausteine wurde daher zunächst 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluorgalactosylbromid (**45**)^[138] über das entsprechende α/β -Ac₄GalF-Produkt **44**^[139] hergestellt (Abb. 3.2.4), indem **40** mit Acetanhydrid und Pyridin in Gegenwart katalytischer Mengen an Dimethylaminopyridin behandelt und durch Umsetzung mit Bromwasserstoff in Eisessig (w = 33%) bei Raumtemperatur in das α -anomere Bromid **44** überführt wurde.

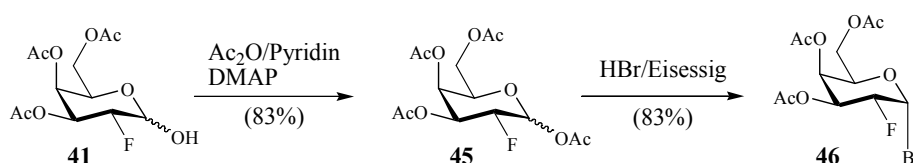


Abb. 3.2.4: Synthese des 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactosylbromid (**46**)

Die anschließende *Helferich*-Glycosylierung (Abb. 3.2.5) mit Quecksilber(I)cyanid in Nitromethan und Dichlormethan (2:3) verlief jedoch nicht erfolgreich und führte bei längeren Reaktionszeiten lediglich zur allmählichen Zersetzung des Donors **46**. Ebenso wenig gelang eine Aktivierung durch Mikrowelleneinstrahlung, die in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zum Einbau des verwandten 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactosylbromids eingesetzt wurde.^[140]

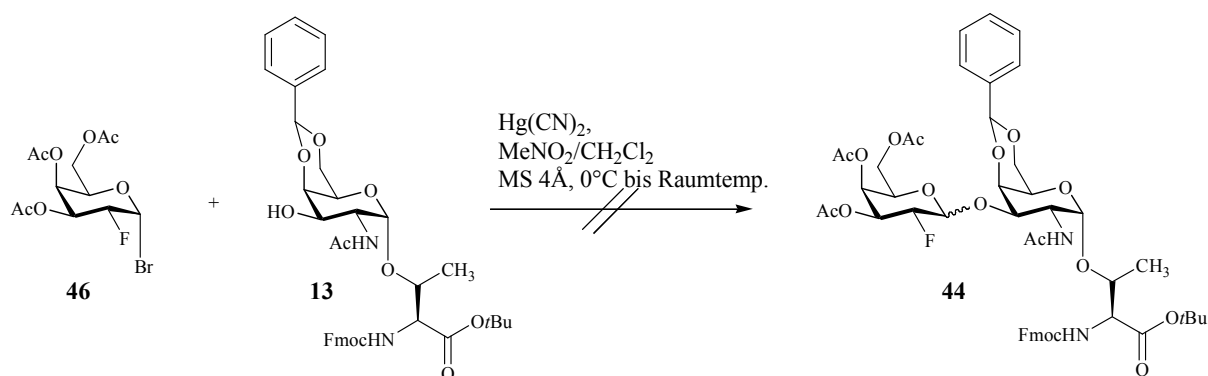


Abb. 3.2.5: Verwendung des 2F-Bromid-Donors **46**

Im Gegensatz dazu verlief die Glycosylierung von **13** unter Verwendung der Thio-Donoren Phenyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (**48**) und *para*-Chlorphenyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (**47**)^[141] deutlich erfolgreicher. Beide neu synthetisierten Donoren können als Anomerengemische von

Trichloracetimidat **43** ausgehend leicht in guten bis sehr guten Ausbeuten zugänglich gemacht werden (Abb. 3.2.6).^[142] Darüber hinaus wurde die Darstellung ähnlicher Donoren aus der Glucose in der Literatur beschrieben.^[138]

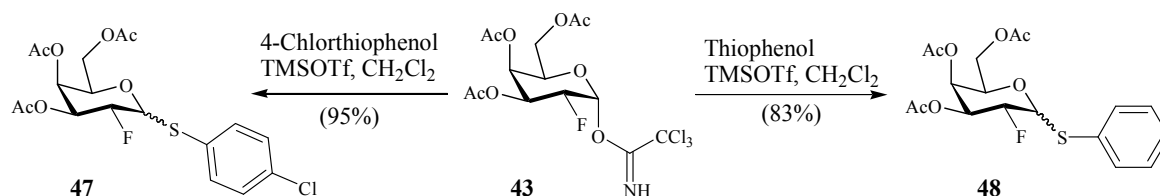


Abb. 3.2.6: Synthese der Thio-Donoren **47** und **48**

Zur Glycosylierung von **13** wurden die beiden Donoren **47** und **48** mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) und Trifluormethansulfonsäure (TfOH) aktiviert und in Dichlormethan unter Erwärmung von 0 °C auf Raumtemperatur reagieren gelassen (Abb. 3.2.7). Wie im Fall des Trichloracetimidat-Donors **43** wurde erneut bevorzugt das unerwünschte α -anomere Disaccharid **44** gebildet.

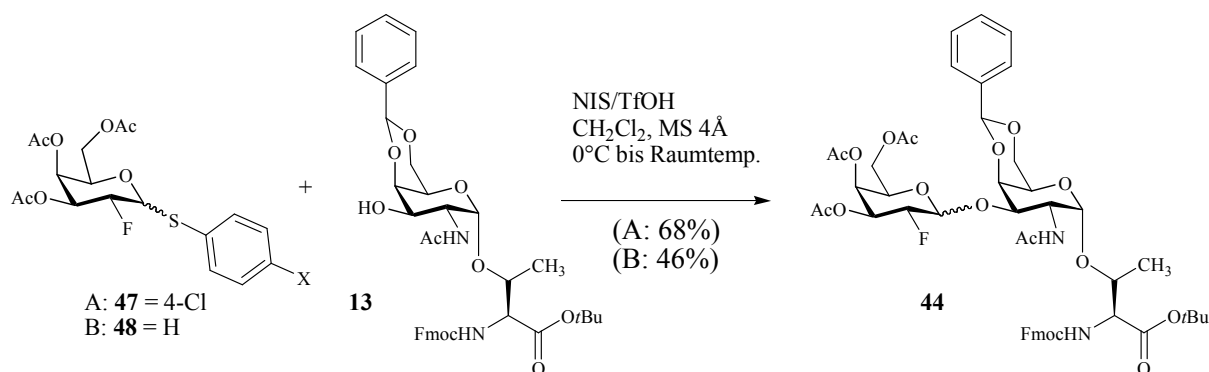


Abb. 3.2.7: Glycosylierungsreaktionen mit den Thio-Donoren

Um den Temperatureinfluss auf die Ausbeute und Anomerenverhältnis der Reaktion zu überprüfen, wurde diese auch bei -5 °C durchgeführt, wobei jedoch kein nennenswerter Umsatz beobachtet wurde.

Da sich das 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**43**) bisher stets als der reaktivste Donor erwiesen hatte, wurde versucht, bei dessen Umsetzungen durch Wahl der Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Reaktionstemperatur und Promoter) das Anomerenverhältnis zugunsten des β -Anomers zu beeinflussen (siehe Tabelle 2). Wie zu erwarten war, führte eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf Raumtemperatur zu einer

verbesserten Ausbeute. Allerdings wurde im Vergleich zu der bisher erfolgten Aktivierung bei 0 °C mit anschließendem Erwärmen auch ein erhöhter Anteil des α -Anomeren beobachtet. Im Gegensatz hierzu konnte bei der analogen Glycosylierung bei -20 °C selbst nach 24 h noch kein nennenswerter Umsatz beobachtet werden. Wie es scheint, läuft die Reaktion insgesamt erst oberhalb von etwa 5 °C mit einer ausreichenden Geschwindigkeit ab, während bei tiefer Temperatur entweder keine Reaktion erfolgt oder aber allmähliche Hydrolyse des Donors durch eingeschleppte Feuchtigkeit auftritt. Auch der Wechsel des Lösungsmittels von Dichlormethan zu Toluol, Acetonitril, Diethylether oder einer Mischung aus Dichlormethan und Nitromethan brachte keine Verbesserung mit sich. So wurde entweder kein Umsatz oder aber die Zersetzung des Donors beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich auch von *S. A. Allman et al.*^[143] berichtet, die in der regioselektiven 2-Fluorgalactosylierungen von Glucosamin-Derivaten mit **43** ebenfalls eine deutliche Begünstigung des α -anomeren Produktes fanden. Zudem spiegelt sich auch in dieser Arbeit eine starke Abhängigkeit der Ausbeute und Selektivität vom verwendeten Lösungsmittel wider, wobei ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Acetonitril dort die besten Ergebnisse (α/β , 1:4) lieferte.

Donor	Promotor	Lösungsmittel	Temperatur	Ausbeute	α : β - Selektivität	Bemerkungen
43	TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	-20 °C			Zu langsame Reaktion
43	TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	0 °C bis RT	bis 78%	max. 2:1	
43	TMSOTf	MeNO ₂ /CH ₂ Cl ₂	0 °C bis RT	-	-	Zersetzung
43	TMSOTf	Et ₂ O	0 °C bis RT	-	-	keine Reaktion
43	TMSOTf	Toluol	0 °C bis RT	-	-	keine Reaktion
43	TMSOTf	MeCN	0 °C bis RT	-	-	Zersetzung
43	BF ₃ * Et ₂ O	CH ₂ Cl ₂	0 °C bis RT	kleiner 10%	max. 2:1	
46	Hg(CN) ₂	MeNO ₂ /CH ₂ Cl ₂	0 °C bis RT	-	-	Zersetzung
48	NIS, TfOH	CH ₂ Cl ₂	0 °C bis RT	46%	3:2	
48	NIS, TfOH	CH ₂ Cl ₂	-5 °C			Zu langsame Reaktion
47	NIS, TfOH	CH ₂ Cl ₂	0 °C bis RT	68%	4:3	

Tabelle 2: Übersicht über die Glycosylierungen

In der 2-Fluorgalactosylierung von **43** wurde schließlich noch die vergleichsweise milde Lewis-Säure Bortrifluorid-Etherat ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) anstelle von TMSOTf getestet, wobei jedoch erneut nur geringe Ausbeuten des Disaccharids **44** erhalten werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass bei Einsatz von 1.5 Äquiv. des Trichloracetimidat-Donors **43** in Gegenwart katalytischer Mengen an TMSOTf in Dichlormethan bei 0 °C und langsamen Erwärmen auf Raumtemperatur (18 h) die höchsten Ausbeuten (78%) des gewünschten T-Antigen-Bausteins β -**44** erhalten werden konnten.

Zur Umwandlung des 2'-Fluor-T-Antigen-Derivats **44** in einen für die Glycopeptidsynthese geeigneten Baustein, wurde die Benzylidenschutzgruppe unter sauren Bedingungen entfernt werden, wobei diese Umsetzung z.B. in guten Ausbeuten mit Iod in Methanol^[144] bzw. unter Verwendung des oben beschriebenen sauren Kieselgel-Katalysators gelang (Abb. 3.1.11). Wie in der Synthese des T_N -Bausteins **12** ermöglichte zudem die Polaritätsänderung des Moleküls nach partieller Deblockierung eine vollständige säulenchromatographische Abtrennung des unerwünschten Anomers α -**49** auf dieser Stufe.

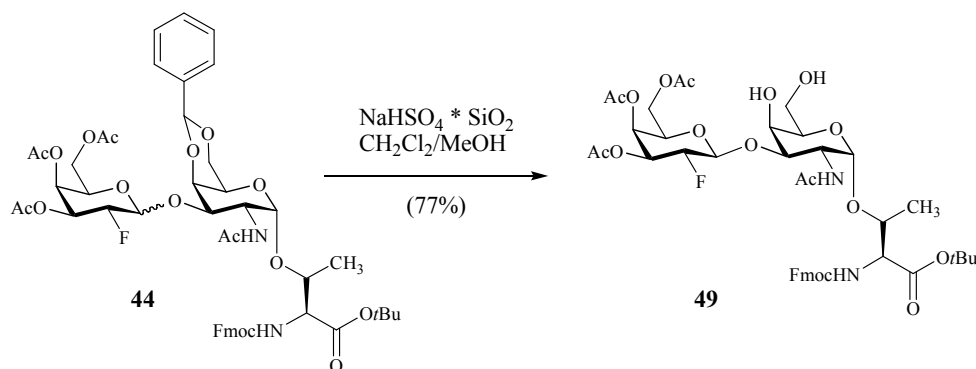


Abb. 3.2.8: Schutzgruppenmanipulationen zur Synthese des fluorierten T-Threonin-Konjugates **49**

Abschließende Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin sowie Deblockierung des *tert*-Butylesters mit TFA/Anisol (10:1) lieferte in guter Ausbeute den gewünschten Glycosyl-aminosäure-Baustein **51** für die Festphasensynthese (Abb. 3.2.9).

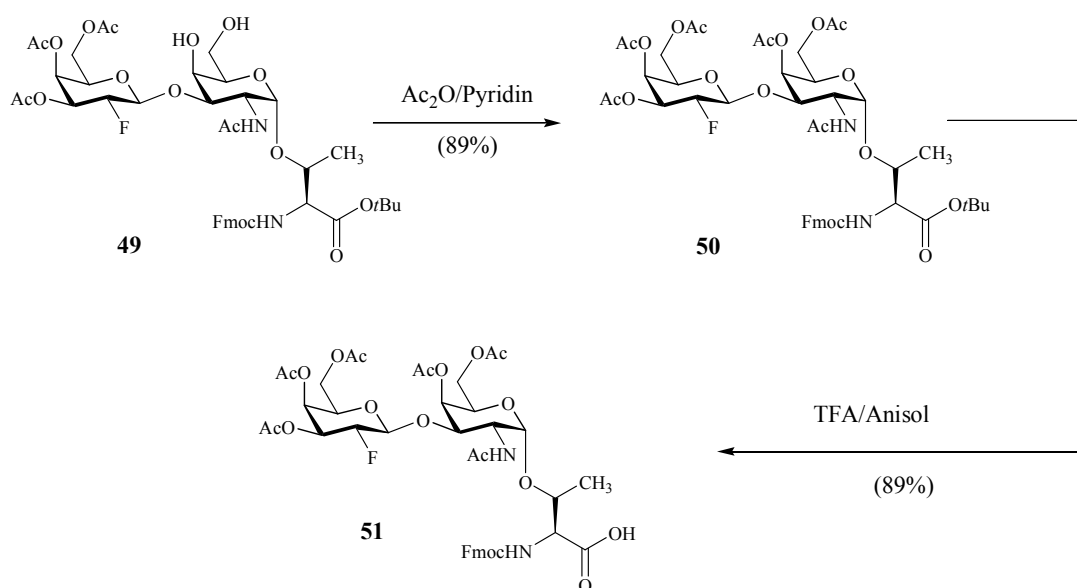


Abb. 3.2.9: Synthese des Glycosylaminosäure-Bausteines **51** für die Festphasensynthese

Darüberhinaus wurde auch ein 2'-Fluor-T-Antigen-Threonin-Baustein **52** hergestellt, bei dem die Kohlenhydrat-Seitenkette für vergleichende Untersuchungen zur Stabilität fluorierter Antigen-Analoga gegen β -Galactosidasen vollständig deblockiert wurde. Ausgehend von Fmoc-Thr(α/β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-BznGalNAc)-OrBu **44** wurde hierzu die Benzyliden-Schutzgruppe abgespalten und das Konjugat **49** unter Zemplén-Bedingungen de-O-acetyliert. Da diese Reaktion, wie oben aufgeführt, zu einem teilweisen Verlust der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe führte, wurde letztere unter den bereits genannten Bedingungen (Fmoc-OSu, CH₂Cl₂ und DIPEA) erneut eingeführt. Das deblockierte Disaccharid **52** wurde somit in einer Ausbeute von 52% nach semipräparativer RP-HPLC erhalten (Abb. 3.2.10).

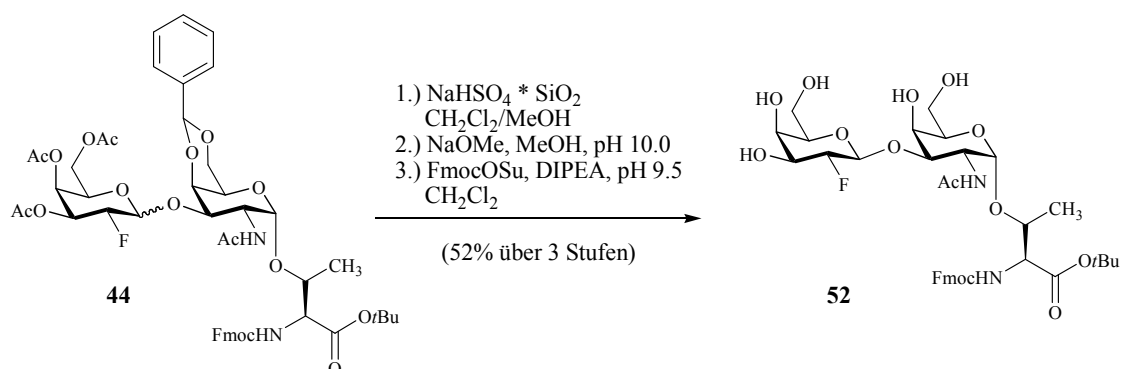


Abb. 3.2.10: Synthese des Deblockierten Fmoc-Thr(β Gal2F-(1 \rightarrow 3)-GalNAc)-OrBu **52**

Obwohl mit der oben vorgestellten Syntheseroute nun erstmals ein in der 2'-Position fluoriertes T-Antigen-Analogon als Threonin-Konjugat für die Glycopeptidsynthese zugänglich gemacht werden konnte, stellt die unzureichende β -Selektivität der 2'-Fluorgalactosylierung für synthetische Anwendungen ein Problem dar. Da in der Literatur immer wieder beschrieben wurde, dass neben den Reaktionsbedingungen auch die Schutzgruppen einen deutlichen Einfluss auf die Selektivität von Glycosylierungsreaktionen zeigen können,^[145] werden im folgenden Kapitel weitere 2-Desoxy-2-fluorgalactosyl-Donoren mit elektronenreicheren Benzyl- bzw. *para*-Methoxybenzylethern als Schutzgruppen vorgestellt und hinsichtlich ihrer α/β -Selektivität in der Glycosylierung von T_N-Baustein **13** charakterisiert.

3.2.2 Synthese der benzyl- und *para*-methoxybenzylgeschützten Donoren und deren Glycosylierungsreaktionen

Wie bereits angedeutet wurde, sollte durch Verwendung von reaktiveren und damit bei tieferen Temperaturen einsetzbaren Benzylether-geschützten 2-Fluorgalactosyl-Donoren versucht werden, die Glycosylierungsreaktion zum T-Antigen-Analogon selektiver zu gestalten. So konnte experimentell häufig ein starker Einfluss des gewählten Schutzgruppenmusters (z.B. Acetyl- oder Benzylgruppen) auf das Anomerenverhältnis beobachtet werden, der u.a. aus den elektronischen Eigenschaften der Schutzgruppe und deren Wirkung auf die Bildung bestimmter Vorzugskonformationen der intermediär entstehenden Oxocarbeniumionen-Zwischenstufen resultiert.^[146] Nach *Woerpel und Mitarbeitern* werden hierzu bspw. zwei diastereomere Oxocarbeniumionen **A** und **B** betrachtet, die miteinander im Gleichgewicht stehen und deren Konformationen durch die beiden Halbsessel ⁴H₃ und ³H₄ gegeben sind (Abb. 3.2.11). Je nach Anordnung und Art der Substituenten am Ring sollte eines dieser Konformere begünstigt sein, wobei Heteroatomsubstituenten (vorzugsweise in den Positionen C3 und C4) pseudo-axiale Orientierungen bevorzugen.^[146,147] Als Ursache dieser weithin gültigen Vorzugskonformationen werden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den freien Elektronenpaaren des Heteroatomsubstituenten und dem kationischen Kohlenstoffatom des Oxocarbeniumions angenommen, die aufgrund des geringeren interatomaren Abstands bei

einer axialen Substituentenanordnung größer als bei einer äquatorialen Anordnung sein sollten.^[148] Eine solche Vorzugskonformation wird auch für elektronenziehende Substituenten in den Positionen C5 und C2 diskutiert,^[146,149] wobei im letzteren Fall die äquatoriale Position begünstigt sein sollte, da diese zu einer Stabilisierung des Oxocarbeniumions durch Hyperkonjugation mit der 2-C-H-Bindung führt.^[150,151] Obgleich die Effekte durch die Beiträge der einzelnen Substituenten additiv sind, reicht ihre Kenntnis jedoch meist nicht aus, um den stereochemischen Verlauf von Glycosylierungsreaktionen hoch substituierter Systeme eindeutig vorherzusagen.^[151,152] Insbesondere im Fall von ungünstigen Substitutionsmustern nach *Woerpel* müssen neben der (elektronischen) Betrachtung des Grundzustandes auch sterische Faktoren sowie ein potentieller Reaktionsverlauf entsprechend den Curtin-Hammett/Winstein-Holness-Konzepten^[153] berücksichtigt werden.

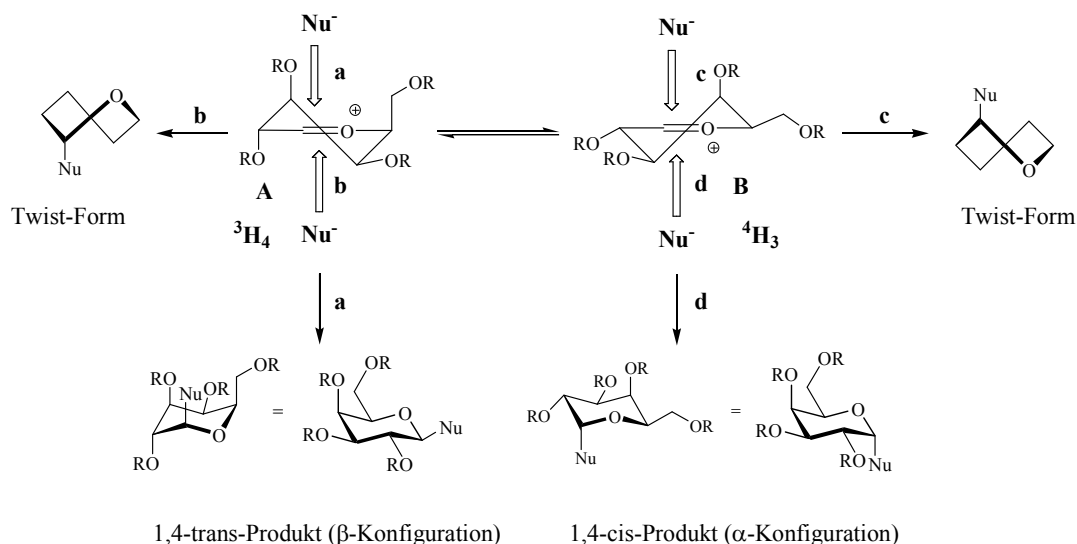


Abb. 3.2.11: Überlegungen zum stereochemischen Verlauf von Glycosylierungen

Vor diesem Hintergrund wurde ein benzylgeschützter 2-Fluorgalactosyl-Donor hergestellt, indem zunächst 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal **4** durch Behandlung mit Natriummethanolat-Lösung (1% NaOMe in MeOH) deblockiert wurde. Anschließende Deprotonierung mit Natriumhydrid in DMF und Umsetzung mit Benzylbromid führte zur Bildung des 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-D-galactals **53** in einer Ausbeute von 80%.^[154,155] Aufgrund der erhöhten Reaktivität von **53** gegenüber dem Acetyl-geschütztem Galactal (**4**), die bei der Umsetzung in der Mikrowelle zu einer verstärkten Bildung von Nebenprodukten führte, wurde **53** konventionell, d.h. ohne Mikrowelleneinstrahlung, mit Selectfluor[®] fluoriert (Abb. 3.2.12).

Dazu wurde **53** zunächst in einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) bei Raumtemperatur 18 h gerührt und dann eine Stunde unter Rückfluss erhitzt.

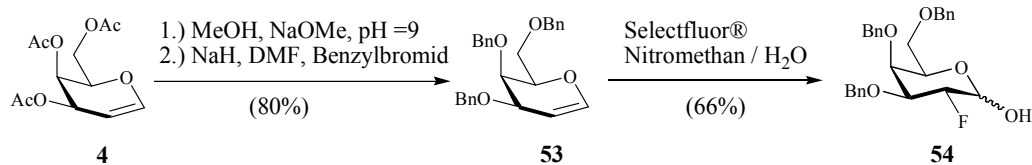


Abb. 3.2.12: Synthese der 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranose (**54**)

Das nach der Aufarbeitung in 66%iger Ausbeute als Anomerengemisch anfallende Produkt 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (**54**) wurde anschließend in einer basen-katalysierten Reaktion mit Trichloracetonitril und DBU zum entsprechend 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**55**) umgesetzt (Abb. 3.2.13). Dieses wird ebenso wie die Verbindung **43** bevorzugt als α -anomerer Produkt, welches das thermodynamisch stabilere Produkt der beiden Anomere darstellt, erhalten.

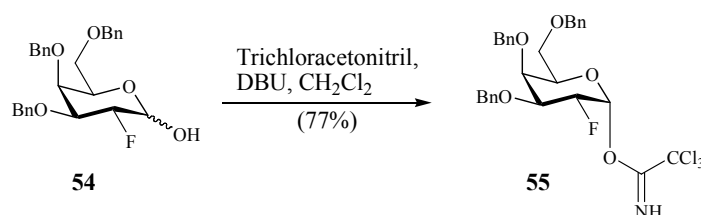


Abb. 3.2.13: Synthese des 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**55**)

Die Glycosylierung des T_N -Antigen-Bausteins **13** mit dem Benzylether-geschützten 2-Fluor-Trichloracetimidat-Donor **55** erfolgte unter denselben Bedingungen, wie die im vorherigen Kapitel beschriebene Glycosylierung des Acetyl-geschützten Bausteins **43**, d.h. in abs. Dichlormethan bei 0 °C bis Raumtemperatur und unter Verwendung von TMSOTf als Promotor. Dabei verlief die Reaktion mit einer Ausbeute von 92% des Disaccharids **56** nicht nur glatter, sondern es wurde auch ein deutlich besseres Anomerenverhältnis von 1:9 zugunsten des *trans*-verknüpften Produkts β -**56** erhalten (Abb. 3.2.14).

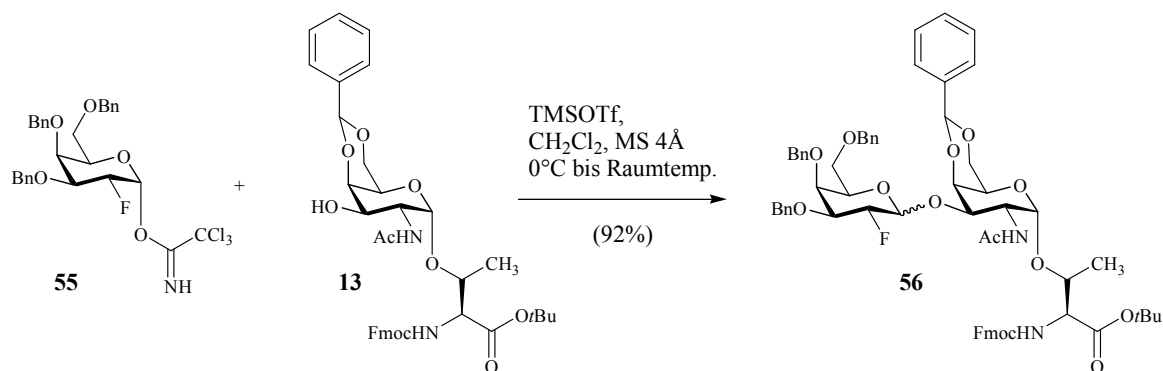


Abb. 3.2.14: Glycosylierung nach *Schmidt* mit dem 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloroacetimidat (**55**)

Im Fall des aus **43** resultierenden Oxoniumions nehmen jeweils zwei Substituenten (³H₄: 2-F/4-OAc bzw. ⁴H₃: 3-OAc/5-OAc) in beiden Konformeren ³H₄ (**57**) und ⁴H₃ (**58**) die ungünstigere Position ein (Abb. 3.2.15). Bei einer vollständigen *trans*-Anordnung der Substituenten ist normalerweise das ³H₄-Konformer energetisch bevorzugt, wobei der Angriff des Nucleophils entlang einer pseudoaxialen Trajektorie mit maximaler HOMO_{Nu}-LUMO_{Oxocarb}-Wechselwirkung erfolgt (siehe Abb. 3.2.11). Da bei **57** zudem der Oberseitenangriff elektronisch begünstigt ist, sollte dieses Konformer zu dem gewünschten 1,2-*trans*-verknüpften β -Disaccharid **44** führen (Weg a). Die Glycosylierung von **43** mit **13** liefert jedoch bevorzugt das α -(1,2-*cis*)-konfigurierte Produkt **44**, welches aus **57** nur durch einen Unterseitenangriff gebildet werden kann (Weg b). Letzterer wäre jedoch nicht nur durch die Wechselwirkungen mit dem benachbarten axial-ständigen Fluorsubstituenten sterisch und elektronisch gehindert, sondern würde das Durchlaufen eines energetisch ungünstigen Boot-Übergangszustands erfordern. Im Gegensatz hierzu ist der nucleophile Angriff an ein intermediäres Oxoniumion mit ⁴H₃-Konformation sterisch nicht gehindert und erfolgt bevorzugt von der Unterseite, d.h. unter Bildung des 1,2-*cis*-konfigurierten Produkts. Da dies der beobachteten Stereochemie von **44** entspricht, erscheint ein Reaktionsverlauf über dieses ⁴H₃-Konformer für die Glycosylierung mit **43** plausibel.

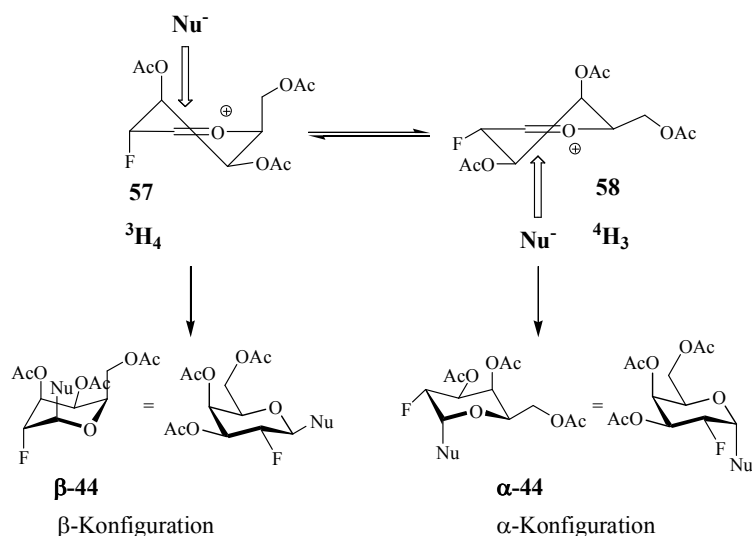


Abb. 3.2.15: Erklärung des stereochemischen Verlaufes der Glycosylierung zu 44

Im Fall des benzylierten Donors **55** ist hingegen aufgrund des geringeren sterischen Anspruchs der Benzylether ein Oberseitenangriff auf das energetisch tiefer liegende $^3\text{H}_4$ -Konformer **59** günstiger (Abb. 3.2.16), so dass dessen Reaktion mit **13** bevorzugt zum β -konfigurierten Produkt β -**56** führt. Darüber hinaus ist bei diesem Konformer auch eine zusätzliche Stabilisierung des Oxocarbeniumions durch eine dipolare Wechselwirkung zwischen dem axialen 2-Fluorsubstituenten und dem kationischen C1-Kohlenstoffatom möglich. Eine solche Dipolinteraktion ist kürzlich von *Bucher und Gilmour* für 2-Fluor-glucosyloxonium-Ionen postuliert worden^[156] und sollte einen Oberseitenangriff von **55** ebenfalls begünstigen.

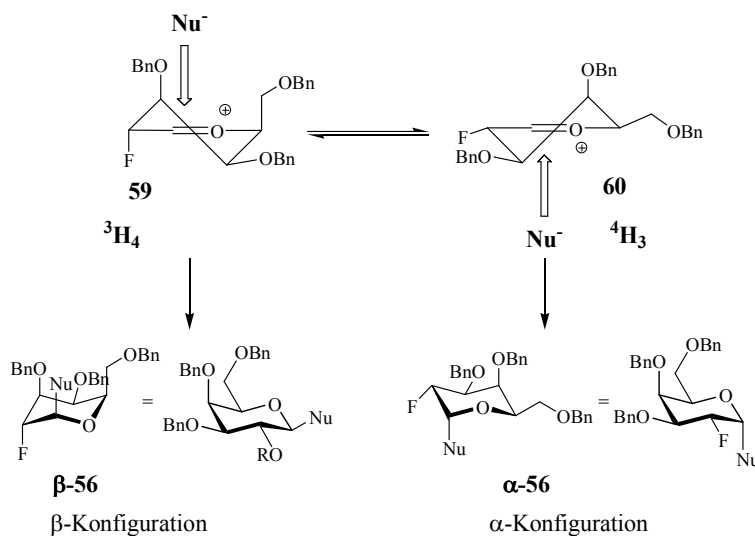


Abb. 3.2.16: Erklärung des stereochemischen Verlaufes der Glycosylierung zu 56

Wie im Fall des Acetyl-geschützten Disaccharids **44** gelang die säulenchromatographische Abtrennung der entstandenen Mengen an α -**56** erst nach Abspaltung der Benzylidenacetal-Schutzgruppe. Zur vollständigen Charakterisierung der beiden anomeren Produkte wurde daher ein kleiner Teil von **56** durch semi-präparative RP-HPLC getrennt. Anhand von Abb. 3.2.17 und Abb. 3.2.18 zeigt sich, dass eine Zuordnung der Anomere durch charakteristische Signale in den ^{13}C -NMR-Spektren relativ leicht möglich ist. So liegt im *trans*-verknüpften Disaccharid β -**56** die Resonanzfrequenz des C1'-Atoms bei einem Wert von 102.3 ppm, während dieses Signal im *cis*-verknüpften Disaccharid α -**56** bei einem Wert von 96.5 ppm auftaucht (Abb. 3.2.17 und Abb. 3.2.18).

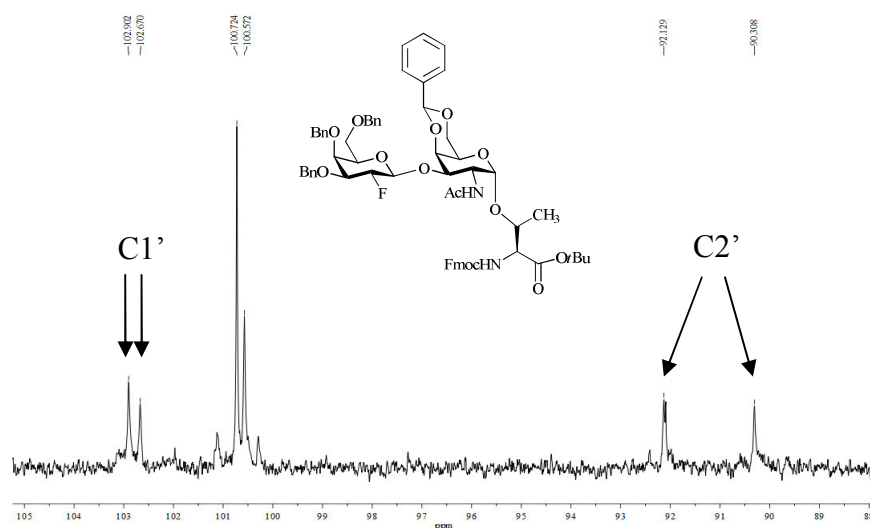


Abb. 3.2.17: Ausschnitt aus dem ^{13}C -Spektrum des beta-konfigurierten Disaccharides **56**

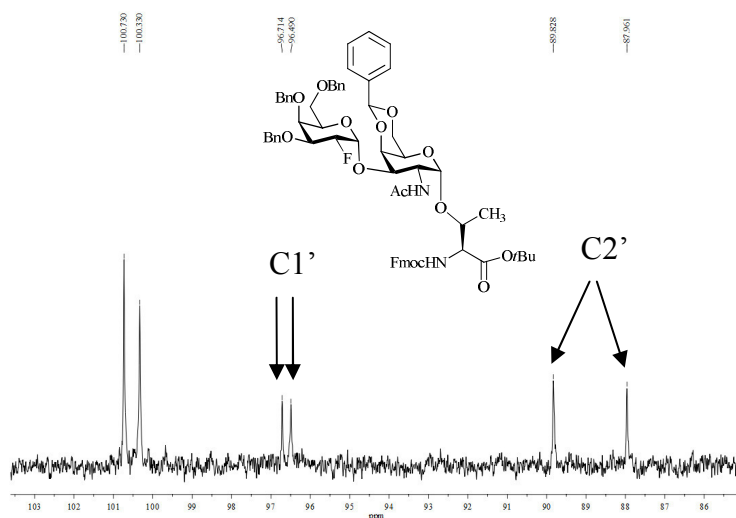


Abb. 3.2.18: Ausschnitt aus dem ^{13}C -Spektrum des alpha-konfigurierten Disaccharides **56**

Von dem überwiegenden Teil des erhaltenen Anomerengemischs α/β -**56** wurde selektiv die Benzylidenschutzgruppe unter sauren Bedingungen (Kieselgel-Katalysator $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ ^[96]) abgespalten und das resultierende β -Anomer **56** flashchromatographisch gereinigt (Abb. 3.2.19).

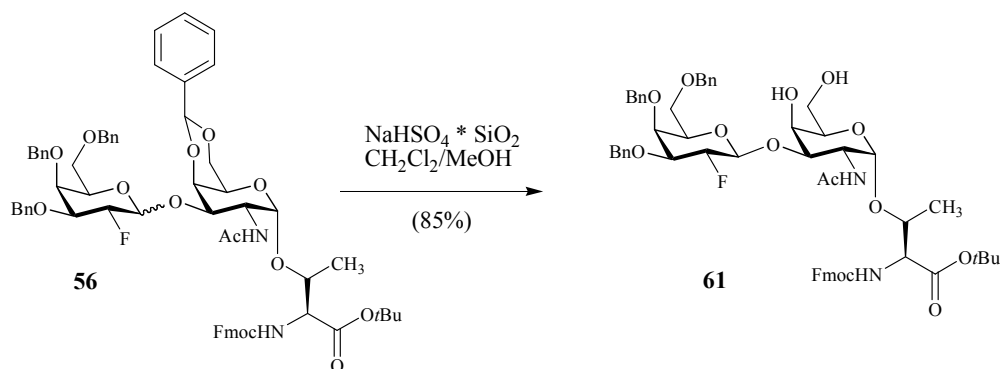


Abb. 3.2.19: Synthese des Fmoc-Thr($\beta\text{Bn}_3\text{Gal}2\text{F}$ -(1 \rightarrow 3)- αGalNAc)-OtBu **61**

Anschließend wurden die freien Hydroxyl-Gruppen unter Verwendung von Acetanhydrid und Pyridin acetyliert (Abb. 3.2.20).

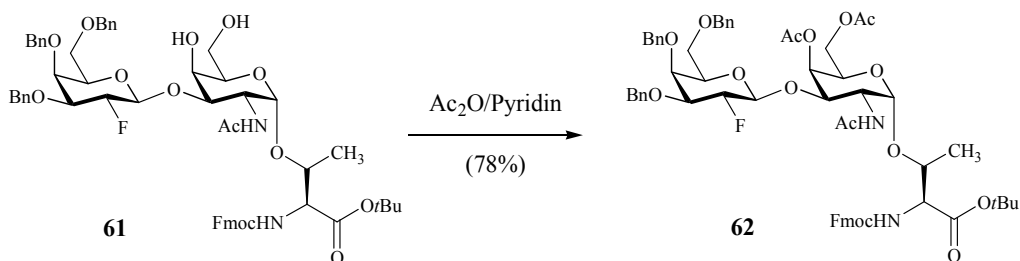


Abb. 3.2.20: Synthese des Fmoc-Thr($\beta\text{Bn}_3\text{Gal}2\text{F}$ -(1 \rightarrow 3)- $\alpha\text{Ac}_2\text{GalNAc}$)-OtBu **62**

Durch die Kombination von Benzylidenacetal-Schutzgruppe mit Benzylethern sollte es zudem möglich sein, durch Hydrogenolyse alle Hydroxyl-Schutzgruppen gleichzeitig abzuspalten und so in einem Schritt die wesentlich säurestabileren Acetyl-Schutzgruppen für die Festphasenpeptidsynthese einzuführen. Allerdings war bereits bekannt,^[157] dass unter den Bedingungen der Hydrogenolyse häufig auch die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wird, so dass im Anschluss das Amin erneut blockiert werden musste. Die Abspaltung des Benzylidenacetals und der Benzylether gelang am besten in Ethanol unter Verwendung von Palladium(II)-acetat als Katalysator. Das dabei erhaltene Rohprodukt wurde in Dichlormethan

gelöst und mit Fmoc-OSu und DIPEA bei einem pH-Wert von 9.5 versetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit einigen Tropfen Essigsäure neutralisiert, um einen Anstieg des pH-Wertes beim Entfernen des Lösungsmittels und damit die Zersetzung des Produktes durch β -Eliminierung zu verhindern. Abschließende Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin lieferte den gewünschten Baustein **50** in variablen Ausbeuten von bis zu 80%.

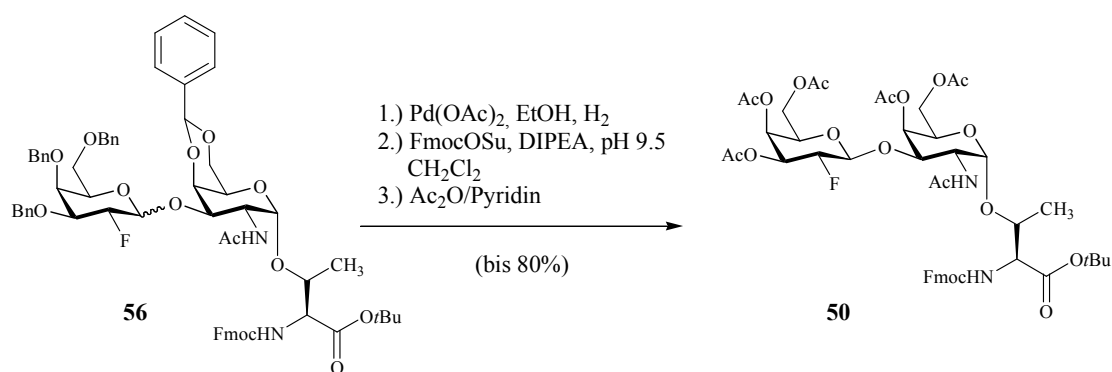


Abb. 3.2.21: Umschüttung zum Fmoc-Thr(β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)-Ac₂GalNAc)-OrBu **50**

Während also die Glycosylierung von **13** mit dem Trichloracetimidat-Donor **43** das acetylierte 2'-Fluor-T-Antigen-Derivat **44** nach Schutzgruppenmanipulation in einer Gesamtausbeute von max. 18% bezogen auf das β -Anomer lieferte, konnte diese Ausbeute durch Verwendung des benzylierten Donors **55** schließlich auf einen Wert von bis zu 66% gesteigert werden. Als großer Nachteil erwies sich jedoch, dass die Debenzylierung trotz teilweise hervorragender Ausbeuten nicht immer reproduzierbar verlief und mitunter sogar vollständig scheiterte. Die Gründe hierfür blieben unbekannt, und auch der Wechsel zu anderen Reaktionsführungen (Transferhydrierung in der Mikrowelle mit Ammoniumformiat und Pd/C (w = 10%), Verwendung von Pd/C (w = 5 bzw. 10%) oder Pd(OAc)₂) brachte kein einheitliches Ergebnis.

Für den Einsatz in der Festphasensynthese wurde der C-Terminus des erhaltenen Bausteins Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OrBu **62** mit TFA und Anisol (10:1) deblockiert (Abb. 3.2.22).

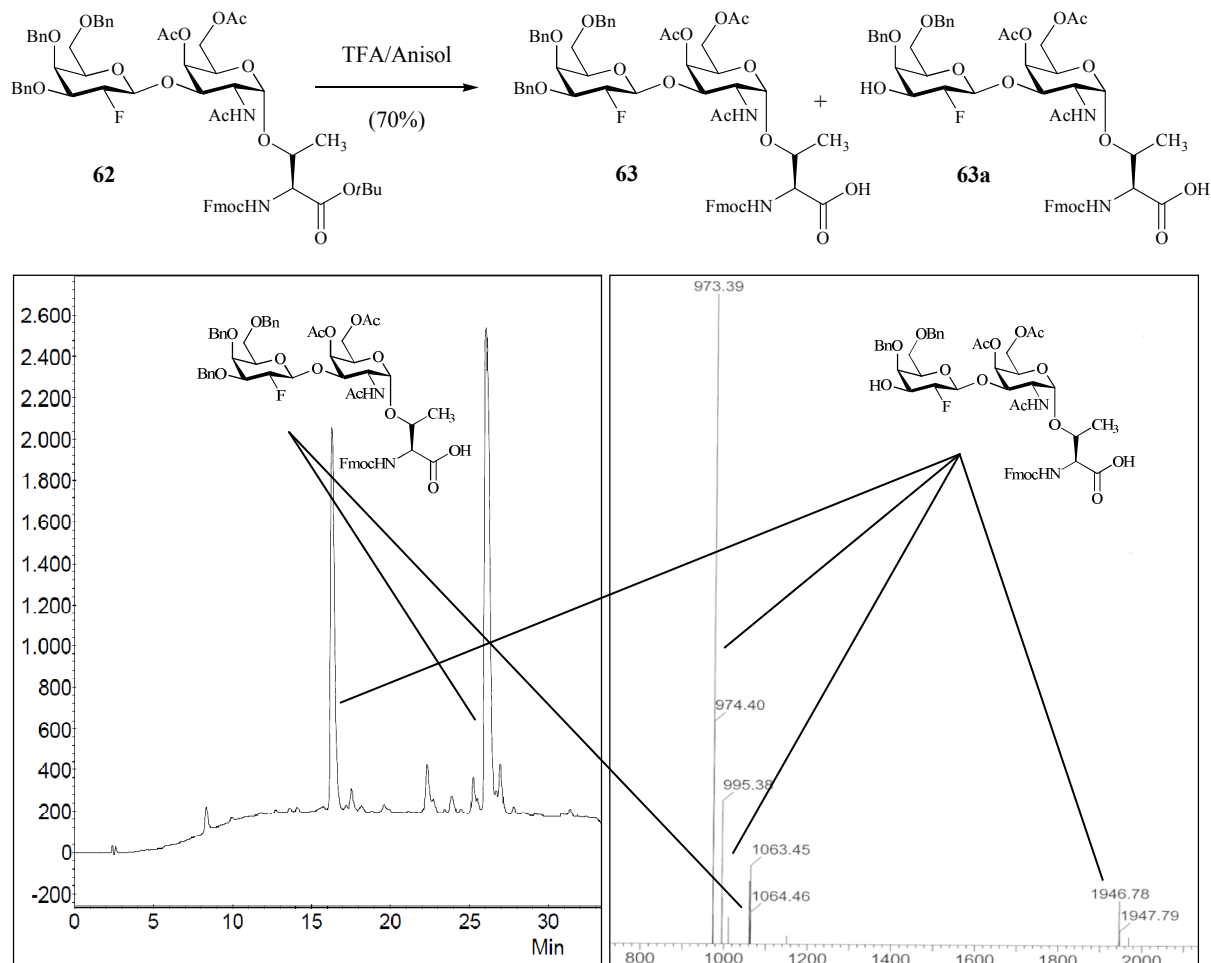


Abb. 3.2.22: Bildung und Nachweis des partiell debenzilierten Bausteins **63**

Nicht gänzlich unerwartet^[158,159] wurde unter diesen Bedingungen teilweise auch ein Benzyl-ether gespalten (Abb. 3.2.22), wobei zunächst vermutet wurde, dass es sich hierbei um die primäre Hydroxylgruppe handelte, die freigesetzt wurde. Um zu untersuchen, welche Position im Molekül deblockiert wurde, wurden NMR-Untersuchungen (NOESY und Einstrahl-experimente) an der bisfluorierten Verbindung durchgeführt. Danach lässt sich nicht mit völliger Sicherheit beweisen, dass die 3'-Position deblockiert wurde. Durch die Nähe des 3'-Protons zum Fluor beträgt die Kopplungskonstante in vergleichbaren Verbindungen ca. 13 Hz zum Fluor. Allerdings würde die Kopplungskonstante zum OH-Proton eine ähnliche Kopplungskonstante aufweisen. Daher konnte aus den NMR-Experimenten keine eindeutige Aussage erhalten werden. Deshalb wurden die chemischen Verschiebungen der Protonen 2'-, 3'- und 4'-H in den Verbindungen **63** und **63a** betrachtet. Dabei fällt auf, dass nur das Protonensignal von 3'-H eine deutlichere Abweichung in der Verschiebung (~0.2 ppm) aufweist: **63**: 3.71 ppm und **63a**: 3.52 ppm. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde die

Deblockierung der 3'-Position angenommen. Dies liegt vermutlich an dem stark elektronegativen Fluorsubstituenten in der Nachbarposition, dessen Elektronenzug die Abspaltung an der C3'-Position erleichtert. Der Anteil an partiell deblockiertem Produkt **63a** ließ sich jedoch durch vorsichtiges Einengen der TFA-Lsg. in Gegenwart eines großen Überschusses an Toluol minimieren. Zudem hat sich gezeigt, dass die freie Hydroxylgruppe an der 3'-Position in der späteren Festphasensynthese nicht weiter stört, so dass darauf verzichtet wurde, diese Position wieder zu blockieren. Zur Charakterisierung der beiden Produkte wurden diese mittels RP-HPLC getrennt.

Da die Debenzylierung häufig kein zufriedenstellendes Ergebnis brachte, sollte durch die Verwendung von *para*-Methoxybenzylethern (PMB) als Schutzgruppen die Synthese eines 2'-Fluor-T-Antigen-Derivats erleichtert werden. So wurde davon ausgegangen, dass die PMB-Schutzgruppe zu vergleichbaren β -Selektivitäten wie die benzylierte Verbindung in der Glycosylierungsreaktion führen würde, diese Gruppe jedoch durch oxidative Spaltung unter neutralen Bedingungen leichter zu entfernen sei.

Da aufgrund der Labilität der Schutzgruppe, der PMB-geschützte TCA-Donor nicht direkt durch elektrophile Fluorierung des PMB-Galactals hergestellt werden kann,^[132,160] wurde dieser über ein entsprechendes Thiophenol **64** erhalten. Dazu wurde Verbindung **47** zunächst durch Behandlung mit Natriummethanolat-Lösung (1% in Methanol) deblockiert und das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung mit Natriumhydrid in DMF unter Zugabe von *para*-Methoxybenzylchlorid und Tetrabutylammoniumiodid in den PMB-geschützten Baustein **64** überführt (Abb. 3.2.23). Leider verlief diese Umsetzung mit einer Ausbeute von 32% an *p*-Chlorthiophenyl-Donor **64** nicht zufriedenstellend, wobei auch ein Wechsel des Lösungsmittels zu THF^[161] keine nennenswerte Verbesserung brachte.

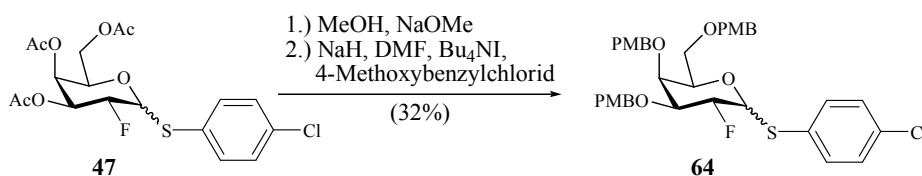


Abb. 3.2.23: Synthese der *para*-Chlor-phenyl-3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (**64**)

Es wurde daher ein analoger Thiophenyl-Donor über diegleiche Route hergestellt, wobei das gewünschte Produkt Phenyl-3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-

galactopyranose (**65**) in einer deutlich höheren Ausbeute von 58% erhalten werden konnte (Abb. 3.2.24).

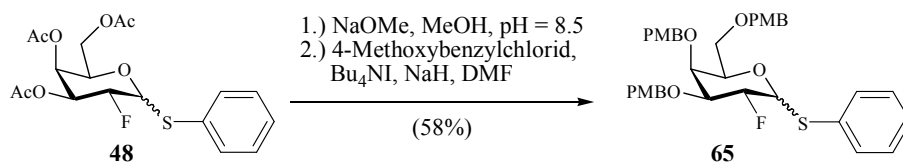


Abb. 3.2.24: Phenyl-3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (**65**)

Um aus diesen Thio-Donoren den sich in der Synthese des Disaccharids **44** bewährten Trichloracetimidat-Donor herzustellen, musste zunächst die anomere-Position freigesetzt werden, wofür verschiedene elektrophile Promotoren, wie z.B. V_2O_5 - H_2O_2 / NH_4Br ^[162], NIS/TFA^[163], *N*-Bromsuccinimid (NBS) bzw. NIS in nassem Aceton^[164,165] und Chloramin-T^[166] zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit wurden NIS/TFA als Promotoren in Dichlormethan und Wasser (10:1) eingesetzt, wodurch es *in situ* zunächst zur Bildung eines Iodonium-Ions kommt. Dieses bildet mit dem Thioglycosid **65** intermediär ein Sulfoniumion **65a**, welches nach Abspaltung der nucleofugen Gruppe und unter Ausbildung eines Anomerengemisches Wasser nucleophil addiert (Abb. 3.2.25).

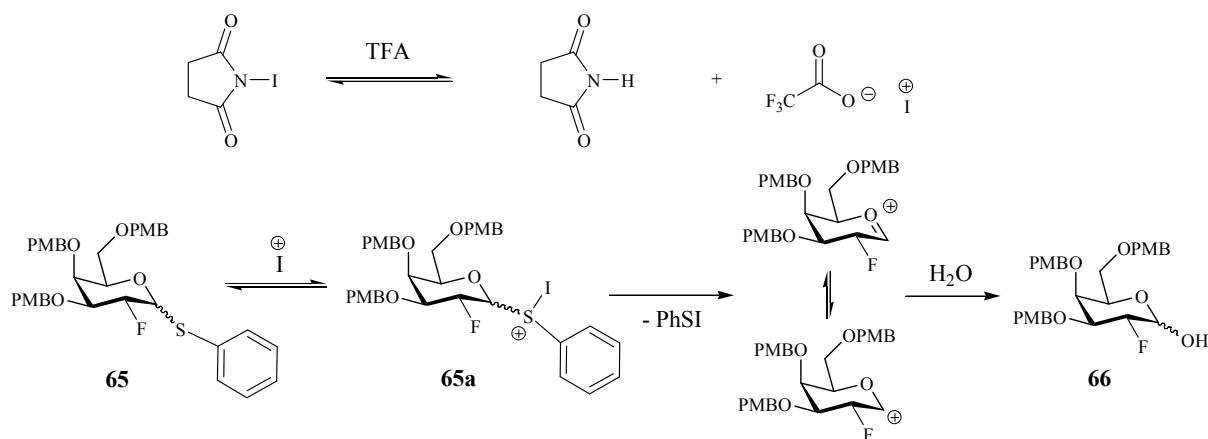
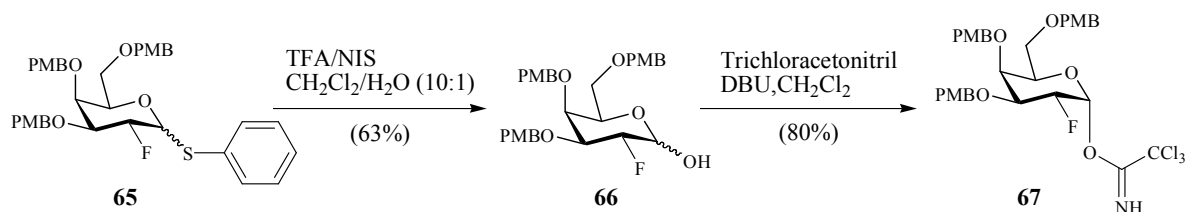
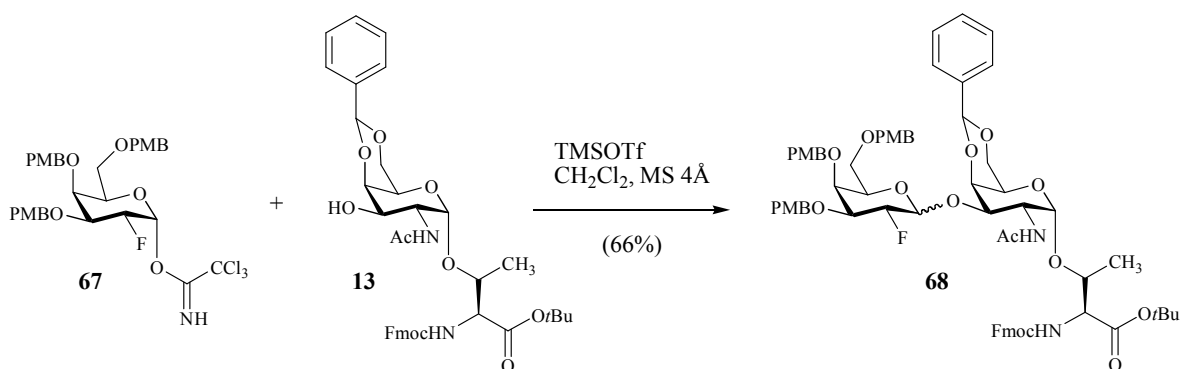


Abb. 3.2.25: Iodonium-vermittelte Aktivierung der Thiogruppe

Das erhaltene Anomerengemisch **66** wurde anschließend mit Trichloracetonitril in Gegenwart von DBU in das gewünschte 3,4,6-Tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**67**) überführt (Abb. 3.2.26).

Abb. 3.2.26: Synthese des Trichloracetimidat-Bausteins **67**

Der Donor **67** erwies sich in den nachfolgenden Glycosylierungen wieder als der am Besten geeignete Baustein für den Aufbau des gewünschten Disaccharids **68**. So gelang die *Schmidt*-Glycosylierung von T_N-Baustein **13** mit **67** in einer guten Ausbeute von 66% bei einem Anomerenverhältnis von 9:1 zugunsten des gewünschten β-konfigurierten Produktes **68** (Abb. 3.2.27).

Abb. 3.2.27: *Schmidt*-Glycosylierung mit dem PMB₃Gal2F-TCI **67**

Im Vergleich hierzu lieferten die beiden Thio-Donoren Phenyl-3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio-α/β-D-galactopyranose (**65**) und *para*-Chlor-phenyl-3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio-α/β-D-galactopyranose (**64**) in den entsprechenden Glycosylierungen das gewünschte Disaccharid **68** in deutlich geringeren Ausbeuten von 43% und 55% (Abb. 3.2.28). Interessanterweise führte jedoch in beiden Reaktionen die Aktivierung durch NIS/TfOH zu einer gleichbleibend hohen β-Selektivität von β/α = 9:1.

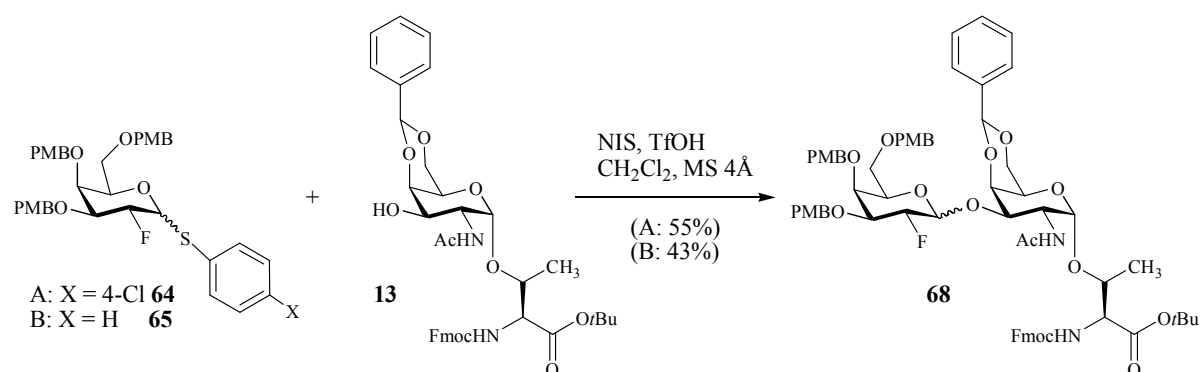


Abb. 3.2.28: Synthese des Fmoc-Thr(βPMB₃Gal₂F-(1→3)-α_{4,6}-Bzn-GalNAc)-OrBu **68**

Die Ergebnisse der in den T_N-Glycosylierungen eingesetzten Benzyl- und PMB-geschützten Donoren sind zum Vergleich mit den Resultaten der entsprechenden Acetyl-geschützten Donoren in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst. Dabei lieferten die Trichloracetimidat-Donoren stets die besten Ausbeuten und β-Selektivitäten, wobei insbesondere Donor **55** sehr gute Ausbeuten (bis 92%) und eine hohe β-Selektivität in der Glycosylierung zum Disaccharid **56** lieferte.

Donor	Promotor	Ausbeute	α:β-Selektivität	Ausbeute bezogen auf β-Produkt
43	TMSOTf	78%	max. 2:1	max. 26%
48	NIS, TfOH	46%	3:2	~ 18%
47	NIS, TfOH	68%	3:2	~ 29%
55	TMSOTf	92%	1:9	~ 83%
67	TMSOTf	66%	1:9	~ 56%
65	NIS, TfOH	42%	1:9	~ 38%
64	NIS, TfOH	55%	1:9	~ 50%

Tabelle 3: Zusammenfassung der Glycosylierungen

Anmerkung: Die Reaktionen wurden in Dichlormethan bei 0°C bis Raumtemp. durchgeführt

Um Verbindung **68** ebenfalls in einen für die Festphasensynthese geeigneten Baustein zu überführen, musste noch das Schutzgruppenmuster geändert werden. Hierzu wurden die PMB-Schutzgruppen unter Verwendung von 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) in einem Gemisch aus Dichlormethan und Wasser (20:1) gespalten^[167] und das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Reinigung acetyliert (Abb. 3.2.29). Leider konnte der gewünschte Festphasen-Baustein **44**, der einen direkten Vorläufer sowohl für das 2'Fluor-T-

Antigen-Konjugat **44**, als auch für ein entsprechendes 2,6-Sialyl-2'-Fluor-T-Antigen-Konjugat darstellt, nur in einer mäßigen Ausbeute von 42% über beide Stufen erhalten werden.

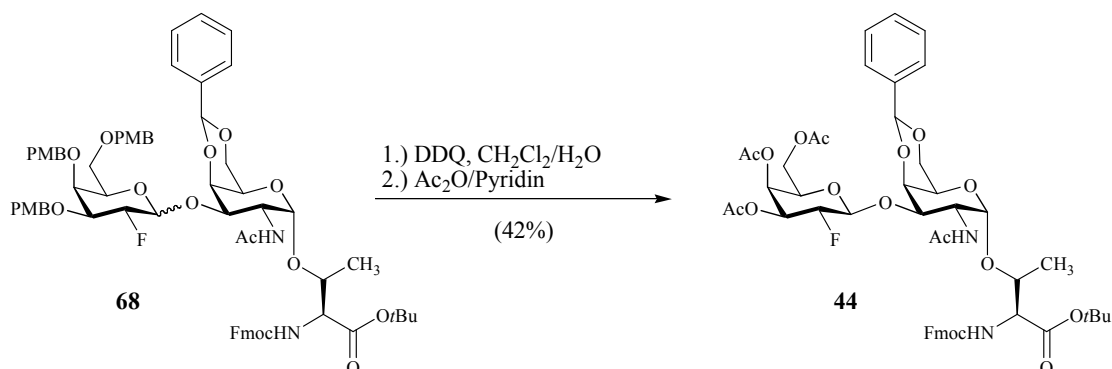


Abb. 3.2.29: Umschüttung zum Fmoc-Thr(β Ac₃Gal₂F-(1→3)- α 4,6-BznGalNAc)-OrBu **44**

Der Mechanismus der DDQ-vermittelten oxidativen Spaltung des PMB-Ethers verläuft über Ein-Elektronen-Übertragungen (single electron transfer, SET-Mechanismus) vom elektronenreichen PMB-Ether auf ein DDQ-Molekül (Abb. 3.2.30). Das dabei resultierende Oxonium-Ion wird durch Wassermoleküle unter Bildung des Alkohols **69** und *para*-Methoxybenzaldehyd **70** hydrolysiert.^[168]

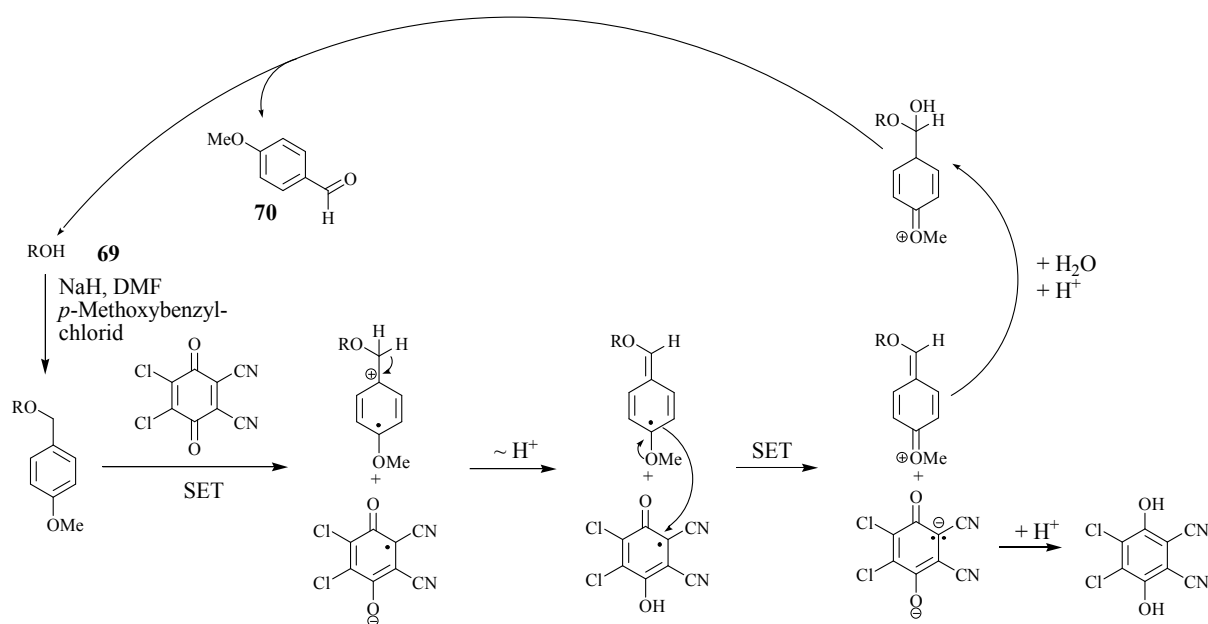


Abb. 3.2.30: Mechanismus der oxidativen Spaltung von *para*-Methoxybenzylethern mit DDQ

Da die geringe Ausbeute bei der PMB-Ether-Spaltung von **68** höchst wahrscheinlich aus der Anwesenheit der labilen Benzyliden-Schutzgruppe herrührt, wurde diese zunächst sauer abgespalten (Abb. 3.2.31). Anschließend wurden die beiden freien Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid in Gegenwart von Pyridin acetyliert, bevor die oxidative Spaltung der *para*-Methoxybenzylether und die finale Acetylierung der deblockierten Hydroxylgruppen durchgeführt wurden. Mit dieser Sequenz konnte dann der gewünschte Baustein Fmoc-Thr(β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OrBu **50** in einer deutlich höheren Ausbeute von insgesamt 60% über vier Stufen erhalten werden.

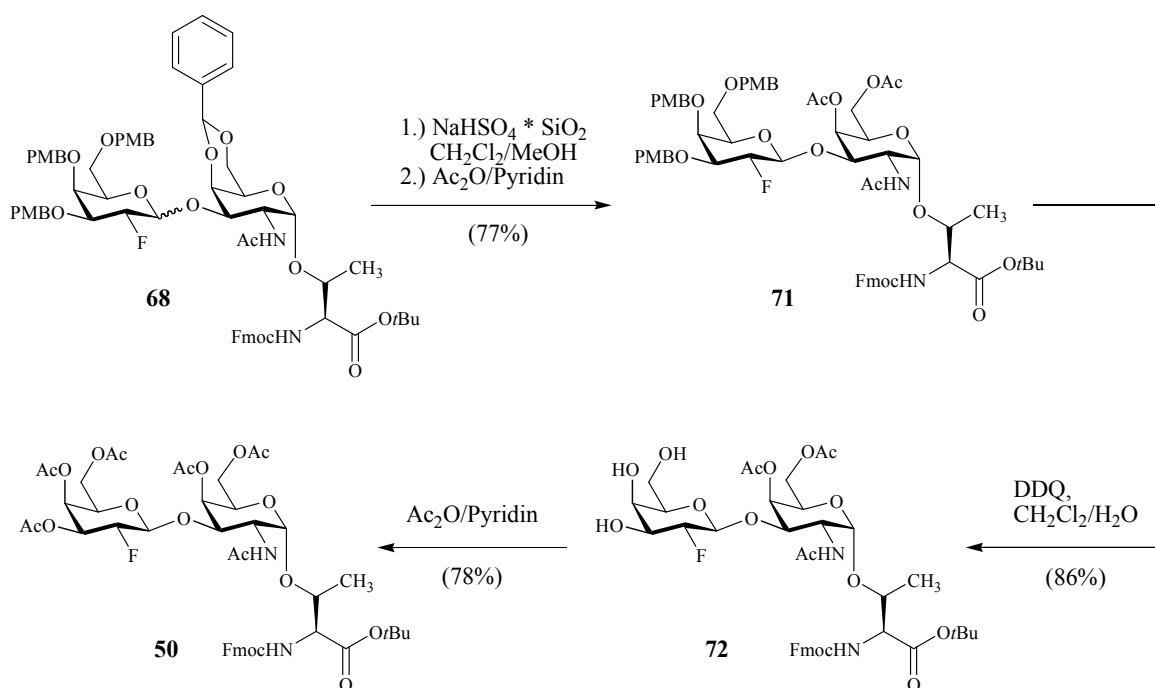


Abb. 3.2.31: Synthese des Fmoc-Thr(β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OrBu **50**

Die Verbindung **50** kann, wie im vorherigen Kapitel bereits gezeigt wurde, durch Abspaltung des *tert*-Butylethers in den Glycosylaminosäure-Baustein **51** überführt werden, der sich für den Aufbau der Glycopeptid-Analoga durch Festphasensynthese eignet (siehe Kap. 3.3.3).

3.2.2.1 Synthese des fluorierten 2,6-ST-Antigens

Mit der erfolgreichen Darstellung von Verbindung **61**, bei der die beiden Hydroxylgruppen in den Positionen C4 und C6 deblockiert vorliegen, war ein direkter Zugang zu einem 2'-Fluor-2,6-Sialyl-T-Antigen-Analogon geschaffen worden. Daher sollte diese Verbindung mit der für die natürlichen Vertreter entwickelten Strategie,^[106] d.h. durch regioselektive α -Sialylierung in Position C6 des T-Bausteins **15** unter Verwendung des Xanthogenat-Donors **22** synthetisiert werden. Obwohl ein ähnliches Derivat, bei dem sich ein Fluorsubstituent in Position 6 des Galactose-Bausteins befindet, bereits erfolgreich von *S. Wagner*^[169] hergestellt werden konnte, gelang die analoge Umsetzung zum 2'F-2,6-ST-Antigen zunächst nicht. So wurde in den entsprechenden Umsetzungen stets nur die Zersetzung des Donors **22** und die Bildung des Glycals **24** bei der Reaktionskontrolle durch RP-HPLC beobachtet.

Als mögliche Ursache für die mangelnde Reaktionsbereitschaft des Akzeptors **62** wird mittlerweile eine Verunreinigung durch Ca^{2+} -Salze angesehen,^[170] die eine elektrophile Aktivierung des Donors **22** scheinbar verhindern, dessen Zersetzung jedoch fördern. Während dieser Arbeiten wurde in der Arbeitsgruppe für die Säulenchromatographie ein Kieselgel mit relativ hohem Gehalt an Ca^{2+} -Ionen verwendet, wodurch z.T. auch bei anderen Glycosylierungsreaktionen Schwierigkeiten auftraten, die jedoch nach einem Wechsel zu einem Ca^{2+} -armen Kieselgel nicht mehr beobachtet wurden. Da aus Zeitgründen die Synthese des Akzeptor-Bausteins **62** nicht mehr wiederholt werden konnte, wurde versucht, diesen durch Waschen mit verd. Essigsäure weitgehend von Ca^{2+} zu befreien. Dies gelang zwar nur teilweise, doch konnte mit dem so behandelten Glycosylakzeptor schließlich das gewünschte Produkt **73** erstmals in einer Ausbeute von 3% nach Flashchromatographie und semi-präparativer RP-HPLC erhalten werden (Abb. 3.2.32).

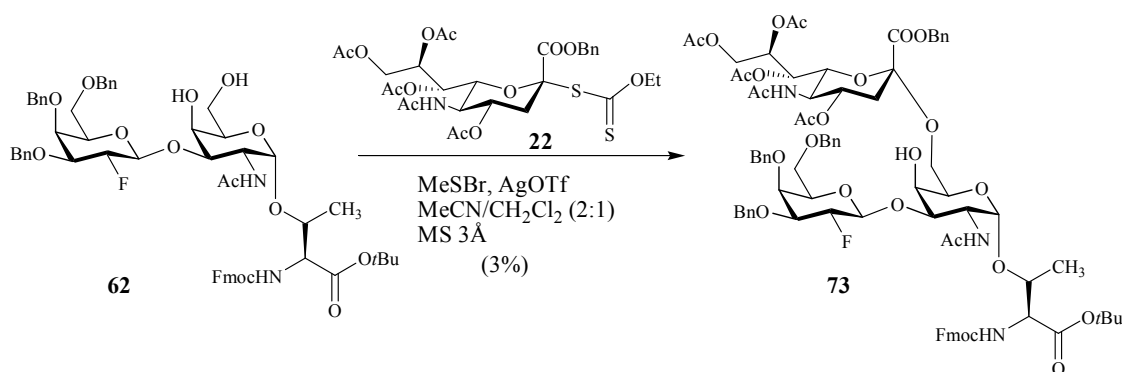


Abb. 3.2.32: Synthese des in 2-Position fluorierten Analoga des ST-Antigens

Letztere erwies sich dabei aufgrund der vergleichbaren Polarität von Akzeptor **62**, Glycal **24** und Sialosid **73** als zwingend notwendig. Um sicher zu stellen, dass es sich bei dem synthetisierten Produkt um das α -Sialosid handelt, wurde die anomere Konfiguration von **73** anhand von NMR-Daten (Differenzen der chemischen Verschiebung bzw. Kopplungskonstanten) und unter Berücksichtigung empirischer Regeln bestimmt.^[171] Im Falle des α -Anomers ist entsprechend der Karplus-Beziehung eine starke Kopplung zwischen dem C1-Atom und dem axial orientierten Proton in der 3-Position ($H_{3_{ax}}$) zu erwarten, da die Bindungen, die von beiden Kernen ausgehen, einen Winkel von 180° einschließen. Da noch keine Vergleichsdaten vorlagen, wurde von **73** zur Konfigurationsbestimmung zunächst ein HMBC-Spektrum aufgenommen, in dem bei einer α -Verknüpfung diese Kopplung zu sehen sein sollte. Liegt dagegen das β -glycosidisch verknüpfte Sialosid vor, so kommt es zu einer axial-äquatorialen-Wechselwirkung zwischen den entscheidenden Kernen, die nur zu einer schwachen Kopplung führt, und die als solche im HMBC-Spektrum nicht zu erkennen wäre. Im abgebildeten HMBC-Spektrum (Abb. 3.2.33) kann ein Kreuzpeak zwischen dem C1-Sia und dem $H_{3_{ax}}$ gefunden werden, so dass das gewünschte α -Sialosid sicher nachgewiesen ist.

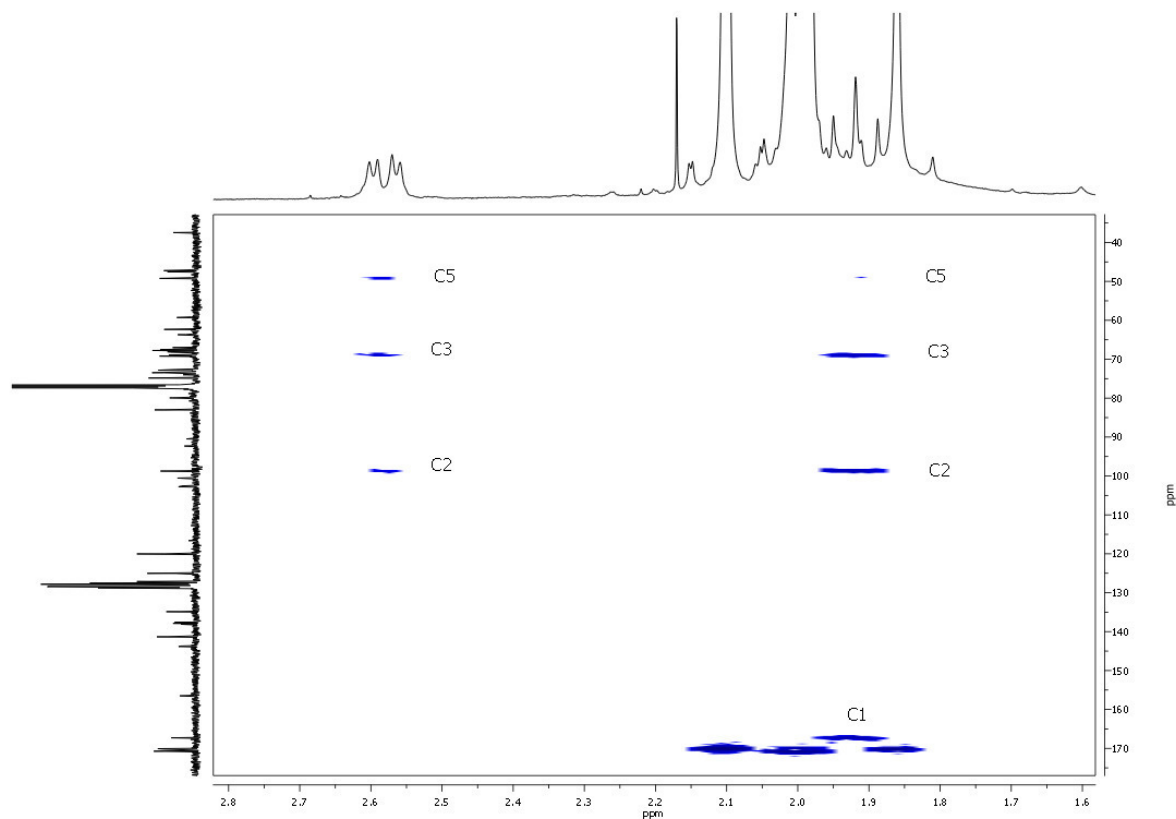


Abb. 3.2.33: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des α -Sialosids **73**

Aufgrund der geringen Ausbeute konnte das Sialosid **73** nicht in die Festphasensynthese eingesetzt werden, so dass die Synthese eines Glycopeptids mit dem 2'F-2,6-ST-Antigen-Analogons auf dieser Stufe beendet werden musste. Für zukünftige Versuche könnte der Akzeptor jedoch unter Verwendung eines Ca^{2+} -armen Kieselgels erneut synthetisiert und zur Sialylierung eingesetzt werden. Darüber hinaus wäre auch eine alternative Syntheseroute denkbar, bei der zuerst das ST_N -Antigen **74** aufgebaut werden würde,^[78] welches dann in einer regio- und stereoselektiven 3β -Galactosylierung mit den beschriebenen 2-Fluor-Galactosyl-Donoren **43** bzw. **55** zu dem 2'F-2,6-ST-Antigen-Analogon umgesetzt werden könnte (Abb. 3.2.34).

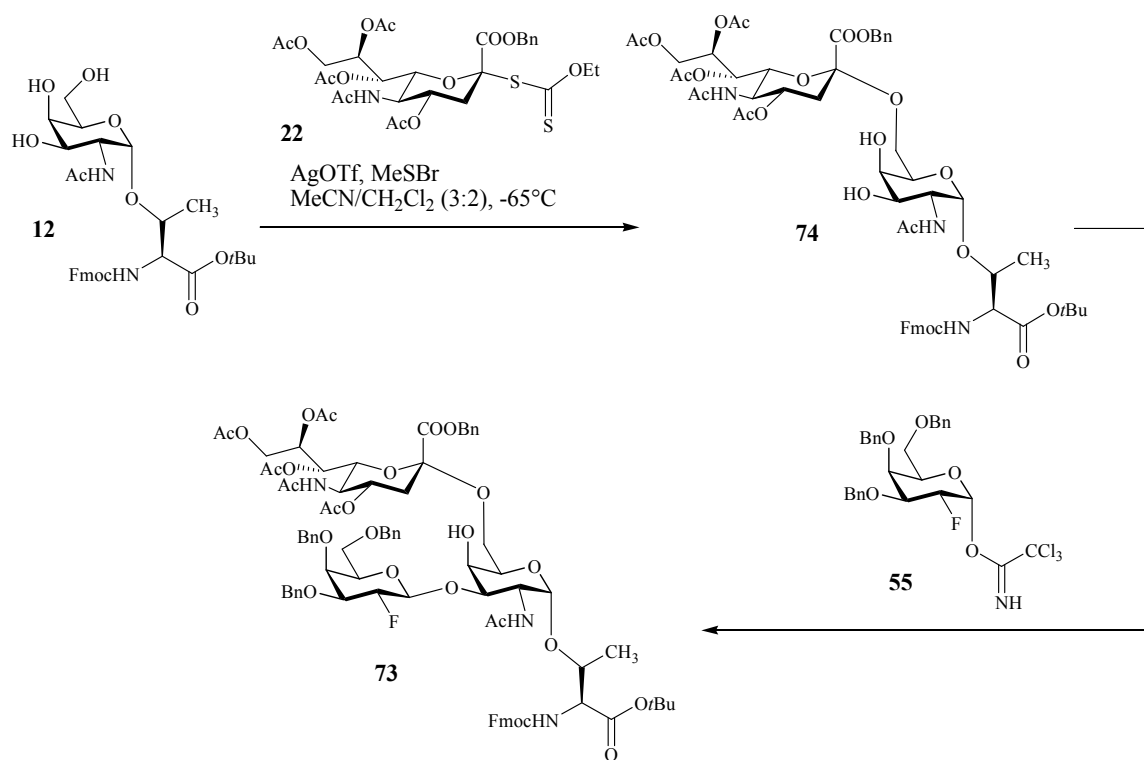


Abb. 3.2.34: Aufbau der fluorierten Analoga der sialylierten Verbindungen über das ST_N -Antigen **74**

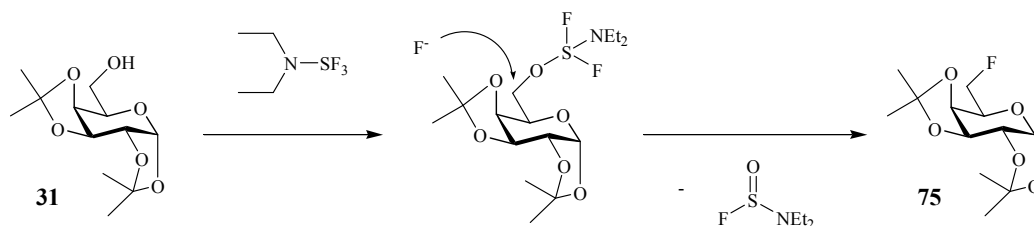
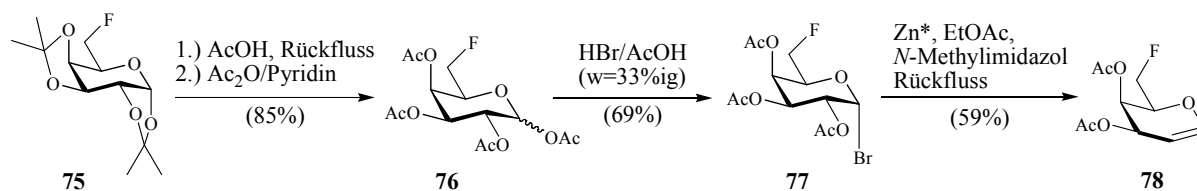
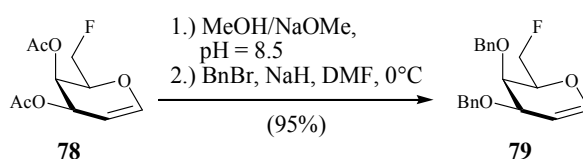


Abb. 3.2.36: Mechanismus der nucleophilen Fluorierung mit DAST

Das erhaltene Produkt **75** wurde durch Erhitzen mit 80%-iger Essigsäure von den Isopropyliden-Schutzgruppen befreit und in Gegenwart von Acetanhydrid und Pyridin acetyliert. Anschließende Behandlung von **76** mit HBr in Eisessig (w = 33%) lieferte das α -Bromid **77**, welches durch reduktive Eliminierung unter Verwendung von aktiviertem Zink und *N*-Methylimidazol in den gewünschten Galactal-Baustein **78** überführt wurde (Abb. 3.2.37).

Abb. 3.2.37: Synthese des 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactals (**78**) nach *S. Wagner*

Zur Einführung der Benzylether-Schutzgruppen, die sich in den bisherigen 3-Galactosylierungen der 2-Fluor-Donoren als besonders β -selektiv erwiesenen hatten, wurde das 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**78**) unter *Zemplén*-Bedingungen deblockiert und mit Natriumhydrid und Benzylbromid in DMF^[155] versetzt. Das gewünschte benzylierte Galactal-Derivat **79** wurde dabei in einer Ausbeute von 95% erhalten (Abb. 3.2.39).

Abb. 3.2.38: Synthese des 3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactals (**79**)

Während die anschließende elektrophile Fluorierung mit Selectfluor[®] in der Mikrowelle zunächst nur zur Bildung komplexer Produktgemische führte, konnte 3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (**80**) schließlich durch zwanzigstündiges Rühren der Reaktionsmischung bei Raumtemperatur, gefolgt von dreißigminütigem Erhitzen unter Rückfluss, in einer guten Ausbeute von 76% erhalten werden. Zur Einführung der Trichloracetimidat-Abgangsgruppe wurde **80** schließlich mit Trichloracetonitril in Gegenwart katalytischer Mengen an DBU behandelt (Abb. 3.2.39).

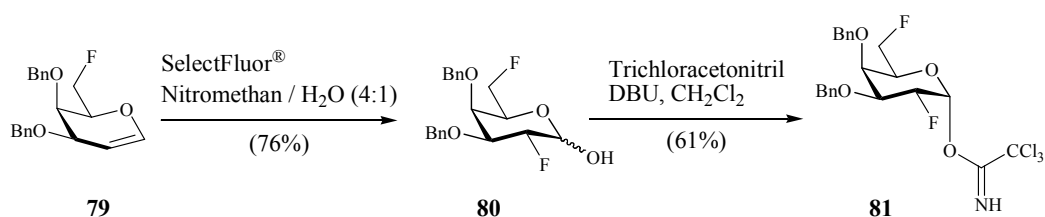


Abb. 3.2.39: Synthese des 2,6-Bisfluorierten Trichloracetimidat-Donor **81**

Für den Aufbau des 2',6'-bisfluorierten T-Antigen-Analogons **82** wurde **81** unter den zuvor ermittelten Bedingungen, d.h. durch Aktivierung mit TMSOTf in Dichlormethan und Rühren des Reaktionsgemisches unter Erwärmung von 0 °C auf Raumtemperatur, mit Akzeptor **13** umgesetzt. Das dabei erhaltene Produkt Fmoc-Thr(Bn₂Gal2,6F₂-(1→3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **82** wies bei guter Ausbeute jedoch nur ein mäßiges Anomerenverhältnis von ca. 1:3 zugunsten des gewünschten β -Produktes **82** auf (Abb. 3.2.40)

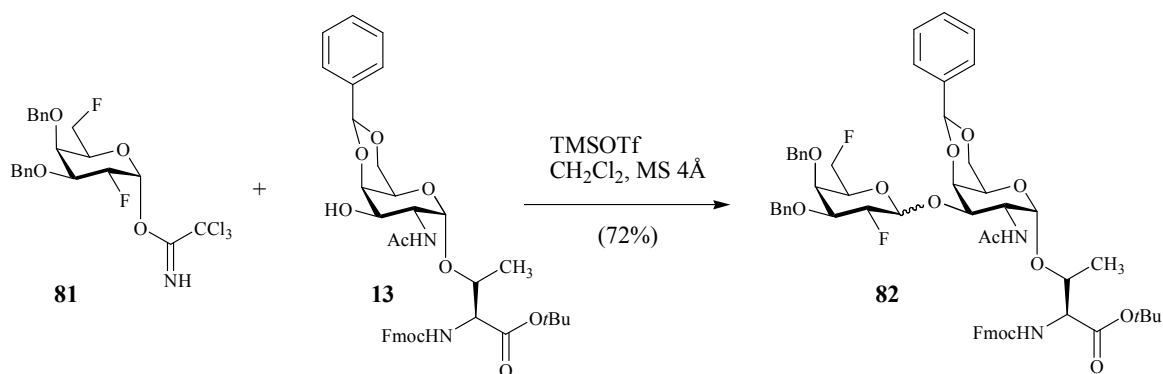


Abb. 3.2.40: Synthese des Fmoc-Thr(β Bn₂Gal2,6F₂-(1→3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **82**

Dieser deutliche Selektivitätsabfall im Vergleich zu Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1→3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **56** war zunächst unerwartet, ließe sich jedoch ebenfalls durch die

bevorzugte Reaktion des energetisch niedriger liegenden Oxocarbeniumionen-Konformers 3H_4 **83** erklären (Abb. 3.2.41). Während in Anwesenheit des Benzylethers an C-6 der bevorzugte Oberseitenangriff sterisch nicht gehindert ist, scheint in **84** teilweise auch der Angriff des Nucleophils von der Unterseite aus zu erfolgen. So wäre es denkbar, dass der 6-Fluorsubstituent eine stabilisierende dipolare Wechselwirkung mit dem Carbenium-Kohlenstoffatom C1 eingeht,^[149,172] wodurch die Oberseite von **83** für den Angriff des Nucleophils weniger gut zugänglich ist und der beobachtete Einbruch der Stereoselektivität resultiert.

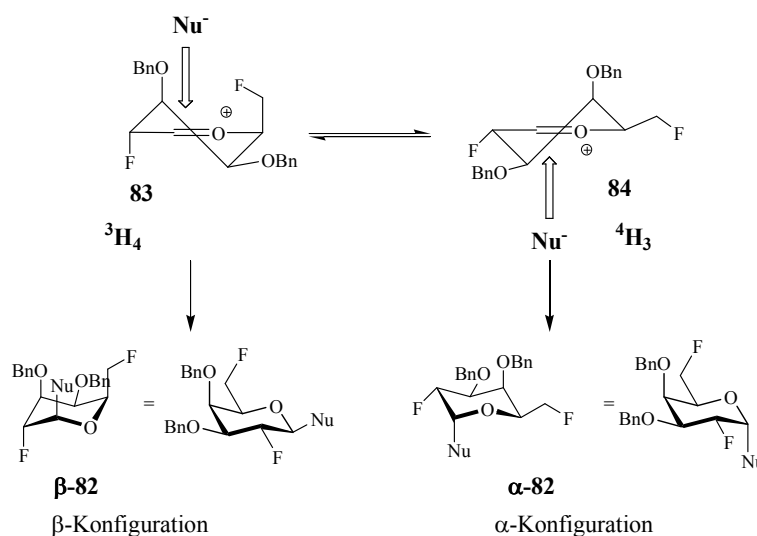
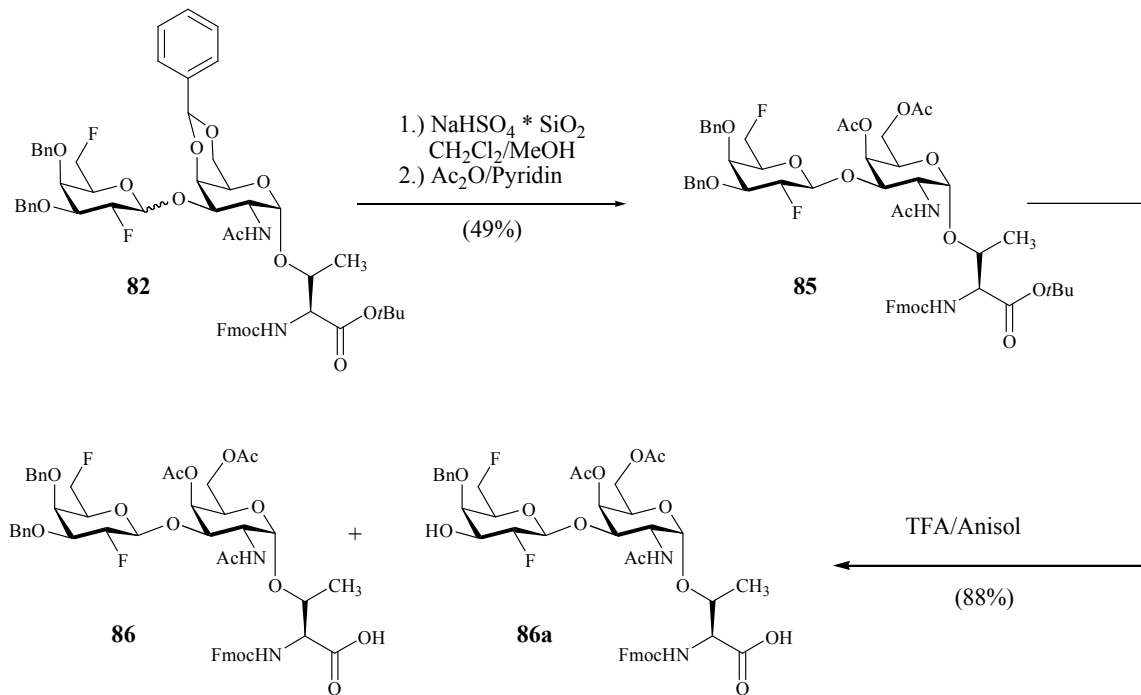


Abb. 3.2.41: Erklärung des stereochemischen Verlaufes der Glycosylierung zu **82**

Daneben könnte natürlich auch das vorliegende Gleichgewicht zugunsten des 4H_3 -Konformers **84** verschoben sein, bei dem ein Angriff durch das Nucleophil von der Unterseite ebenfalls zur Bildung des α -Disaccharids führt. Allerdings sollte Konformer **84** eine höhere Grundzustandsenergie als **83** besitzen, da durch die axialen Stellungen der Substituenten keine attraktiven Dipolwechselwirkungen mit den Fluoratomen möglich sind.

Nach saurer Hydrolyse der Benzylidenacetalschutzgruppe, Acetylierung der freien Hydroxylgruppen sowie Spaltung des *tert*-Butylesters wurde Disaccharid **85** mit einer Ausbeute von 43% über die drei Stufen ebenfalls in den Festphasen-Baustein **86** für die Glycopeptidsynthese überführt (Abb. 3.2.42). Dabei kam es, wie schon zuvor bei **63**, trotz vorsichtigen Kodestillierens mit größeren Mengen an Toluol zu einem teilweisen Verlust der Benzylether-Schutzgruppe an C3 (**86a**), dessen Anteil jedoch laut RP-HPLC maximal bei ca. 10% lag. Um unnötige Substanzverluste zu vermeiden, wurde nur ein kleiner Anteil des Produktes per RP-HPLC gereinigt und der Rest direkt zur Festphasenpeptidsynthese eingesetzt.



Aus analytischer RP-HPLC wurde ein Verhältnis von **86:86a** = ca. 10:1 bestimmt.

Abb. 3.2.42: Synthese der Glycosylamino säure Fmoc-Thr($\beta\text{Bn}_2\text{Gal}2,6\text{F}_2$ -(1 \rightarrow 3)- $\alpha\text{Ac}_2\text{GalNAc}$)-OH **86**

3.3 Synthese von Glycopeptiden der TR-Domäne des MUC1

3.3.1 Allgemeines Protokoll zur Peptid- und Glycopeptidfestphasensynthese

Die chemische Synthese von Peptiden und Glycopeptiden kann sowohl in Lösung, als auch an der festen Phase erfolgen. Letztere wurde bereits 1963 von *R. B. Merrifield* entwickelt^[173,174,175] und erfordert eine Anbindung der Startaminosäure über ihre Carboxylfunktion an ein unlösliches filtrierbares Polymer, das mechanisch und chemisch inert ist. Der Vorteil dieser Festphasensynthese ist, dass man exakt definierte Strukturen in relativ kurzer Zeit aufbauen kann.^[175,176]

Die Anbindung der Startaminosäure an das Trägermaterial wird durch ein Anker-System erreicht, welches für die jeweilige Synthesestrategie individuell ausgewählt werden kann. Der Aufbau der Peptidkette erfolgt unter Verwendung geeigneter Kupplungsreagenzien sukzessive vom C-Terminus her, so dass der selektiven Blockierung und Freilegung des N-Terminus eine entscheidende Rolle zukommt (Abb. 3.3.1). Zum Schutz der Aminfunktion in der automatisierten Festphasensynthese werden hauptsächlich die *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe (Boc-Schutzgruppe) und die Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc-Schutzgruppe) verwendet. Die Deblockierung der säurelabilen Boc-Schutzgruppe erfordert jedoch eine Behandlung der wachsenden Peptidkette mit einer Lösung aus 20-50%-iger Trifluoressigsäure, die in Gegenwart von Glycanseitenketten zu deren Abspaltung führen kann.^[177,178,179] Aus diesem Grund hat sich für die Synthese von Glycopeptiden und Peptiden mit säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen die Fmoc-Strategie durchgesetzt. Von besonderem Vorteil für die Glycopeptidsynthese ist dabei die Tatsache, dass milde Basen wie Piperidin oder *N*-Methylmorpholin,^[180] die zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe eingesetzt werden können, nicht zu einer baseninduzierten β -Eliminierung der Glycane führen.

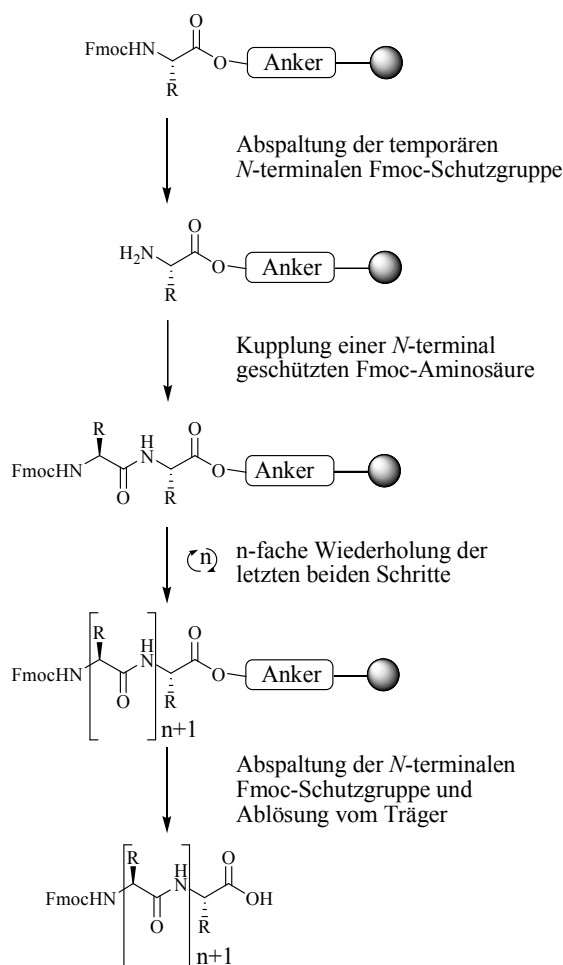
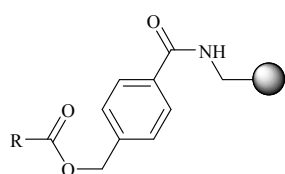


Abb. 3.3.1: Schema der Festphasensynthese mit Fmoc-Bausteinen

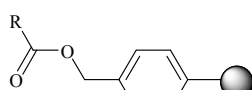
Um das fertige Peptid oder Glycopeptid erhalten zu können, muss die Sequenz noch unter Spaltung des Anker-Systems von dem Trägermaterial abgelöst werden. Dabei sollten die Abspaltungsbedingungen so mild sein, dass nicht nur die Amid- und Glycosid-Bindungen unbeeinträchtigt bleiben, sondern ggf. auch die Schutzgruppen auf den Seitenketten der Aminosäuren intakt verbleiben. Aus diesem Grund wurden vielfältige Anker-Systeme entwickelt, die sich unter den unterschiedlichsten Bedingungen abspalten lassen.^[181,182,183]

Da es bei der Abspaltung von basenlabilen Ankern wie dem HMBA-Linker (4-Hydroxymethylbenzoesäure)^[184] (Abb. 3.3.2) leicht zur Aspartimidbildung und Racemisierungen als Nebenreaktion kommen kann, wurden extrem säurelabile Systeme entwickelt, die dies umgehen. Ein Beispiel für ein solch extrem säurelabiles System stellt das SASRIN-Harz^[185] (super acis sensitive resin) dar. Dabei erleichtert die im Vergleich zum Merrifield-Harz^[173] zusätzlich eingebaute *O*-Methoxygruppe die säurevermittelte Abspaltung des Anker-Systems von der Peptidkette durch die Stabilisierung des intermediär erhaltenen Carbokations. Neben

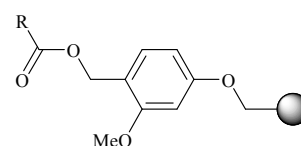
diesem säurelabilen System gibt es noch weitere Anker-Systeme, wie das Wang-Harz,^[186] das Rink-Säure-Harz^[187] oder das Trityl-Harz.^[188] Deren milde Abspaltbedingungen ermöglichen somit die Herstellung von vollständig geschützten Glycopeptiden. Ein weiterer Vorteil dieser Harze ist, dass man gleichzeitig zur Abspaltung des Peptides, auch die säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen entfernen kann. Ist dies nicht gewünscht, kann zudem auch auf fluoridspaltbare (wie PTMSEL),^[189] allylische (wie HYCRON)^[190,191,192] und photolabile^[193,194] Anker-Systeme zurückgegriffen werden (vgl. Abb. 3.3.2). Eine gute Übersicht über die zur Verfügung stehenden Anker für die Festphasenpeptidsynthese findet sich in dem Artikel von I. W. James.^[182]



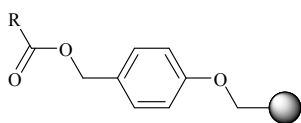
HMBA-Harz: Spaltbar mit aq. NaOH



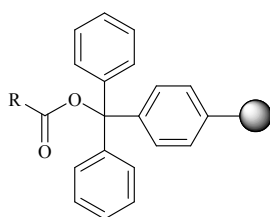
Merrifield-Harz: Spaltbar mit HF



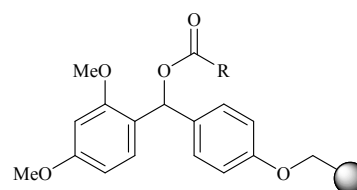
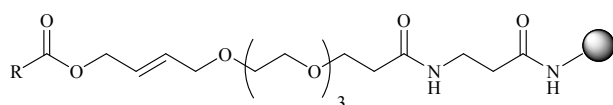
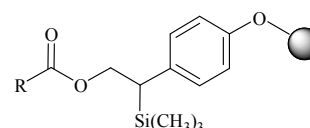
SASRIN-Harz: Spaltbar mit 1%-iger TFA



Wang-Harz: Spaltbar mit 50-90%-iger TFA



Trityl-Harz: Spaltbar mit TFA

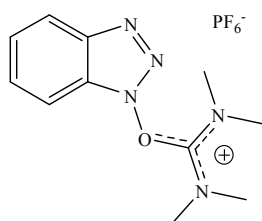
Rink-Säure-Harz: Spaltbar mit 10%AcOH in CH₂Cl₂HYCRON-Linker: Spaltbar mit Pd(0) und *N*-Methylanilin

PTMSEL-Linker: Spaltbar mit Fluorid

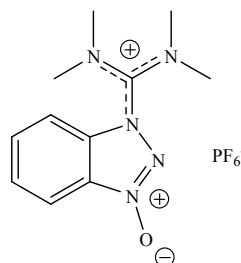
Abb. 3.3.2: Anker-Systeme für die Fmoc-Festphasensynthese

Für eine erfolgreiche Kupplung der Aminosäure-Bausteine ist die Wahl des Kupplungsreagenzes entscheidend, wobei sowohl die Stabilität und Reaktivität der aktivierten Aminosäure, als auch deren Racemisierungsneigung zu beachten sind.^[195] Die Aktivierung von Aminosäuren kann durch deren Überführung in Säureanhydride,^[196] Azide,^[196] Säurehalogenide^[197] oder *in situ* unter Einsatz von Carbodiimiden, wie *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[198], *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)^[199] oder *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) erfolgen. Eine weitere sehr

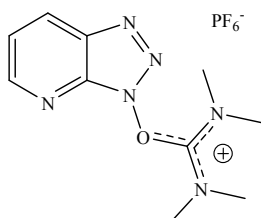
effektive *in situ*-Aktivierungsmethode erfordert die Bildung von Aktivestern, wofür gewöhnlich Oniumsalze^[200] wie z.B. Phosphoniumsalze^[201,202] oder Uroniumsalze verwendet werden (Abb. 3.3.3). Häufig verwendete Uroniumsalze sind das *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU),^[203] das *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU)^[204] und das 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorophosphat (HBTU)^[205] (Abb. 3.3.3). Inwiefern diese Verbindungen tatsächlich als Uroniumsalze (*O*-Form) oder aber als Guanidiniumsalze (*N*-Form) vorliegen, hängt von den Bedingungen des Herstellungsprozesses ab. So lagert sich die *O*-Form unter basischen Bedingungen in die *N*-Form um, die zudem die reaktivere Form der beiden Reagenzien darstellt.^[206]



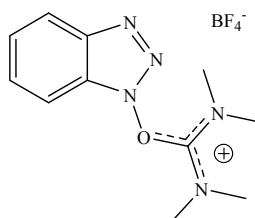
2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorophosphat (HBTU, *O*-Form)



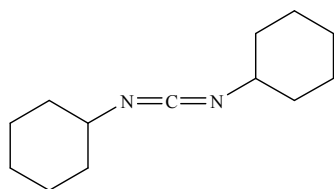
2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorophosphat (HBTU, *N*-Form)



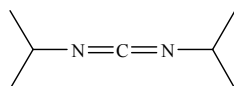
O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)



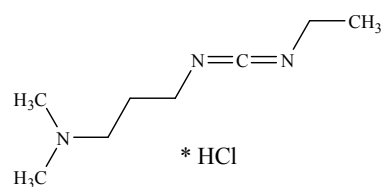
O-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU, *O*-Form)



N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)



N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC)



N-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)

Abb. 3.3.3: Gebräuchliche Kupplungsreagenzien zum Aufbau der Amidbindung

Als Kupplungsreagenzien haben sich die Uroniumsalze besonders dadurch bewährt, dass sie in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[207] oder 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)^[208] die Racemisierung deutlich reduzieren. Der sich unter diesen Bedingungen bildende Aktivester (**87**) besitzt zwar eine im Vergleich zu den *O*-Isoacylharnstoffen etwas geringere Reaktivität, ist aber dennoch reaktiv genug, um eine schnelle Amidbindung zu gewährleisten (Abb. 3.3.4).

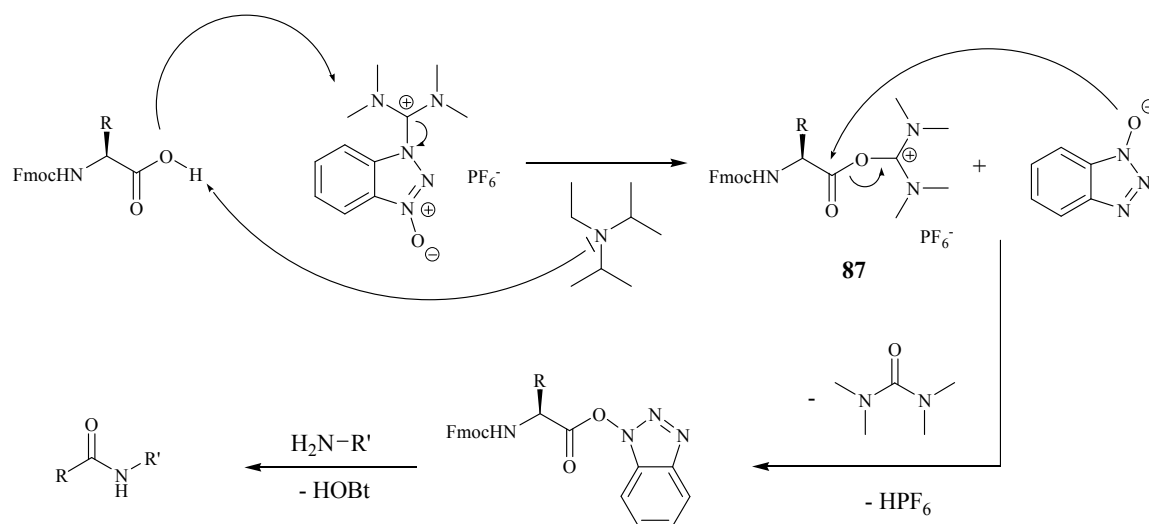


Abb. 3.3.4: Reaktionsmechanismus der Aktivester-Methode

Vergleicht man den HOAt- mit dem HOBt-Aktivester, so zeichnet sich ersterer durch eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit aus. Während der Aminolyse kommt es zu einer Vororientierung des angreifenden Amins über eine intermolekulare Wasserstoffbrücke an den Aktivester, wodurch eine Beschleunigung der Amidbindungsbildung resultiert (Abb. 3.3.5). Für anspruchsvolle Kupplungsreaktionen, wie den Einbau einer sterisch gehinderten Glycosylaminosäure, wird daher das reaktivere Reagenzienpaar HATU/HOAt in Gegenwart von *Hünigs*-Base *N,N'*-Diisopropylethylamin (DIPEA) verwendet.

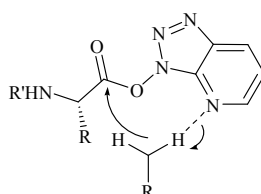
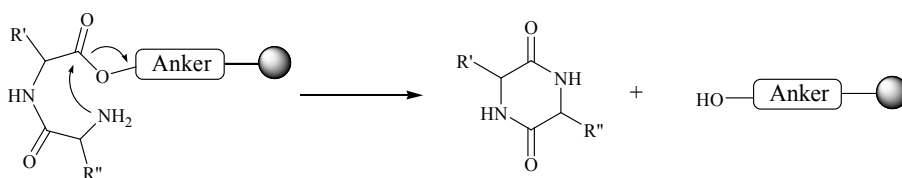


Abb. 3.3.5: Vororientierung der Aminkomponente bei der Verwendung von HOAt

Trotz der positiven Effekte, den die Verwendung der modernen Kupplungsreagenzien häufig auf Ausbeute und Reinheit des Peptids erzielen, können Nebenreaktionen die Menge des gewünschten Produktes deutlich reduzieren. Wird die Festphasensynthese beispielsweise von Prolin, Alanin oder Glycin aus begonnen, kann während der Fmoc-Abspaltung eine unerwünschte basenkatalysierte intramolekulare Aminolyse der Esterbindung auf der Stufe des Dipeptids auftreten, die zur Ausbildung eines 2,5-Diketopiperazins führt.^[209,210] Dabei wird das Dipeptid vom polymeren Träger abgelöst, so daß letzten Endes ein Verlust der wachsenden Peptidkette resultiert (Abb. 3.3.6). Neben den oben erwähnten Aminosäuren begünstigen auch D-Aminosäuren und *N*-Alkylaminosäuren in den entsprechenden Dipeptiden die Diketopiperazinbildung.



Diketopiperazinbildung

Abb. 3.3.6: Bildung des Diketopiperazins

Um die Diketopiperazinbildung unterdrücken zu können besteht die Möglichkeit einen voluminösen Anker, wie den 2-Chlortrityl-Anker,^[211] einzusetzen. Durch den sterischen Anspruch des Tritylankers wird der Abstand zwischen dem Harz und der Aminosäure vergrößert, wodurch die Diketopiperazinbildung effizient vermindert wird.^[212] Dies ist vor allem für die gewählte MUC1-Peptidsequenz entscheidend, für deren Aufbau ein mit Prolin vorbeladenes TentaGel-Trityl-Harz^[213,214] eingesetzt wurde.

Probleme können zudem bei einem Einbau der Aminosäure Asparaginsäure auftreten. So kann diese einen Ringschluss zu einem Succinimid eingehen, das in einer anschließenden Ringöffnungsreaktion mit dem Nucleophil, zu dem α -Aspartyl-Peptid und einem unerwünschten β -Aspartyl-Peptid reagieren kann (Abb. 3.3.7). Diese Nebenreaktion ist sequenzabhängig und tritt besonders häufig auf, wenn Asparaginsäure auf die Aminosäuren Asparagin, Glycin, Alanin oder Glutamin folgt.^[215] Durch den Einsatz des sterisch anspruchsvollen *tert*-Butylesters als β -Carboxylschutzgruppe kann die Bildung des β -Aspartyl-Peptids zurückgedrängt werden. Zu rechnen ist mit einer solchen Aspartimid-

umlagerung allerdings auch bei der abschließenden Abspaltung der Seitenketten-Schutzgruppen.

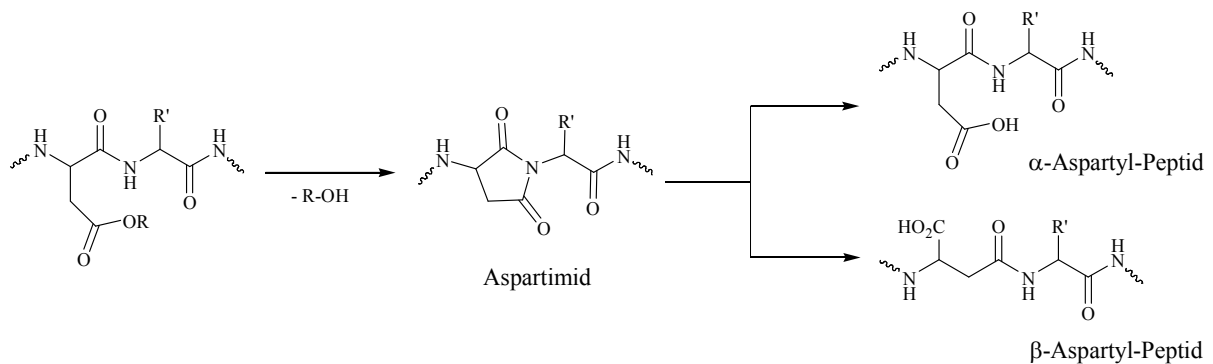


Abb. 3.3.7: Aspartimid-Umlagerung

Des Weiteren kann in Anwesenheit von Arginin-Derivaten eine Nebenreaktion auftreten, bei der zunächst die nucleophile Guanidinium-Gruppe acyliert wird und das Acylierungsprodukt durch die Abspaltung eines 2-Iminoimidazolidins zu einem Ornithin-Derivat führt (Abb. 3.3.8).

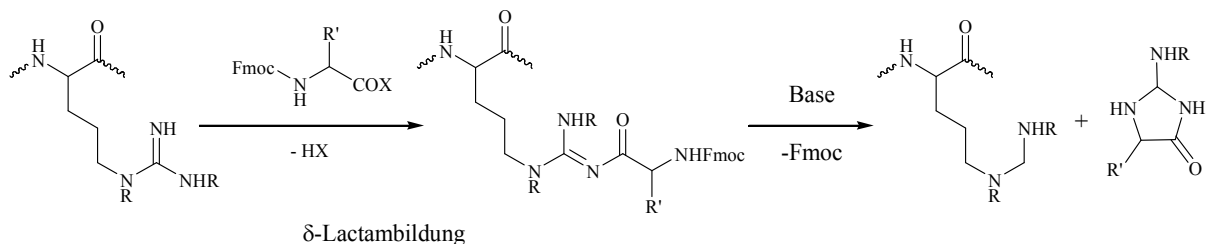


Abb. 3.3.8: δ -Lactambildung in aktivierten Arginin-Derivaten und die Bildung von Ornithin-Derivaten aus Arginin-Derivaten

Durch die Verwendung einer Sulfonylschutzgruppe, wie der Pmc-Schutzgruppe, (siehe Abb. 3.3.9) kann die Nucleophilie der Guanidino-Gruppe jedoch soweit herabgesetzt werden, dass die Gefahr dieser intramolekularen Lactambildung nicht mehr besteht.^[216,217,218] Von Vorteil ist zudem, dass die Abspaltung der Sulfonyl-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen erfolgt, wobei die Labilität der Pmc-Gruppe mit der eines *tert*-Butylesters vergleichbar ist (Abb. 3.3.9). Hierbei ist es jedoch notwendig, ein geeignetes Abfangreagenz (z.B. Wasser) einzusetzen, um eine Sulfonierung der Seitenketten von Threonin und Serin zu verhindern.^[219]

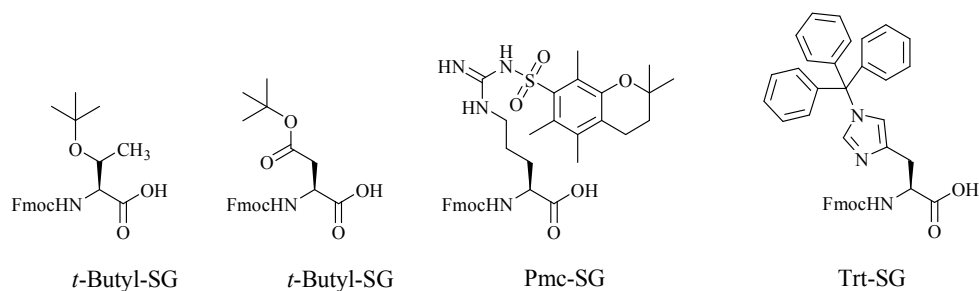


Abb. 3.3.9: Sekundäre Schutzgruppen für Threonin, Asparaginsäure, Arginin und Histidin

3.3.2 Allgemeines Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptide

Die Festphasensynthese der in dieser Arbeit beschriebenen MUC1-Glycopeptide erfolgte nach der Fmoc-Strategie und unter Verwendung von TentaGel-Harzen, die mit der Start-aminosäure Fmoc-Prolin bereits vorbeladen waren. Um einen guten Zugang zu den Reaktionszentren im Harz zu gewährleisten, muss dieses in den verwendeten Lösungsmitteln ausreichend quellen. Durch die Verwendung von polaren Lösungsmitteln während der Festphasensynthese eignen sich die sonst häufig verwendeten mit Divinylbenzol quervernetzten Polystyrol-Harze weniger, während die TentaGel-Harze mit ihren angepfropften Polyethylenglycolseitenketten in diesen Lösungsmitteln gute Quelleigenschaften aufweisen. Für die Synthese eines kurzen Glycopeptids (MUC1-9-mer) für Testzwecke wurde zudem ein Polystyrol-2-Chlortrityl-Harz verwendet, das die Isolierung des geschützten Glycopeptides erlaubt. Um eine gegenseitig Beeinflussung der wachsenden Peptidstränge zu vermeiden, wurden relativ niedrige Beladungszahlen gewählt, die bei den TentaGel-Harzen im Bereich von 0.17-0.23 mmol/g lagen. Als Schutzgruppen für die Hydroxylgruppen von Threonin und Serin sowie für die Säurefunktion der Asparaginsäure wurden säurelabile *tert*-Butylester verwendet. Die Guanidino-Funktion der Arginin-Bausteine wurde mit der säurelabilen 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-Gruppe (Pmc) blockiert und die Hydroxylgruppen der Glycopeptid-Bausteine wurden entweder durch Acetyl-Gruppen oder Benzylether geschützt (Abb. 3.3.9).

Sämtliche Glycopeptide wurden unter Verwendung eines Perkin-Elmer Applied Biosystems ABI 433 A Peptidsynthesizers nach einem automatisierten Standard-Protokoll (*Fastmoc*) in iterativen Synthesesyklen hergestellt. Jeder dieser automatisierten Zyklen setzt sich aus drei Teilschritten zusammen: Der erste Schritt ist die Entfernung der terminalen *Fmoc*-Schutzgruppe durch wiederholte Behandlung mit einer Lösung von Piperidin in NMP (20%-ig). Dieser Schritt wird i. d. R. dreimal wiederholt und durch UV-spektroskopische Messung des als Abspaltungsprodukt entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes kontrolliert (siehe Abb. 3.3.10). Dabei erlaubt der Vergleich der Extinktionswerte in der Synthese Rückschlüsse auf den Erfolg der einzelnen Kupplungsschritte. Nach der Freisetzung des *N*-Terminus erfolgt die Knüpfung der Peptidbindung. Die Dauer eines Kupplungsschrittes, bei dem 1.00 mmol (10 Äquiv.) Aminosäure mit jeweils 1.00 mmol der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt und DIPEA umgesetzt werden, beträgt 20-30 min. Nicht umgesetzte Aminogruppen werden anschließend in einem sog. *Capping*-Schritt mit Acetanhydrid, DIPEA und katalytischen Mengen an HOBt blockiert, um den Aufbau von (schwer abtrennbaren) Fehlsequenzen zu minimieren.

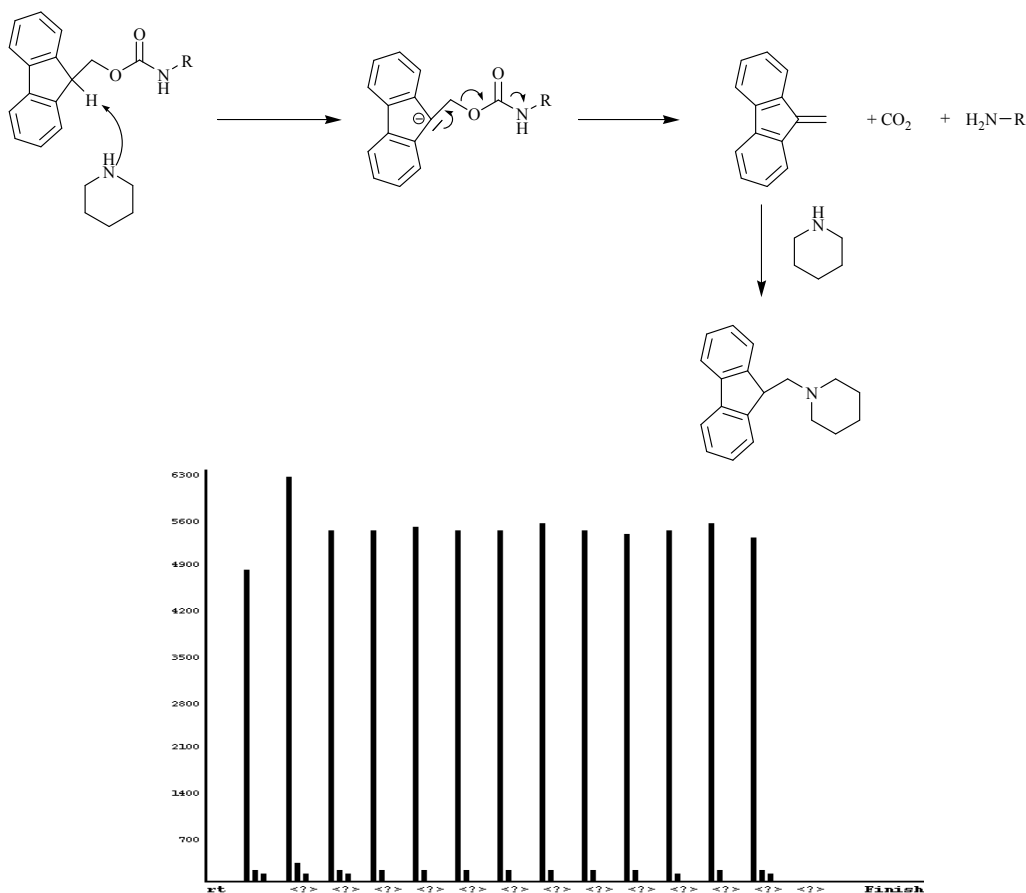


Abb. 3.3.10: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung und Abspaltungsprotokoll eines Peptids

Der Einbau der wertvollen glycosylierten Aminosäuren wird in Abweichung zu dem Standard-Protokoll mit maximal 2.5-fachen Überschüssen an Glycosylaminosäuren durchgeführt, wobei diese halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers an die Peptidsequenz gekuppelt werden. Um dabei gute Ausbeuten zu erreichen, wird zudem das reaktivere Reagenzienpaar HATU/HOAt zur Aktivierung verwendet, und die Reaktionszeit wird auf bis zu acht Stunden ausgedehnt. Anschließend erfolgt wiederum ein *Capping*-Schritt, bei dem der *N*-Terminus nicht umgesetzt Glycosylaminosäure acetyliert wird. Im Anschluss an den Aufbau der Peptidsequenz erfolgt noch die Anbindung eines Triethylenglycolspacers (s.u.) unter Verwendung der Standard-*Fastmoc*-Bedingungen, bevor das Harz in einen Merrifield-Reaktor überführt und das Peptid bzw. Glycopeptid mit einer Mischung aus TFA, Triisopropylsilan und Wasser (10:1:1) vom Harz abgespalten wird. Aufgrund der Tatsache, dass unter diesen Bedingungen auch die Seitenketten der Aminosäuren deblockiert werden, müssen schließlich nur noch die Schutzgruppen des Kohlenhydrat-Bausteins entfernt werden.

Um im späteren Vakzin-Konjugat eine gute Zugänglichkeit der einzelnen Epitope des MUC1-Glycopeptids und des Carrierproteins sicherzustellen, sollen die Glycopeptide unter Verwendung eines nicht immunogenen Spacers an die Carrierproteine gebunden werden.^[100] Dabei soll durch den Einbau einer Spacer-Aminosäure nicht nur der notwendige Abstand zwischen dem MUC1-Glycopeptid und dem Carrierprotein eingehalten werden, bei dem die gegenseitige Beeinflussung der Epitope möglichst gering ist, sondern auch die Wasserlöslichkeit des Konjugats erhöht werden.

Der hierzu erforderliche Spacer-Baustein **93** wurde nach einer von *S. Keil*^[100,220,221] beschriebenen Route ausgehend von Triethylenglycol aufgebaut (Abb. 3.3.11), wobei **88** zunächst durch eine Hetero-Michael-Addition mit Acrylsäure-*tert*-butylester in den 12-Hydroxy-4,7,9-dioxanonansäure-*tert*-butylester **89** überführt wurde. Nach Mesylierung der Hydroxylgruppe von **89** wurde diese durch Natriumazid substituiert. Die Reduktion der Azid-Funktion von **90** mit Wasserstoff unter Verwendung von Raney-Nickel in Isopropanol lieferte den 12-Amino-4,7,9-dioxanonansäure-*tert*-butylester **91** (Abb. 3.3.11).

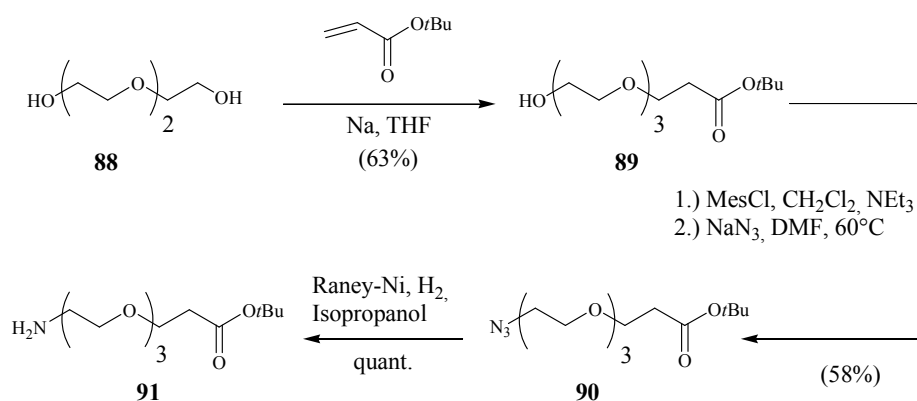


Abb. 3.3.11: Synthese des 12-Amino-4,7,9-dioxanonansäure-*tert*-butylester (**91**)

Nach Einführung der Fmoc-Schutzgruppe mit Fmoc-OSu in Aceton/Wasser (1:1) wurde Baustein **92** in guter Ausbeute erhalten. Die abschließende Deblockierung des *tert*-Butylesters erfolgte mit einer Mischung aus TFA und Wasser (10:1), wobei der gewünschte Synthese-Baustein **93** erhalten wurde (Abb. 3.3.12).

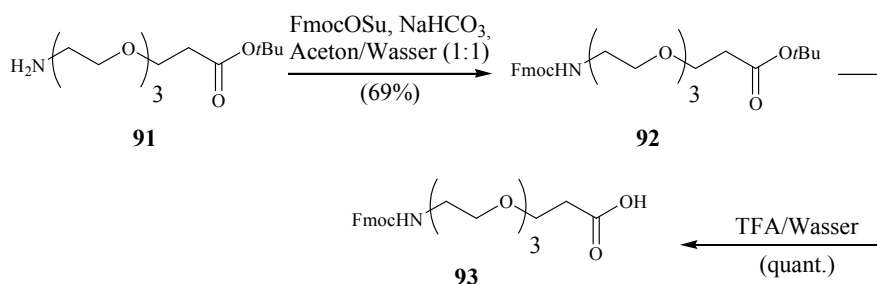


Abb. 3.3.12: Synthese des Triethylglycolspacers **93**

3.3.3 Synthese von MUC1-Eicosapeptiden

Um in immunologischen Studien einen Vergleich der fluorsubstituierten Glycopeptid-Vakzine mit den bereits in der Arbeitsgruppe Kunz vorhandenen Konjugaten mit natürlicher Antigenstruktur^[222,223] erlauben zu können, wurden vollständige *tandem repeat*-Sequenzen des Mucins MUC1 hergestellt, bei denen sich die fluorierten Glycosylaminosäuren stets in Position 6 befinden. Als Vergleichssubstanz wurde zudem das entsprechende MUC1-Eicosapeptid **98** mit T-Antigen-Einheit synthetisiert.

Wie oben bereits beschrieben wurde, erfolgte die Kupplung der nicht glycosylierten Aminosäuren nach dem Standard-Kupplungsprotokoll, während die Anbindung der Glycosylaminosäure **17** den Einsatz von HATU/HOAt und eine Reaktionszeit von acht Stunden benötigte. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz wurde in einem *Merrifield*-Reaktor unter Verwendung von TFA, TIS und Wasser (10:1:1) durchgeführt und das partiell geschützte Glycopeptid **94** wurde in einer Ausbeute von 37% nach semi-präparativer RP-HPLC erhalten (Abb. 3.3.13, genauere Informationen zu den Festphasensynthesen siehe Kapitel 7). Die verbliebenen Acetyl-Schutzgruppen der Glycanseitenkette wurden durch Umestern mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) bei einem pH-Wert von 10 entfernt.

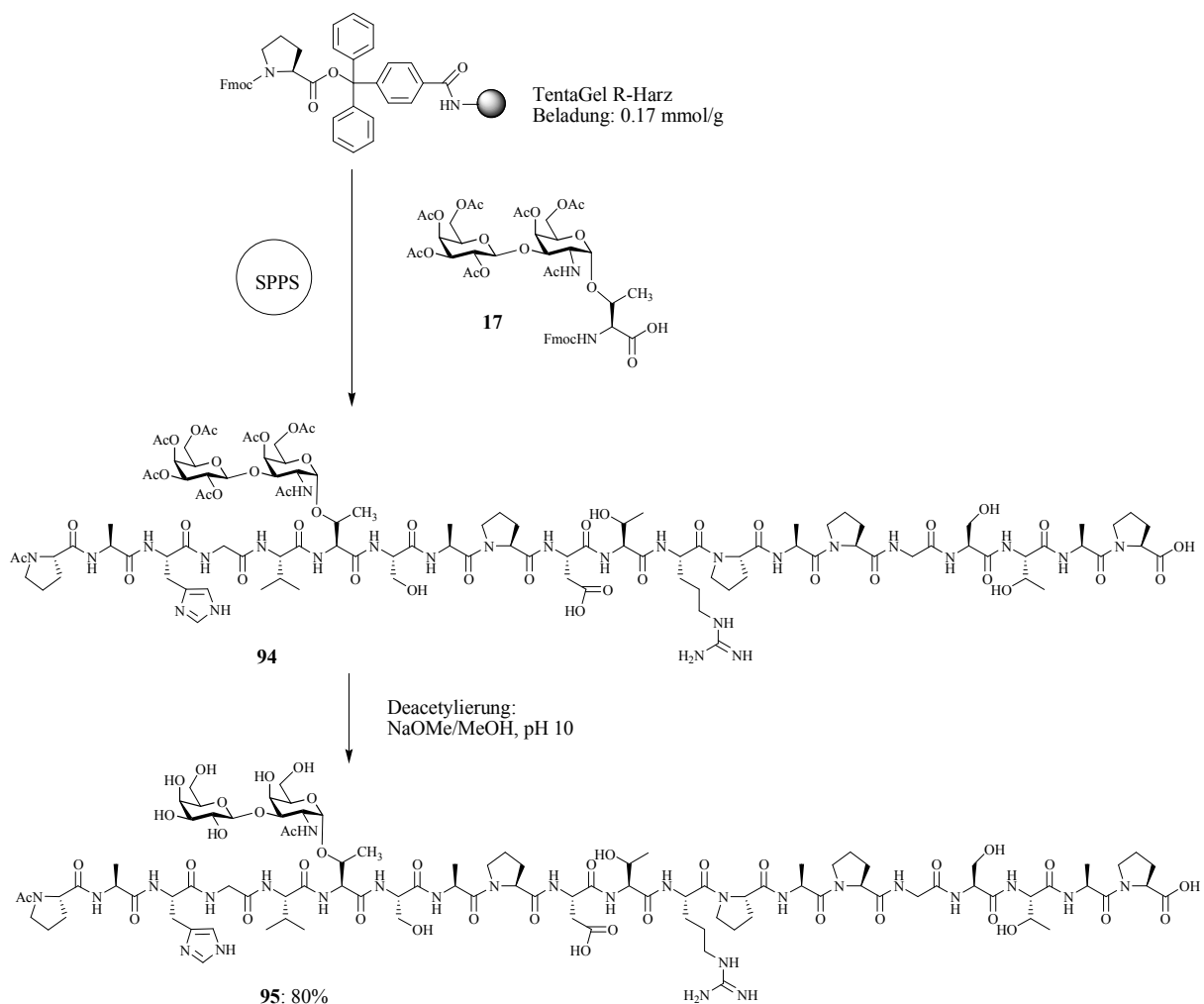


Abb. 3.3.13: Festphasensynthese des MUC1-Glycopeptides **95**

Bei diesem Schritt ist auf ein genaues Einstellen des pH-Wertes zu achten (Reaktionskontrolle mittels analytischer RP-HPLC), da es unter basischeren Bedingungen und langen Reaktionszeiten zu einer β -Eliminierung, d.h. zum Verlust des Glycans, kommen kann. Im vorliegenden Fall konnte das vollständig geschützte Glycopeptid **95** nach semi-präparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 80% erhalten werden (Abb. 3.3.13, genauere Informationen zu den Festphasensynthesen siehe Kapitel 7). Dieses Glycopeptid **95**, das noch keine Spaceramino-säure trägt, kann zwar nicht für den Aufbau eines Vakzins, wohl aber für Neutralisations-experimente im Rahmen von Analysen der humoralen Immunantwort, sowie für strukturelle Untersuchungen (NMR-Studien) verwendet werden.

Der Aufbau eines analogen MUC1-Glycopeptid **96**^[224] mit Triethylenglycolspacer gelang ebenfalls mithilfe des beschriebenen Verfahrens (Abb. 3.3.14), wobei die Kupplung der Spaceramino-säure **93** nach dem Standard-Kupplungsprotokoll erfolgte. Nach dem Abspalten der Fmoc-Gruppe vom *N*-Terminus und Freisetzen des Glycopeptids wurde das erhaltene Rohprodukt durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt und das gewünschte Peptid wurde in einer Ausbeute von 24% erhalten. In gleicher Weise gelang auch die Herstellung eines Spacer-funktionalisierten Glycopeptids mit 2,6-ST-Antigen-Einheit **97**,^[224] das ausgehend von **30** in 19% Ausbeute nach semi-präparativer RP-HPLC erhalten wurde.

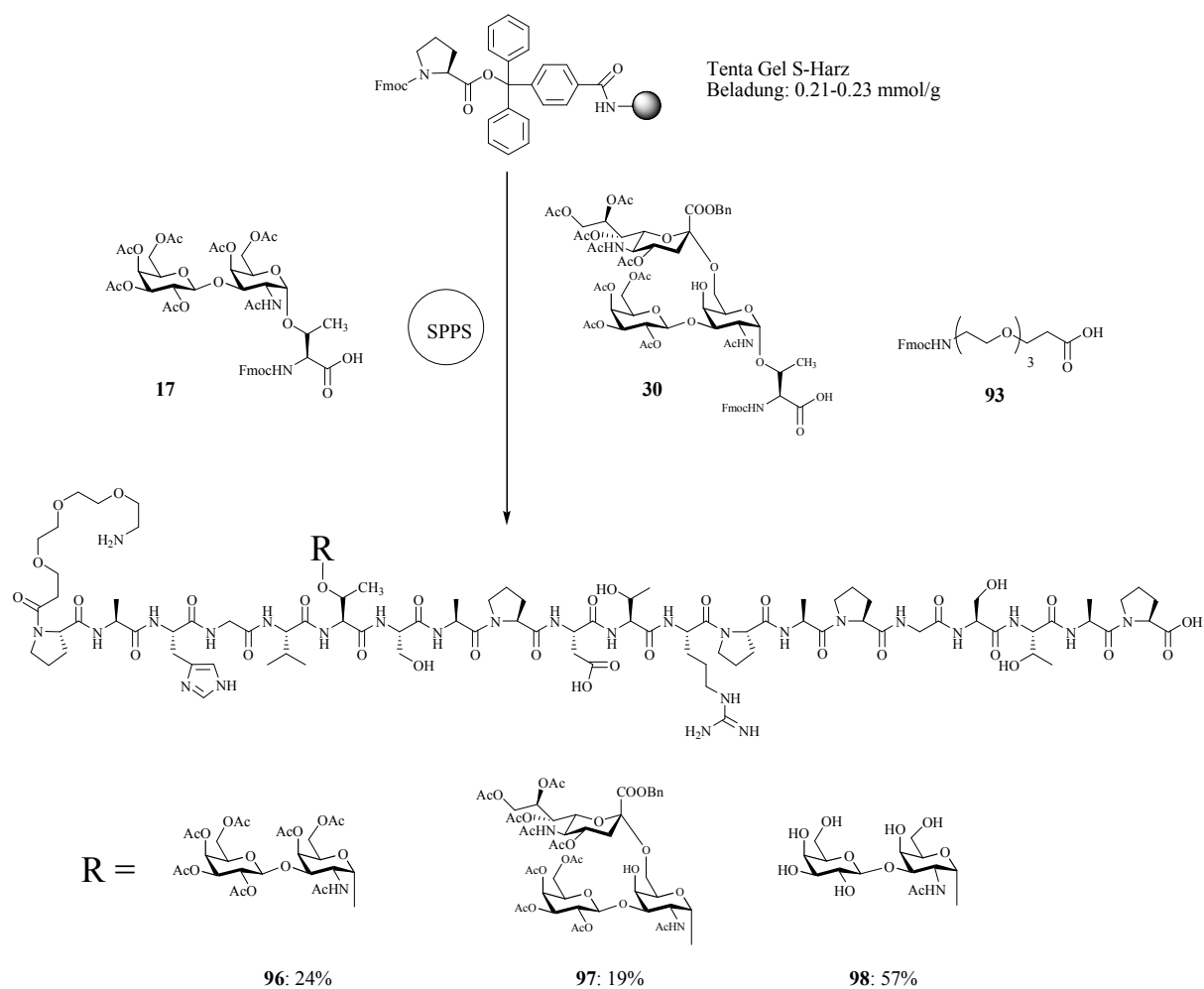


Abb. 3.3.14: Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptide

Die abschließende Deblockierung der Zuckerhydroxylgruppen wurde jedoch nur an dem Glycopeptid **96** durchgeführt. Dazu wurde dieses in Methanol gelöst und mit einer frisch hergestellten methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) solange versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5-10 erreicht war. Nach der vollständigen Deacetylierung konnte das Glycopeptid **98** durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt und in einer Ausbeute von 57% erhalten werden.

3.3.4 Synthese von fluorierten Glycopeptiden

Der Einbau des hergestellten fluorierten Glycosylaminosäure-Bausteins Fmoc-Thr(β Ac₃Gal2F-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-OH **51** sollte zunächst an einem Modellpeptid aus der *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 getestet werden. Dazu wurde ein neun Aminosäuren umfassender Ausschnitt mit der Sequenz SAPDTRPAP gewählt, der nach dem zuvor beschriebenen Verfahren an einem mit Fmoc-Prolin vorbeladenen Polystyrol-2-Chlortrityl-Harz aufgebaut wurde. Der Einbau des 2'-Fluor-TF-Threonin-Konjugates **51** erfolgte in Position 5 dieser Sequenz unter Verwendung von zwei Äquivalenten der Glycosylaminosäure **51** innerhalb von acht Stunden. Nach der Anbindung der verbleibenden vier Aminosäuren wurde das polymergebundene Glycopeptid mit einer Mischung aus TFA, Triisopropylsilan und Wasser (10:1:1) behandelt. (Abb. 3.3.15, für genauere Informationen zu den Festphasensynthesen siehe Kapitel 7). Die Abspaltung der Kohlenhydrat-Schutzgruppen erfolgte wie zuvor durch Behandlung mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) bei einem pH-Wert von 9.5. Der Reaktionsverlauf wurde durch RP-HPLC kontrolliert und nach Beendigung der Reaktion wurde das Rohprodukt schließlich durch semi-präparative RP-HPLC gereinigt. Dabei konnte das vollständig deblockierte Glycopeptid in einer Ausbeute von 22% isoliert werden.

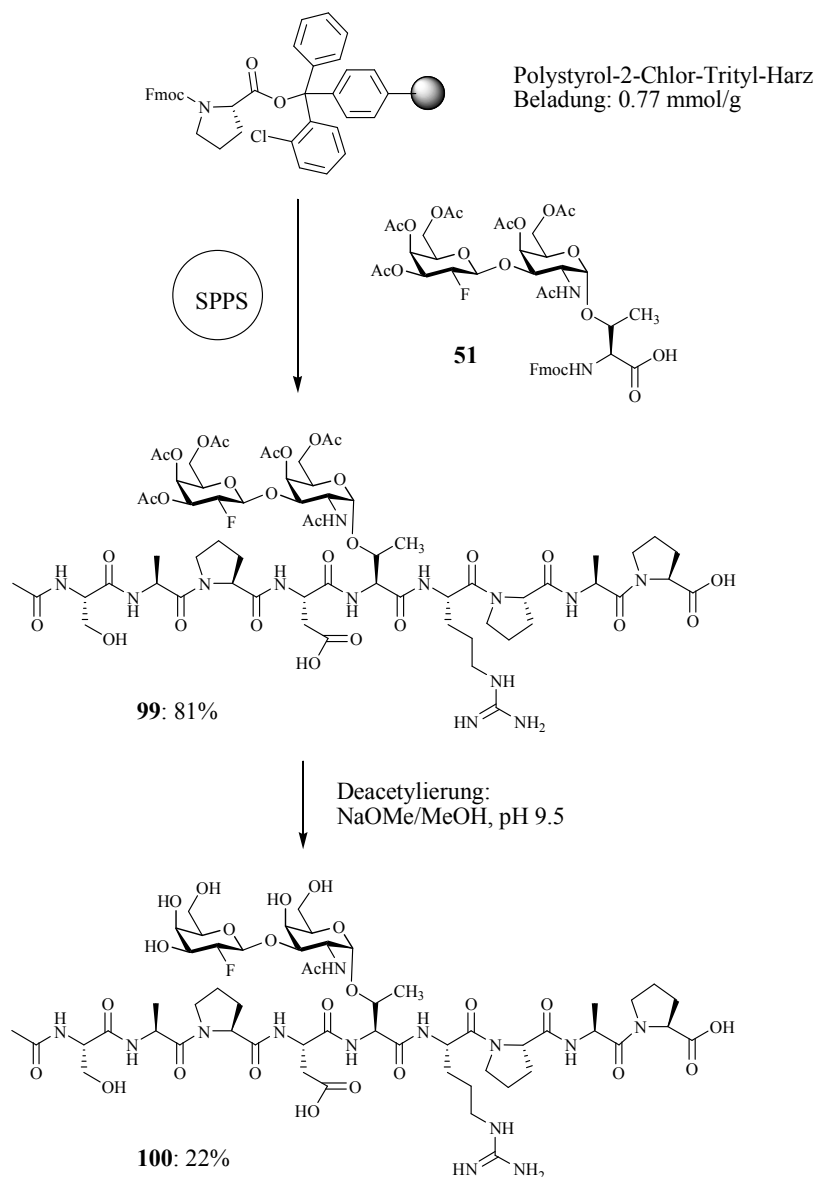


Abb. 3.3.15: Festphasensynthese des 9mer-Glycopeptides **100**

Die Herstellung der fluorierten Glycopeptid-Antigen-Analoga, bestehend aus der vollständigen „*tandem repeat*“-Sequenz und den 2'-Fluor-TF-Antigen-Analoga **51** und **63**, erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie die zuvor hergestellten natürlichen Antigenstrukturen (Siehe Kapitel 3.3.3). Im Fall der Glycosylaminosäure Fmoc-Thr(β Ac₃Gal2F-(1→3)-Ac₂GalNAc)-OH **51** wurden 2.5 Äquivalente **51** bei einer Kupplungszeit von 8 Stunden eingesetzt und das gewünschte Produkt **101** wurde nach Abspaltung von Harz und semi-präparativer RP-HPLC in einer Ausbeute von 21% erhalten. Vorsichtige Spaltung der Acetyl-Schutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen bei pH 9.5 und erneute Reinigung des erhaltenen Produkts durch RP-HPLC lieferten schließlich das Glycopeptid **102** in einer

Ausbeute von 60% (Abb. 3.3.16, für genauere Informationen zu den Festphasensynthesen siehe Kapitel 7).

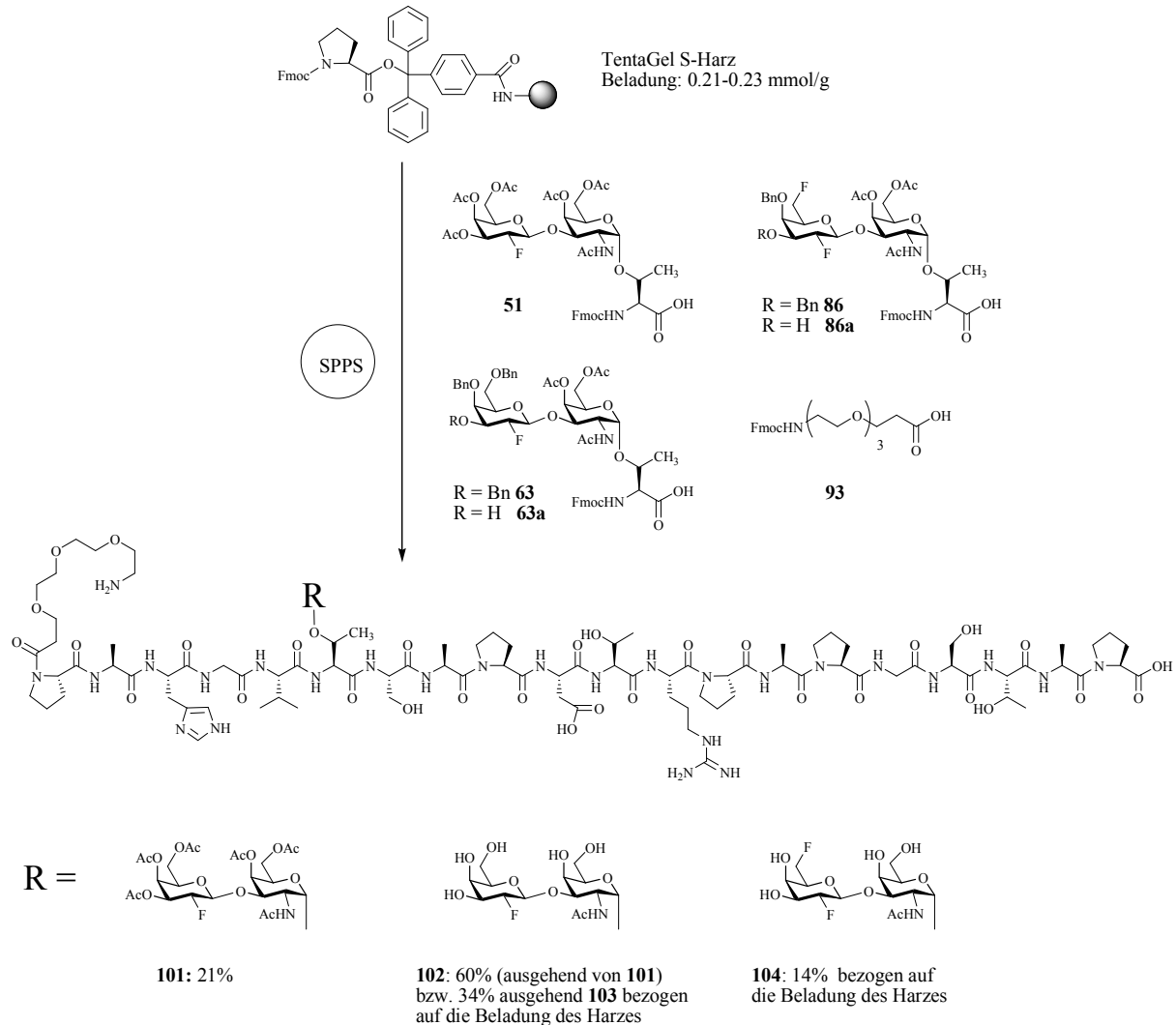


Abb. 3.3.16: Synthese der fluorierten Glycopeptide

Bei der analogen Festphasenpeptidsynthese von **103** unter Verwendung von 2.0 Äquivalenten Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH **63** führte die saure Abspaltung des Glycopeptids vom polymeren Träger zu einem teilweisen Verlust der Benzylether-Schutzgruppe an C-3' (s. Kap. 3.2.2 und Abb. 3.3.17). Dieses Ergebnis war aufgrund der bisherigen Erfahrungen mit Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-O*t*Bu-Derivaten (siehe oben) und der geringeren Stabilität der Benzylether im Vergleich zu den üblicherweise eingesetzten Acetyl-Schutzgruppen nicht unerwartet, zumal vergleichbare Beobachtungen auch bereits von *Nakahara et. al.* für einige wenige Beispiele dokumentiert wurden.^[158,225,226]

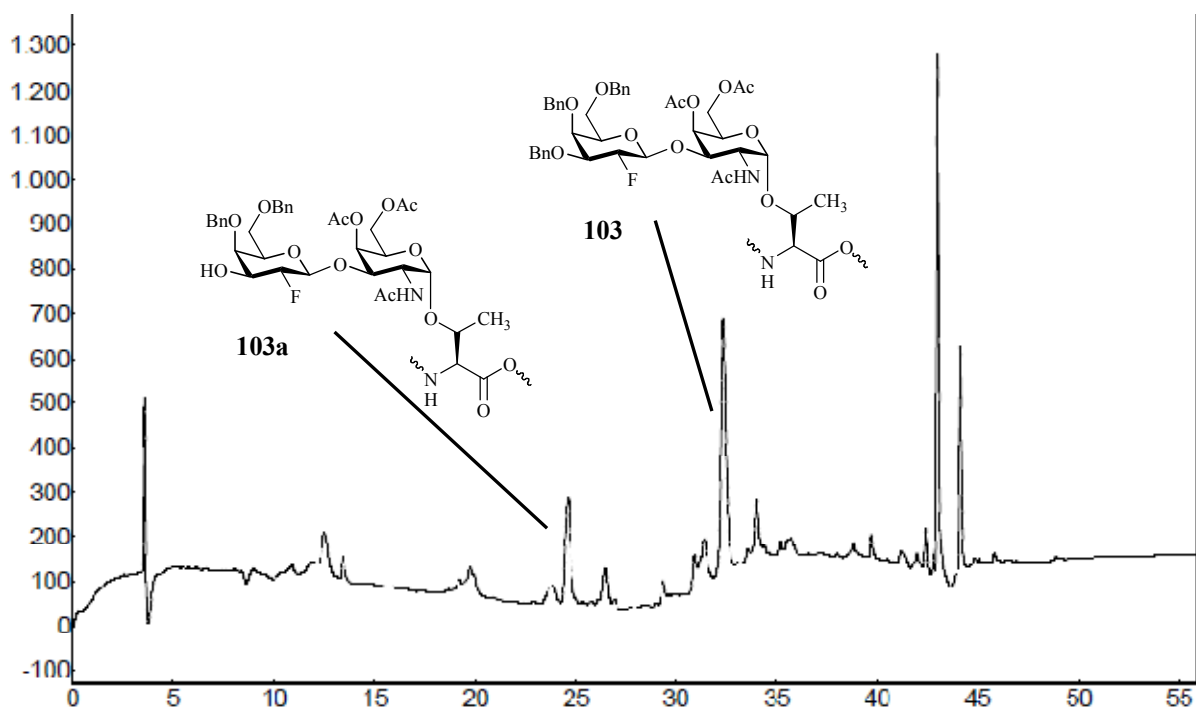


Abb. 3.3.17: HPLC-Chromatogramm des Glycopeptides **103** nach der Abspaltung vom Harz

Für die weitere Umsetzung des partiell geschützten Glycopeptides **103** zu dem gewünschten Produkt **102** stellt die teilweise Deblockierung der Glycankette jedoch kein Problem dar. Sollten hingegen geschützte Glycopeptide aufgebaut werden, müsste ein alternatives Anker-System, das eine Abspaltung unter deutlich milderen Bedingungen erlaubt, herangezogen werden.

Zur Deblockierung wurde Glycopeptid **103** zunächst in Methanol gelöst und mit Palladium(II)-acetat versetzt. Nach vollständiger Hydrogenolyse der Benzylether (Reaktionskontrolle mittels analytischer RP-HPLC) wurde das teilweise deblockierte Peptid in Methanol gelöst und mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht wurde. Nach Beendigung der Reaktion und Reinigung durch RP-HPLC konnte das Glycopeptid **102** schließlich in einer Ausbeute von 34%, bezogen auf das eingesetzte Harz, erhalten werden.

Neben den beiden monofluorierten Glycopeptid-Antigen-Analoga sollte auch das entsprechende bisfluorierte TF-Derivat **86** in die MUC1-TR-Sequenz eingebaut werden. Wie bereits bei Verbindung **63** führte auch in diesem Fall die bei der Acidolyse des *tert*-Butylethers zu einer Spaltung des Benzylethers an C-3'. Da jedoch die freien Hydroxylgruppen nicht den Verlauf der Festphasensynthese stören,^[84] wurde auf eine nachträgliche Blockierung dieser Position verzichtet und stattdessen direkt das

Produktgemisch, bestehend aus **86** und **86a**, eingesetzt. Nach Beendigung der Festphasensynthese (siehe Abb. 3.3.16) und saurer Abspaltung vom Harz konnte in dem erhaltenen Rohprodukt sowohl das gewünschte Glycopeptid **104**, als auch das 3'-debenzylierte Derivat **104a** massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

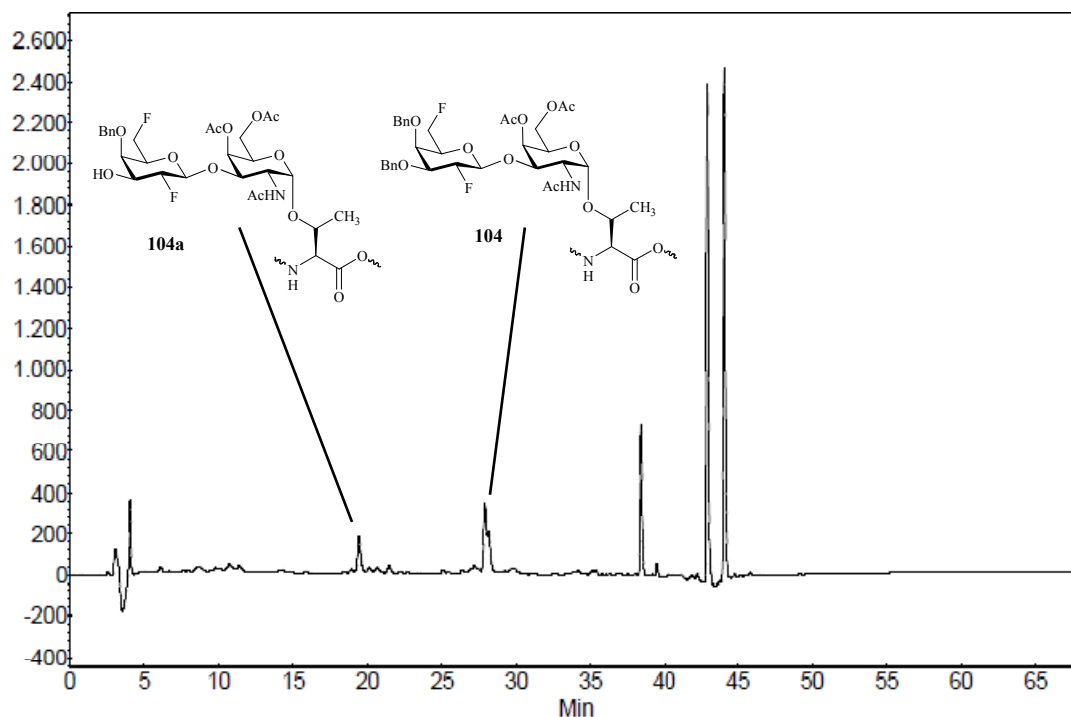


Abb. 3.3.18: HPLC-Chromatogramm des Bisfluorierten Glycopeptids **104**

Die beiden Produkte wurden jedoch nicht getrennt, sondern die Mischung wurde ohne weitere Reinigung zur Deblockierung des Glycanrestes durch Hydrogenolyse und Zemplén-Umesterung eingesetzt. Abschließende Reinigung mittels RP-HPLC lieferte das Glycopeptid **105** in einer Ausbeute von 14% bezogen auf das eingesetzte Harz (siehe Abb. 3.3.16).

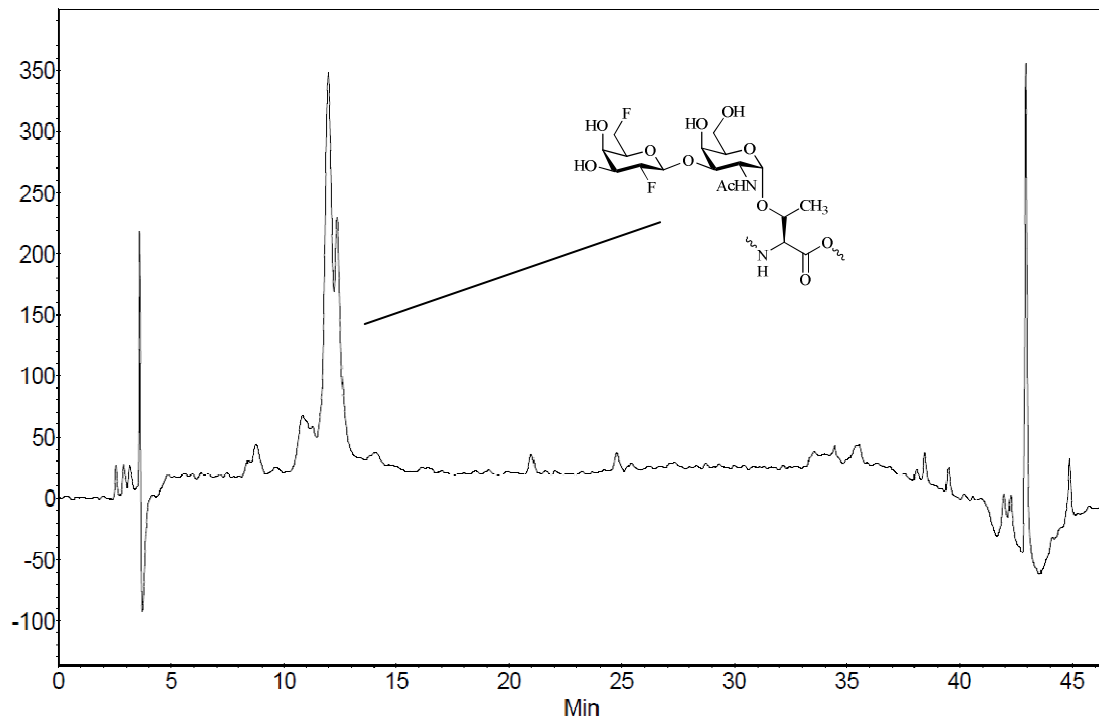


Abb. 3.3.19: Chromatogramm der vollständig deblockierten Verbindung 105

3.4 Konjugation von MUC1-Glycopeptid-Konjugaten an Carrierproteinen

Viele kleine Moleküle, wie kurze Peptide, Pharmaka oder Saccharide mit einem Molekulargewicht von 2-5 kDa, können zwar an Antikörper binden, sind aber im Allgemeinen nicht in der Lage deren Bildung hervorzurufen. Diese schwach immunogenen Antigene nennt man Haptene (vom griechischen haptain = anheften). Man bindet sie zur Erzeugung einer ausreichend starken Immunantwort meist an geeignete Trägerproteine (Carrierproteine).^[227,228,229] Häufig verwendete Vertreter dieser immunologischen Carrier sind beispielsweise das Tetanus-Toxoid,^[230,231,232] das Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA),^[233] das Ovalbumin (OVA)^[234] oder das Hämocyanin der Schlüssellock-Napfschnecke (*keyhole limpet hemocyanin*, KLH).^[235,236] Eine solche Konjugation von Haptenen, wie z.B. Oligosacchariden, ist ein zentraler Schritt in der Entwicklung von synthetischen Vakzinen, da erst durch die sogenannte „gekoppelte Erkennung“ eine MHC-II-restringierte Immunreaktion und damit die Überwindung der Selbsttoleranz des

Immunsystems gewährleistet wird. Nach der Immunisierung mit einem Hapten-Protein-Konjugat wird dieses von antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und proteolytisch in kleinere Fragmente zerlegt. Werden dabei geeignete T_H2 -Zell-Epitope des Carriers auf der B-Zelloberfläche mithilfe des MHC-II-Komplexes präsentiert, können diese von Rezeptoren der T_H2 -Zellen erkannt werden und zu einer Aktivierung der B-Zelle führen. Diese mündet schließlich in der gewünschten adaptiven MHC-II-restringierten Immunantwort.

Die Anbindung der Glycopeptide an die Carrierproteine erfolgt kovalent mithilfe von mono- oder bifunktionellen Linkern, die ihrerseits nicht immunogen sein dürfen, um die Spezifität der Immunantwort nicht zu beeinträchtigen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein MUC1-Glycopeptid-Antigen jeweils an Tetanus-Toxoid und Rinderserumalbumin als Trägerprotein gebunden. Um eine Beeinträchtigung der T_H2 -Zell-Epitope des Carriers zu verhindern, sollte die Anbindung nicht nur möglichst mild, sondern vor allem chemoselektiv erfolgen. In der Literatur findet man hierzu eine Reihe von Konjugationsmöglichkeiten,^[237] wobei in dieser Arbeit auf ein von *Tietze et al.*^[238,239] entwickeltes Verfahren zurückgegriffen wurde. Dieses beruht auf der selektiven Überführung von Quadratsäurediethylester in ein Quadratsäuremonoamid-Derivat (Abb. 3.4.1) und hat sich bereits in früheren Arbeiten^[223,224,240] zur Konjugation von MUC1-Glycopeptiden bewährt.

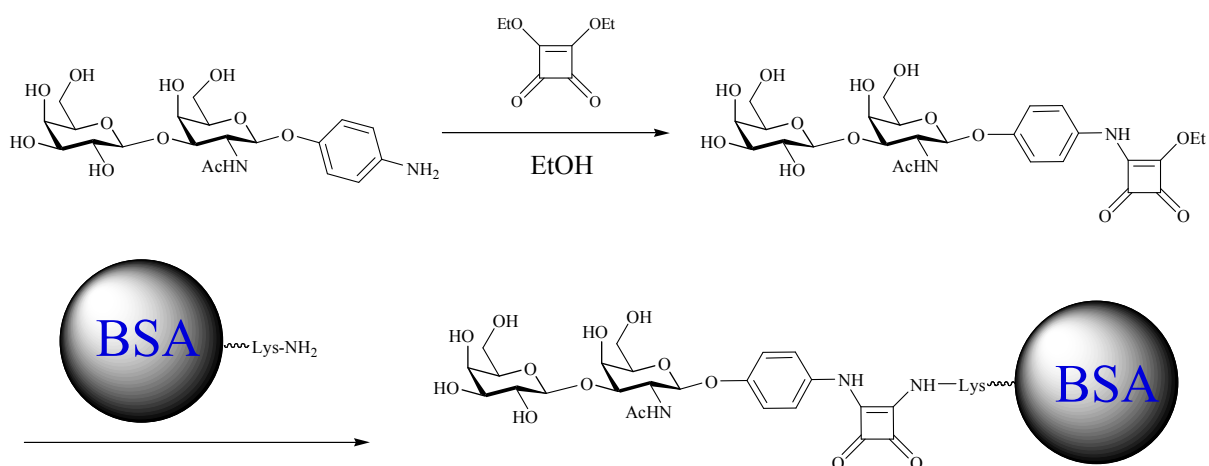


Abb. 3.4.1: Aufbau von Neoglycoproteinen durch Konjugation mit Quadratsäurediethylester nach *Tietze*^[238]

Zur Anbindung an die Trägermoleküle muss der freie *N*-Terminus des spacergebundenen MUC1-Glycopeptids chemoselektiv mit Quadratsäurediethylester umgesetzt werden, ohne dass die anderen funktionellen Gruppen des Glycopeptids in Mitleidenschaft gezogen werden.

Dies kann in einer Lösung aus Ethanol/Wasser (1:1) bei einem pH-Wert von 8.0 erreicht werden, wobei neben dem Monoamid des natürlichen MUC1-Konjugats **106** (88%) auch die jeweiligen Verbindungen **107** und **108** der Glycopeptide mit fluorierten TF-Antigenen in Ausbeute von 44% bzw. 62% erhalten wurden (Abb. 3.4.2).

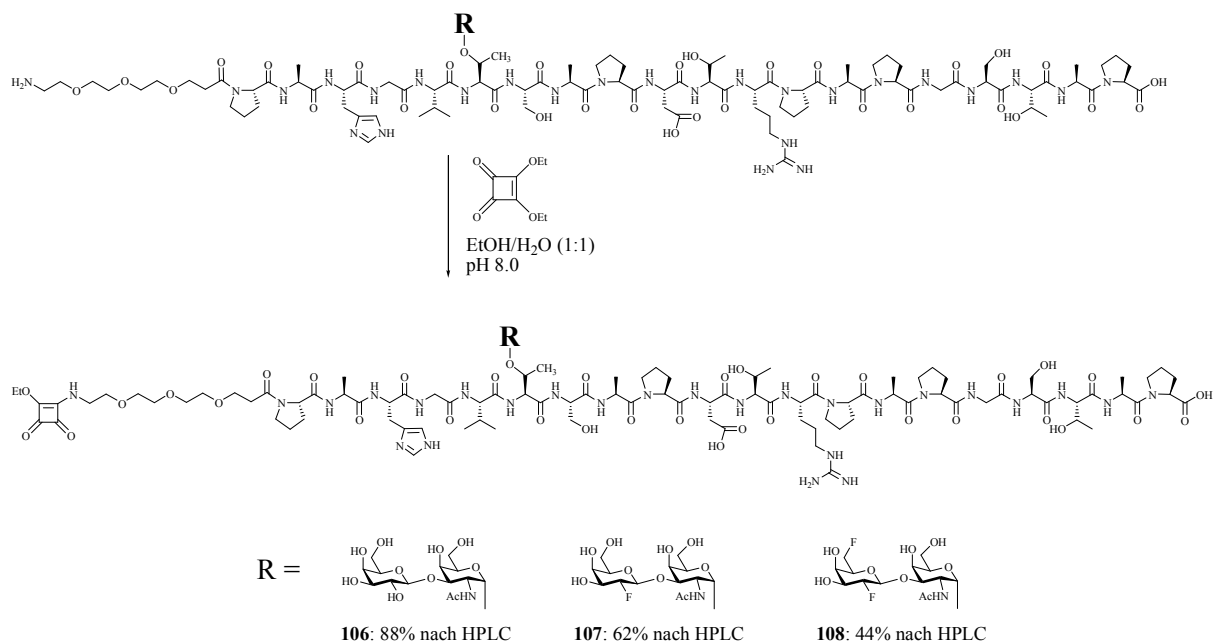


Abb. 3.4.2: Quadratsäurefunktionalisierte MUC1-Glycopeptide

Die Anbindung dieser mit Quadratsäurefunktionalisierten Glycopeptide an Lysinseitenketten der Carrierproteine gelingt ebenfalls chemoselektiv durch Erhöhung des pH-Werts auf pH 9.5. So konnten die entsprechenden Konjugate der Verbindungen **106**, **107** und **108** durch dreitägiges Rühren mit Rinderserumalbumin in einem Dinatriumphosphatpuffer bei Raumtemperatur hergestellt werden (Abb. 3.4.3).

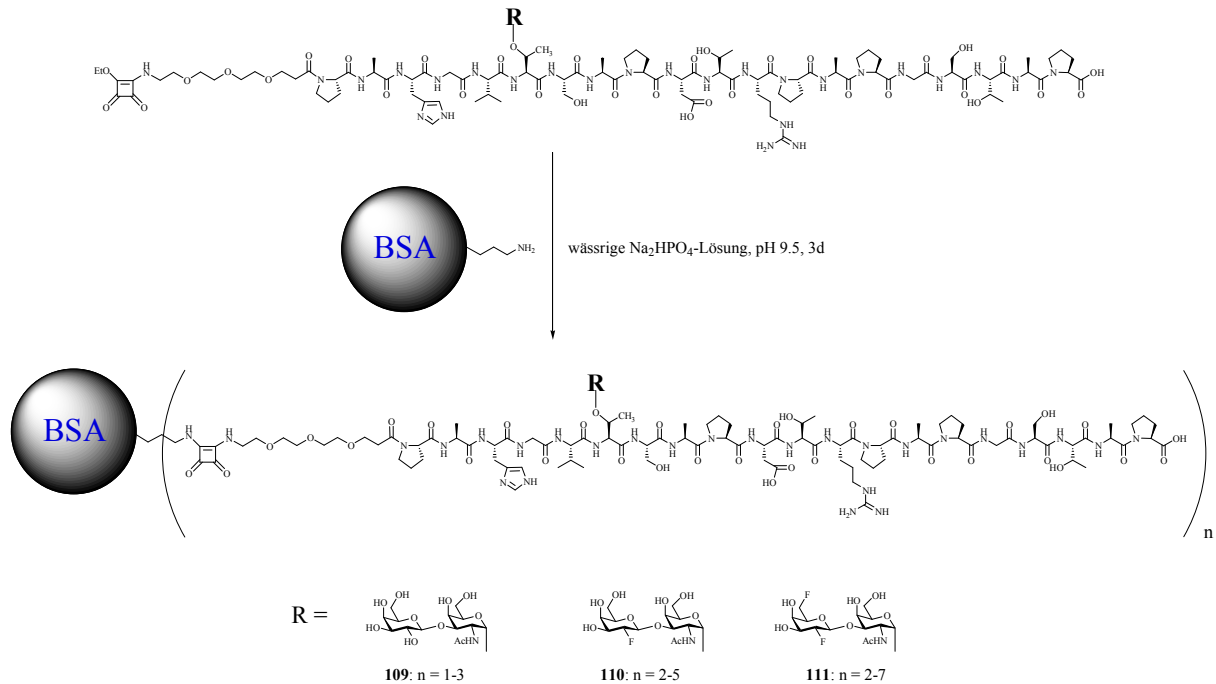


Abb. 3.4.3: Übersicht über die synthetisierten BSA-MUC1-Glycopeptid-Konjugate

Um die nicht ans BSA gebundenen Glycopeptide abzutrennen, wurde die Reaktionslösung anschließend in eine Ultrafiltrationsanlage gegeben. Die Membran dieser Anlage lässt nur Moleküle mit einem Molekulargewicht <30000 g/mol passieren, so dass nach dem Waschen mit entionisiertem Wasser die BSA-Konjugate zurückbleiben. Von diesen konnte nach Gefriertrocknung der durchschnittliche Beladungsgrad mit dem jeweiligen Glycopeptid-Antigen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie abgeschätzt werden.^[222,240]

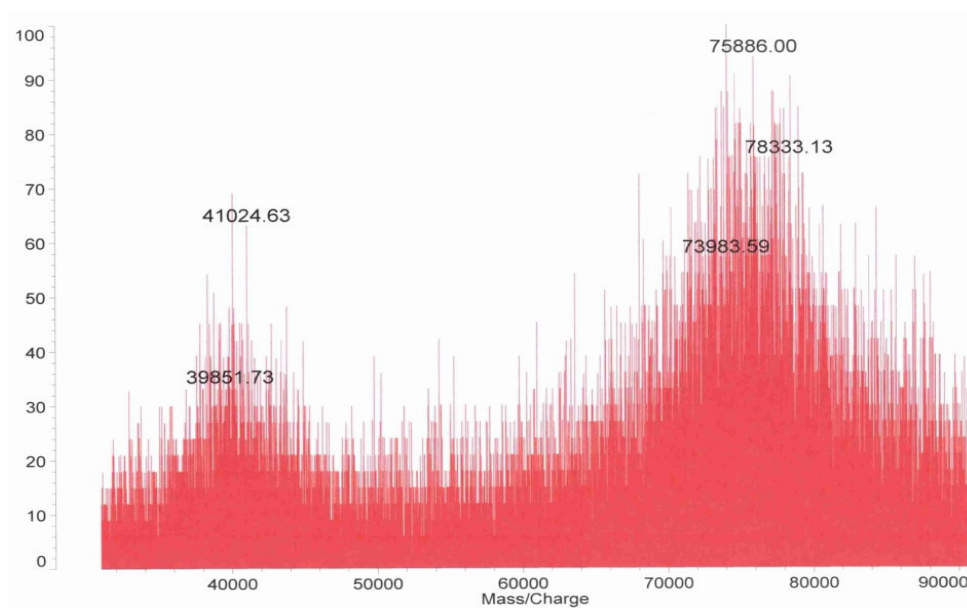


Abb. 3.4.4: MALDI-TOF-Spektrum des BSA-Konjugates 110

Wie in Abb. 3.4.4 am Beispiel des Konjugats **110** zu sehen ist, lag die mittlere Beladungsdichte bei etwa drei Molekülen Antigen pro Molekül BSA. Vergleichbare Beladungsdichten wurden auch für die beiden anderen Glycopeptidkonjugate **109** und **111** ermittelt.

Neben der Konjugation der Glycopeptide an Rinderserumalbumin, welche weniger zur Erzeugung von Vakzinen, als vielmehr zur Beschichtung von Mikrotiterplatten für die Analyse der induzierten Immunantworten durch ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) dienen sollten, wurde auch ein entsprechender Vakzinkandidat durch Anbindung des 2'-Fluor-TF-Antigen-MUC1-Glycopeptids **107** an Tetanus Toxoid hergestellt. Die dazu notwendige chemoselektive Anbindung des Glycokonjugates an die Lysinseitenketten des Tetanus-Toxoids wurde wiederum mithilfe des Quadratsäureester-Verfahrens erreicht und ist in Abb. 3.4.5 gezeigt.

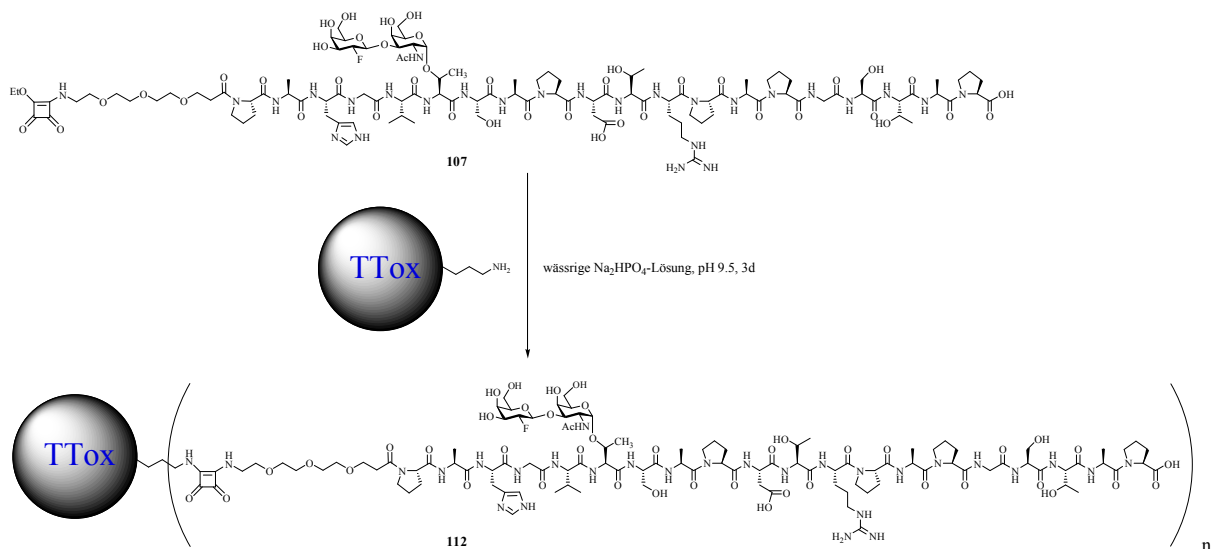


Abb. 3.4.5: Synthese des TTox-Konjugates **112**

Dabei konnten von dem entsprechenden TTox-Konjugat **112** nach Ultrafiltration und Gefriertrocknung 6.8 mg erhalten werden.

Während Rinderserumalbumin (BSA) mit insgesamt 582 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 66.500 g/mol als vergleichsweise kleines Protein noch massenspektrometrisch bezüglich der Beladungsdichte untersucht werden kann, gelingt dies mit dem wesentlich größeren Tetanus-Toxoid (150.000 g/mol) in der Regel nicht mehr. *A. Kaiser* konnte jedoch zeigen, dass sich die Beladungsdichte bei solchen Konjugaten aus gravimetrischen Analysen bzw. aus ELISA-Bindungsdaten abschätzen lässt.^[114,222,241]

Letztere wiesen bei vergleichbaren MUC1-Glycopeptid-Tetanus-Toxoid-Vakzinen Beladungen von mehr als 20 Molekülen Glycopeptid-Antigen pro Molekül Protein auf. Neben der höheren Beladungsdichte bieten Glycopeptid-Vakzine des stark immunogen wirkenden Tetanus-Toxoids vor allem den Vorteil, dass sie sich sowohl für den Einsatz in Tieren (Mausmodell) als auch im Menschen eignen, der mit diesem Protein normalerweise gegen Wundstarrkrampf geimpft wird. Wie bereits gezeigt wurde,^[222,223,240] können Konjugate von MUC1-Glycopeptiden und Tetanus-Toxoid tatsächlich starke Immunantworten mit hohen Konzentrationen an MUC1-spezifischen Antikörpern auslösen.

3.4.1 Immunologische Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen

Da aus Zeitgründen mit dem Konjugat **112** bislang noch keine Vakzinierungsstudie an Mäusen durchgeführt werden konnte, wurde zunächst lediglich die Erkennung der hergestellten Glycopeptidkonjugate durch spezifische anti-MUC1-Antikörper untersucht. Diese wurden freundlicherweise von den Arbeitsgruppen *H. Kunz* und *E. Schmitt* zur Verfügung gestellt und waren durch Impfen von Balb/c-Mäusen mit einem TF-Antigen tragenden MUC1-Glycopeptid-Tetanus-Toxoid-Konjugat **113** (siehe Abb. 3.4.7) erhalten worden. Um die spezifische Erkennung der Glycopeptid-Antigene durch diese Antikörper nachzuweisen, wurden ELISA-Mikrotiterplatten mit den synthetisierten BSA-Neoglycokonjugaten beschichtet. Nach Zugabe der Seren konnten die daran gebundenen Antikörper durch einen sekundären Anti-Maus-Antikörper identifiziert werden. Dazu wurden die BSA-Konjugate zunächst in wässriger Lösung auf die Mikrotiterplatten aufgebracht und inkubiert. Die nach dem Waschen in den Vertiefungen der Platten haften gebliebenen (immobilisierten) Neoglycoproteine konnten anschließend von Serum-Antikörpern, die spezifisch gegen das Glycopeptid-Antigen gerichtet sind, gebunden werden. Diese Bindung kann über einen biotinylierten Anti-Maus-Ig-Antikörper nachgewiesen werden, indem dieser an ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (*Horseradish Peroxidase HRP*, HPO) bindet und hierdurch die Oxidation der farblosen 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure), ABTS, zum freien grünfarbigen Radikal bewirkt (Abb. 3.4.6.).^[242] Dessen

charakteristische Absorptionsbande von $\lambda = 414 \text{ nm}$ wird detektiert und erlaubt so die direkte Visualisierung der Bindung des Antikörpers an das Antigen.

Werden die Absorptionsmesswerte (*optical density*, OD) gegen die Verdünnung/ Konzentration des Serums bzw. Antikörpers aufgetragen, resultiert eine charakteristische Kennlinie, die Aussagen zur Konzentration der Antikörper gegen die tumorassoziierten MUC1-Partialstrukturen ermöglicht. Sämtliche ELISA-Tests wurden von *S. Wagner* und *N. Gaidzik* am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von *Prof. Dr. E. Schmitt* durchgeführt.

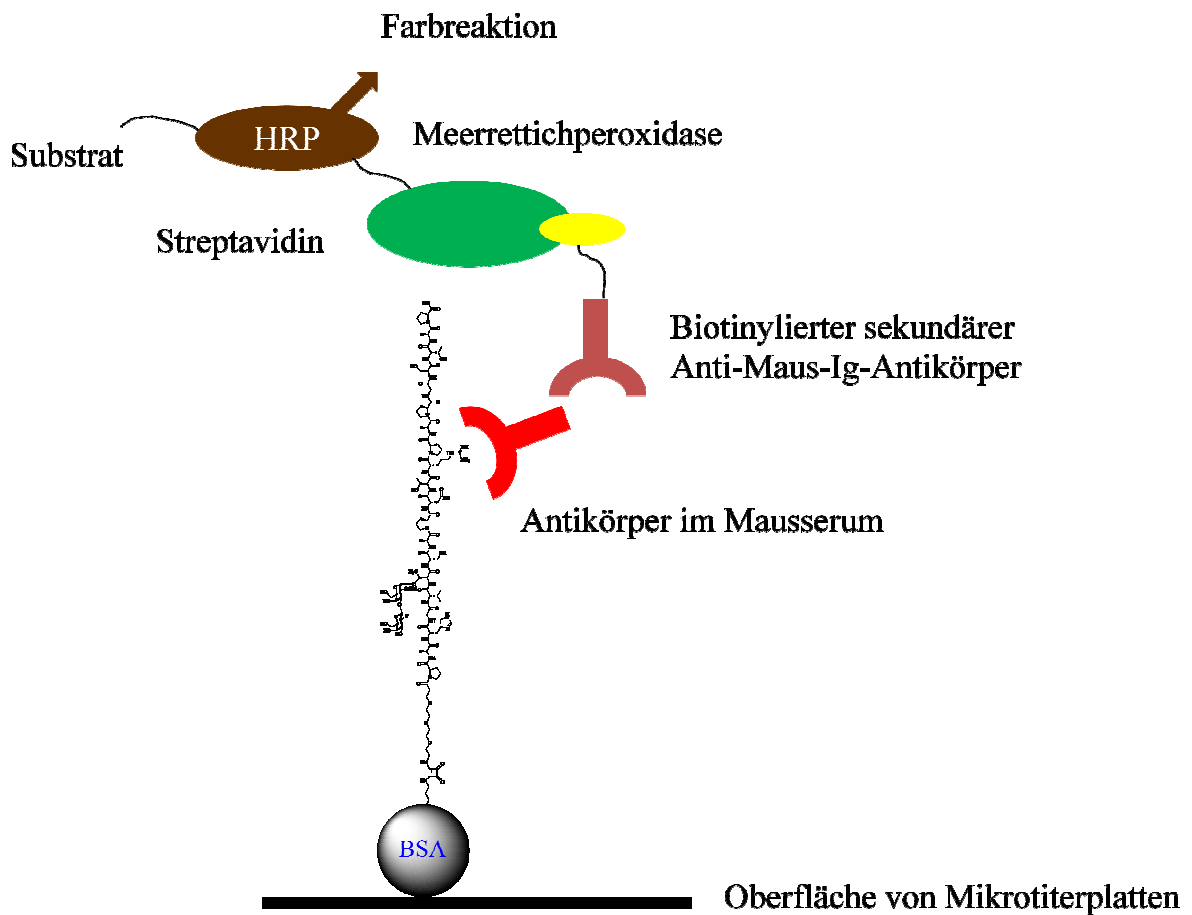
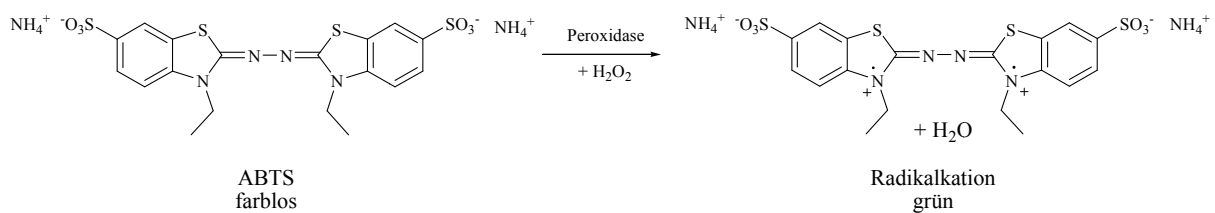


Abb. 3.4.6: Prinzip des ELISA Testes mit BSA-MUC1-Glycopeptiden^[114]

In einem ersten Experiment wurde mittels ELISA-Test die Erkennung des MUC1-2'FT-Antigen-BSA-Konjugats **110** durch die Antikörper TFA 40.06, TFA 40.15 und den Kulturüberstand eines Hybridoms (Kultur 9), die aus der Immunisierung von Mäusen mit einem MUC1-TF-Eicosaglycopeptid-Tetanus-Toxoid-Vakzin **113** resultierten (Abb. 3.4.7), bestimmt.^[114]

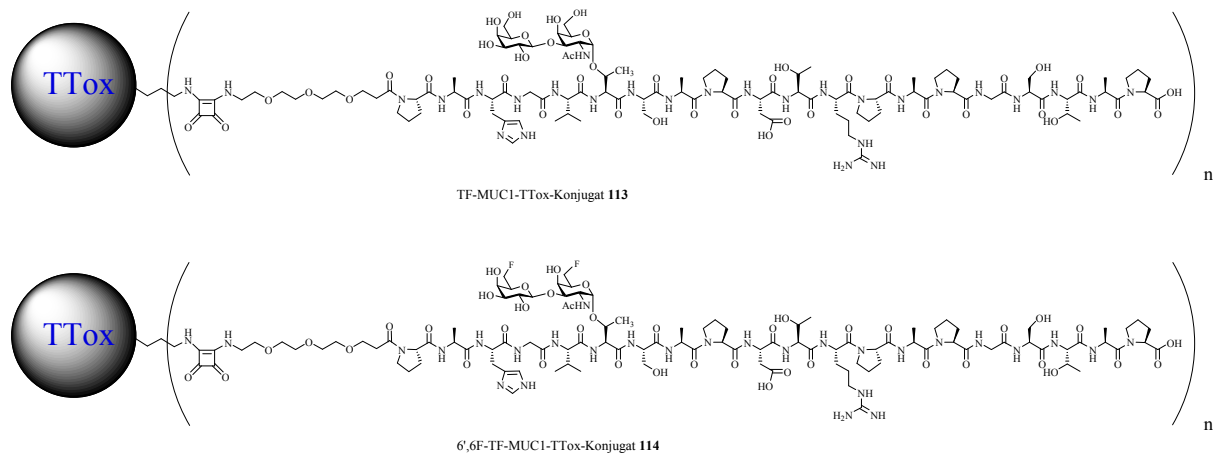


Abb. 3.4.7: Tetanus Toxoid-Konjugate für die Vakzinierung

Wie in Abb. 3.4.8 zu sehen ist, binden die beiden Antikörper TFA 40.06 und TFA 40.15 selbst in großer Verdünnung noch gut an das immobilisierte BSA-Konjugat **110**. Folglich wird von diesen Antikörpern neben der natürlichen Struktur auch das fluoridierte Saccharid-Epitop erkannt.

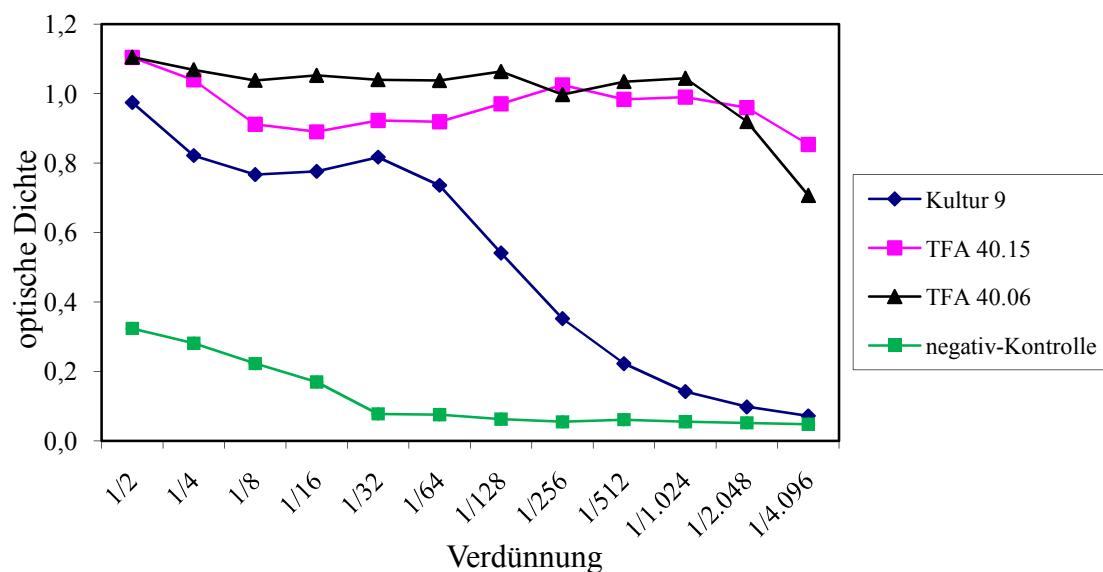


Abb. 3.4.8: ELISA-Experiment von Verbindung 110

Um noch genauere Aussagen bezüglich der Affinität der Antikörper zu den fluorierten Disaccharid-Strukturen **102** und **105**, sowie gegenüber dem natürlichen TF-Antigen **98** zu erhalten, wurden Neutralisationsexperimente mit diesen Verbindungen durchgeführt. Hierzu wird eine Mikrotiterplatte mit dem MUC1-T-BSA-Konjugat **109** beschichtet. Parallel dazu werden auf separaten Mikrotiterplatten verdünnte Lösungen der beiden Antikörper TFA 40.06 und TFA 40.15 mit den MUC1-Glycopeptid-Derivaten **102** und **105** eine Stunde inkubiert. Anschließend werden Aliquote dieser inkubierten Antikörper-Lösungen auf die mit dem MUC1-T-BSA-Konjugat **109** beschichtete Mikrotiterplatte übertragen. Dann wird ein ELISA-Test durchgeführt. Bindet nun der Antikörper an die (löslichen) fluorierten Glycopeptid-Antigene, so wird die Bindung an das immobilisierte Konjugat schwächer ausfallen, wodurch eine geringere optische Dichte resultiert. Somit können Antikörperselektivitäten verglichen und Informationen zur strukturellen Erkennungsbreite der induzierten Antikörper erhalten werden.

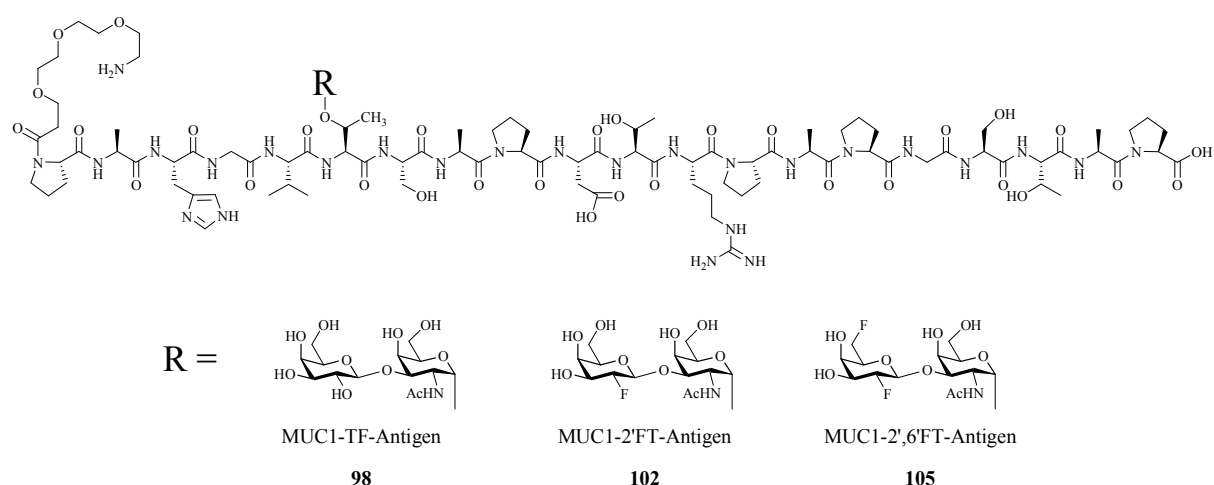


Abb. 3.4.9: Antigenstrukturen in den Neutralisationsexperimenten

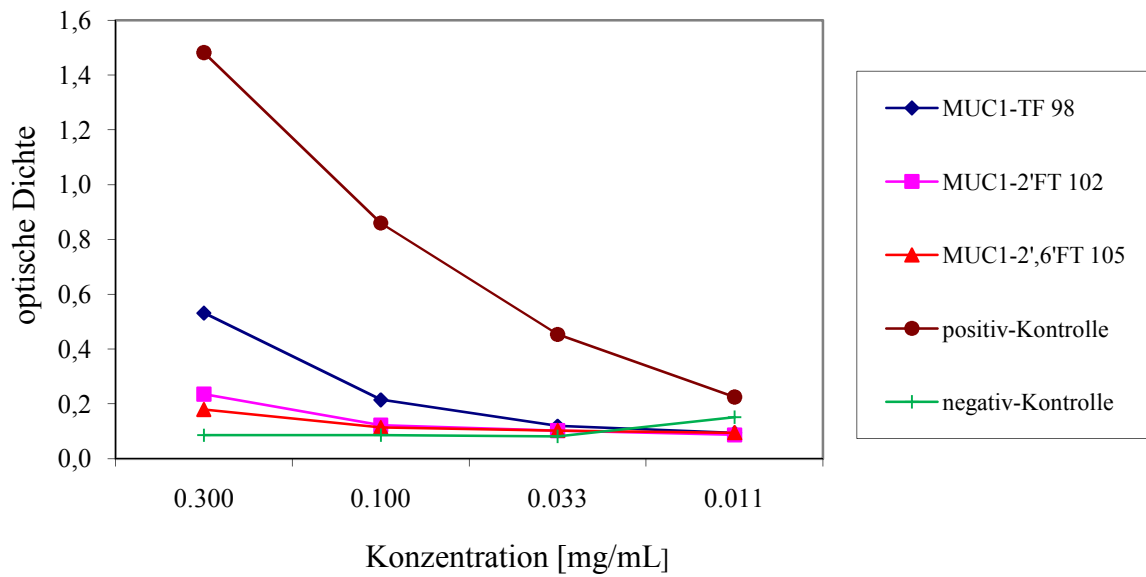


Abb. 3.4.10: Neutralisations-ELISA des Serum-Antikörpers TFA 40.06 (aus Immunisierung von Mäusen gegen das TTox-Vakzin 113) gegen fluorierte MUC1-Glycopeptide (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem BSA-Konjugat des MUC1-TF-Antigens 109); Positiv-Kontrolle: Inkubation des Antikörpers ohne Antigen; Negativ-Kontrolle: Inkubation ohne Antikörper

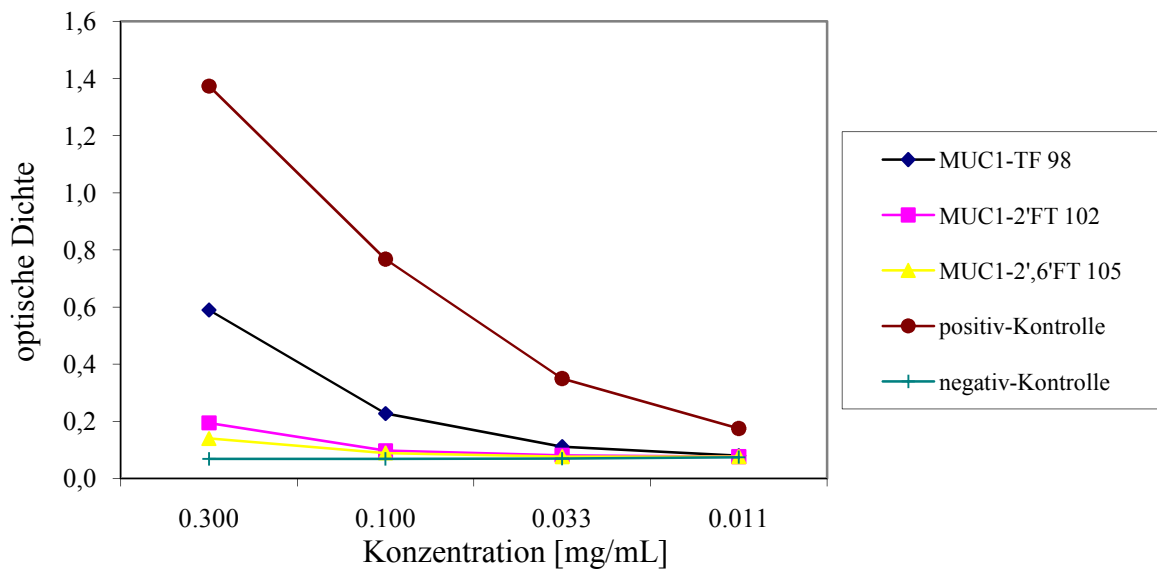


Abb. 3.4.11: Neutralisations-ELISA des Serum-Antikörpers TFA 40.15 (aus Immunisierung von Mäusen gegen das TTox-Vakzin 113) gegen fluorierte MUC1-Glycopeptide (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem BSA-Konjugat des MUC1-TF-Antigens 109); Positiv-Kontrolle: Inkubation des Antikörpers ohne Antigen; Negativ-Kontrolle: Inkubation ohne Antikörper

Da beide Antikörper durch Hybridoma-Technik aus dem Serum von Mäusen gewonnen wurden, die mit dem TTox-Konjugat des TF-Antigens 113 geimpft worden waren, sollten keine bzw. allenfalls geringe Affinitätsunterschiede im ELISA-Test auftreten. Anhand der Abbildungen erkennt man, dass die Antikörper sowohl das natürliche T-Antigen als auch die

analogen fluorierten Antigenstrukturen erkennen, wobei letztere eine etwas stärkere Bindung zeigen. Am besten neutralisiert werden beide Antikörper durch die bisfluorierte Verbindung **108**.

Darüber hinaus wurde die Erkennung der fluorierten Glycopeptid-Antigene durch Maus-Serum-Antikörper, die durch Vakzinierung mit dem eng verwandten 6,6'-F-TF-⁶Thr-MUC1-TTox-Konjugat **113** (siehe Abb. 3.4.7) erhalten wurden,^[240] untersucht. Anhand eines entsprechenden Neutralisationsexperiments konnte wiederum eine spezifische Bindung der Glycopeptid-Antigene **102** und **105** an diese Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.4.12). Zudem zeigte sich erneut, dass das Glycopeptid **105** mit den beiden Fluorsubstituenten im Galactoserest der TF-Determinante am besten gebunden wird. Ein Vergleich der Neutralisation dieser Antikörper durch die unglycosylierte MUC1-TR-Peptidsequenz bzw. durch ein abweichendes MUC4-Peptid-Antigen deutet zudem darauf hin, dass die Spezifität der Antikörper im Wesentlichen von den vorhandenen Peptid-Epitopen herrührt und durch das Saccharid lediglich moduliert wird.

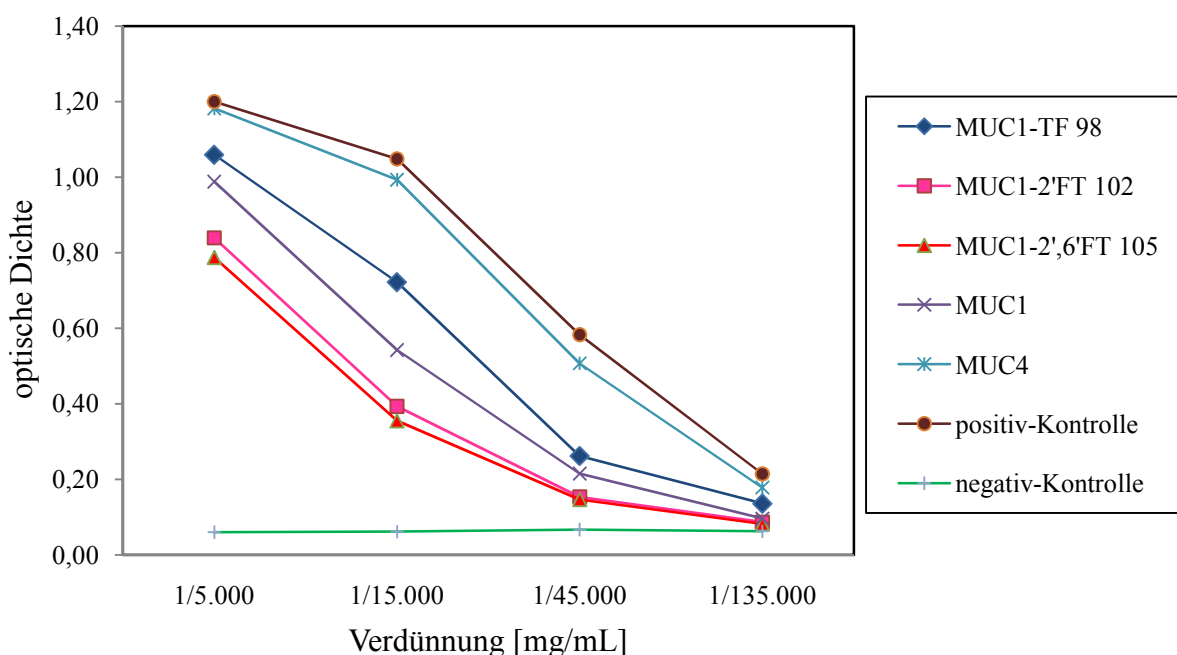


Abb. 3.4.12: Neutralisations-ELISA des Serum-Antikörpers (aus Immunisierung von Mäusen gegen das TTox-Vakzin 114) gegen fluorierte MUC1-Glycopeptide (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem BSA-Konjugat des MUC1-6,6'-F-TF-Antigens)

Weitergehende Studien sollen nun in Zukunft zeigen, ob die hergestellten fluorierten Glycopeptide **102** und **105** ebenfalls erfolgreich als Vakzinkandidaten zur Erzeugung von MUC1-spezifischen Antikörpern eingesetzt werden können.

4 Zusammenfassung

Antitumorimpfstoffe, die auf den veränderten Glycosylierungsmustern von malignen Zellen beruhen, stellen eine wünschenswerte Alternative bzw. Ergänzung zu den bereits etablierten Behandlungsformen von Tumoren dar. Durch die fehlerhafte Expression verschiedener Glycosyltransferasen kommt es bei Krebs auf den Zelloberflächen zu einer Überexpression von mucinartigen Glycoproteinen mit verkürzten Glycanstrukturen. Für die aktive Immuntherapie stellen dabei jedoch nicht nur die tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene, wie z.B. das T_N-, das 2,3-Sialyl-T-, das 2,6-Sialyl-T- und das TF-Antigen, wichtige Zielstrukturen dar, vielmehr führen die verkürzten Glycanketten dazu, dass die auf gesundem Gewebe normalerweise maskierten Peptid-Epitope des Proteinrückgrates freiliegen und damit für das Immunsystem zugänglich sind. Gelänge es, eine Immunantwort gegen eben diese veränderten Oberflächen-Glycoproteinstrukturen zu initiieren, so sollte dadurch ein selektiver Angriff auf Tumorzellen möglich sein, bei dem es zu keiner Beeinträchtigung von gesundem Gewebe kommt. Da die natürliche Toleranz des Immunsystems eine wirksame Immunantwort bei dem Einsatz von Glycopeptid-Epitopen verhindert, muss deren Immunogenität in einem Vakzin durch Anbindung an ein geeignetes Trägerprotein, wie Tetanus Toxoid, erhöht werden. Zudem können für eine solche Vakzine nur strukturell einheitliche, d.h. synthetisch hergestellte Glycopeptid-Fragmente eingesetzt werden, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher Partialstrukturen des tumorassoziierten Glycopeptids MUC1 als Bausteine für die Entwicklung von Antitumorvakzinen hergestellt, die eine solche vorteilhafte Kombination aus *Core1*-Kohlenhydrat-Antigenen und geeigneten Peptid-Epitopen aus der *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 enthalten. Da ein Einsatz von Glykokonjugaten in Impfstoffen durch die metabolische Labilität der *O*-glycosidischen Bindungen eingeschränkt ist, wurden hierzu erstmals fluoridierte Vertreter von MUC1-analogen Glycopeptiden verwendet, in denen das Kohlenhydrat-Epitop durch den strategischen Einbau von Fluoratomen gegenüber einem raschen Abbau durch Glycosidasen geschützt werden soll (siehe Abb. 4.1).

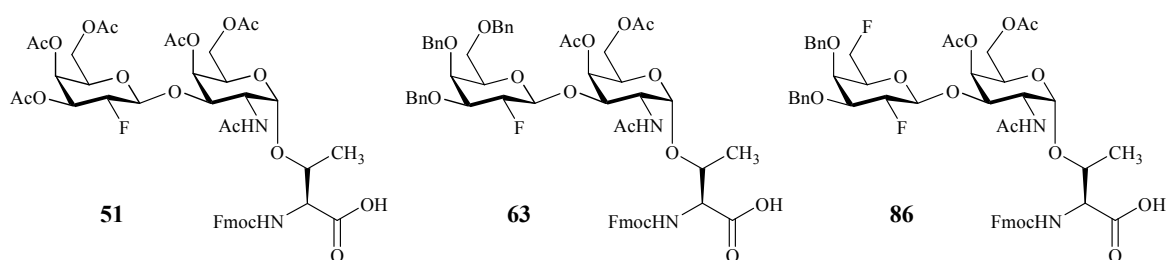


Abb. 4.1: Synthetisierte Glycosylaminosäure-Bausteine

Auf Basis einer literaturbekannten Synthese des Thomsen-Friedenreich-Antigens **17** wurde hierfür zunächst eine Synthesestrategie zur Herstellung eines 2'-Fluoranalogons **51** entwickelt. Schlüsselschritte in dieser Synthese stellten neben der (bekannten) elektrophilen Fluorierung eines entsprechenden Galactalvorläufers, wofür ein verbessertes mikrowellen-unterstütztes Syntheseprotokoll erarbeitet wurde, vor allem die β -selektive 3-Galactosylierung des T_N-Antigen-Bausteins **13** zum TF-Disaccharid **44** dar. Diese Umsetzung wird durch die vergleichsweise geringe Reaktivität des fluorierten Galactosyl-Donors und T_N-Akzeptor-Bausteins **13** erschwert, die eine Reaktionsführung bei erhöhter Temperatur erfordern. Diese andererseits unterliegt auch keiner Stereokontrolle durch eine partizipierende Gruppe in 2-Position des Donors.

Wie sich in entsprechenden Umsetzungen mit verschiedenen (teils neuen) Donoren zeigte, ist die Stereoselektivität dieser Glycosylierung stark abhängig vom Schutzgruppenmuster des 2-Fluor-Galactosyldonors. So führt die Verwendung der zur Stabilisierung des Glycosids üblicherweise eingesetzten Acetyl-Schutzgruppen zu bevorzugter Bildung des thermodynamisch begünstigten, jedoch unerwünschten α -anomeren Produkts **44** ($\alpha/\beta = 2:1$). Trotz der relativ geringen Ausbeute an β -Disaccharid **44** gelang dessen Umwandlung in den gewünschten 2'-Fluor-TF-Glycosylaminosäure-Baustein **51** für die Festphasenpeptidsynthese (Abb. 4.2).

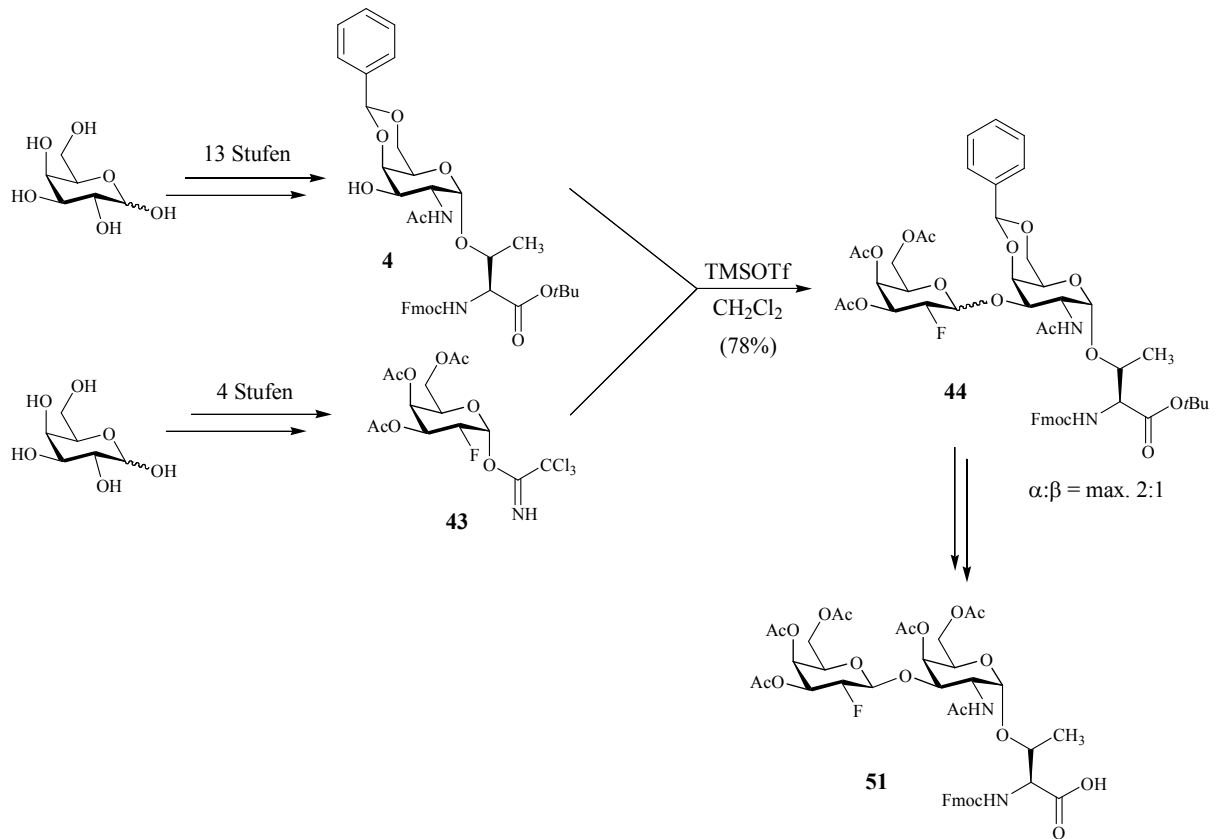


Abb. 4.2: Syntheseroute zum Aufbau der 2'-fluorierten Glycosylaminosäure **51** durch eine *Schmidt*-Glycosylierung

Während der Acetyl-geschützte 2-Fluorgalactosyl-Donor **43** lediglich zu geringen Mengen des β -anomenen Disaccharids **44** führte, konnten die jeweiligen β -konfigurierten Disaccharide **56** und **68** bei Verwendung der Benzyl- bzw. *para*-Methoxybenzyl-geschützten Trichloracetimidat-Donoren **55** und **67** als Hauptprodukte isoliert werden ($\alpha:\beta = 1:9$, s. Abb. 4.3).

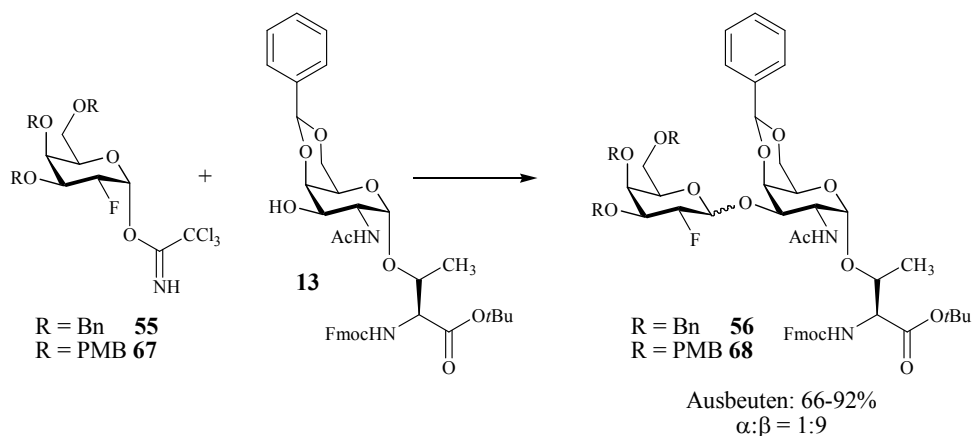


Abb. 4.3: Glycosylierungen mit den Trichloracetimidat-Donoren **55** und **67**

Damit erwiesen sich zwar Benzylether-Schutzgruppen für die Galactosylierungsreaktion zunächst als vorteilhaft, jedoch traten in den nachfolgenden Transformationen Probleme auf, indem z.B. die Debenzylierung von **56** nicht reproduzierbar verlief und die Acidolyse des *tert*-Butylesters von **62** stets unter einem teilweisen Verlust des 3'-Benzylethers erfolgte (Abb. 4.4). In letzterem Fall konnte das Gemisch zwar dennoch erfolgreich in der Glycopeptidsynthese eingesetzt werden, doch erschwerte die partielle Debenzylierung die Reinigung und Charakterisierung der hergestellten Verbindungen erheblich.

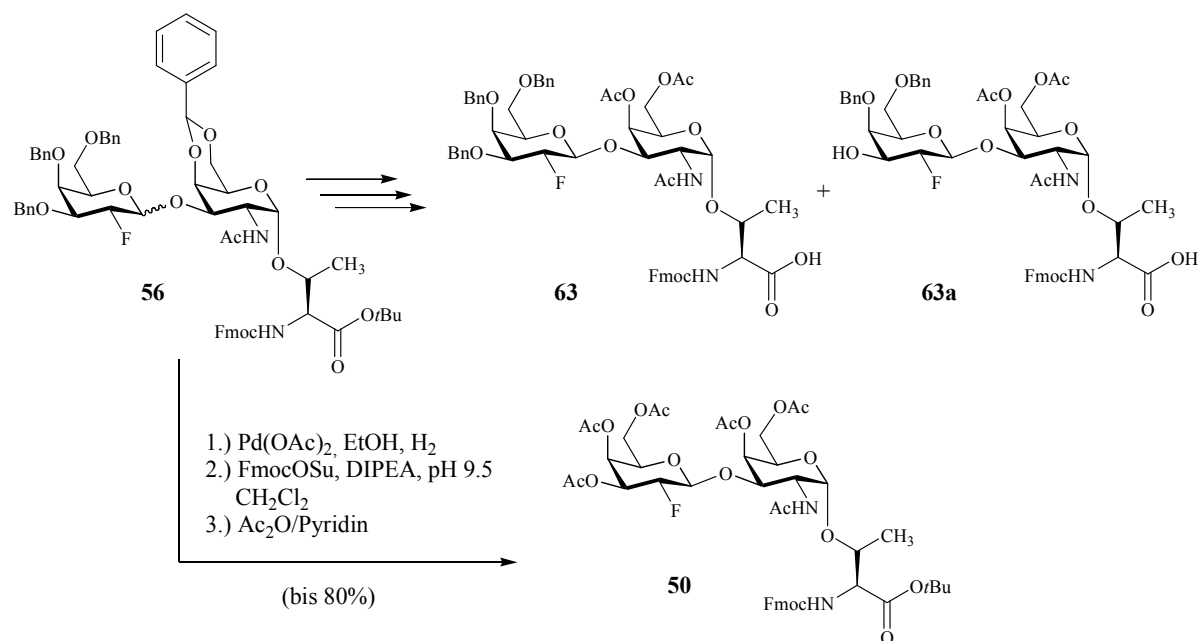


Abb. 4.4: Schutzgruppenmanipulation zur Synthese von Glycosylaminosäure-Bausteine

Demgegenüber zeichnete sich das *para*-Methoxybenzyl-geschützte Disaccharid **68** durch wesentlich leichtere Schutzgruppenmanipulationen aus. Allerdings wiegen die zusätzlich benötigten Syntheschritte zur Herstellung des Donors **67** diesen Vorteil wieder auf, weshalb die *para*-Methoxybenzyl-Schutzgruppenstrategie für den Aufbau der Glycopeptide nicht weiterverfolgt wurde (Abb. 4.5).

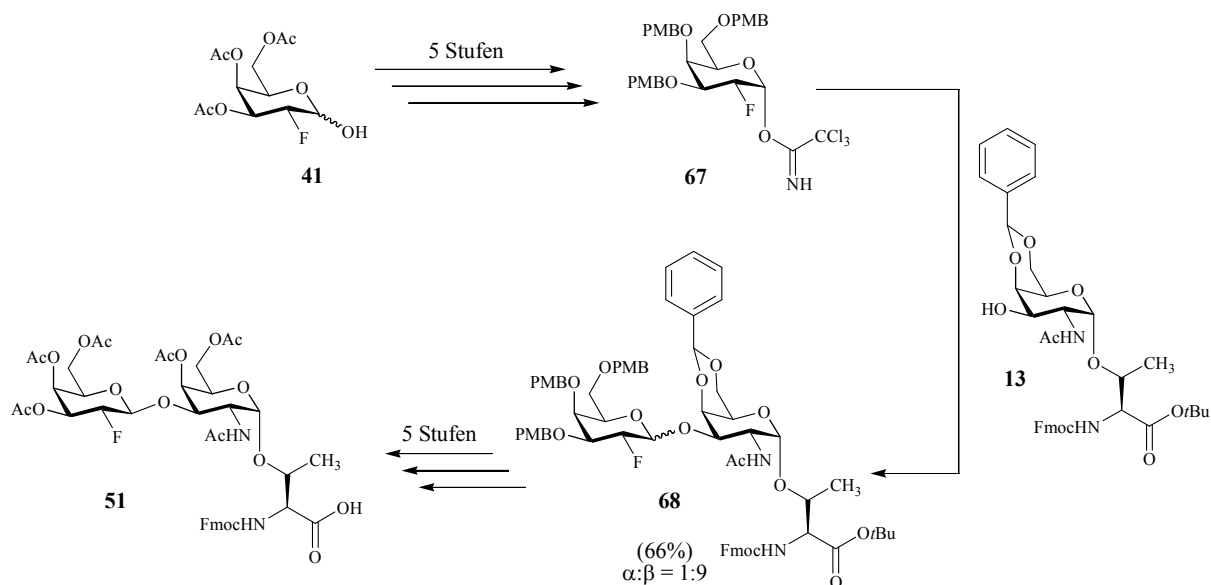


Abb. 4.5: Synthese des *para*-Methoxybenzylether geschützten Disaccharids **68**

Neben den beiden 2'-Fluor-TF-Antigen-Derivaten wurde erstmals auch ein entsprechendes 2,6-Sialyl-FT-Antigen-Analogon synthetisiert (s. Abb. 4.6). Dessen Synthese folgte einer bekannten Strategie, die auch zur Darstellung des nicht fluorierten Trisaccharids **29** herangezogen wurde und über einen Xanthogen-Donor-Baustein **22** verläuft. Nach selektiver Deblockierung des C-Terminus sollte diese Verbindung ebenfalls zur Synthese eines MUC1-Glycopeptidanalogs herangezogen werden, was jedoch leider aus Substanzmangel und Zeitgründen nicht mehr gelang.

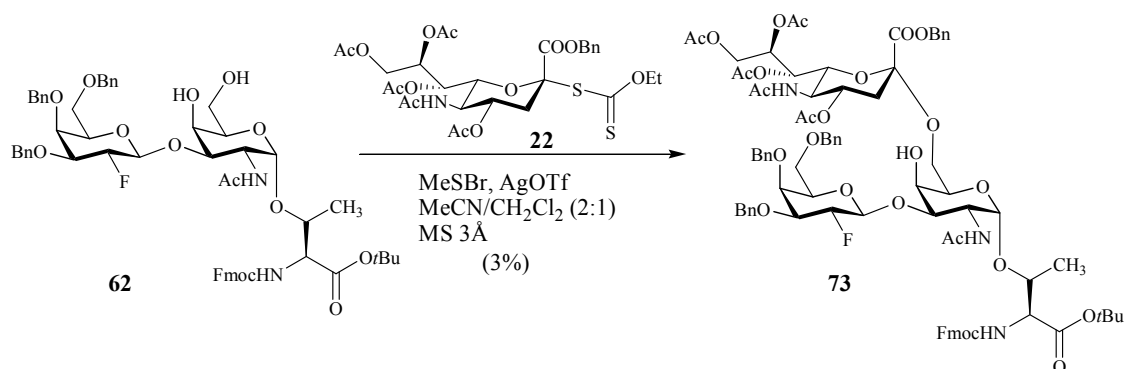


Abb. 4.6: Synthese eines 2'F-Analogons des 2,6-Sialyl-T-Antigens

Schließlich konnte auch ein erstes bisfluoriertes TF-Antigen-Analogon **82** hergestellt werden, bei dem Fluoratome in der 2- und 6-Position des Galactoserestes eingebaut wurden. Dazu musste 3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**79**) unter Verwendung von Selectfluor[®]

elektrophil fluoriert und in den entsprechenden Trichloracetimidat-Donor **81** überführt (Abb. 4.7) werden.

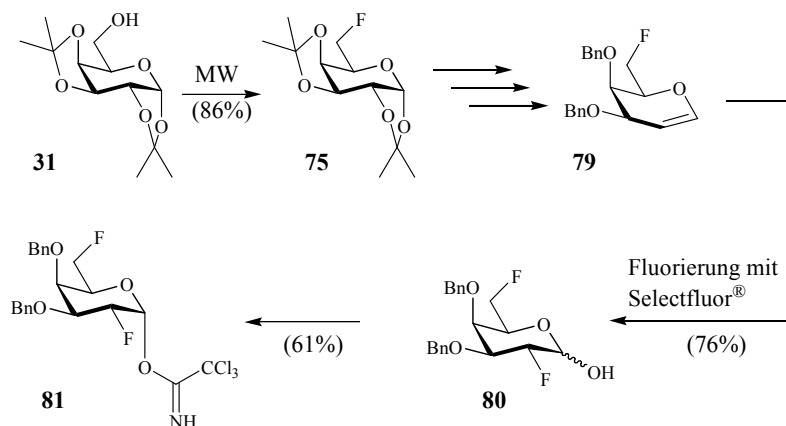


Abb. 4.7: Syntheseroute für den Aufbau eines 2,6-Bisfluorierten Trichloracetimidat-Donors

Die anschließende 3-Galactosylierung des T_N-Bausteins **13** gelang dabei zwar in guten Ausbeuten, jedoch mit einer noch nicht zufriedenstellenden β-Selektivität von 1:3 zugunsten des gewünschten β-Disaccharids **82**, die sicherlich durch weitere Optimierung noch verbessert werden kann. Allerdings ist der große Einfluss des zusätzlichen Fluorsubstituenten in der 6-Position auf die Stereoselektivität überraschend. Möglicherweise liegt hier eine (im Vergleich zu **56**) veränderte Konformation der Oxocarbeniumionen-Zwischenstufe vor, in der der 6-Fluorsubstituent die Oberseite des reaktiven ³H₄-Konformers teilweise abschirmt (s. Abb. 4.8).

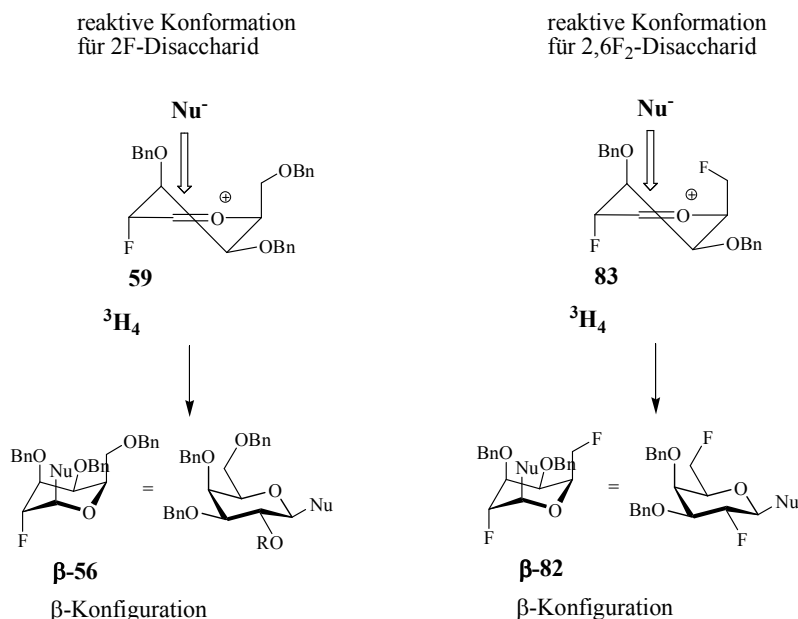


Abb. 4.8: Glycosylierung und Vergleich der reaktiven Konformationen mit Benzyl-Schutzgruppen für 2F- und 2,6F₂

Nach Abtrennung des als Nebenprodukt erhaltenen α -Anomers von **82** und Schutzgruppen-
transformation wurde schließlich erneut ein für die Festphasensynthese geeigneter
bisfluorierter Glycosylaminosäure-Baustein **86** erhalten (Abb. 4.9).

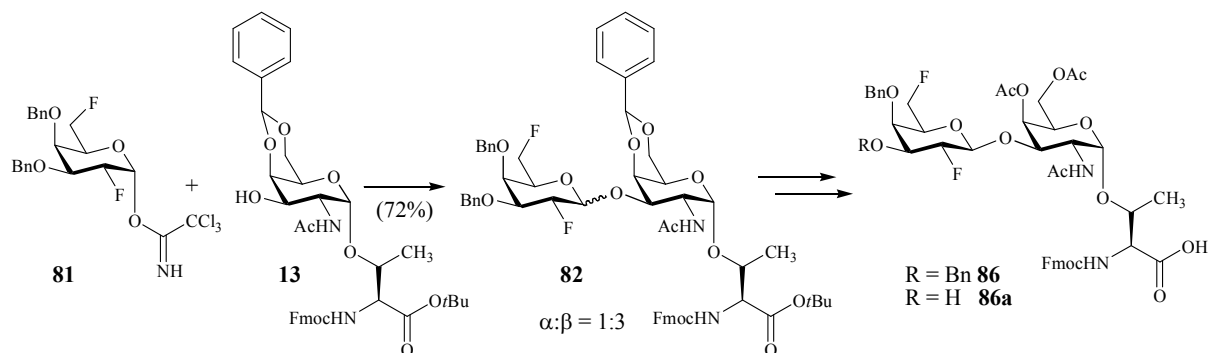


Abb. 4.9: Synthese der 2',6'-Bisfluorierten Glycosylaminosäure **86**

Zu Vergleichszwecken wurden neben den fluorierten Glycosylaminosäure-Bausteinen auch
deren natürliche (nicht-fluorierte) Vertreter anhand von literaturbekannten Synthese-
protokollen hergestellt (Abb. 4.10).

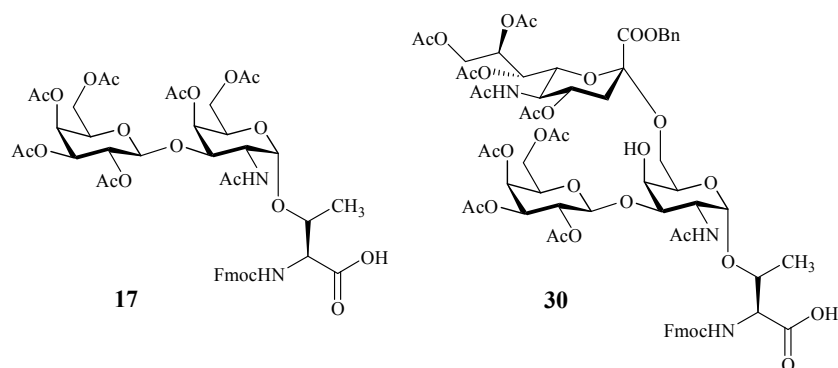


Abb. 4.10: Strukturen der natürlichen Antigene

Zudem wurden von den synthetisierten Glycosylaminosäuren insgesamt drei Vertreter durch
Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll in Peptidsequenzen des MUC1
eingebaut (s. Abb. 4.11). Die erhaltenen Glycopeptide und Glycopeptidanaloga **98**, **102** und
105 umfassen dabei mit zwanzig Aminosäuren jeweils eine vollständige Wiederholungs-
einheit aus der *tandem repeat*-Domäne des epithelialen Mucins MUC1, wobei die
entsprechenden Glycanseitenketten stets in Position 6 eingeführt wurden. Um die erhaltenen
Glycopeptide für immunologische Studien an Carrierproteine anbinden zu können und so ggf.

zu funktionsfähigen Impfstoff-Konjugaten zu gelangen, wurden diese stets *N*-terminal mit einem nicht-immunogenen Triethylenglycol-Spacer **93** verknüpft (Abb. 4.11).

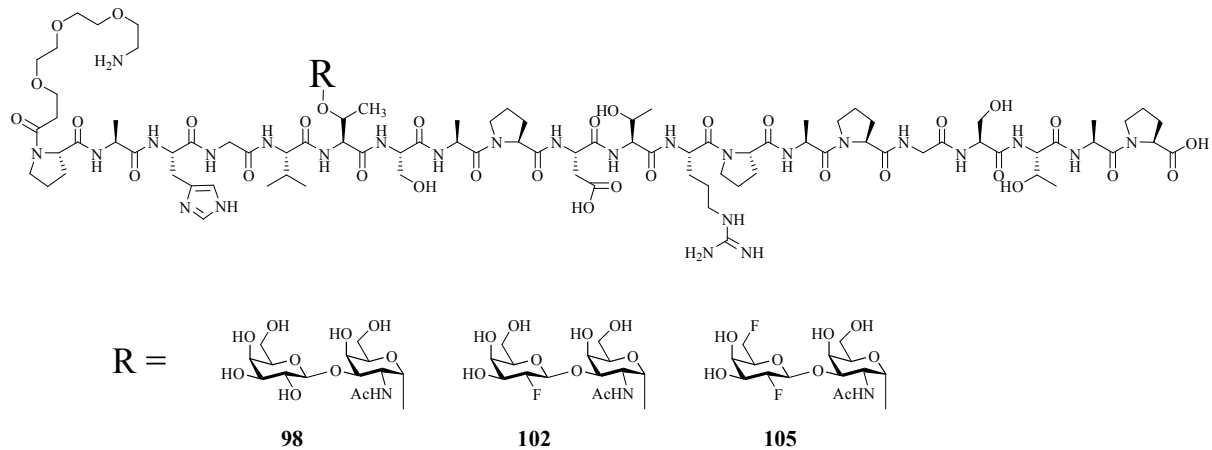


Abb. 4.11: Strukturen der synthetisierten Glycopeptide

Nach Reinigung der resultierenden vollständig deblockierten Glycopeptide **98**, **102** und **105** durch präparative RP-HPLC wurden diese mit Quadratsäurediethylester funktionalisiert, was eine pH-Wert gesteuerte chemoselektive Proteinkonjugation an die Lysin-Seitenketten des Carrierproteins BSA erlaubte (Abb. 4.12).

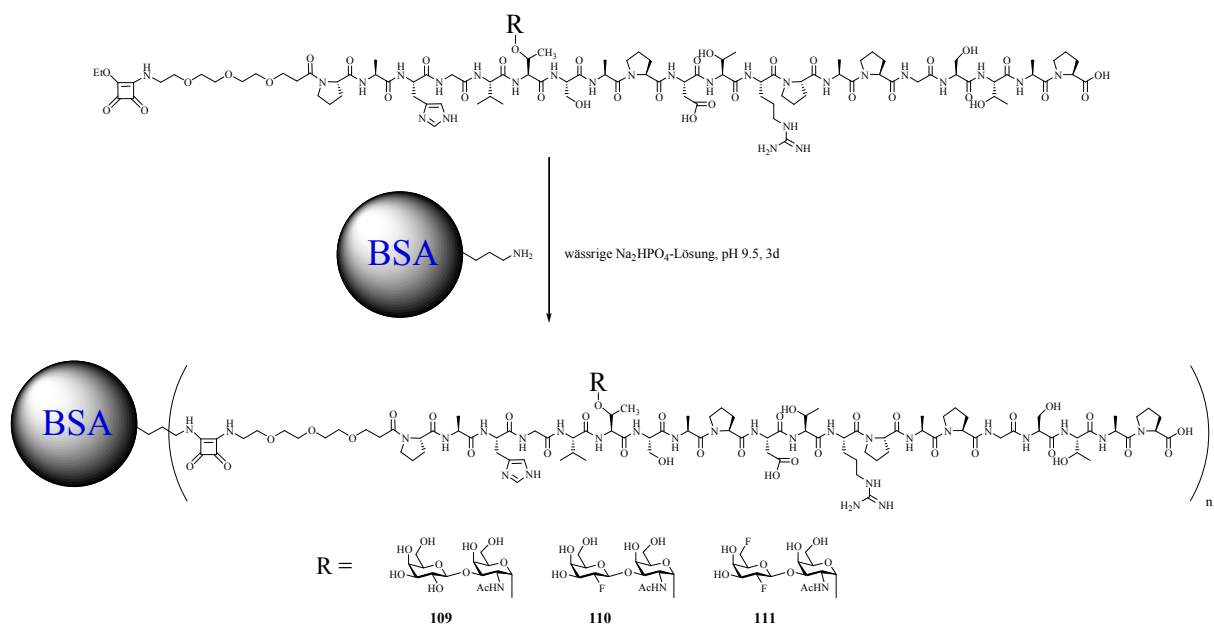


Abb. 4.12: Chemoselektive Anbindung der Glycopeptide an Carrierproteine

Obwohl derartige BSA-Konjugate für einen Einsatz als Impfstoffe weniger interessant sind, stellen sie wichtige Werkzeuge zur Beschichtung von Mikrotiterplatten in immunologischen Bindungsstudien dar. Beispielsweise kann mithilfe von BSA-Glycopeptidkonjugaten in Neutralisationsstudien die Selektivität der induzierten MUC1-spezifischen Antikörper ermittelt werden. Dazu werden letztere zunächst mit dem jeweiligen Glycopeptid-Linker-Konjugat inkubiert, bevor die Restbindungsfähigkeit der Antikörper an immobilisierte BSA-MUC1-Konjugate im Vergleich zur Bindung des unbehandelten Serums bestimmt wird. Im vorliegenden Fall wurden Serum-Antikörpern aus Vakzinierungsstudien von MUC1-Tetanus Toxoid-Konjugaten, die (i) eine natürliche TF-Antigenstruktur und (ii) ein entsprechendes TF-Antigen-Derivat mit Fluorsubstituenten an C-6 des Galactosamin-Bausteins und C-6' des Galactoserests tragen, eingesetzt. In beiden Fällen wurde eine nahezu vollständige Neutralisierung der Antikörper mit den eng verwandten fluorierten Glycokonjugaten **102** und **105** nachgewiesen. Wie Abb. 4.13 dabei zeigt, ist zudem die Bindung der fluorierten Glycopeptid-Antigene etwas stärker als die des vergleichbaren natürlichen Vertreters. Da zudem auch das unglycosylierte MUC1-Peptid-Antigen mit hoher Affinität erkannt wird, nicht jedoch ein verwandtes Mucin MUC4, das eine andere Peptidsequenz aufweist, wird die Spezifität der Antikörper im Wesentlichen von den vorhandenen Peptid-Epitopen der MUC1-TR-Sequenz bestimmt. Ein Vergleich der ELISA-Werte des unglycosylierten Konjugats mit denen der fluorierten Glycopeptid-Antigene zeigt jedoch deutlich, dass durch den Einbau geeigneter Kohlenhydrat-Epitope die Spezifität der induzierten Antikörper moduliert werden kann, und dass mit solchen Glycokonjugaten die strukturellen Erkennungseigenschaften von Antikörpern besser abgebildet werden.

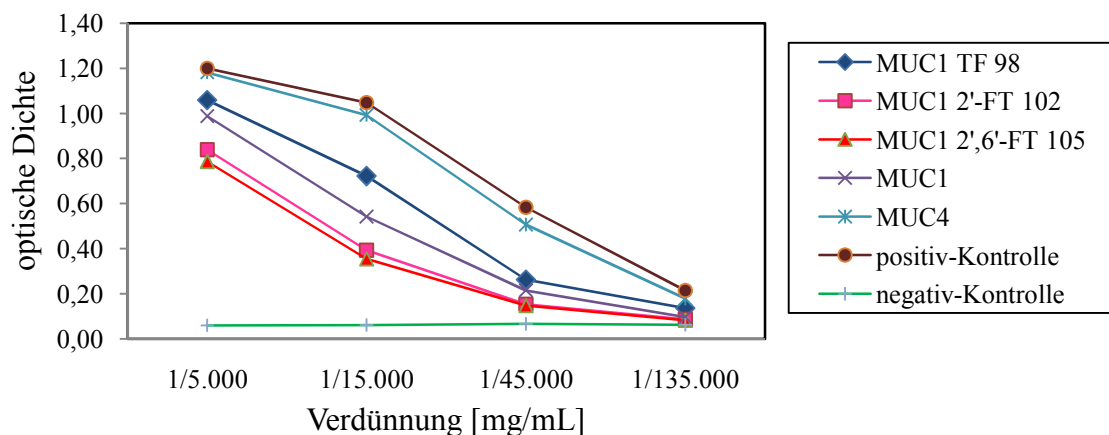


Abb. 4.13: Neutralisations-ELISA des Serum-Antikörpers (aus Immunisierung von Mäusen gegen das TTox-Vakzin 114) gegen fluorierte MUC1-Glycopeptide (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem BSA-Konjugat des MUC1-TF-Antigens 109)

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Lösungsmittel:

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

Chromatographie:

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

- Methoxyphenol-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%-iger ethanolischer Methoxyphenol-Lösung und 2 N ethanolischer Schwefelsäure).
- Seebach-Reagenz (2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 1.0 g Cer-(IV)-sulfat-tetrahydrat, 6 mL konzentrierte Schwefelsäure und 94 mL Wasser).

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

Für Flashchromatographie wurde Kieselgel der Firma *Acros Organics*, Nidderau, mit der Korngröße 0.035-0.070 mm und der Porengröße von 60 Å, sowie Kieselgel der Firma *Sigma Aldrich*, München, mit einer Korngröße von 0.040-0.063 mm und einer Porengröße von 60 Å verwendet.

Charakterisierung bereits bekannter Verbindungen:

- Die Charakterisierung dieser Verbindungen erfolgte i. d. Regel über ESI-MS, ¹H, ¹³C, gegebenenfalls ¹⁹F-NMR, sowie analytische RP-HPLC.
- Falls keine vollständige Charakterisierung möglich war, wird dies bei der jeweiligen Verbindung angegeben.
- Weiterführende Daten zu den jeweiligen Verbindungen sind aus der angegebenen Literatur zu entnehmen.

Drehwerte:

Die Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter 241 bei Wellenlängen von $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 578$ nm (Quecksilberdampfampe) gemessen und auf die Natrium-D-Linie ($\lambda = 589.5$ nm) extrapoliert. Lösungsmittel, Konzentrationen und Temperaturen sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt. Die Messküvette hat eine Länge von 10 cm mit einem Gesamtvolumen von ca. 1 mL.

Massenspektrometrie:

- ESI-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* LCT-Spektrometer bzw. einem *Micromass* Q-TOF Ultima 3 Spektrometer der Firma *Micromass*, Eschborn, aufgenommen.
- Hochaufgelöste HR-ESI-TOF-Spektren wurden mit einem *Micromass* Q-TOF Ultima 3-Spektrometer aufgenommen.
- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem *Micromass* Tofspec E-Spektrometer aufgenommen. Als Matrices dienten 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb, 20 mg/mL in Wasser/Acetonitril 1:1, mit Zusatz von 0.1% TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/mL in Wasser/Acetonitril + 0.1% TFA, 1:1).
- Das Molekulargewicht der Verbindungen wird in runden Klammern und die Angabe zur absoluten Masse wird in eckigen Klammern angegeben.
- Isotopenpeaks werden mit einem * angegeben.

Kernresonanzspektroskopie:

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

- Bruker AC-300: 300 MHz- ^1H -NMR und 75.5 MHz- ^{13}C -NMR
- Bruker AM-400: 400 MHz- ^1H -NMR und 376.6 MHz- ^{19}F -NMR
- Bruker AM-400: 400 MHz- ^1H -NMR, ^1H - ^1H -COSY, HMQC, HMBC, TOCSY, NOESY und 100.6 MHz- ^{13}C -NMR

Die angegebenen Werte für die chemische Verschiebung δ (in ppm) beziehen sich auf das Signal des jeweiligen Lösungsmittels als Standard. Die Kopplungskonstanten J der Signale werden in Hertz (Hz) angegeben.

Die Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffsignale erfolgte unter Verwendung von COSY, NOESY-, TOCSY-, HMQC- und HMBC-Experimenten, soweit in den NMR-Auswertungen

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

<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin:	ohne Apostroph
(1→3)- β -Galactose:	ein Apostroph
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure:	zwei Apostrophe.

Die Zuordnung der Signale der Aminosäuren erfolgt durch Indizierung mit den griechischen Buchstaben. Die Glycosylaminosäure in der Glycopeptidsynthese wird durch den Index * angezeigt.

Die Multiplizitäten der Signale wurden mit folgenden Abkürzungen angegeben:

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

Reversed-Phase HPLC:

Analytische RP-HPLC wurde mit einer *Jasco*-HPLC-Pumpe (PU-2080 Plus), einer tenären *Jasco*-Gradienteneinheit (LG-2080-02) und einem *Jasco*-3-Wege-Entgaser (DG-2080-53) sowie einem *Jasco*-Diodenarraydetektor MD-2010 Plus durchgeführt. Als Säulen wurden verwendet:

- *PerfectSil*-Säule 5 μm , C18, 300A, 250 \times 4.6 mm
- Phenomenex Luna 5 μm , C18(2), 100A, 250 \times 4.6 mm
- Phenomenex Jupiter 5 μm , C18(2), 300A, 250 \times 4.6 mm

Die Flussraten der Gradienten betragen jeweils 1 mL/min.

Semipräparative RP-HPLC wurden mit Hilfe zweier *Jasco* Gradientenpumpen (PU-2087Plus) und einem variablen Wellenlängendetektor (UV 2075Plus), ebenfalls von der Firma *Jasco*, durchgeführt. Als Säulen für die semipräparative HPLC wurden verwendet:

- *PerfectSil* 5 μm , C18, 300 Å, 250 \times 20 mm, Flussrate: 10 mL/min

- Phenomenex Luna 10 μm , C18(2), 100 \AA , 250 x 30.0 mm, Flussrate: 20 mL/min
- Phenomenex Jupiter 10 μm , C18(2), 300 \AA , 250 x 30.0 mm, Flussrate: 20 mL/min

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

Festphasenpeptidsynthese:

Die Festphasensynthesen der Glycopeptide wurden mit Hilfe eines Perkin-Elmer ABI 433A-Peptidsynthesizer der Fa. *Applied Biosystems* durchgeführt. Der Syntheseverlauf wurde mittels eines externen Series-200 UV/VIS-Detektors der Firma *Perkin-Elmer*, Rodgau, verfolgt.

Die verwendeten Aminosäure-Bausteine wurden von der Firma *Novabiochem AG*, Holzkirchen, und der Firma *Orpegen Pharma*, Heidelberg, bezogen. Als Harze wurden TentaGel S-Trt-Pro (SA1222), TentaGel R-Trt-Pro (RA1222) und Polystyrol-2-CT-Pro (PS-2-CT-Pro) von der Firma *Rapp Polymere*, Tübingen, eingesetzt.

N-Methylpyrrolidin-2-on und Dichlormethan (beide Peptide Grade) wurden von der Firma *Iris Biotech*, Marktredwitz, bezogen.

Die Kupplungsreagenzien HBTU und HOBt stammen von der Firma *Novabiochem AG*, Holzkirchen und *Iris Biotech*, Marktredwitz. Die Kupplungsreagenzien HATU und HOAt wurden von der Firma *AK Scientific*, Mountain View, USA, bezogen.

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

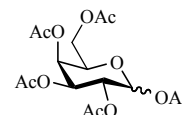
Tetanus-Toxoid: Es wurde eine Lösung des Tetanus-Toxoids mit einer Konzentration von 17 mg pro mL Natriumchloridpuffer ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Substanz wurde von der Firma *CLS Behring*, Marburg, bezogen.

Ultrafiltration: Wurde mit einer *Stirred Ultrafiltration Cell* der Firma *Millipore Corporation*, Bedford, USA durchgeführt. Für die Ultrafiltrationen wurden Polyethersulfon-Membrane mit einer Durchlässigkeit von 10 kDa und 30 kDa verwendet.

5.2 Synthesen zu Kapitel 3.1

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- α/β -D-galactopyranose (**2**)^[77]

(α/β -Ac₅Gal)



Es wurden 50.00 g (0.278 mol) D-(+)-Galactose (**1**) in 500 mL Pyridin gelöst und unter Rühren mit 265 mL Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 20 h unter Argon-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde auf 500 mL Eiswasser gegossen und fünfmal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das rohe Anomeren-gemisch wurde aus Ethanol umkristallisiert.

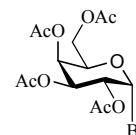
Ausbeute: 58.72 g (54%, 150.4 mmol), farbloser Feststoff als Anomeren-gemisch

C₁₆H₂₀O₁₁ (M = 390.34 g/mol) [390.12]

Analytische Daten siehe Literatur.^[244]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid (**3**)^[77]

(α Ac₄GalBr)



Es wurden 58.72 g (150.4 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- α -D-galactopyranose (**2**) portionsweise zu einer gut gerührten, auf 0 °C gekühlten Lösung aus HBr in Eisessig (33%, 100 mL) gegeben. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemp. erwärmt und 45 min gerührt. Zur Hydrolyse wurde die Reaktionsmischung auf Eiswasser gegossen und mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 250 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 58.18 g (94%, 0.141 mol), farbloses Öl

$[\alpha]_D^{23} = +210.8$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.^[245] $[\alpha]_D^{21} = +212.0$ (c = 1.00, CHCl₃)

R_f = 0.50 (^cHex /EtOAc, 1:1)

C₁₄H₁₉BrO₉ (M = 411.20 g/mol) [410.02]

ESI-MS (*positiv*), m/z : 331.14 ($[M-Br]^+$, ber.: 331.10).

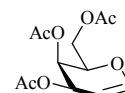
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 6.69 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, 1-H), 5.51 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.2$ Hz, 4-H), 5.39 (dd, 1 H, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, $J_{H3,H2} = 10.7$ Hz, 3-H), 5.04 (dd, 1 H, $J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.5$ Hz, 2-H), 4.48 (t, 1 H, $J_{H5,H6a/b} = 6.3$ Hz, 5-H), 4.22–4.08 (m, 2 H, 6a/b-H), 2.14, 2.11, 2.05, 2.00 (4 x s, 12 H, 4 x CH_3 (Ac)).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 170.3, 170.0, 169.9, 168.7 (4 x C=O (Ac)), 88.1 (C1), 71.0 (C2), 68.0 (C6), 67.7 (C3), 66.9 (C4), 60.8 (C5), 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 (4 x CH_3 (Ac)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[245,246]

3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**4**)^[77,78]

(Ac₃Gal)



57.80 g (0.88 mol) Zinkpulver wurden mit verdünnter Salzsäure (1 M) aktiviert, je zweimal mit dest. Wasser, mit Essigsäureethylester und Diethylether gewaschen und getrocknet. Das so aktivierte Zink wurde in 250 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt und mit 7.20 mL (90.00 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt. Die Mischung wurde zum Sieden erhitzt, bevor 36.23 g (88.10 mmol) Ac₄GalBr **3**, gelöst in 150 mL Essigsäureethylester, innerhalb von einer Stunde zugetropft wurden. Die Reaktionsmischung wurde noch eine weitere Stunde unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen wurde durch *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 150 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und zweimal mit je 200 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 13.92 g (58%, 51.10 mmol), farbloser kristalliner Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = -19.7$ ($c = 0.10$, $CHCl_3$), Lit.:^[247] $[\alpha]_D^{23} = -16.9$ ($c = 1.10$, $CHCl_3$)

$R_f = 0.35$ (c Hex /EtOAc, 2:1)

$C_{12}H_{16}O_7$ (M = 272.25 g/mol) [272.09]

ESI-MS (*positiv*), m/z : 295.11 ($[M+Na]^+$, ber.: 295.08).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 6.46 (dd, 1 H, $J_{H1,H2} = 6.2$ Hz, $J_{H1,H3} = 1.8$ Hz, 1-H), 5.55 (d, 1 H, $J_{H3,H4} = 2.2$ Hz, 3-H), 5.44–5.40 (m, 1 H, 4-H), 4.75–4.71 (m, 1 H, 2-H),

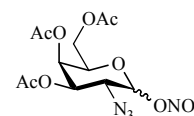
4.33–4.29 (m, 1 H, 5-H), 4.26–4.17 (m, 2 H, 6a/b-H), 2.13, 2.09, 2.03 (3 x s, 9 H, 3 x CH₃ (Ac)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.5, 170.2, 170.1 (3 x C=O (Ac)), 145.4 (C1), 98.8 (C2), 72.8 (C5), 63.8, 63.7 (C3, C4), 61.9 (C6), 20.8, 20.7, 20.6 (3 x CH₃ (Ac)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[248]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (**5**)^[78]

(α/β -Ac₃GalN₃ONO₂)



Es wurden 192.1 g (350.4 mmol) Cer(IV)-ammoniumnitrat und 12.15 g (186.8 mmol) Natriumazid in 300 mL absol. Acetonitril suspendiert. Die Suspension wurde auf -25 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur tropfenweise mit 25.42 g (93.40 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-galactal (**4**), gelöst in 150 mL absol. Acetonitril, versetzt. Anschließend wurde 16 h bei -18 °C (Tiefkühltruhe) weitergerührt. Danach wurde die intensiv gelbe Reaktionslösung durch Zugabe von 400 mL eiskaltem Diethylether verdünnt und auf 500 mL Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 250 mL dest. Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex /EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 15.89 g (45%, 42.23 mmol), farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.33 (°Hex/EtOAc, 2:1),

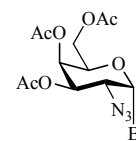
C₁₂H₁₆N₄O₁₀ (M = 376.28 g/mol) [376.09]

ESI-MS (*positiv*), *m/z*: 399.11 ([M+Na]⁺, ber.: 399.09).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.34 (d, 1 H, J_{H1 α ,H2 α} = 4.1 Hz, 1 α -H), 5.57 (d, 1 H, J_{H1 β ,H2 β} = 8.8 Hz, 1 β -H), 5.50 (d, 1 H, J_{H4 α ,H3 α} = 2.2 Hz, 4 α -H), 5.39 (d, 1 H, J_{H4 β ,H3 β} = 2.9 Hz, 4 β -H), 5.25 (dd, 1 H, J_{H3 α ,H4 α} = 3.3 Hz, J_{H3 α ,H2 α} = 11.4 Hz, 3 α -H), 4.95 (dd, 1 H, J_{H3 β ,H4 β} = 3.3 Hz, J_{H3 β ,H2 β} = 10.7 Hz, 3 β -H), 4.36 (pt, 1 H, 5 α -H), 4.14–4.07 (m, 6 H, 2 α -H 5 β -H, 6a/b-H), 3.83 (dd, 1 H, J_{H2 β ,H1 β} = 8.8 Hz, J_{H2 β ,H3 β} = 10.3 Hz, 2 β -H), 2.17, 2.07, 2.04 (3 x s, 9 H, 3 x CH₃ (Ac)).

Aus den Integralen des ¹H-Spektrums wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 6:1$ erhalten.

Analytische Daten siehe Literatur.^[79,249]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromid (6)^[250,251]**(α Ac₃GalN₃-Br)**

Zu einer Suspension aus 13.50 g (155.4 mmol) Lithiumbromid in 150 mL absol. Acetonitril wurden langsam 11.00 g (29.23 mmol) α/β -Ac₃GalN₃-ONO₂ **5**, gelöst in 80 mL absol. Acetonitril, getropft. Die Mischung wurde bei Raumtemp. 14 h gerührt und anschließend mit 300 mL Dichlormethan verdünnt. Es wurde zweimal mit je 250 mL ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.33 g (70%, 16.06 mmol), farbloser kristalliner Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +166.5$ (c = 0.10, CHCl₃), Lit.:^[252] $[\alpha]_D^{25} = +188.6$ (c = 1.95, CHCl₃)

$R_f = 0.76$ (^cHex /EtOAc, 1:1)

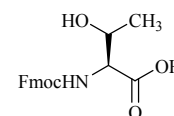
C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (M = 394.18 g/mol) [394.02]

ESI-MS (*positiv*), *m/z*: 416.02 ([M+Na]⁺, ber.: 416.01), 418.02 ([M*+Na]⁺, ber.: 418.00).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.47 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, 1-H), 5.50–5.49 (m, 1 H, 4-H), 5.34 (dd, 1 H, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, $J_{H3,H2} = 10.7$ Hz, 3-H), 4.50–4.45 (pt, 1 H, 5-H), 4.17–4.07 (m, 2 H, 6a/b-H), 3.99 (dd, 1 H, $J_{H2,H1} = 3.7$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.7$ Hz, 2-H), 2.16, 2.06, 2.05 (3 x s, 9 H, 3 x CH₃ (Ac)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.3, 168.8, 169.5 (3 x C=O (Ac)), 88.8 (C1), 71.4 (C5), 69.8 (C3), 66.5 (C4), 61.0 (C6), 58.6 (C2), 20.6, 20.5, 20.4 (3 x CH₃ (Ac)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[253,254]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-threonin (8)**^[81,92]**(Fmoc-Thr-OH)**

Es wurden 17.70 g (148.5 mmol) L-Threonin (**7**) und 12.50 g (148.6 mmol) Natriumhydrogencarbonat wurden in einem 1:1-Gemisch aus Aceton/Wasser (V = 800 mL) gelöst. Zu dieser Mischung wurden unter Rühren 50.00 g (148.2 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) gegeben. Nach ca. 24 h Rühren wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 2 angesäuert und das Aceton wurde i. Vak. abdestilliert. Die verbleibende wässrige Phase wurde dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert und

die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 200 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und zweimal mit je 200 mL dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde dreimal mit Toluol sowie zweimal mit Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 45.70 g (90%, 0.13 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$C_{19}H_{19}NO_5$ (M = 341.36 g/mol) [341.13]

ESI-MS (*positiv*), *m/z*: 364.14 ($[M+Na]^+$, ber.: 364.12), 705.30 ($[2M+Na]^+$, ber.: 705.25).

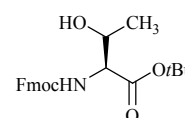
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.7$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60–7.55 (m, 2 H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.44 (t, 2 H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.5$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.30–7.22 (m, 2 H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.03 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.0$ Hz, NH), 4.50–4.32 (m, 4 H, T^α , T^β , CH_2 (Fmoc)), 4.17 (t, 1 H, $J_{CH,CH_2} = 7.1$ Hz, CH (Fmoc)), 1.21 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ), 1.07 (bs, 1 H, OH).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 174.5 (C=O (Ac)), 157.2 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.5 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 67.9 (CH_2 (Fmoc)), 67.4 (T^β), 59.06 (T^α), 47.0 (CH (Fmoc)), 19.4 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[255]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (9)**^[83,256]

(Fmoc-Thr-*Or*Bu)



Eine Mischung aus 110.7 g (536.5 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 22.60 g (698.3 mmol) *tert*-Butanol und 1.20 g (12.00 mmol) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wurde unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre fünf Tage lang gerührt. Anschließend wurde die dunkelgrüne Reaktionsmischung mit 40 mL absol. Dichlormethan verdünnt, bevor eine Lösung aus 29.80 g (87.30 mmol) Fmoc-Thr-OH **8**, gelöst in 100 mL absol. Dichlormethan, innerhalb von einer Stunde zugetropft wurde. Die Reaktionslösung wurde zunächst 1 h unter Eisbadkühlung gerührt und anschließend noch eine weitere Stunde bei Raumtemp. gerührt, bevor mit 100 mL Dichlormethan verdünnt wurde. Danach wurde durch *Hyflo* filtriert und der Rückstand wurde mit eiskaltem Dichlormethan (200 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.

Vak. eingengt und ausgefallener Harnstoff wurde abfiltriert und mit eiskaltem Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. komplett entfernt, und der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1) sowie anschließender Umkristallisation aus Diethylether und Cyclohexan gereinigt.

Ausbeute: 20.54 g (59%, 51.68 mmol), farbloser kristalliner Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = -7.0$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[89] $[\alpha]_D^{23} = -9.0$ (c = 1.15, CHCl₃)

$R_f = 0.16$ (^cHex /EtOAc, 4:1)

C₂₃H₂₇NO₅ (M = 397.46 g/mol) [397.19]

ESI-MS (positiv), m/z: 420.28 ([M+Na]⁺, ber.: 420.18).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.7$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.31 (t, 2 H, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.55 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 8.4$ Hz, NH), 4.41 (d, 2 H, $J_{CH2,CH} = 6.8$ Hz, CH₂ (Fmoc)), 4.31–4.29 (m, 2 H, T^α, T^β), 4.24 (t, 1 H, $J_{CH/CH2} = 7.0$ Hz, CH (Fmoc)), 1.95 (bs, 1 H, OH), 1.49 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.25 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

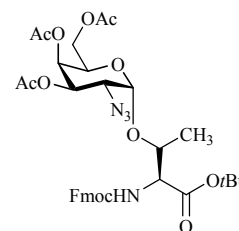
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ(ppm): 170.2 (C=O (Ac)), 156.7 (C=O (Urethan)), 143.9, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 82.6 (C_q (tBu)), 68.3 (T^β), 67.1 (CH₂ (Fmoc)), 59.0 (T^α), 47.1 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (tBu)), 14.9 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[89,257]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (10)^[89]**

(Fmoc-Thr-(αAc₃GalN₃)-OtBu)

Eine Lösung aus 5.96 g (15.00 mmol) Fmoc-Thr-OtBu **9** in einer Mischung aus 50 mL absol. Dichlormethan und 40 mL absol. Toluol wurde zusammen mit 15 g gepulvertem, aktiviertem Molekularsieb (4 Å) 0.5 h unter Argonatmosphäre gerührt. Im Eisbad wurde die Suspension auf 0 °C abgekühlt, bevor unter Lichtausschluss 6.05 g (21.94 mmol) Silbercarbonat⁴ hinzugefügt wurden. Die Reaktions-



⁴ Wurde einige Stunden im Vakuum getrocknet.

mischung wurde anschließend mit einer Lösung von 1.00 g (4.82 mmol) wasserfreiem Silberperchlorat,⁵ gelöst in 25 mL absol. Toluol, versetzt. Es wurde eine Stunde bei 0 °C gerührt, bevor innerhalb von 30 min eine Lösung aus 4.70 g (11.90 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**6**), gelöst in 100 mL einer Mischung aus absol. Dichlormethan und absol. Toluol (1:1), zugetropft wurde. Die Reaktionsmischung wurde unter langsamem Erwärmen auf Raumtemp. weitere 18 h gerührt, bevor sie schließlich mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und durch *Hyflo* filtriert wurde. Anschließend wurde dreimal mit je 250 mL ges. Natriumhydrogencarbonat- und zweimal mit je 250 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt. Dabei war die vollständige Abtrennung des unglycosylierten Akzeptors nicht möglich, die jedoch nach einer weiteren flashchromatographischen Reinigung an Kieselgel (CH₂Cl₂/EtOAc, 10:1) gelang. Das als Nebenprodukt anfallende β -Anomer konnte säulenchromatographisch abgetrennt werden.

Ausbeute: 5.38 g (39%, 7.57 mmol, bezogen auf das α -Anomer), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +64.0$ (c = 1.01, CHCl₃), Lit.:^[89] $[\alpha]_D^{23} = +69.3$ (c = 1.00, CHCl₃)

$R_f = 0.58$ (CH₂Cl₂/EtOAc, 10:1)

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

ESI-MS (*positiv*), *m/z*: 733.25 ([M+Na]⁺, ber.: 733.72), 1444.54 ([2M+Na]⁺, ber.: 1444.45).

¹H-NMR (400 MHz, COSY, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_7,H_8} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42–7.27 (m, 4 H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 5.66 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 5.47 (d, 1 H, $J_{H_4,H_3} = 2.3$ Hz, 4-H), 5.34 (dd, 1 H, $J_{H_3,H_4} = 3.3$ Hz, $J_{H_3,H_2} = 11.2$ Hz, 3-H), 5.11 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, 1-H), 4.49–4.42 (m, 1 H, T ^{β}), 4.42–4.31 (m, 2 H, 6a/b-H), 4.31–4.25 (m, 3 H, T ^{α} , 5-H, CH (Fmoc)), 4.11 (d, 2 H, $J_{CH_2,CH} = 6.4$ Hz, CH₂ (Fmoc)), 3.64 (dd, 1 H, $J_{H_2,H_1} = 3.7$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 11.2$ Hz, 2-H), 2.16, 2.09, 2.06 (3 x s, 9 H, 3 x CH₃ (Ac)), 1.51 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.35 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

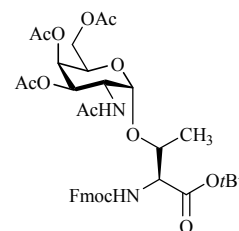
¹³C-NMR (100.6 MHz, HMQC, CDCl₃), δ (ppm): 170.3, 170.0, 169.8, 169.2 (4 x C=O (Ac, Ester)), 156.8 (C=O (Urethan)), 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.3, 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 119.9, 119.9 (C4-,

⁵ Silberperchlorat Monohydrat wurde mehrfach mit absol. Toluol i. Vak. kodestilliert.

C5–Fmoc), 99.2 (C1), 82.9 (C_q (*t*Bu)), 76.4 (T^β), 68.0 (C3), 67.6 (C4, CH₂ (Fmoc)), 67.0 (C5), 61.8 (C6), 59.2 (T^α), 57.7 (C2), 47.1 (CH (Fmoc)), 27.9 (CH₃ (*t*Bu)), 20.6, 20.6, 20.6 (3 x CH₃ (Ac)), 18.9 (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 (11)** [78]

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu)



In 400 mL einer Mischung aus THF, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) wurden 5.60 g (7.88 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu **10** gelöst. Zu dieser Lösung wurden 6.00 g (91.70 mmol) Zink-Staub gegeben, welcher zuvor durch eine 5%-ige CuSO₄-Lösung aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet worden war. Es wurde 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 600 mL THF verdünnt und durch *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wurde i. Vak. eingengt und der Rückstand wurde fünfmal mit jeweils 50 mL Toluol und dreimal mit jeweils 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 200 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 200 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 150 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.36 g (76%, 6.00 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = + 50.50$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[89] $[\alpha]_D^{23} = + 61.3$ (c = 1.00, CHCl₃)

R_f = 0.20 (^cHex /EtOAc, 1:1)

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

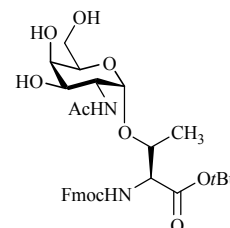
ESI-MS (*positiv*), *m/z*: 671.49 ([M-*t*Bu+H]⁺, ber.: 671.25), 727.46 ([M+H]⁺, ber.: 727.31), 749.44 ([M+Na]⁺, ber.: 749.29), 765.46 ([M+K]⁺, ber.: 765.40)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.44–7.27 (m, 4 H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc), 5.99 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz, NH (Fmoc)), 5.56 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz, NH (GalNAc)), 5.39 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.3$ Hz, 4-H), 5.09 (dd, 1 H, $J_{H3,H4} =$

2.9 Hz, $J_{H3,H2} = 11.2$ Hz, 3-H), 4.89 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.66–4.58 (m, 1 H, 2-H), 4.45–4.37 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.31–4.03 (m, 6 H, CH (Fmoc), 5-H, 6a/b-H, T^α, T^β), 2.17 (s, 3 H, CH₃ (Ac)), 2.04 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 2.00, 1.99 (2 x s, 6 H, 2 x CH₃ (Ac)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.33 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, HMQC), δ(ppm): 170.9 (C=O (NHAc)), 170.3, 170.3 (3 x C=O (Ac)), 170.0 (C=O (Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 99.9 (C1), 83.2 (C_q (*t*Bu)), 77.2 (T^β), 68.7 (C3), 67.4 (C4, C5), 67.3 (CH₂ (Fmoc)), 62.1 (C6), 58.9 (T^α), 47.3, 47.1 (C2, CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.2 (CH₃ (NHAc)), 20.7, 20.6 (3 x CH₃ (Ac)), 18.5 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (12)^[84,258]
(Fmoc-Thr(α GalNAc)-*Ot*Bu)**



Es wurden 2.40 g (3.30 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-*Ot*Bu **11** in 50 mL absol. Methanol gelöst und unter ständiger pH-Wertkontrolle so lange mit einer frisch hergestellten 1%-igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung tropfenweise versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde ca. 18 h gerührt, wobei der pH-Wert ständig kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wurde. Nach der vollständigen Deacetylierung wurde das Reaktionsgemisch durch Zusatz von saurem Ionenaustauscher *Amberlyst IR 120* neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/EtOH, 5:0.4) gereinigt.

Ausbeute: 1.21 g (61%, 2.02 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +29.0$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[89] $[\alpha]_D^{22} = +40.2$ (c = 1.00, CHCl₃)

$R_f = 0.15$ (CH₂Cl₂/EtOH, 5:0.4)

C₃₁H₄₀N₂O₁₀ (M = 600.66 g/mol) [600.27]

ESI-MS (*positiv*), *m/z*: 601.33 ([M+H]⁺, ber.: 601.31), 623.32 ([M+Na]⁺, ber.: 623.29), 1224.65 ([2M+H+Na]⁺, ber.: 1224.61).

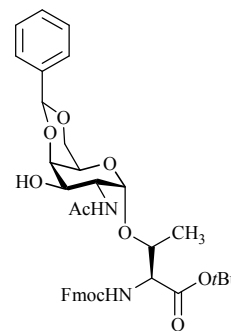
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 7.74 (d, 2 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62–7.58 (m, 2 H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38 (t, 2 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/\text{H}_7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2 H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1/\text{H}_3} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6/\text{H}_8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.92 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.6$ Hz, NH (GalNAc)), 6.10 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 4.95 (bs, 1 H, OH), 4.85 (d, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.47–4.28 (m, 4 H, CH_2 (Fmoc), CH (Fmoc), 2-H), 4.27–4.20 (m, 1 H, T^α), 4.19–4.07 (m, 2 H, 4-H, T^β), 3.92–3.76 (m, 4 H, 3-H, 5-H, 6a/b-H), 3.66 (bs, 3 H, 3 x OH), 2.10 (s, 3 H, CH_3 (NHAc)), 1.42 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{\text{T}\alpha,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 173.3, 170.6 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 156.6 (C=O (Urethan)), 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 99.7 (C1), 82.9 (C_q (*t*Bu)), 76.3 (T^β), 70.3, 70.2 (C3, C5), 69.3 (C4), 67.1 (CH_2 (Fmoc)), 61.9 (C6), 59.1 (T^α), 50.4 (C2), 47.1 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH_3 (*t*Bu)), 23.0 (CH_3 (NHAc)), 18.9 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (13)^[106]**

(Fmoc-Thr-(α 4,6-BznGalNAc)-*Ot*Bu)

Es wurden 1.20 g (1.99 mmol) Fmoc-Thr(α GalNAc)-*Ot*Bu **12** in 50 mL absol. Acetonitril gelöst und langsam mit 0.73 mL (4.80 mmol) Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Durch Zugabe von *para*-Toluolsulfonsäure wurde der pH-Wert der Lösung auf pH = 4 eingestellt. Die



Mischung wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend durch die Zugabe von drei Tropfen Triethylamin neutralisiert. Danach wurde das Lösungsmittel i.Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex /EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.15 g (84%, 1.87 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +64.5$ (c = 1.00, CHCl_3), Lit.:^[259] $[\alpha]_D^{23} = +61.3$ (c = 1.00, CHCl_3)

$R_f = 0.30$ (c Hex /EtOAc, 1:2)

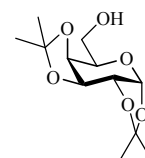
$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (M = 688.76 g/mol) [688.30]

ESI-MS (*positiv*), m/z : 689.57 ($[M+H]^+$, ber.: 689.31), 711.49 ($[M+Na]^+$, ber.: 711.29), 727.43 ($[M+K]^+$, ber.: 727.40).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY) δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.8$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.56–7.48 (m, 2 H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.47–7.28 (m, 7 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{ar} (Bzn)), 6.54 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 8.6$ Hz, NH (GalNAc)), 5.61 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 5.57 (s, 1 H, CH (Bzn)), 4.96 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.56–4.42 (m, 3 H, 2-H, 6a/b-H), 4.30–4.23 (m, 2 H, CH (Fmoc), T^α), 4.23–4.14 (m, 3 H, 4-H, CH_2 (Fmoc), T^β), 4.10–4.03 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH} = 12.3$ Hz, CH_2 (Fmoc)), 3.90–3.82 (m, 1 H, 3-H), 3.72 (s, 1 H, 5-H), 3.50 (bs, 1 H, OH), 2.11 (s, 3 H, CH_3 (Ac)), 1.47 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)), 1.27 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, HMQC), δ (ppm): 172.4, 170.7 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 ($C1a-$, $C8a$ -Fmoc), 141.3 ($C4a-$, $C5a$ -Fmoc), 137.4 (C_q (Bzn)), 129.1, 128.2 (C_{ar} (Bzn)), 127.8, 127.7 ($C3-$, $C6$ -Fmoc), 127.0 ($C2-$, $C7$ -Fmoc), 126.3 (C_{ar} (Bzn)), 125.0 ($C1-$, $C8$ -Fmoc), 120.0 ($C4-$, $C5$ -Fmoc), 101.1 (CH (Bzn)), 100.4 ($C1$), 83.3 (C_q (*t*Bu)), 76.7 (T^β), 75.5 ($C4$), 69.6 ($C3$), 69.1 (CH_2 -Fmoc), 67.1 ($C6$), 63.6 ($C5$), 58.9 (T^α), 50.3 ($C2$), 47.1 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH_3 (*t*Bu)), 23.1 (CH_3 (NHAc)), 19.0 (T^γ).

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**31**)^[121,259]



Zu einer Mischung aus 45.00 g (0.25 mol) D-(+)-Galactose (**1**) und 100.5 g (0.63 mol) Kupfersulfat in 900 mL Aceton wurden 6.0 mL konz. Schwefelsäure zugegeben. Die Suspension wurde 24 h bei Raumtemp. gerührt, bevor das Kupfersulfat abfiltriert wurde und das Filtrat mit festem Calciumhydroxid neutralisiert wurde. Anschließend wurde durch *Hyflo* filtriert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 46.30 g (7%, 0.18 mmol), gelbes Öl

$R_f = 0.39$ (c Hex/EtOAc, 1:1)

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

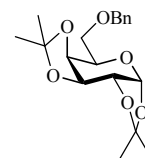
ESI-MS (positiv), m/z : 283.09 ($[M+Na]^+$, ber.: 283.12), 543.24 ($[2M+Na]^+$, ber.: 543.25).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5.53 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 5.0$ Hz, 1-H), 4.58 (dd, 1 H, $J_{H3,H4} = 7.9$ Hz, $J_{H3,H2} = 2.4$ Hz, 3-H), 4.30 (dd, 1 H, $J_{H2,H1} = 5.0$ Hz, $J_{H2,H3} = 2.4$ Hz, 2-H), 4.24 (dd, 1 H, $J_{H4,H3} = 8.0$ Hz, $J_{H4,H5} = 1.3$ Hz, 4-H), 3.87-3.75 (m, 2 H, 6a/b-H), 3.71 (pt, 1 H, $J_{H5,H6a/b} = 8.7$ Hz, 5-H), 2.47 (bs, 1 H, OH), 1.49, 1.41, 1.30 (3 x s, 12 H, CH_3).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$, DEPT), δ (ppm): 109.3, 108.6 (2 x C (CH_3)₂), 96.2 (C1), 71.4 (C4), 70.6 (C3), 70.5 (C2), 68.1 (C5), 62.1 (C6), 25.9, 25.8, 24.8, 24.2 (4 x CH_3).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[260]

6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**32**)^[122]



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 36.50 g 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**31**) (0.14 mol) in 245 mL DMF wurden portionsweise 9.00 g (0.23 mol) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) zugegeben. Bei dieser Temperatur wurde 30 min gerührt, bevor eine Lösung von 26.7 mL (0.23 mol) Benzylbromid in 40 mL DMF langsam zugetropft wurde. Nach 20 h Rühren bei Raumtemp. wurden langsam 8.20 mL Methanol zugesetzt, bevor die Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurden. Der Rückstand wurde in 250 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit jeweils 100 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde noch viermal mit je 20 mL Toluol kodestilliert und anschließend durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}Hex/EtOAc$, 8:1) gereinigt.

Ausbeute: 40.90 g (83%, 0.12 mol), blassgelbes Öl

$R_f = 0.54$ ($^{\circ}Hex/EtOAc$, 5:1)

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

ESI-MS (positiv), m/z : 373.17 ($[M+Na]^+$, ber.: 373.16), 389.15 ($[M+K]^+$, ber.: 389.27).

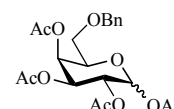
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.36-7.25 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.55 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 5.0$ Hz, 1-H), 4.65-4.52 (m, 3 H, 3-H, 4.59 {d, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.0$ Hz, CH_2 (Bn)}), 4.31 (dd, 1 H, $J_{H2,H1} = 5.0$ Hz, $J_{H2,H3} = 2.4$ Hz,), 4.27 (dd, 1 H, $J_{H4,H3} = 8.0$ Hz, $J_{H4,H5} = 1.7$ Hz, 4-H), 4.0 (pt, 1 H, $J_{H5,H6a/b} = 6.7$ Hz, 5-H), 3.73-3.60 (m, 2 H, 6a/b-H), 2.47 (bs, 1 H, OH), 1.54, 1.43, 1.33 (3 x s, 12 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , DEPT), δ (ppm): 138.2 (C_q (Bn)), 128.2, 127.6, 127.4 (C_{Ar}), 109.1, 108.4 (2 x C (CH_3)₂), 96.3 (C1), 73.2 (CH_2 (Bn)), 71.1 (C4), 70.5 (C3), 70.5 (C2), 68.8 (C6), 26.0, 25.9, 24.8, 24.3 (4 x CH_3).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[261]

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (**33**)^[122]

(α/β Ac₄-6-Bn-Gal)



Es wurden 9.71 g (27.72 mmol) 6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**32**) in 200 mL Essigsäure ($w = 75\%$) gelöst und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Essigsäure i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde viermal mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung unter Eisbadkühlung mit 105 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (2:1) versetzt und über Nacht auf Raumtemp. erwärmt. Überschüssiges Pyridin und Acetanhydrid wurden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde fünfmal mit jeweils 80 mL Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2.1).

Ausbeute: 365.6 mg (66%, 0.81 mmol), blassgelbes Öl

$R_f = 0.69$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1)

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ $M = 438.43$ g/mol [438.15]

ESI-MS (positiv), m/z : 461.16 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 461.14), 477.14 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 477.25).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 7.26-7.23 (m, 10 H, H_{Ar}), 6.36 (d, 1 H, $J_{\text{H}1\alpha,\text{H}2\alpha} = 3.9$ Hz, $1\alpha\text{-H}$), 5.69 (d, 1 H, $J_{\text{H}1\beta,\text{H}2\beta} = 3.9$ Hz, $1\beta\text{-H}$), 5.57-5.55 (m, 1 H, $4\alpha\text{-H}$), 5.51 (dd, 1 H, $J_{\text{H}4\beta,\text{H}3\beta} = 3.4$ Hz, $J_{\text{H}4\beta,\text{H}5\beta} = 1.0$ Hz, $4\beta\text{-H}$), 5.33-5.27 (m, 3 H, $2\beta\text{-H}$ {5.32}, $3\beta\text{-H}$ {5.30}, $2\alpha\text{-H}$ {5.29}), 5.07 (dd, 1 H, $J_{\text{H}3\beta,\text{H}2\beta} = 10.4$ Hz, $J_{\text{H}3\beta,\text{H}4\beta} = 3.4$ Hz, $3\beta\text{-H}$), 4.54 (d, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.0$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.39 (dd, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.0$ Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 5.1$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.37-4.27 (m, 1 H, $5\alpha\text{-H}$), 3.99 (ddd, 1 H, $J_{\text{H}5\beta,\text{H}6\alpha\beta} = 7.0$ Hz, $J_{\text{H}5\beta,\text{H}6\beta\beta} = 5.7$ Hz, $J_{\text{H}5\beta,\text{H}4\beta} = 1.0$ Hz, $5\beta\text{-H}$), 3.55 (dd, 1 H, $J_{\text{H}6\alpha\beta,\text{H}6\beta\beta} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H}6\alpha\beta,\text{H}5\beta} = 5.7$ Hz, $6\alpha\beta\text{-H}$), 3.49 (dd, 1 H, $J_{\text{H}6\alpha\alpha,\text{H}6\beta\alpha} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H}6\alpha\alpha,\text{H}5\alpha} = 5.9$ Hz, $6\alpha\alpha\text{-H}$), 3.46-3.39 (m, 2 H, $6\beta\beta\text{-H}$ {3.46}, $6\beta\alpha\text{-H}$ {3.42}), 2.14, 2.10, 2.04, 2.04, 2.02, 2.00, 1.99, 1.98 (8 x CH_3 (Ac) $\alpha + \beta$).

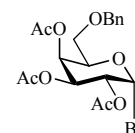
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.0, 170.0, 169.9, 169.4, 169.0, 169.0 (8 x C=O (Ac)), 137.3, 137.3 (C_q (Bn)), 128.4, 128.0, 127.9, 127.9 (C_{Ar} (Bn)), 92.2 ($\text{C1}\beta$), 89.8 $\text{C1}\alpha$), 73.5, 73.5 (CH_2 (Bn)), 72.8 ($\text{C5}\beta$), 71.0 ($\text{C3}\beta$), 70.0 ($\text{C5}\alpha$), 68.0 ($\text{C2}\alpha$), 67.9 ($\text{C4}\alpha$), 67.5 ($\text{C3}\alpha$), 67.2 ($\text{C6}\beta$), 67.1 ($\text{C4}\beta$), 66.7 ($\text{C6}\alpha$), 66.6 ($\text{C2}\beta$), 21.0, 21.0, 20.9, 20.8, 20.6, 20.6, 20.5 (8 x CH_3 (Ac) $\alpha + \beta$).

Aus den Integralen des $^1\text{H-NMR}$ wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 2:3$ bestimmt.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[261]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosylbromid (**34**)^[123]

(αAc_3 -6-Bn-GalBr)



Es wurden 12.15 g (27.12 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α,β -D-galactopyranose (**33**) in 150 mL absol. Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 80 mL HBr in Eisessig ($w = 33\%$) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor sie auf 500 mL Eiswasser gegossen und mit 500 mL Dichlormethan verdünnt wurde. Danach wurde die Mischung mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die organische Phase wurde dreimal mit je 200 mL ges. Natriumhydrogencarbonat- und zweimal mit je 150 mL 10%-iger Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.21 g (48%, 13.52 mmol), blassgelbes Öl

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{Cl}_3\text{BrO}_8$ $M = 459.29$ g/mol [458.06]

$R_f = 0.42$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1)

ESI-MS (positiv), m/z : 481.04 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 481.05), 483.04 ($[\text{M}^*+\text{Na}]^+$, ber.: 483.05), 497.03 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 497.16), 499.02 ($[\text{M}^*+\text{K}]^+$, ber.: 499.15).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.43–7.24 (m, 5 H, H_{Ar} (Bn)), 6.70 (d, 1 H, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 3.9$ Hz, 1-H), 5.58 (d, 1 H, $J_{\text{H4},\text{H3}} = 2.3$ Hz, 4-H), 5.45 (dd, 1 H, $J_{\text{H3},\text{H2}} = 10.6$ Hz, $J_{\text{H3},\text{H4}} = 3.3$ Hz, 3-H), 5.03 (dd, 1 H, $J_{\text{H2},\text{H1}} = 4.0$ Hz, $J_{\text{H2},\text{H3}} = 10.6$ Hz, 2-H), 4.60–4.37 (m, 5 H, CH_2 (Bn), 5-H, 6a/b-H), 2.11, 2.04, 2.01 (3 x s, 9 H, CH_3 (Ac)).

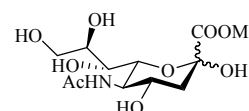
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , DEPT), δ (ppm): 170.1, 169.8, 169.7 (3 x C=O (Ac)), 137.2 (C_q (Bn)), 129.0, 128.7, 128.4, 128.4, 127.9 (C_{Ar} (Bn)), 88.6 (C1), 73.4 (CH_2 (Bn)), 72.0, 68.1, 67.9, 67.3 (C2, C3, C4, C5), 66.7 (C6), 20.7, 20.5 (3 x CH_3 (Ac)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[262]

Methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosid

(37)^[263,264]

(α/β -Neu5AcCOOMe-OH)



Es wurden 4.61 g (14.90 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **18** wurden in 200 mL Methanol (HPLC-grade) aufgeschlämmt und mit 3.5 g Dowex[®] 40WX-200 Ionentauscher (zweimal mit Methanol gewaschen) versetzt. Nach 18 h rühren bei Raumtemp unter Argonatmosphäre wurde der Ionentauscher abfiltriert und noch dreimal mit je 100 mL Methanol gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Ausbeute: 4.82 g (quant., 14.89 mmol), farbloses Öl

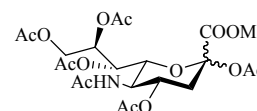
R_f = 0.39 (n-Butanol/AcOH/ H_2O , 5:2:2)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): 8.11 (d, 1 H, $J_{\text{NH,H5}} = 8.4$ Hz, NH), 3.84 (dt, 1 H, $J_{\text{H4,H3}} = 4.8$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 10.3$ Hz, 4-H), 3.70 (s, 3 H, CH_3), 3.61 (dd, 1 H, $J_{\text{H9a,H8}} = 1.8$ Hz, $J_{\text{H9a,H9b}} = 11.1$ Hz, 9a-H), 3.28 (dd, 1 H, $J_{\text{H9b,H8}} = 6.9$ Hz, $J_{\text{H9b,H9a}} = 11.1$ Hz, 9b-H), 3.75-3.16 (m, 9 H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 5 x OH), 2.03 (dd, 1 H, $J_{\text{H3eq,H4}} = 4.8$ Hz, $J_{\text{H3eq,H3ax}} = 12.8$ Hz, 3- H_{eq}), 1.89 (s, 3 H, CH_3 (OAc)), 1.76-1.68 (m, 1H, 3- H_{ax}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[157]

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α/β -D-galacto-non-2-ulopyranosid (38)^[264,265]

(α/β -Ac₄Neu5AcCOOMe-OAc)



Es wurden 4.82 g (14.91 mmol) α/β -Neu5AcCOOMe-OH **37** in 150 mL Pyridin gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden innerhalb von 30 min 75 mL Acetanhydrid zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde drei Tage bei Raumtemp. gerührt, bevor das

überschüssige Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurde. Der Rückstand wurde mehrfach mit Toluol kodestilliert und anschließend flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1) gereinigt, wobei ein Anomerengemisch mit einem Verhältnis von α : β = 1:1 erhalten wurde.

Ausbeute: 7.80 g (98%, 14.62 mmol), farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.78 (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1),

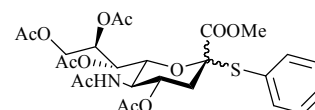
C₂₂H₃₁NO₁₄ (M = 533.48 g/mol) [533.17]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): **β -Anomer**: 5.41 (d, 1 H, $J_{\text{NH,H5}}$ = 9.9 Hz, NH (Ac)), 5.36-5.34 (m, 1 H, 7-H), 5.28-5.15 (m, 1 H, 4-H), 5.08-4.95 (m, 1 H, 8-H), 4.49 (dd, 1 H, $J_{\text{H9a,H9b}}$ = 12.5 Hz, $J_{\text{H9a,H8}}$ = 2.6 Hz, 9a-H), 4.18-4.01 (m 3 H, 5-H, 6-H, 9b-H), 3.78 (s, 3 H, COOCH₃ α), 3.75 (s, 3 H, COOCH₃ β), 2.55 (dd, 1H, $J_{\text{H3eq,H4}}$ = 5.1 Hz, $J_{\text{H3eq,H3ax}}$ = 13.2 Hz, 3-H_{eq}), 2.13, 2.08, 2.02 (s, 15 H, 5 x CH₃ (OAc)), 1.89 (s, 3 H, CH₃ (NHAc)), 1.27-1.22 (m, 1 H, 3-H_{ax}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[157]

Phenyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- α / β -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat (**39**)^[99]

(α / β -Ac₄Neu5AcCOOMe-SPh)



Es wurden 7.80 g (14.62 mmol) α / β -Neu5AcCOOMe-OAc **38** in 150 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 1.7 mL (16.66 mmol) Thiophenol versetzt. Danach wurde die Lösung auf 0°C gekühlt und innerhalb von 20 min mit einer Lösung von 7.00 mL (37.50 mmol) Bortrifluorid-Etherat, gelöst in 40 mL absol Dichlormethan, tropfenweise versetzt. Die Lösung wurde 18 h gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Anschließend wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.35 g (84%, 12.60 mmol bezogen auf α , β -Neu5AcCOOH), farbloser amorpher Feststoff. Aus den Integralen des HPLC-Spektrums wurde ein Anomerenverhältnis von α : β = 1:4 erhalten.

α -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = -115.2$ (c = 1.00, CH₂Cl₂), Lit.:^[99] $[\alpha]_D^{23} = 21.0$ (c = 0.90, CHCl₃)

$R_f = 0.31$ (°Hex/EtOAc, 1:5)

C₂₆H₃₃NO₁₂S (M = 583.60 g/mol) [583.17]

ESI-MS (positiv), m/z : 606.11 ([M+Na]⁺, ber.: 606.16), 1189.32 ([2M+Na]⁺, ber.: 1189.33).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): **α -Anomer:** 7.53-7.47 (m, 2 H, *o*-H_{Ar}), 7.42-7.37 (m, 1 H, *p*-H_{Ar}), 7.36-7.31 (m, 2 H, *m*-H_{Ar}), 5.31-5.24 (m, 2 H, 7-H {5.30}, 8-H {5.27}), 5.15 (d, 1 H, $J_{\text{NH,H5}} = 10.0$ Hz, NH (NeuAc)), 4.84 (ddd, 1 H, $J_{\text{H4,H3ax}} = 11.7$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 10.3$ Hz, $J_{\text{H4,H3eq}} = 4.7$ Hz, 4-H), 4.39 (dd, 1 H, $J_{\text{H9a/H9b}} = 12.4$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.4$ Hz, 9a-H), 4.19 (dd, 1 H, $J_{\text{H9b,H9a}} = 12.4$ Hz, $J_{\text{H9b,H8}} = 5.1$ Hz, 9b-H), 3.98 (q, 1 H, $J_{\text{H5,H6}} = J_{\text{H5,H4}} = J_{\text{H5,NH}} = 10.4$ Hz, 5-H), 3.89 (dd, 1H, $J_{\text{H6,H5}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H6,H7}} = 1.7$ Hz, 6-H), 3.57 (s, 3 H, OMe), 2.81 (dd, 1 H, $J_{\text{H3eq,H3ax}} = 12.9$ Hz, $J_{\text{H3eq,H4}} = 4.7$ Hz, 3-H_{eq}), 2.07-1.98 (m, 1 H, 3-H_{ax}), 2.14, 2.06, 2.04, 2.02 (4 x s, 12 H, CH₃ (Ac)), 1.86 (s, 3 H, NH (Ac)).

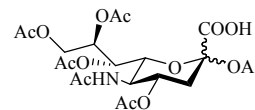
β -Anomer: 7.44-7.40 (m, 2 H, *o*-H_{Ar}), 7.36-7.33 (m, 1 H, *p*-H_{Ar}), 7.33-7.28 (m, 2 H, *m*-H_{Ar}), 5.79 (d, 1 H, $J_{\text{NH,H5}} = 10.3$ Hz, NH (Ac)), 5.46 (t, 1 H, $J_{\text{H7,H6/8}} = 2.3$ Hz, 7-H), 5.37 (td, 1 H, $J_{\text{H4,H5/H3ax}} = 11.6$ Hz, $J_{\text{H4,H3eq}} = 4.8$ Hz, 4-H), 4.93 (dt, 1 H, $J_{\text{H8,H9a}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{H8,H9b/H7}} = 2.1$ Hz, 8-H), 4.62 (dd, 1 H, $J_{\text{H6,H5}} = 10.5$ Hz, $J_{\text{H6,H7}} = 2.5$ Hz, 6-H), 4.48 (dd, 1 H, $J_{\text{H9a,H9b}} = 12.3$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.1$ Hz, 9a-H), 4.12 (q, 1 H, $J_{\text{H5,H6}} = 10.4$ Hz, $J_{\text{H5,H4}} = 10.4$ Hz, $J_{\text{H5,NH}} = 10.4$ Hz, 5-H), 3.98 (dd, 1H, $J_{\text{H9b,H9a}} = 12.3$ Hz, $J_{\text{H9b,H8}} = 8.7$ Hz, 9b-H), 3.57 (s, 3 H, OMe), 2.66 (dd, 1 H, $J_{\text{H3eq,H3ax}} = 13.9$ Hz, $J_{\text{H3eq,H4}} = 8.7$ Hz, 3-H_{eq}), 2.16-2.07 (m, 1 H, 3-H_{ax}), 2.09, 2.06, 2.03, 1.95 (4 x s, 12 H, CH₃ (Ac)), 1.89 (s, 3 H, NH (Ac)).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): **α -Anomer:** 170.9, 170.7, 170.2, 170.0 (5 x C=O (NHAc, Ac)), 167.9 (C1), 136.5 (*o*-C), 129.9 (*p*-C), 128.9 (C_q (Ph)), 128.6 (*m*-C), 87.5 (C2), 74.7 (C6), 69.8 (C4), 69.6 (C8), 67.6 (C7), 62.0 (C9), 52.7 (OMe), 49.3 (C5), 38.1 (C3), 23.2 (NH (Ac)), 21.0, 20.8, 20.8 (4 x CH₃ (Ac)).

β -Anomer: 171.2, 170.9, 170.3, 170.2, 170.2 (5 x C=O (NHAc, Ac)), 167.9 (C1), 136.5 (*o*-C), 129.9 (*p*-C), 128.9 (C_q (Ph)), 128.6 (*m*-C), 88.9 (C2), 73.2 (C6), 73.1 (C4), 69.0 (C8), 68.8 (C7), 62.6 (C9), 52.6 (OMe), 49.3 (C5), 37.5 (C3), 23.2 (NH (NeuAc)), 21.0, 20.8, 20.7, 20.7 (4 x CH₃ (Ac)).

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (19)^[78]

(α/β Ac₅NeuNAcCOOH)



Zu einer Lösung von 10.00 g (32.33 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **18** in 140 mL Pyridin wurden unter Eisbadkühlung langsam 70 mL Acetanhydrid zugetropft. Es wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt, bevor die Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurden. Der Rückstand wurde dreimal mit jeweils 100 mL Toluol und zweimal mit jeweils 100 mL Dichlormethan kodestilliert. Das als Anomerengemisch erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 16.79 g (quant., 32.33 mmol), farbloser amorpher Feststoff

C₂₁H₂₉NO₁₄ M = 519.45 g/mol [519.16]

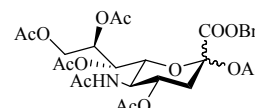
R_f = 0.37 (CH₂Cl₂/EtOH, 1:3).

ESI-MS (positiv), *m/z*: 542.23 ([M+Na]⁺, ber.: 542.15), 1061.45 ([2M+Na]⁺, ber.: 1061.31).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[266]

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosid (20)^[78]

(α/β Ac₅NeuNAcCOOBn)



Es wurden 16.79 g (32.33 mmol) α/β Ac₅NeuNAcCOOH **19** in 100 mL Ethanol gelöst und mit 10.0 g (30.70 mmol) Cäsiumcarbonat, gelöst in 20 mL Wasser, versetzt. Nach dem Abklingen der Reaktion (Gasentwicklung) wurde noch 30 min bei Raumtemp. weitergerührt und danach das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde zweimal mit jeweils 100 mL Toluol kodestilliert und das Rohprodukt wurde in 60 mL absol. DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden langsam 35.0 mL (294.7 mmol) Benzylbromid zugetropft und die Reaktionsmischung wurde weitere 18 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen. Das ausgefallene Cäsiumbromid wurde abfiltriert und das Filtrat wurde i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wurde viermal mit jeweils 75 mL Toluol kodestilliert und anschließend durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc,

1:3→EtOAc) gereinigt. Es wurden 13.03 g (66%, 21.37 mmol) eines Anomerengemisches und 5.21 g (26%, 8.54 mmol) des reinen β -Anomeres erhalten.

Gesamtausbeute: 18.24 g (92%, 29.92 mmol), farbloser amorpher Feststoff

α : $R_f = 0.31$, β : $R_f = 0.28$ (EtOAc)

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

ESI-MS (positiv), m/z : 632.21 ($[M+Na]^+$, ber.: 632.20), 1241.43 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1241.40).

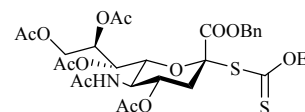
1H -NMR (400 MHz, DMSO, COSY), δ (ppm): **β -Anomer**: 7.83 (d, 1 H, $J_{NH,H5} = 9.6$ Hz, NH), 7.41-7.31 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.25 (dd, 1 H, $J_{H7,H8} = 7.3$ Hz, $J_{H7,H6} = 2.4$ Hz, 7-H), 5.20 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.6$ Hz, CH_2 (Bn)), 5.11 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.6$ Hz, CH_2 (Bn)), 5.09-5.01 (m, 1 H, 4-H), 4.99-4.94 (m, 1 H, 8-H), 4.24 (dd, 1 H, $J_{H9a,H9b} = 12.4$ Hz, $J_{H9a,H8} = 3.0$ Hz, 9a-H), 4.13 (dd, 1 H, $J_{H6,H5} = 10.7$ Hz, $J_{H6,H7} = 2.4$ Hz, 6-H), 4.05-3.90 (m, 2 H, 9b-H {4.00}, 5-H {4.03, q, $J_{H5,H6} = J_{H5,H4} = J_{H5,NH} = 10.3$ Hz}), 2.44 (dd, 1 H, $J_{H3eq,H3ax} = 13.3$ Hz, $J_{H3eq,H4} = 5.0$ Hz, 3- H_{eq}), 2.11, 2.01, 1.96, 1.96, 1.93 (5 x s, 15 H, CH_3 (Ac)), 1.99-1.83 (m, 1 H, 3- H_{ax}), 1.70 (s, 3 H, CH_3 (AcNH)).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO, HMQC), δ (ppm): **β -Anomer**: 170.0, 169.9, 169.3, 169.2, 169.0, 168.2 (6 x C=O (Ac, Ester)), 165.4 (C1), 135.2 (C_q (Bn)), 128.5, 128.2, 127.8 (C_{Ar} (Bn)), 96.6 (C2), 71.7 (C6), 69.1 (C8), 68.6 (C4), 67.1 (C7), 66.9 (CH_2 (Bn)), 61.3 (C9), 47.5 (C5), 35.6 (C3), 22.6 (CH_3 (NHAc)), 20.7, 20.6, 20.5 (5 x CH_3 (Ac)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[267]

***O*-Ethyl-*S*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]dithiocarbonat (21)^[78,99]**

(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)



Unter Eisbadkühlung wurden 75.0 mL Acetylchlorid zu 13.02 g (21.37 mmol) α/β Ac₅NeuNAcCOOBn **20** getropft und das Reaktionsgemisch wurde mit 3.0 mL Wasser versetzt. Die Lösung wurde 4 d bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel und überschüssiges Acetylchlorid wurden i. Vak. abdestilliert. Das als Rohprodukt erhaltene anomere Chlorid wurde dreimal mit jeweils 100 mL Toluol kdestilliert und anschließend in 150 mL absol. Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung wurden 4.11 g (25.64 mmol) Kaliummethylxanthogenat gegeben und die Lösung wurde 20 h unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde mit 250 mL Dichlormethan verdünnt,

zweimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 11.46 g (80%, 17.06 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.42$ (EtOAc)

$C_{29}H_{37}NO_{13}S_2$ (M = 671.73 g/mol) [671.17]

$[\alpha]_D^{23} = +39.83$ (c = 1.00, $CHCl_3$), Lit.:^[268] $[\alpha]_D^{23} = +34.1$ (c = 1.00, $CHCl_3$)

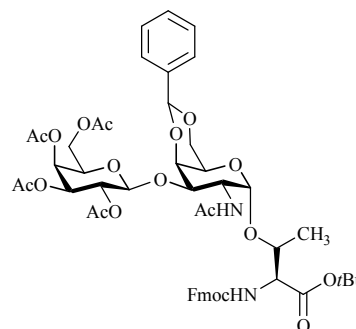
ESI-MS (positiv), m/z : 694.18 ($[M+Na]^+$, ber.: 694.16).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 7.41-7.30 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.31 (dd, 1 H, $J_{H7,H8} = 6.4$ Hz, $J_{H7,H6} = 2.0$ Hz, 7-H), 5.27 (td, 1 H, $J_{H8,H7/H9a} = 6.2$ Hz, $J_{H8,H9b} = 2.0$ Hz, 8-H), 5.23-5.16 (m, 3 H, CH_2 (Bn), NH {5.22}), 4.85 (td, 1 H, $J_{H4,H5/H3ax} = 11.5$ Hz, $J_{H4,H3eq} = 4.6$ Hz, 4-H), 4.56 (dd, 1 H, $J_{H6,H5} = 10.8$ Hz, $J_{H6,H7} = 2.0$ Hz, 6-H), 4.41 (dd, 1 H, $J_{CH,CH3} = 12.8$ Hz, $J_{CH,CH3} = 7.1$ Hz, CH_2 (Et)), 4.33 (dd, 1 H, $J_{H9a,H9b} = 12.4$ Hz, $J_{H9a,H8} = 2.7$ Hz, 9a-H), 4.20 (dd, 1 H, $J_{H9b,H9a} = 12.4$ Hz, $J_{H9b,H8} = 5.9$ Hz, 9b-H), 4.03 (q, 1 H, $J_{H5,H6} = J_{H5,H4} = J_{H5,NH} = 10.4$ Hz, 5-H), 2.66 (dd, 1 H, $J_{H3eq,H3ax} = 12.9$ Hz, $J_{H3eq,H4} = 4.6$ Hz, 3- H_{eq}), 2.13, 2.12 (2 x s, 6 H, CH_3 (Ac)), 2.02 (s, 7 H, CH_3 (Ac), 3- H_{ax}), 1.89 (s, 3 H, CH_3 (AcNH)), 1.21 (t, 3 H, $J_{CH3,CH2} = 7.1$ Hz, CH_3 (Et)).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, DEPT, HMQC), δ (ppm): 207.0 (C=S), 170.7, 170.5, 170.2, 170.2, 170.1 (5 x C=O (Ac)), 167.8 (C1), 134.9 (C_q (Bn)), 128.8, 128.6, 128.0 (C_{Ar} (Bn)), 86.5 (C2), 75.2 (C6), 70.6 (CH_2 (Bn)), 70.3 (C8), 68.7 (C4), 67.9 (CH_2 (Et)), 67.7 (C7), 62.0 (C9), 49.2 (C5), 37.1 (C3), 23.2 (CH_3 (NHAc)), 21.1, 20.8, 20.8 (5 x CH_3 (Ac)), 13.0 (CH_3 (Et)).

***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]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (14)^[269]**

(Fmoc-Thr(β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)**



Es wurden 1.13 g (1.63 mmol) Fmoc-Thr(α 4,6-Bzn-Gal-NAc)-*O**t*Bu **13** in 20 mL einer Mischung aus absol. Dichlormethan und Nitromethan (2:3) gelöst und mit 2.0 g frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) eine Stunde unter Argonatmosphäre gerührt. Danach wurden 1.23 g (4.87 mmol) Quecksilbercyanid⁶ zugegeben, sowie eine Lösung von 2.03 g (4.87 mmol) Ac₄GalBr **3** in 30 mL absol. Dichlormethan/Nitromethan (2:3) zugetropft. Die Lösung wurde zwei Tage bei Raumtemp. gerührt, durch *Hyflo* filtriert und mit 200 mL Dichlormethan gewaschen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 60 mL ges. Natriumhydrogencarbonat- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.62 g (89%, 1.59 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +69.8$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[269] $[\alpha]_D^{23} = +63.2$ (c = 1.00, CHCl₃)

$R_f = 0.33$ (^cHex /EtOAc, 1:2), Analytische RP-HPLC: $R_t = 15.84$ min (PerfectSil C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O (70:30) \rightarrow (70:30), 5 min, (100:0), 30 min).

C₅₃H₆₄N₂O₁₈ (M = 1017.08 g/mol) [1016.42]

ESI-MS (*positiv*), *m/z*: 1041.65 ([M+Na]⁺, ber.: 1041.41).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 6.6$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.56–7.48 (m, 2 H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.47–7.28 (m, 7 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar} (Bzn)), 5.96 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.2$ Hz, NH (Fmoc)), 5.89 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH (GalNAc)), 5.56 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.39 (d, 1 H, $J_{H_4',H_3'} = 2.7$ Hz, 4'-H), 5.22–5.10 (m, 1 H, 2'-H), 5.00–4.89 (m, 2 H, 3'-H {4.99}, 1-H {4.94}), 4.82–4.65 (m, 2 H, 1'-H {4.74}, 2-H {4.70}), 4.62–4.39 (m, 3 H, T ^{α} {4.22}, CH₂ (Fmoc) {4.54}), 4.30–4.18 (m, 5 H, CH (Fmoc), T ^{β} {4.27}, 4-H {4.26}, 6a-H {4.22}, 6a'-H {4.24}), 4.15–4.03 (m, 2 H, 6b-H {4.07}, 6b'-H {4.12}), 3.92–3.84 (m, 2 H, 3-H {3.88}, 5-H), 3.73–3.62 (m, 1 H, 5'-H), 2.17 (s, 3 H, CH₃ (Ac)), 2.04 (s, 3 H, CH₃

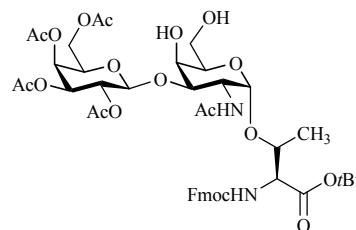
⁶ Im Hochvakuum getrocknet

(AcNH), 2.00, 1.97 (2 x s, 6 H, 2 x CH₃ (Ac)), 1.47 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.27 (d, 3 H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.5, 170.4, 170.3, 169.8, 169.5, 169.3 (6 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.5 (C_q (Bzn)), 128.9, 128.2, 128.2, 127.8, 127.7, 127.1, 126.3 (C_{ar} (Bzn), C6-, C7-Fmoc), 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 101.3 (C1'), 100.7 (CH (Bzn)), 100.5 (C1), 83.6 (C_q (*t*Bu)), 76.2 (T^β), 75.6 (C4), 74.2 (C3), 71.1, 70.8 (C3', C5), 69.1 (C6), 68.7 (C2'), 66.9, 66.8 (C4', CH₂ (Fmoc)), 63.7 (C5'), 61.3 (C6'), 59.1 (T^α), 47.8 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 23.5 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (4 x CH₃ (Ac)), 19.0 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (15)^[84,270]**

(Fmoc-Thr(βAc₄Gal-(1→3)-αGalNAc)-*Ot*Bu)**



Es wurden 1.10 g (1.08 mmol) Fmoc-Thr(βAc₄Gal-(1→3)-α4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **14** in 150 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (4:1) gelöst und mit 1.15 g aktiviertem Natriumhydrogensulfat-Kieselgel-Katalysator^[96] versetzt. Die Suspension wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt, bevor mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert wurde. Die Lösung wurde anschließend dreimal mit je 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flash-chromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 516.0 mg (51%, 0.55 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +29.2$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[84] $[\alpha]_D^{23} = +43.93$ (c = 1.00, CH₂Cl₂)

$R_f = 0.54$ (°Hex /EtOAc,1:6), Analytische RP-HPLC: $R_t = 13.43$ min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(90:10), 30 min, (100:0) nach 10 min).

C₄₅H₅₈N₂O₁₉ (M = 930.94 g/mol) [930.36]

ESI-MS (positiv), m/z: 953.42 ([M+Na]⁺, ber.: 953.35), 1883.81 ([2M+Na]⁺, ber.: 1883.72).

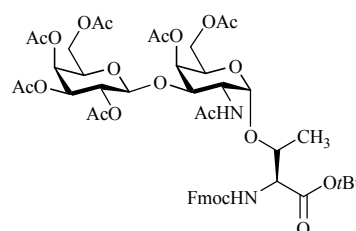
HR-ESI-MS (positiv), m/z: 931.3725 ([M+H]⁺, ber.: 931.3712).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, COSY), δ (ppm): 7.91 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 8.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.75 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.53-7.46 (m, 2 H, NH (Fmoc) {7.51, d, $J_{NH,T\alpha} = 8.8$ Hz}, NH (GalNAc) {7.48, d, $J_{NH,H2} = 9.6$ Hz}), 7.45-7.38 (m, 2 H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36-7.28 (m, 2 H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.28 (d, 1 H, $J_{H3',H4'} = 3.4$ Hz, 3'-H), 5.05-4.94 (m, 2 H, 4'-H {5.02, d, $J_{H4',H3'} = 3.4$ Hz}, 2'-H {4.99}), 4.74 (d, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.6$ Hz, 1'-H), 4.58 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 4.1$ Hz, 1-H), 4.54-4.40 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.32 (t, 1 H, $J_{CH,CH2} = 6.7$ Hz, CH (Fmoc)), 4.28-4.19 (m, 2 H, 2-H {4.24}, T ^{β} {4.22}), 4.18-4.11 (m, 2 H, 6a-H {4.15}, 5-H {4.15}), 4.07 (dd, 1 H, $J_{T\alpha,H2} = 9.9$ Hz, $J_{T\alpha,T\beta} = 1.7$ Hz, T ^{α}), 4.02-3.94 (m, 1 H, 6b-H), 3.91-3.88 (m, 1 H, 4-H), 3.64 (t, 1 H, $J_{H5,H6a/b} = 6.7$ Hz, 5-H), 3.56 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 11.2$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.7$ Hz, 3-H), 3.50-3.44 (m, 2 H, 6'a/b-H), 2.12, 2.07, 2.00, 1.99, 1.91 (4 x s, 12 H, CH₃ (Ac)), 1.84 (s, 3 H, CH₃ (NHAc)), 1.34 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.14 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO, HMQC), δ (ppm): 170.0, 169.9, 169.6, 169.1, 169.0, 168.8 (6 x C=O (NHAc, Ac, Ester), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.8, 141.8 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7, 127.7 (C6-, C7-Fmoc), 125.3, 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 101.3 (C1'), 99.0 (C1), 81.3 (C_q (*t*Bu)), 77.6 (C3), 73.6 (T ^{β}), 71.7 (C5'), 70.6 (C4'), 69.9 (C5), 68.4 (C2'), 67.5 (C4), 67.3 (C3'), 65.6 (CH₂ (Fmoc)), 61.2 (C6), 60.5 (C6'), 59.4 (T ^{α}), 47.0 (C2), 46.8 (CH (Fmoc)), 27.6 (CH₃ (*t*Bu)), 23.0 (CH₃ (NHAc)), 20.5, 20.4, 20.3 (4 x CH₃ (Ac)), 19.1 (T ^{γ}).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-acetyl-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (16)^[84,271]**

(Fmoc-Thr(β Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-*Ot*Bu)



Es wurden 100.0 mg (0.11 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-*Ot*Bu **15** in 6 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (2:1) gelöst und 18 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand mehrfach mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:5) gereinigt.

Ausbeute: 89.0 mg (81%, 0.09 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +48.9$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[84,106] $[\alpha]_D^{23} = +46.55$ ($c = 1.00$, CH_2Cl_2)

$R_f = 0.60$ ($^c\text{Hex} / \text{EtOAc}$, 1:5), Analytische RP-HPLC: $R_t = 32.04$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (50:50)→(100:0) in 60 min).

$\text{C}_{49}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{21}$ ($M = 1015.02$ g/mol) [1014.38]

ESI-MS (positiv), m/z : 1037.35 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1037.37), 2052.64 ($[\text{2M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, ber.: 2052.77).

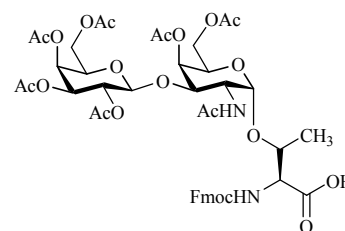
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1015.3961 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1015.3924).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.3$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42 (t, 2 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/\text{H}_7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2 H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3/\text{H}_1} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6/\text{H}_8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.94 (d, 1 H, $J_{\text{NH}, \text{T}\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 5.50 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.1$ Hz, NH (GalNAc)), 5.38-5.30 (m, 2 H, 4-H {5.36}, 4'-H {5.35, d, $J_{\text{H}_4',\text{H}_3'} = 3.2$ Hz}), 5.08 (d, 1 H, $J_{\text{H}_2',\text{H}_3'} = 10.4$ Hz, $J_{\text{H}_2',\text{H}_1'} = 7.9$ Hz, 2'-H), 4.93 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_3',\text{H}_2'} = 10.4$ Hz, $J_{\text{H}_3',\text{H}_4'} = 2.8$ Hz, 3'-H), 4.82 (d, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.0$ Hz, 1-H), 4.60-4.46 (m, 4 H, 1'-H {4.57}, 2-H {4.55}, CH_2 (Fmoc) {4.52}), 4.29-4.06 (m, 7 H, CH (Fmoc) {4.25}, T^α {4.22}, T^β {4.16}, 6a-H {4.16}, 6'a/b-H {4.18, 4.11}, 5-H {4.12}), 3.98 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_6\text{a}} = 10.8$ Hz, $J_{\text{H}_6\text{b},\text{H}_5} = 7.1$ Hz, 6b-H), 3.86 (t, 1 H, $J_{\text{H}_5',\text{H}_6'\text{a}} = 6.3$ Hz, $J_{\text{H}_5',\text{H}_6'\text{b}} = 6.3$ Hz, 5'-H), 3.80 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 10.9$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.4$ Hz, 3-H), 2.15, 2.13, 2.06, 2.00 (6 x s, 18 H, CH_3 (Ac)), 1.96 (s, 3 H, CH_3 (AcNH)), 1.45 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 5.8$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.4, 170.4, 170.2, 170.1, 169.9, 169.8, 169.5 (7 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8, 127.1 (C6-, C7-Fmoc), 124.8 (C1-, C8-Fmoc), 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 100.9 (C1), 100.1 (C1'), 83.3 (C_q (*t*Bu)), 76.7 (T^β), 73.1 (C4), 70.7 (C3), 70.6 (C3'), 69.1 (C4'), 68.6 (C2'), 67.8 (C5), 66.9 (CH_2 (Fmoc)), 66.7 (C4), 63.0 (C6), 60.9 (C6'), 59.0 (T^α), 48.3 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH_3 (*t*Bu)), 23.3 (CH_3 (NHAc)), 20.7, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 (6 x CH_3 (Ac)), 18.5 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-acetyl-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (17)^[84,271,272]**

(Fmoc-Thr(β Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH)



Es wurden 200.0 mg (0.20 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-O*t*Bu **16** mit 4.0 mL TFA und 0.4 mL Anisol versetzt und unter Argonatmosphäre 2 h gerührt. Danach wurde mit 50 mL Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde noch mehrfach mit jeweils 30 mL Toluol kdestilliert und anschließend flaschromatographisch an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 5:1) gereinigt. Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung zur Festphasensynthese verwendet.

Ausbeute: 161.0 mg (85%, 0.17 mmol), farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.19 (EtOAc/EtOH, 5:1), Analytische RP-HPLC: R_t = 10.29 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (50:50) \rightarrow (90:10), 30 min, (100:0) nach 10 min).

C₄₅H₅₄N₂O₂₁ (M = 958.91 g/mol) [958.32]

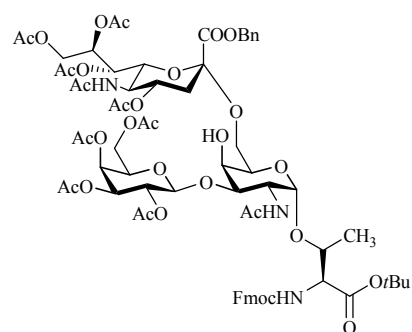
ESI-MS (positiv), m/z : 981.39 ([M+Na]⁺, ber.: 981.32).

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonin-*tert*-butylester (**29**)^[84]

(Fmoc-Thr(β Ac₄Gal-(1→3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2,6)]- α GalNAc)-*Or*Bu)

Herstellung einer Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in Dichlorethan):^[84]

Es wurden 410 μ L (7.99 mmol) Brom zu einer Lösung von 709 μ L (7.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 mL abs. 1,2-Dichlorethan getropft. Die Lösung wurde 18 h unter Lichtausschluss bei Raumtemp. gerührt.



Glycosylierungsreaktion: Eine Lösung von 300.0 mg (0.32 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₃Gal-(1→3)- α GalNAc)-*Or*Bu **15** und 542.0 mg (0.81 mmol) Ac₄NeuNAcCOOBn-Xan **22** in 15 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Acetonitril (2:1) wurde 1.5 h mit 945 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 3 Å bei Raumtemp. und unter Argonatmosphäre gerührt. Es wurde auf -65 °C gekühlt und unter Lichtausschluss wurden 207.0 mg (0.81 mmol) Silbertriflat zugegeben. Anschließend wurden langsam 0.5 mL (0.80 mmol) einer auf 0 °C gekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in Dichlorethan) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 2.5 h bei -65 °C gerührt und mit 150 μ L DIPEA neutralisiert. Es wurde weitere 15 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor auf Raumtemp. erwärmt wurde. Nach dem Verdünnen mit 25 mL Dichlormethan wurde durch *Hyflo* filtriert und das Filtrat wurde i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc) gereinigt. Anteile des als Nebenprodukt anfallenden β -Anomeres (7%) wurden durch semi-präparative RP-HPLC abgetrennt (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(70:30), 50 min, (100:0) in 5 min, R_t = 33.26 min).

Ausbeute: 233.0 mg (49%, 0.16 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +19.3$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[84] $[\alpha]_D^{23} = +18.18$ (c = 1.00, CH₂Cl₂)

$R_f = 0.20$ (EE), Analytische RP-HPLC: $R_t = 18.54$ min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(70:30), 50 min, (100:0) nach 40 min)

C₇₁H₈₉N₃O₃₁ (M = 1480.47 g/mol) [1479.55]

ESI-MS (*positiv*), m/z : 1502.49 ($[M+Na]^+$, ber.: 1502.54).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.45-7.29 (m, 9 H, 3-H-, 6-H-Fmoc, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.85 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH (GalNAc)), 5.45 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.1$ Hz, NH (Fmoc)), 5.38 (s, 1 H, 4'-H), 5.36-5.28 (2 H, 8''-H {5.34}, 7''-H {5.31}), 5.26-5.14 (m, 3 H, CH_2 (Bn) {5.21}, 2'-H {5.19}), 5.10 (d, 1 H, $J_{NH,H5''} = 9.3$ Hz, NH (NeuNAc)), 4.97 (dd, 1 H, $J_{H3',H2'} = 10.8$ Hz, $J_{H3',H4'} = 2.8$ Hz, 3'-H), 4.88-4.79 (m, 1 H, 4''-H), 4.74 (d, 1 H, $J_{H1',H2'} = 3.3$ Hz, 1'-H), 4.62 (d, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.9$ Hz, 1'-H), 4.57-4.47 (m, 3 H, CH_2 (Fmoc) {4.53}, 2-H {4.52}), 4.32-4.23 (m, 2 H, 9''a-H {4.29, d, $J_{H9''a,H9''b} = 12.4$ Hz, $J_{H9''a,H8''} = 2.3$ Hz}, CH (Fmoc) {4.27}), 4.20-4.00 (m, 7 H, T^α {4.18}, T^β {4.13}, 6a/b-H {4.16, 4.06}, 9''b-H {4.08}, 5''-H {4.05}, 6''-H {4.05}), 3.95-3.86 (m, 3 H, 6'a-H {3.92}, 4-H {3.90}, 5-H {3.89}), 3.84-3.77 (m, 1 H, 5'-H), 3.63 (d, 1 H, $J_{H3,H2} = 10.2$ Hz, 3-H), 3.54 (dd, 1 H, $J_{H6'b,H6'a} = 12.6$ Hz, $J_{H6'b,H5'} = 4.4$ Hz, 6'b-H), 2.63 (dd, 1 H, $J_{H3''eq,H3''ax} = 12.6$ Hz, $J_{H3''eq,H4''} = 4.4$ Hz, 3''-H_{eq}), 2.44 (bs, 1 H, OH), 2.15, 2.11, 2.11, 2.08, 2.02, 2.00, 1.98 (7 x s, 21 H, CH_3 (Ac)), 1.93 (d, 1 H, $J_{H3''ax,H3''eq} = 13.5$ Hz, 3''-H_{ax}), 1.86, 1.81 (2 x s, 6 H, CH_3 (AcNH)), 1.44 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)), 1.26 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.1$ Hz, T^γ).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, HMQC), δ (ppm): 170.8, 170.7, 170.3, 170.2, 170.2, 170.0, 169.6 (10 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 167.3 ($C1''$), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 ($C1a-$, $C8a$ -Fmoc), 141.3 ($C4a-$, $C5a$ -Fmoc), 134.8 (C_q (Bn)), 128.8, 128.7, 128.4, 128.4 (C_{Ar} (Bn)), 127.8, 127.1 ($C6-$, $C7$ -Fmoc), 124.9 ($C1-$, $C8$ -Fmoc), 120.1, 120.1 ($C4-$, $C5$ -Fmoc), 101.5 ($C1'$), 100.3 ($C1$), 98.7 ($C2''$), 83.1 (C_q (*t*Bu)), 77.2 ($C3$), 72.8 ($C6''$), 70.7 ($C3'$), 70.6 ($C4$), 69.0 ($C5'$), 68.9 ($C4''$, $C8''$), 68.5 ($C2'$), 68.2 ($C5$), 67.8 (CH_2 (Bn)), 67.4 ($C4$, $C7''$), 66.8 (CH_2 (Fmoc)), 66.7 ($C4'$), 63.7 ($C6'$), 62.3 ($C9''$), 60.8 ($C6$), 59.2 (T^α), 49.2 ($C5''$), 47.5 ($C2$), 47.2 (CH (Fmoc)), 37.4 ($C3''$), 28.0 (CH_3 (*t*Bu)), 23.4, 23.2 (CH_3 (NHAc)), 21.0, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7, 20.7, 20.6, 20.6 (8 x CH_3 (Ac)), 18.7 (T^γ).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (30)^[106]
(Fmoc-Thr(β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2,6)]- α GalNAc)-OH**

Es wurden 223.0 mg (0.15 mmol) Fmoc-Thr(β Ac₄Gal(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2,6)]-

α GalNAc)-O*t*Bu **29** in 5.0 mL TFA gelöst und mit 0.5 mL Anisol versetzt. Die Lösung wurde 3 h unter Argonatmosphäre gerührt und mit 50 mL Toluol verdünnt. Die

Lösungsmittel wurden i.Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde fünfmal mit jeweils 25 mL Toluol kdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EE/EtOH, 3:1) gereinigt. Die Verbindung wurde ohne weitere Charakterisierung in der Festphasensynthese eingesetzt.

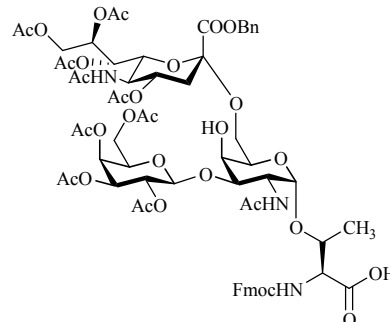
Ausbeute: 205.0 mg (96%, 0.14 mmol), farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.12 (EE/EtOH, 3:1)

C₆₇H₈₁N₃O₃₁ (M = 1424.36 g/mol) [1423.49]

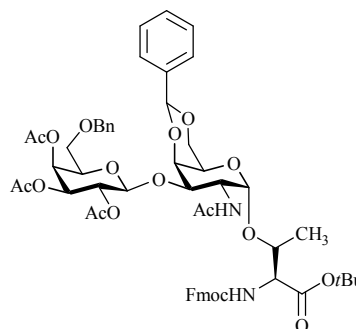
ESI-MS (*positiv*), m/z : 1446.40 ([M+Na]⁺, ber.: 1446.48), 1462.42 ([M+K]⁺, ber.: 1462.58).

Weitere analytische Daten siehe Literatur:^[84]



***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (35)^[258]**

(Fmoc-Thr(β 6-BnAc₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu)



Es wurden 553.2 mg (0.80 mmol) Fmoc-Thr-(α 4,6-BznGalNAc)-OtBu **13** in 7 mL absol. Dichlormethan gelöst und zu einer Suspension von 1.80 g frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å in 25 mL absol. Nitromethan und 5 mL absol. Dichlormethan gegeben. Diese Suspension wurde mit 405.0 mg (1.60 mmol) Quecksilbercyanid⁷ versetzt und auf 0 °C gekühlt. Es wurden innerhalb von dreißig min 734.1 mg (1.60 mmol) α Ac₃-6-Bn-GalBr **34** (zuvor mit Toluol kodestilliert und im Hochvakuum getrocknet), gelöst in 8 mL Dichlormethan, zugetropft. Anschließend wurde die Suspension über Nacht auf Raumtemp. erwärmt und weitere 24 h gerührt. Die Suspension wurde mit 150 mL Dichlormethan verdünnt und durch *Hyflo* filtriert. Die organische Phase wurde dreimal mit je 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, zweimal mit je 75 mL Natriumiodid-Lösung und zweimal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:3) gereinigt.

Ausbeute: 744.0 mg (87%, 0.69 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.54$ (^cHex/EtOAc, 1:3)

C₅₇H₆₆N₂O₁₈ (M = 1067.14 g/mol) [1066.43]

$[\alpha]_D^{23} = +70.7$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[258] $[\alpha]_D^{23} = +74.4$ (c = 1.00, CH₂Cl₂)

ESI-MS (positiv), *m/z*: 1089.36 ([M+Na]⁺, ber.: 1089.42), 2155.81 ([2M+Na]⁺, ber.: 2155.85).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 8.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.53 (dd, 2 H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.8$ Hz, $J_{H_3,H_2} = J_{H_6,H_7} = 1.6$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.41 (t, 2 H, $J_{H_2,H_1/H_3} = J_{H_7,H_6/H_8} = 7.0$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 7.46-7.20 (m, 10 H, H_{Ar}), 5.97 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.5$ Hz, NH (Fmoc)), 5.62 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.3$ Hz, NH (GalNAc)), 5.52 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.43 (dd, 1 H, $J_{H_4',H_3'} = 3.9$ Hz, $J_{H_4',H_5'} = 0.9$ Hz, 4'-H), 5.19 (dd, 1 H, $J_{H_2',H_3'} = 10.3$ Hz, $J_{H_2',H_1'} = 8.0$ Hz,

⁷ Im Hochvakuum getrocknet.

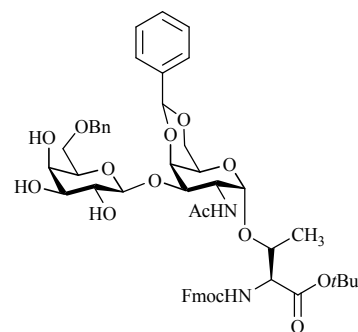
2'-H), 5.06-4.89 (m, 2 H, 4'-H {5.00}, 1-H {4.92, d, $J_{H1,H2} = 2.8$ Hz}), 4.74-4.61 (m, 4 H, CH₂ (Fmoc) {4.54}, CH₂ (Bn) {4.46}), 4.33-4.08 (m, 5 H, 4-H {4.31}, CH (Fmoc) {4.26}, T^α {4.21}, T^β {4.21}, 6a-H {4.18}), 3.97-3.82 (m, 3 H, 6b-H {3.93}, 5'-H {3.91}, 3-H {3.87}), 3.65-3.54 (m, 1 H, 5-H), 2.07, 2.06, 2.00 (3 x s, 9 H, CH₃ (Ac)), 1.98 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.43 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.24 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.0$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, HMQC), δ (ppm): 170.3, 170.0, 169.9, 169.5 (4 x C=O (NHAc, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.6, 137.4 (C_q (Bn)), 128.8, 128.4, 128.1, 127.9, 127.1, 126.2, 126.0 (C_{Ar} (Bn), C6-, C7-Fmoc), 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 101.6 (C1'), 100.5 (CH (Bzn)), 100.3 (C1), 83.1 (C_q (*t*Bu)), 76.1 (T^β), 75.5 (C4), 74.7 (C3), 73.5 (CH₂ (Bn)), 72.1 (C5'), 71.2 (C3'), 69.0 (C6), 68.9 (C2'), 68.0 (C6'), 67.6 (C4'), 66.8 (CH₂ (Fmoc)), 63.6 (C5), 59.1 (T^α), 47.9 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 23.4 (CH₃ (NHAc)), 20.7, 20.7, 20.6 (CH₃ (Ac)), 19.0 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[258]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[6-*O*-benzyl-*D*-galactopyranosyl]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (36)^[78]
(Fmoc-Thr(β 6-BnGal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)**

Es wurden 724.3 mg (0.68 mmol) Fmoc-Thr(β 6-BnAc₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu **35** in 25 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und langsam mit einer 1%en methanolischen Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Unter ständiger Kontrolle des



pH-Wertes wurde die Lösung 18 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit saurem Ionentauscher (Amberlyst 15) neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 30:1) gereinigt. Das teilweise durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe erhaltene freie Amin wurde durch Elution mit Methanol isoliert und nach Entfernen des Lösungsmittels in 40 mL absol. Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden zu dieser Lösung 215.5 mg (0.64 mmol) Fmoc-OSu gegeben und der pH-Wert der Reaktionsmischung

mittels DIPEA auf einen Wert von 9.5 eingestellt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemp. wurde die Lösung durch Zugabe von saurem Ionentauscher (Amberlyst 15) neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc→EtOAc/MeOH 30:1) gereinigt.

Gesamtausbeute: 457.8 mg (72%, 0.49 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +62.8$ (c = 1.01, CHCl₃), Lit.:^[258] $[\alpha]_D^{23} = +74.4$ (c = 1.00, CH₂Cl₂)

$R_f = 0.58$ (EtOAc/EtOH, 10:1), Analytische RP-HPLC: $R_t = 18.03$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(90:10), 30 min, (100:0), 40 min)

C₅₁H₆₀N₂O₁₅ (M = 941.03 g/mol) [940.40]

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY), δ (ppm): 7.78 (dd, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, $J_{H4,H5} = J_{H5,H4} = 3.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.67 (t, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.1$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.43-7.25 (m, 11 H, 3-H-, 7-H-, 3-H-, 7-H-Fmoc, NH (GalNAc), NH (Fmoc), H_{Ar}), 5.36 (s, 1 H, CH (Bzn)), 4.81 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, 1-H), 4.57 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 6.9$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.51 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 6.9$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.43 (dd, 1 H, $J_{H2,H3} = 11.0$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.9$ Hz, 2-H), 4.35 (dd, 1 H, $J_{T\beta,T\gamma} = 6.5$ Hz, $J_{T\beta,T\alpha} = 1.7$ Hz, T^β), 4.29 (d, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.6$ Hz, 1'-H), 4.24 (t, 1 H, $J_{CH,CH2} = 6.3$ Hz, CH (Fmoc)), 4.13 (d, 1 H, $J_{T\alpha,T\beta} = 1.7$ Hz, T^α), 4.11 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.4$ Hz, 4-H), 3.90-3.85 (m, 1 H, 5-H), 3.81-3.62 (m, 7 H, 4'-H {3.80, d, $J_{H4',H3'} = 3.2$ Hz}, 3-H {3.77}, 6a/b-H {3.74, 3.64}, 6'a/b-H {3.69}), 3.52 (dd, 1 H, $J_{H2',H3'} = 9.7$ Hz, $J_{H2',H1'} = 7.6$ Hz, 2'-H), 3.41 (dd, 1 H, $J_{H3',H2'} = 9.8$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.3$ Hz, 3'-H), 1.98 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.43 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.24 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

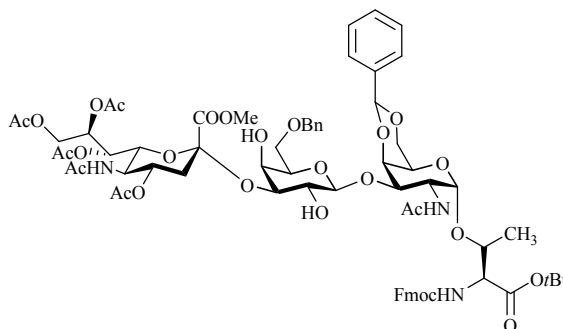
¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD, DEPT, HMQC), δ (ppm): 174.0, 171.0 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 159.2 (C=O (Urethan)), 145.3, 145.1 (C1a-, C8a-Fmoc), 142.7 (C4a-, C5a-Fmoc), 139.5, 139.4 (C_q (Bn)), 129.5, 129.2, 128.9, 128.8 (C_{Ar} (Bn)), 128.2, 127.8 (C6-, C7-Fmoc), 126.1, 126.0 (C1-, C8-Fmoc), 121.0, 121.0 (C4-, C5-Fmoc), 106.5 (C1'), 104.5 (CH (Bzn)), 100.9 (C1), 83.1 (C_q (tBu)), 78.7 (C3), 76.4 (T^β), 75.2 (C4), 74.5 (CH₂ (Bn), C3'), 72.6 (C2'), 72.3 (C5), 71.1 (C6'), 70.4 (C4), 70.3 (C4'), 67.6 (CH₂ (Fmoc)), 62.9 (C6), 60.9 (T^α), 28.4 (CH₃ (tBu)), 23.4 (CH₃ (NHAc)), 19.8 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur^[258]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[6-*O*-benzyl-3-*O*-{methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat}- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (40)^[78]**

(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNHAcCOOMe-(2→3)- β 6-BnGal-(1→3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-*O*tBu)

Es wurden 371.5 mg (0.40 mmol) Fmoc-Thr(β 6-BnGal-(1→3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-*O*tBu und 280.0 mg (0.48 mmol) α/β -Ac₄Neu5AcCOOMe-SPh **39** in jeweils 5 mL einer Mischung aus absol. Dichlormethan und absol. Acetonitril (3:2) gelöst und zu 440 mg



frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å gegeben. Die Mischung wurde 30 min bei Raumtemp. gerührt und auf -65 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 332.4 mg (1.48 mmol) *N*-Iodsuccinimid, gelöst in 6 mL einer Mischung aus absol. Dichlormethan und absol. Acetonitril (1:1), zugegeben, bevor langsam 18 µL Trifluormethansulfonsäure in 5 mL Acetonitril zugetropft wurden. Das resultierende Gemisch wurde 4 h bei -60 °C gehalten und anschließend noch weitere 12 h bei -25 °C gerührt. Es wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und mit 50 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde dreimal mit jeweils 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak abdestilliert. Der Rückstand wurde durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt um Spuren des Thiophenol-Donors und des Glycals vollständig abzutrennen.

Ausbeute: 70.0 mg (12%, 0.05 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.56$ (EtOAc/EtOH, 10:1)

$[\alpha]_D^{23} = +47.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃)

C₇₁H₈₇N₃O₂₇ (M = 1414.45 g/mol) [1413.55]

ESI-MS (positiv), m/z : 1436.54 ([M+Na]⁺, ber.: 1436.54).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.76 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.6$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.53 (d, 2 H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.6$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H_2,H_1} = J_{H_7,H_8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc),

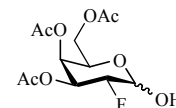
7.35–7.24 (m, 5 H, H_{Ar}), 6.57 (d, 1 H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.4$ Hz, NH (GalNAc)), 6.06 (d, 1 H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.8$ Hz, NH (Fmoc)), 5.51 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.45 (t, 1 H, $J_{\text{H8''},\text{H7''}/\text{H9a''}} = 6.5$ Hz, 8''–H), 5.20 (d, 2 H, $J_{\text{NH,H5''}} = 9.2$ Hz, NH (NeuNAc), 7''–H), 5.01 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, 1–H), 4.93–4.84 (m, 1 H, 4''–H), 4.73 (dt, 1 H, $J_{\text{H2,H3}} = 10.4$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.4$ Hz, 2–H), 4.58 (dd, 2 H, $J_{\text{CH2,CH2}} = 11.9$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.50–4.14 (m, 9 H, 9a''–H {4.48}, CH₂ (Fmoc) {4.42}, T^β {4.34}, 4–H {4.32}, T^α {4.29}, 1'–H {4.27}, CH (Fmoc) {4.23}, 6a'–H {4.19}), 4.13–3.91 (m, 3 H, 4''–H {4.09}, 6b'–H {3.94}, 9b''–H {3.94}), 3.77 (s, 3 H, OMe), 3.76–3.74 (m, 3 H, 6a/b–H {3.75, d, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 5.9$ Hz}, 3–H {3.75}), 3.71–3.60 (m, 4 H, 2'–H {3.68}, 5'–H {3.64}, 5–H {3.64}, 4'–H {3.62}), 2.67 (dd, 1 H, $J_{\text{H3eq''},\text{H3ax''}} = 12.9$ Hz, $J_{\text{H3eq''},\text{H4''}} = 4.5$ Hz, 3''–H_{eq}), 2.24 (bs, 2 H, OH), 2.11, 2.10, 2.05, 2.02 (4 x s, 12 H, CH₃ (Ac)), 1.98, 1.85 (2 x s, 6 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 171.7, 171.4, 171.0, 170.7, 170.2, 170.1, 169.9 (7 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 168.5 (C1''), 156.8 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a–, C8a–Fmoc), 141.3, 141.2 (C4a–, C5a–Fmoc), 138.1, 137.6 (C_q (Bn)), 128.8, 128.4, 128.1, 127.8, 127.5, 127.1, 127.0 (C_{Ar} (Bn), C2–, C7–Fmoc), 126.5 (C3–, C6–Fmoc), 125.2, 125.0 (C1–, C8–Fmoc), 120.0, 120.0 (C4–, C5–Fmoc), 106.5 (C1'), 100.9 (CH (Bzn)), 100.5 (C1), 97.4 (C2''), 83.2 (C_q (*t*Bu)), 78.0 (C3), 76.0 (C3'), 75.8 (T^β, C4), 73.6 (CH₂ (Bn)), 73.4 (C5'), 73.1 (C6''), 69.4 (C6'), 69.3 (C8''), 69.1 (C6), 68.7 (C4''), 68.4, 68.2 (C4', C2'), 67.9 (C7''), 67.3 (CH₂ (Fmoc)), 63.6 (C5), 63.5 (C9''), 59.2 (T^α), 53.1 (OMe), 49.2 (C5''), 47.9 (C2), 47.1 (CH (Fmoc)), 37.3 (C3''), 23.3, 23.1 (2 x CH₃ (NHAc)), 21.1, 21.0, 20.8, 20.7 (4 x CH₃ (Ac)), 19.4 (T^γ).

5.3 Synthesen zu Kapitel 3.2

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (41)

(α/β Ac₃Gal2F-OH)



Variante A:

Es wurden 411.0 mg (1.51 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**4**) und 799.0 mg (2.26 mmol) Selectfluor[®] in 5 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (5:1) in der Mikrowelle bei $T = 108\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p_{\text{max}} = 5.0\text{ bar}$, und einer Aufheizphase von $t = 1.0\text{ min}$ sowie einer Haltephase von $t = 1.0\text{ min}$ reagieren gelassen. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit 150 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 250 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 307.2 mg (66%, 0.99 mmol), farbloser amorpher Feststoff.

Variante B: ^[273]

Es wurden 430.0 mg (1.60 mmol) Galactal **4** in 5 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (5:1) gelöst. Danach wurden 846.0 mg (2.39 mmol) Selectfluor[®] zugegeben und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde zur Vervollständigung des Umsatzes noch eine halbe Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde mit 150 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 250 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 455.3 mg (63%, 1.57 mmol), Anomerenmischung (1:1) gelbes, zähflüssiges Öl. Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 2:3$ bestimmt.

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

$[\alpha]_D^{23} = +106.76$ ($c = 1.00$, CHCl_3)

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{FO}_8$ ($M = 308.26\text{ g/mol}$) [308.09]

ESI-MS (positiv), m/z : 331.13 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 331.08), 347.13 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 347.19).

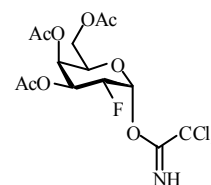
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 331.0813 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 331.0805).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), Charakteristische Signale δ (ppm): 5.12 (ddd, 1 H, $J_{\text{H}2\beta,\text{F}} = 52.7$ Hz, $J_{\text{H}2\beta,\text{H}1\beta} = 3.8$ Hz, $J_{\text{H}2\beta,\text{H}3\beta} = 9.8$ Hz, 2 β -H), 4.69 (ddd, 1 H, $J_{\text{H}2\alpha,\text{F}} = 51.3$ Hz, $J_{\text{H}2\alpha,\text{H}1\alpha} = 2.3$ Hz, $J_{\text{H}2\alpha,\text{H}3\alpha} = 9.8$ Hz, 2 α -H), 4.49 (pt, 1 H, $J_{\text{H}5\alpha,\text{H}6a} = J_{\text{H}5\alpha,\text{H}6b} = 6.6$ Hz, 5 α -H), 3.98 (pt, 1 H, $J_{\text{H}5\beta,\text{H}6a} = J_{\text{H}5\beta,\text{H}6b} = 6.5$ Hz, 5 β -H).

Eine eindeutige Zuordnung der restlichen Signale ist aufgrund des Anomerengemisches nicht möglich.

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 MHz, CDCl_3), δ (ppm): **α -Anomer:** - 207.6 (dd, $J_{\text{F}2,\text{H}2} = 48.9$ Hz, $J_{\text{F}2,\text{H}3} = 11.3$ Hz), **β -Anomer:** - 207.1 (dd, $J_{\text{F}2,\text{H}2} = 52.7$ Hz, $J_{\text{F}2,\text{H}3} = 11.3$ Hz).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (43)^[274] ($\alpha\text{Ac}_3\text{Gal}2\text{F-TCI}$)



Es wurden 1.05 g (3.41 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranose **41** in 80 mL absol. Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden wenige Tropfen DBU gegeben und anschließend wurden 1.03 mL (10.23 mmol) Trichloressigsäurenitril zugesetzt. Die Mischung wurde 18 h gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurde. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex /EtOAc, 1:1 mit 0.3% Triethylamin) gereinigt.

Ausbeute: 970.7 mg (63%, 2.15 mmol), blassgelbes Öl

$R_f = 0.64$ (^cHex /EtOAc, 1:1)

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{Cl}_3\text{FO}_7$ ($M = 436.64$ g/mol) [435.01]

$[\alpha]_D^{23} = +96.5$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[275] $[\alpha]_D^{23} = +95.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3)

ESI-MS (positiv), m/z : 474.01 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 473.99), 476.01 ($[\text{M}^*+\text{Na}]^+$, ber.: 475.99).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 473.9885 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 473.9901), 475.9862 ($[\text{M}^*+\text{Na}]^+$, ber.: 475.9872).

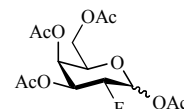
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.78 (s, 1 H, -NH), 6.66 (d, 1 H, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 3.7$ Hz, 1-H), 5.61–5.57 (m, 1 H, 4-H), 5.52–5.43 (m, 1 H, 3-H), 4.98 (ddd, 1 H, $J_{\text{H}2,\text{F}} = 48.9$ Hz, $J_{\text{H}2,\text{H}1} = 3.7$ Hz, $J_{\text{H}2,\text{H}3} = 10.2$ Hz, 2-H), 4.44 (pt, 1 H, $J_{\text{H}5,\text{H}6a} = 6.6$ Hz, $J_{\text{H}5,\text{H}6b} = 6.6$ Hz, 5-H), 4.20–4.01 (m, 2 H, 6a/b-H), 2.15 (s, 3 H, CH_3 (Ac)), 2.04 (s, 3 H, CH_3 (Ac)), 2.01 (s, 3 H, CH_3 (Ac)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.3, 169.9 (2 x C=O (Ac)), 160.8 (TCI), 93.0 (d, $J_{\text{C1,F}} = 22.6$ Hz, C1), 84.4 (d, $J_{\text{C2,F}} = 192.2$ Hz, C2), 68.2 (d, $J_{\text{C3,F}} = 19.2$ Hz, C3), 67.9 (d, $J_{\text{C4,F}} = 6.8$ Hz, C4), 61.0 (C6), 20.6, 20.5 (2 x CH_3 (Ac)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 MHz, CDCl_3), δ (ppm): - 209.6 (dd, $J_{\text{F2,H2}} = 48.9$ Hz, $J_{\text{F2,H3}} = 11.3$ Hz).

1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (45)

($\alpha/\beta\text{Ac}_4\text{Gal2F}$)



Es wurden 715.0 mg (2.63 mmol) $\alpha/\beta\text{Ac}_3\text{Gal2F-OH}$ **41** in 20 mL Pyridin gelöst und mit 1.0 mL Ac_2O sowie einer Spatelspitze DMAP versetzt. Die Mischung wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe von 1.0 mL Methanol abgebrochen wurde. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde flash-chromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 762.7 mg (83%, 2.18 mmol), kristalliner Feststoff

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

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{FO}_5$ (M = 350.29 g/mol) [350.10]

$[\alpha]_D^{23} = +109.8$ (c = 1.00, CHCl_3 , Anomerenverhältnis $\alpha:\beta = 1:3$)

ESI-MS (positiv), m/z : 373.25 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 373.09).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): **α -Anomer**: 6.45 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 4.1$ Hz, 1-H), 5.51 (td, 1 H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.4$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 1.3$ Hz, 4-H), 5.43-5.36 (m, 1 H, 3-H), 4.88 (ddd, 1 H, $J_{\text{H2,F}} = 49.1$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 10.1$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 4.0$ Hz, 2-H), 4.30 (td, 1 H, $J_{\text{H5,H6}} = 6.7$ Hz, $J_{\text{H5,H4}} = 1.0$ Hz, 5-H), 4.07 (d, 2 H, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 6.7$ Hz, 6a/b-H), 2.18, 2.14, 2.05, 2.03 (4 x s, 12 H, CH_3 (Ac)). **β -Anomer**: 5.78 (dd, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 8.1$ Hz, $J_{\text{H1,H3}} = 4.1$ Hz 1-H), 5.45 (t, 1 H, $J_{\text{H4,H3}} = 2.7$ Hz, 4-H), 5.17 (ddd, 1 H, $J_{\text{H3,F}} = 13.2$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 9.9$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.6$ Hz, 3-H), 4.64 (ddd, 1 H, $J_{\text{H2,F}} = 51.6$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 9.9$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 8.0$ Hz, 2-H), 4.30 (td, 1 H, $J_{\text{H5,H6}} = 6.7$ Hz, $J_{\text{H5,H4}} = 1.0$ Hz, 5-H), 4.12 (dd, 2 H, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 6.4$ Hz, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 4.3$ Hz 6a/b-H), 2.18, 2.14, 2.05, 2.03 (4 x s, 12 H, CH_3 (Ac)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): **α -Anomer**: 170.3, 170.0, 169.9, 168.8 (4 x C=O (Ac)), 88.9 (d, $J_{\text{C1,F}} = 22.9$ Hz, C1), 84.1 (d, $J_{\text{C2,F}} = 191.3$ Hz, C2), 68.5 (C5), 68.1 (d, $J_{\text{C3,F}} = 18.9$ Hz, C3), 67.8 (d, $J_{\text{C4,F}} = 7.7$ Hz, C4), 60.9 (C6), 20.8, 20.6, 20.5 (4 x CH_3 (Ac)). **β -Anomer**: 170.3, 169.9, 169.8, 168.8 (4 x C=O (Ac)), 91.5 (d, $J_{\text{C1,F}} = 24.5$ Hz, C1),

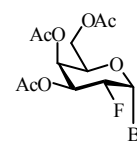
86.7 (d, $J_{C_2,F} = 188.4$ Hz, C2), 70.9 (d, $J_{C_3,F} = 18.9$ Hz, C3), 68.5 (C5), 67.4 (d, $J_{C_4,F} = 8.1$ Hz, C4), 60.8 (C6), 20.8, 20.6, 20.5 (4 x CH₃ (Ac)).

¹⁹F-NMR (376.6 MHz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer**: - 209.5 (dd, $J_{F_2,H_2} = 48.9$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 9.4$ Hz), **β-Anomer**: - 208.5 (dd, $J_{F_2,H_2} = 52.7$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 11.3$ Hz).

Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von α:β = 1:1 bestimmt. Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[139]

3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor-α-D-galactopyranosylbromid (46)^[273]

(αAc₃Gal2F-Br)



Es wurden 465.1 mg (1.33 mmol) α/β-Ac₄Gal2F **45** in 5 mL Dichlormethan gelöst und langsam mit 10 mL Bromwasserstoff in Eisessig (w = 33%) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1.5 h bei Raumtemp. gerührt, bevor auf 100 mL Eiswasser gegossen wurde. Anschließend wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 40 mL ges. Natriumhydrogencarbonat- sowie mit 40 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (c^{Hex}/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 412.2 mg (83%, 1.11 mmol), blassgelbes zähes Öl

$R_f = 0.72$ (c^{Hex}/EtOAc, 1:1)

C₁₂H₁₆F₂O₇ (M = 370.15 g/mol) [370.01]

$[\alpha]_D^{23} = +182.37$ (c = 0.8, CHCl₃), Lit.:^[273] $[\alpha]_D^{23} = +162.0$ (c = 0.8, CHCl₃)

ESI-MS (positiv), m/z: 371.26 ([M+H]⁺, ber.: 371.02), 393.17 ([M+Na]⁺, ber.: 393.00).

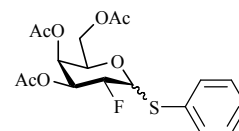
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.60 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 4.1$ Hz, 1-H), 5.54 (dd, 1 H, $J_{H_4,H_3} = 3.5$ Hz, $J_{H_4,5} = 1.4$ Hz, 4-H), 5.47 (dd, 1 H, $J_{H_3,H_2} = 10.0$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 3.5$ Hz, 3-H), 4.75 (ddd, 1 H, $J_{H_2,F} = 50.1$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.0$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 4.1$ Hz, 2-H), 4.54–4.46 (m, 1 H, 5-H), 4.21–4.07 (m, 2 H, 6a/b-H), 2.16, 2.05, 2.05 (3 x s, 9 H, 3 x CH₃ (Ac)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.3, 169.7, 169.6 (3 x C=O (Ac)), 86.8 (d, $J_{C_1,F} = 26.0$ Hz, C1), 84.1 (d, $J_{C_2,F} = 195.6$ Hz, C2), 71.2 (C5), 68.9 (d, $J_{C_3,F} = 18.1$ Hz, C3), 67.4 (d, $J_{C_4,F} = 6.8$ Hz, C4), 60.6 (C6), 20.6, 20.5, 20.4 (3 x CH₃ (Ac)).

¹⁹F-NMR (376.6 MHz, CDCl₃), δ (ppm): - 195.4 (dd, $J_{F_2,H_2} = 50.8$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 9.4$ Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[276]

Phenyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (48)
(α/β Ac₃Gal2F-SPh)



Es wurden 959.8 mg (2.12 mmol) α Ac₃Gal2F-TCI **43** in 40 mL absol.

Dichlormethan gelöst und nacheinander mit 240 μ L (2.35 mmol) Thiophenol und dann 1.0 mL (55.50 mmol) TMSOTf versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei Raumtemp. gerührt und die Umsetzung anschließend durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat abgebrochen. Nach dem Verdünnen mit 20 mL Dichlormethan wurde filtriert und die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt. Durch die Flashchromatographie konnte eine kleine mit β -Anomer angereicherte Fraktion für die Analytik erhalten werden.

Ausbeute: 711.6 mg (83%, 1.78 mmol), gelbes Öl. Aus den Integralen des ¹H-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:3$ bestimmt.

$R_f = 0.55$ (^cHex/EtOAc, 2:1)

C₁₈H₂₁FO₇S (M = 400.42 g/mol) [400.10]

ESI-MS (positiv), m/z : 423.08 ([M+Na]⁺, ber.: 423.09).

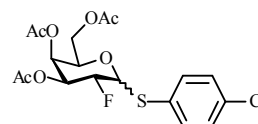
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 423.0872 ([M+Na]⁺, ber.: 423.0890).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): **β -Anomer**: 7.36-7.29 (m, 5 H, H_{Ar}), 5.82 (dd, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 5.78$ Hz, $J_{H_1,H_3} = 1.53$ Hz, 1-H), 5.55-5.52 (m, 1 H, 4-H), 5.29 (dd, 1 H, $J_{H_3,H_2} = 10.8$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 3.5$ Hz, 3-H), 5.09 (ddd, 1 H, $J_{H_2,F} = 50.6$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.3$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 5.9$ Hz, 2-H), 4.82-4.77 (pt, 1 H, 5-H), 4.10 (dd, 2 H, $J_{H_{6a/b},H_5} = 6.44$ Hz, $J_{H_{6a/b},H_5} = 2.1$ Hz, 6a/b-H), 2.14, 2.06, 2.00 (3 x s, CH₃(Ac)).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): **β -Anomer**: 170.4, 169.9, 169.8 (3 x s, C=O (Ac)), 129.1, 129.0, 128.9 (C_{Ar} (Bn)), 86.3 (d, $J_{C_1,F} = 21.7$ Hz, C1), 85.0 (d, $J_{C_2,F} = 192.1$ Hz, C2), 68.9 (d, $J_{C_3,F} = 18.4$ Hz, C3), 68.5 (d, $J_{C_4,F} = 50.6$ Hz, C4), 67.3 (C5), 61.5 (C6), 20.6, 20.5, 20.5 (3 x CH₃ (Ac)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 Hz, CDCl_3), δ (ppm): **α -Anomer**: - 197.8 (dd, $J_{\text{F}_2,\text{H}_2} = 36.8$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_3} = 13.3$ Hz), **β -Anomer**: - 197.6 (dd, $J_{\text{F}_2,\text{H}_2} = 50.6$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_3} = 11.1$ Hz).

***p*-Chlorphenyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (47)**
($\alpha/\beta\text{Ac}_3\text{Gal}2\text{F}$ -(4-Cl)-SPh)



Es wurden 3.66 g (8.09 mmol) $\alpha\text{Ac}_3\text{Gal}2\text{F-TCl}$ **43** in 60 mL absol.

Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser gekühlten Lösung wurden nacheinander 2.34 g (16.18 mmol) *p*-Chlorthiophenol und 3.0 mL (16.60 mmol) TMSOTf zugegeben und über Nacht unter Argonatmosphäre auf Raumtemp. erwärmt. Anschließend wurde durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und mit 50 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1) gereinigt. Durch die Flashchromatographie konnte eine Fraktion des β -Anomeren für die Analytik erhalten werden.

Ausbeute: 3.41 g (95%, 7.84 mmol), blassgelbes Öl. Aus den Integralen des ^{19}F -Spektrums wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:2$ bestimmt.

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClFO}_7\text{S}$ (M = 434.86 g/mol) [434.06]

ESI-MS (positiv), m/z : 457.09 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.:457.05), 459.10 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.:459.05).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 457.0493 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.:457.0500), 459.0513 ($[\text{M}^*+\text{Na}]^+$, ber.: 459.0470).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): **β -Anomer**: 7.46 (d, 2 H, $J_{m\text{-H},o\text{-H}} = 8.6$ Hz, $m\text{-H}_{\text{Ar}}$), 7.30 (d, 2 H, $J_{o\text{-H},m\text{-H}} = 8.6$ Hz, $o\text{-H}_{\text{Ar}}$), 5.78 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 5.8$ Hz, $J_{\text{H}_1,\text{F}} = 1.5$ Hz, 1-H), 5.53 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 3.4$ Hz, $J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 1.2$ Hz, 4-H), 5.27 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.5$ Hz, 3-H), 5.09 (ddd, 1 H, $J_{\text{H}_2,\text{F}} = 50.5$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.3$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 5.8$ Hz, 2-H), 4.75 (t, 1 H, $J_{\text{H}_5,\text{H}_{6a/b}} = 6.0$ Hz, 5-H), 4.20-4.06 (m, 2 H, 6a/b-H), 2.15, 2.06, 2.01 (3 x s, CH_3 (Ac)).

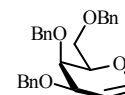
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): **β -Anomer**: 170.3, 169.9, 169.8 (3 x CH_3 (Ac)), 135.2, 133.9, 129.3, 129.1 (C_{Ar} (Bn)), 86.3 (d, $J_{\text{C}_1,\text{F}} = 21.8$ Hz, C1), 84.9 (d,

$J_{H2,F} = 192.4$ Hz, C2), 68.9 (d, $J_{C3,F} = 18.5$ Hz, C3), 68.4 (d, $J_{C4,F} = 7.7$ Hz, C4), 67.5 (C5), 61.6 (C6), 20.6, 20.6, 20.5 (3 x CH₃ (Ac)).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer**: - 198.0 (dd, $J_{F2,H2} = 49.9$ Hz, $J_{F2,H3} = 13.3$ Hz), **β-Anomer**: - 197.8 (dd, $J_{F2,H2} = 50.4$ Hz, $J_{F2,H3} = 11.2$ Hz).

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-D-galactal (**53**)^[277]

(Bn₃Gal)



Es wurden 10.28 g (37.74 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**4**) in 100 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%-ig) versetzt, bis ein pH-Wert von 9-9.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol kodestilliert und danach in 80 mL trockenem DMF aufgenommen. Unter Eisbadkühlung wurden zu dieser Lösung portionsweise 7.60 g (188.7 mmol) Natriumhydrid (60%-ig in Mineralöl) zugegeben und nach beendeter Zugabe 20 min gerührt, bevor 16.3 mL (136.3 mmol) Benzylbromid zugetropft wurden. Die erhaltene Suspension wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt und mit 200 mL Wasser und 100 mL Toluol vorsichtig versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 100 mL Toluol extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 5:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.54 g (80%, 30.11 mmol), farblos kristalliner Feststoff

$R_f = 0.63$ (°Hex/EtOAc, 4:1)

C₂₇H₂₈O₄ M = 416.51 g/mol [416.20]

$[\alpha]_D^{23} = -29.6$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[277] $[\alpha]_D^{20} = -45.0$ (c = 1.00, CHCl₃)

ESI-MS (positiv), m/z : 439.21 ([M+Na]⁺, ber.: 439.19).

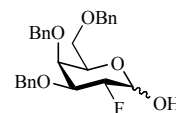
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.44-7.27 (m, 15 H, H_{Ar}), 6.39 (dd, 1 H, $J_{H1,H2} = 6.3$ Hz, $J_{H1,H3} = 1.1$ Hz, 1-H), 4.90 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.9$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.90-4.85 (m, 1 H, 2-H), 4.71-4.41 (m, 5 H, CH₂ (Bn)), 4.24-4.18 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 3.99-3.95 (m, 1 H, 4-H), 3.81 (dd, 1 H, $J_{H6a,H6b} = 10.1$ Hz, $J_{H6a,H5} = 7.3$ Hz, 6a-H), 3.67 (dd, 1 H, $J_{H6b,H6a} = 10.1$ Hz, $J_{H6b,H5} = 5.1$ Hz, 6b-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 144.2 (C1), 138.5, 138.3, 137.9 (C_q (Bn)), 128.3, 128.3, 128.1, 127.9, 127.7, 127.5, 127.4 (C_{Ar} (Bn)), 99.9 (C2), 75.6, 73.4, 73.3, 71.2, 70.8, 70.7 (3 x CH_2 (Bn), C3, C4, C5), 68.4 (C6).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[278]

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (**54**)^[279]

($\alpha/\beta\text{Bn}_3\text{Gal2F-OH}$)



Es wurden 509.0 mg (1.22 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactal **53** in 20 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) gelöst und mit 865.9 mg (2.45 mmol) Selectfluor[®] versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt und anschließend 30 min unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde die Reaktionslösung in eine Mischung aus 100 mL Wasser und 20 mL verd. Salzsäure (1M) gegossen und sechsmal mit je 200 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 150 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^c\text{Hex/EtOAc}$, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 365.6 mg (66%, 0.81 mmol), farbloses Öl. Aus den Integralen des ^{19}F -Spektrums wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 3:2$ bestimmt.

$R_f = 0.29$ ($^c\text{Hex/EtOAc}$, 4:1)

$[\alpha]_D^{23} = +32.7$ ($c = 1.00$, CHCl_3)

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{FO}_5$ ($M = 452.51$ g/mol) [452.20]

ESI-MS (positiv), m/z : 475.32 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 475.50), 491.27 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 491.61).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 475.1906 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 475.1897), 476.1961 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, ber.: 476.1930).

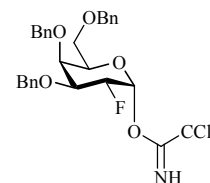
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 7.42-7.24 (m, 24 H, $\text{H}_{\text{Ar}(\alpha+\beta)}$), 5.43 (d, 1 H, $J_{\text{H}1\alpha, \text{H}2\alpha} = 3.7$ Hz, $1\alpha\text{-H}$), 4.95 (dd, 1 H, $J_{\text{H}2, \text{F}} = 50.3$ Hz, $J_{\text{H}2, \text{H}3} = 8.8$ Hz, $J_{\text{H}2, \text{H}1} = 3.8$ Hz, $2\alpha\text{-H}$), 4.93 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.4$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.82 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.9$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.78 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 12.1$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.74-4.69 (m, 1 H, $2\beta\text{-H}$), 4.69 (d, 2 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 12.4$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.69 (d, 2 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 12.4$ Hz, CH_2 (Bn) an β -Anomer, $1\beta\text{-H}$ {4.69}), 4.18 (t, 1 H, $J_{\text{H}2, \text{H}1} = 6.3$ Hz, $5\alpha\text{-H}$), 4.03 (dt, 1 H, $J_{\text{H}3\alpha, \text{H}2\alpha/\text{F}} = 10.2$ Hz, $J_{\text{H}3\alpha, \text{H}4\alpha} =$

3.0 Hz, 3 α -H), 3.93 (t, 1 H, $J_{H5\alpha, H6a/b\alpha} = 6.3$ Hz, 5 α -H, 4 β -H {3.91}), 3.64-3.53 (m, 3 H, 5 β -H {3.61}, 3b-H {3.60}, 6 $\alpha\alpha$ -H {dd, $J_{H6a\alpha, H6b\alpha} = 9.5$ Hz, $J_{H6a\alpha, H5\alpha} = 6.9$ Hz}), 3.41 (dd, 1 H, $J_{H6b\alpha, H6a\alpha} = 9.6$ Hz, $J_{H6b\alpha, H5\alpha} = 5.6$ Hz, H6b α).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 138.3, 138.2, 138.0, 137.9, 137.5 (C_q (Bn)), 128.5, 128.4, 128.3, 128.3, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.5, 127.0 (C_{Ar} (Bn)), 95.2 (d, $J_{\text{C}1\beta, \text{F}} = 24.5$ Hz, C1 β), 93.3 (d, $J_{\text{C}2, \text{F}} = 183.1$ Hz, C2 β), 90.9 (d, $J_{\text{C}1\alpha, \text{F}} = 21.5$ Hz, C1 α), 89.6 (d, $J_{\text{C}2\alpha, \text{F}} = 186.5$ Hz, C2 α), 80.0 (d, $J_{\text{C}3\beta, \text{F}} = 15.9$ Hz, C3 β), 76.6 (C3 α), 75.6 (d, $J_{\text{C}4\alpha, \text{F}} = 8.4$ Hz, C4 α), 74.8, 74.8 (CH_2 (Bn)), 74.3 (d, $J_{\text{C}4\beta, \text{F}} = 9.0$ Hz, C4 β), 73.8 (C5 β), 73.5, 73.5, 73.1, 72.8 (CH_2 (Bn)), 69.1 (C6 α), 68.9 (C6 β).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 Hz, CDCl_3), δ (ppm): **α -Anomer:** - 207.2 (ddd, $J_{\text{F}2, \text{H}2} = 50.3$ Hz, $J_{\text{F}2, \text{H}3} = 10.5$ Hz, $J_{\text{F}2, \text{H}1} = 3.8$ Hz), **β -Anomer:** - 205.1 (dd, $J_{\text{F}2, \text{H}2} = 52.7$ Hz, $J_{\text{F}2, \text{H}3} = 11.3$ Hz).

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**55**) ($\alpha\text{Bn}_3\text{Gal}2\text{F-TCl}$)



Es wurden 5.89 g (13.0 mmol) $\alpha/\beta\text{Bn}_3\text{Gal}2\text{F-OH}$ **54** in 80 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit wenigen Tropfen DBU und 3.0 mL (29.9 mmol) Trichloracetonitril versetzt. Die Reaktionslösung wurde 18 h bei Raumtemp. Gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurde. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.57 g (84%, 11.0 mmol), farbloses Öl

$\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{Cl}_3\text{FNO}_5$ (M = 596.90 g/mol) [596.11]

$R_f = 0.64$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1)

$[\alpha]_D^{23} = +33.0$ (c = 1.00, CHCl_3)

ESI-MS (positiv), m/z: 618.20 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 618.10), 636.17 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 636.00).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 618.1019 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 618.0993), 620.0986 ($[\text{M}^*+\text{Na}]^+$, ber.: 620.0964).

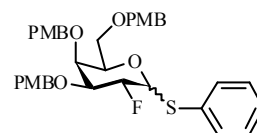
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 8.64 (s, 1 H, NH), 7.41-7.20 (m, 15 H, H_{Ar}), 6.57 (d, 1 H, $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.7$ Hz, 1-H), 5.17 (ddd, 1 H, $J_{\text{H}2, \text{F}} = 49.3$ Hz, $J_{\text{H}2, \text{H}3} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H}2, \text{H}1} = 3.8$ Hz, H-2), 4.97 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.3$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.82 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.9$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.73 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.9$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.60 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.3$ Hz, CH_2

(Bn)), 4.48 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.7$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.42 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.7$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.19-4.08 (m, 3 H, 3-H {4.11}, 4-H {4.11}, 5-H {4.16}), 3.67-3.55 (m, 2 H, 6a/b-H). ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 160.8 (TCI), 138.1, 137.8, 137.6 (C_q (Bn)), 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7 (C_{Ar} (Bn)), 94.1 (d, $J_{\text{C}_1,\text{F}} = 23.0$ Hz, C1), 91.0 (CCl₃), 88.4 (d, $J_{\text{C}_2,\text{F}} = 189.6$ Hz, C2), 76.2 (d, $J_{\text{C}_3,\text{F}} = 16.1$ Hz, C3), 75.1 (CH₂ (Bn)), 74.9 (d, $J_{\text{C}_4,\text{F}} = 8.4$ Hz, C4), 73.5 (CH₂ (Bn)), 72.2 (C5), 67.8 (C6). ¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -209.1 (ddd, $J_{\text{F}_2,\text{H}_2} = 49.3$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_3} = 9.3$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_1} = 4.8$ Hz).

Phenyl-3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose

(65)

(α/β PMB₃Gal2F-SPh)



Es wurden 918.0 mg (2.29 mmol) α/β Ac₃Gal2F-SPh **48** in 50 mL Methanol gelöst und mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%-ig) auf einen pH-Wert von 9-10 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert ($R_f = 0.83$ (CH₂Cl₂/MeOH, 4:1)). Der Rückstand wurde dreimal mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert und in 40 mL trockenem DMF aufgenommen. Nach Kühlen der Lösung auf 0 °C wurde diese portionsweise mit 800 mg (33.33 mmol) Natriumhydrid (60%-ig in Mineralöl) versetzt. Die Suspension wurde 30 min gerührt, bevor 1.8 mL (14.73 mmol) 4-Methoxybenzylchlorid zugetropft und eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumiodid zugegeben wurden. Das Ganze wurde 18 h gerührt, bevor mit 50 mL Essigsäureethylester und 50 mL Wasser verdünnt wurde. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit 70 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 5:1+ 0.1% Triethylamin) gereinigt.

Ausbeute: 843.2 mg (58%, 1.33 mmol), blassgelbes Öl. Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis $\alpha:\beta = 1:3$ bestimmt.

α : $R_f = 0.63$, β : $R_f = 0.56$ (^cHex/EtOAc, 3:1)

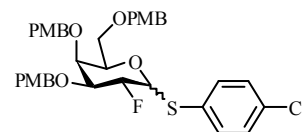
C₃₆H₃₉FO₇S (M = 634.75 g/mol) [634.24]

ESI-MS (positiv), m/z : 657.11 ($[M+Na]^+$, ber.: 657.23).

Aus dem 1H -NMR war aufgrund des Anomerengemisches eine eindeutige Zuordnung der Signale nicht möglich.

^{19}F -NMR (376.6 Hz, $CDCl_3$), δ (ppm): **α -Anomer**: - 196.4 (dd, $J_{F_2,H_2} = 51.2$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 14.8$ Hz), **β -Anomer**: - 195.9 (ddd, $J_{F_2,H_2} = 51.1$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 11.9$ Hz, $J_{F_2,H_1} = 3.6$ Hz).

***para*-Chlorphenyl-3,4,6-tri-*O*- *para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (64)**



Es wurden 3.17 g (7.29 mmol) *para*-Chlorphenyl-3,4,6-tri-*O*-

acetyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (**47**) in 80 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) solange versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht wurde. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und nach vollständiger Deacetylierung wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung in 60 mL absol. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser gekühlten Lösung wurden portionsweise 1.8 g (45.00 mmol) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) zugegeben. Nach 30 min Rühren wurden eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumiodid und 1.90 mL (14.00 mmol) *para*-Methoxybenzylchlorid zugegeben und die Lösung wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt, bevor sie zur Hydrolyse auf eine Mischung aus 70 mL Eiswasser und 70 mL Essigsäureethylester gegossen wurde. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 100 mL Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde mehrfach mit jeweils 75 mL Toluol kodestilliert und anschließend flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 3:1) gereinigt, wobei ein kleiner Teil des reinen β -Anomeres für die Analytik abgetrennt werden konnte.

Ausbeute: 1.54 g (32%, 2.30 mmol), blassgelbes Öl. Aus den Integralen des ^{19}F -Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis $\alpha:\beta = 1:2$ bestimmt.

β -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = + 154.0$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$)

$R_f = 0.43$ (c Hex/EtOAc, 3:1),

$C_{36}H_{38}ClFO_7S$ ($M = 669.20$ g/mol) [668.20]

ESI-MS (positiv), m/z : 691.22 ($[M+Na]^+$, ber.: 691.19), 707.21 ($[M+K]^+$, ber.: 707.30).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 691.1913 ($[M+Na]^+$, ber.: 691.1909).

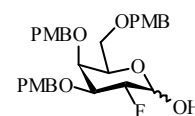
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): **β -Anomer**: 7.46-7.41 (m, 2 H, m -H_{Ar} (4-Cl-Phenyl)), 7.34-7.30 (m, 2 H, m -H_{Ar} (PMB)), 7.23-7.15 (m, 6 H, H_{Ar}), 6.94-6.82 (m, 6 H, H_{Ar}), 5.69 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 5.8$ Hz, 1-H), 5.22 (ddd, 1 H, $J_{H2,F} = 51.1$ Hz, $J_{H2,H3} = 9.9$ Hz, $J_{H2,H1} = 5.7$ Hz, 2-H), 4.85 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.0$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.75 (d, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 11.4$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.63 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.5$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.51 (d, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 11.0$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.45-4.40 (m, 1 H, 5-H), 3.96 (t, 1 H, $J_{H4,H3/H5} = 2.8$ Hz, 4-H), 3.87-3.79 (m, 1 H, 3-H), 3.83, 3.82, 3.79 (3 x s, 9 H, OMe), 3.52 (d, 2 H, $J_{H6a/b,H5} = 6.3$ Hz, 6a/b-H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, DEPT, HMQC), δ (ppm): **β -Anomer**: 159.3 (C_{Ar} (p -Cl)), 133.8 (C_q (4-Cl-Ph)), 133.7 (C_{Ar}), 131.8, 130.3, 130.0 (C_q (PMB)), 129.8, 129.4, 129.3, 129.0, 113.9, 113.8, 113.6 (C_{Ar}), 88.9 (d, $J_{C2,F} = 189.0$ Hz, C2), 86.8 (d, $J_{C1,F} = 22.2$ Hz, C1), 77.4 (d, $J_{C3,F} = 14.6$ Hz, C3), 74.9 (d, $J_{C4,F} = 8.3$ Hz, C4), 74.5, 73.1, 72.8 (3 x CH₂ (PMB)), 70.7 (C5), 68.4 (C6), 55.2 (CH₃ (OMe)).

^{19}F -NMR (376.6 Hz, $CDCl_3$), δ (ppm): **α -Anomer**: - 195.6 - -195.8 (m), **β -Anomer**: - 196.3 (ddd, $J_{F2,H2} = 51.1$ Hz, $J_{F2,H3} = 10.4$ Hz, $J_{F2,H1} = 3.3$ Hz)

3,4,6-Tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (66)

(α/β PMB₃Gal2F-OH)



Es wurden 1.58 g α/β Phenyl-3,4,6-tri-*O*-*p*-methoxyphenyl-2-fluor-2-desoxy-1-thio- α/β -D-galactopyranose **65** in 44 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Wasser (10:1) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser gekühlten Lösung wurden 713 mg (3.17 mmol) *N*-Iodsuccinimid und 0.25 mL (3.25 mmol) TFA gegeben und die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 0 °C gerührt, bevor 75 mL einer gesättigten Natriumthiosulfat-Lösung zugesetzt wurden. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase zweimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde flash-chromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 831.8 mg (63%, 1.53 mmol), farbloses Öl. Aus den Integralen des ^{19}F -Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:1$ bestimmt.

$R_f = 0.15$ (c Hex/EtOAc, 3:1), $R_f = 0.53$ (c Hex/EtOAc, 1:1).

$C_{30}H_{35}FO_8$ ($M = 542.59$ g/mol) [542.23]

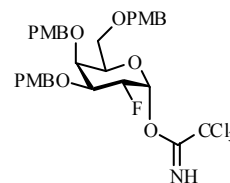
ESI-MS (positiv), m/z : 565.23 ($[M+Na]^+$, ber.: 565.22), 1107.47 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1107.45).

Aufgrund des Anomerengemisches war eine Zuordnung der Signale nicht möglich.

^{19}F -NMR (376.6 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): **α -Anomer**: - 205.1 (dd, $J_{F_2,H_2} = 54.8$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 11.9$ Hz), **β -Anomer**: - 207.3 (ddd, $J_{F_2,H_2} = 50.7$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 9.5$ Hz, $J_{F_2,H_1} = 3.5$ Hz).

3,4,6-Tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (67)

(α PMB₃Gal2F-TCI)



Es wurden 830.8 mg (1.53 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose **66** in 50 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 121 μ L (1.21 mmol) Trichloracetonitril und wenigen Tropfen DBU versetzt. Nach 18-stündigem Rühren bei Raumtemp. wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 847.8 mg (80%, 1.23 mmol), farbloser kristalliner Feststoff

$C_{32}H_{35}Cl_3FNO_8$ ($M = 686.98$ g/mol) [685.14]

$R_f = 0.78$ (c Hex/EtOAc, 1:1)

$[\alpha]_D^{23} = +38.6$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$)

ESI-MS (positiv), m/z : 708.17 ($[M+Na]^+$, ber.: 708.13), 710.17 ($[M^*+Na]^+$, ber.: 710.13), 1393.37 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1393.27), 1397.36 ($[2M^*+Na]^+$, ber.: 1397.27).

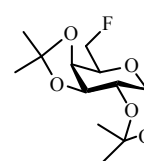
HR-ESI-MS (positiv), m/z : 708.1333 ($[M+Na]^+$, ber.: 708.1310), 710.1304 ($[M^*+Na]^+$, ber.: 710.1280).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 8.61 (s, 1 H, -NH), 7.32-7.28 (m, 2 H, H_{Ar}), 7.25-7.16 (m, 4 H, H_{Ar}), 6.91-6.81 (m, 6 H, H_{Ar}), 6.53 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, 1-H), 5.12 (ddd, 1 H, $J_{H_2,F} = 49.2$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 9.6$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.8$ Hz, 2-H), 4.85 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 10.9$ Hz, CH_2 (PMB)), 4.71 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.5$ Hz, CH_2 (PMB)), 4.64 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.5$ Hz, CH_2 (PMB)), 4.51 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.5$ Hz, CH_2 (PMB)), 4.41 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.3$ Hz, CH_2 (PMB)), 4.34 (d, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.3$ Hz, CH_2 (PMB)), 4.13-4.00 (m, 2 H, 5-H {4.11}, 3-H {4.06}, 4-H {4.03}), 3.81, 3.80, 3.79 (3 x s, 9 H, OMe), 3.68-3.48 (m, 2 H, 6a/b-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 160.9 (TCI), 159.3, 159.3, 159.3 (3 x s, CH_3 (OMe)), 130.4, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5 (C_{Ar} (PMB)), 113.8, 113.7 (C_{Ar} (PMB)), 94.2 (d, $J_{\text{C1,F}} = 23.0$ Hz, C1), 88.4 (d, $J_{\text{C2,F}} = 189.4$ Hz, C2), 75.7 (d, $J_{\text{C3,F}} = 16.0$ Hz, C3), 74.7 (CH_2 (PMB)), 74.5 (d, $J_{\text{C4,F}} = 8.3$ Hz, C4), 73.1 (CH_2 (PMB)), 72.4 (C5), 72.3 (CH_2 (PMB)), 67.4 (C6), 55.3 (CH_3 (OMe)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 Hz, CDCl_3), δ (ppm): -209.1 (ddd, $J_{\text{F2,H2}} = 49.4$ Hz, $J_{\text{F2,H3}} = 9.9$ Hz, $J_{\text{F2,H1}} = 4.4$ Hz).

6-Desoxy-6-fluor-1,2;3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (75)^[140]



Zu einer Lösung von 8.23 g (31.64 mmol) 1,2;3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose **31** in 40 mL absol. Dichlormethan wurden 6.12 g (37.97 mmol) DAST[®] und 10.1 mL (75.85 mmol) 2,4,6-Collidin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 80 °C und 100 W ($p_{\text{max}} = 5.0$ bar, und einer Aufheizphase von max. 5 min) in der Mikrowelle reagieren gelassen. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mL Methanol die Lösung abgebrochen und die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.18 g (86%, 27.39 mmol), blassgelbes Öl

$R_f = 0.60$ (^cHex/EtOAc, 3:1)

$[\alpha]_D^{23} = -45.4$ (c = 1.00, CHCl_3), Lit.:^[280] $[\alpha]_D^{23} = -51.4$ (c = 1.28, CHCl_3)

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{FO}_5$ (M = 262.27 g/mol) [262.12]

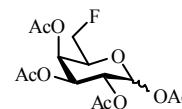
ESI-MS (positiv), m/z : 285.11 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 285.11).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.54 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 5.0$ Hz, 1-H), 4.68-4.58 (m, 2 H, 3-H, 6a-H), 4.52-4.40 (m, 1 H, 6b-H), 4.33 (dd, 1 H, $J_{\text{H2,H1}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 2.5$ Hz, 2-H), 4.26 (dd, 1 H, $J_{\text{H4,H3}} = 7.9$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 2.0$ Hz, 4-H), 4.12-4.02 (m, 1 H, 5-H), 1.53, 1.44, 1.33 (3 x s, 12 H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , DEPT), δ (ppm): 109.6, 108.8 (2 x C (CH_3)₂), 96.1 (C1), 82.0 (d, $J_{\text{C6,F}} = 168.0$ Hz, C6), 70.5, 70.4, 70.4 (C2, C3, C4), 66.6 (d, $J_{\text{C5,F}} = 22.5$ Hz, C5), 26.0, 25.9, 24.9, 24.4 (4 x CH_3).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 Hz, CDCl_3), δ (ppm): -231.1 (dt, $J_{\text{F,H6a/b}} = 47.2$ Hz, $J_{\text{F,H5}} = 12.6$ Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[281]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranosylacetat (76)^[282]**(α/β Ac₄Gal6F)**

Es wurden 6.25 g (23.84 mmol) 6-Desoxy-6-fluor-1,2,3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose **75** in 80 mL Essigsäure (80%) gelöst und 20 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 30 mL Toluol und zweimal mit je 30 mL Dichlormethan kodestilliert. Das erhaltene Öl wurde ohne weitere Reinigung in 90 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (2:1) gelöst und 2 d bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurden die Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde mehrfach mit jeweils 100 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.10 g (85%, 20.27 mmol), blassgelbes Öl. Aus den Integralen des ¹H-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:1$ bestimmt.

$R_f = 0.62$ (^cHex/EtOAc, 1:1)

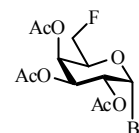
C₁₄H₁₉FO₉ (M = 350.29 g/mol) [350.10]

ESI-MS (positiv), m/z : 373.12 ([M+Na]⁺, ber.: 373.09).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): charakteristische Signale: 5.72 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 8.3$ Hz, 1-H β), 5.48 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.9$ Hz, 4-H β), 5.35-5.33 (m, 1 H, 2-H β), 5.09 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 10.4$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, 3-H β), 4.60-4.28 (m, 2 H, 6a/b-H β), 4.13-4.04 (m, 1 H, 5-H β), 2.16, 2.11, 2.04, 2.01 (4 x s, 12 H, CH₃ (Ac)).

¹³C-NMR: Eine eindeutige Zuordnung der Signale war aufgrund des Anomerenverhältnisses nicht möglich.

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): - 231.5 - -232.0 (m).

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranosylbromid (77)^[283,284]**(α Ac₃Gal6F-Br)**

Zu einer Lösung von 7.09 g (20.25 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranose (**76**) in 50 mL Dichlormethan wurden unter Eisbadkühlung langsam 30 mL HBr (33%-ig in Eisessig) getropft. Nach dem Erwärmen auf Raumtemp. wurde die Lösung 2 h gerührt, bevor sie zur Hydrolyse auf Eiswasser (150 mL) gegossen

wurde. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 150 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 75 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat- und einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 5.20 g (69%, 14.02 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$R_f = 0.59$ (^cHex/EtOAc, 2:1)

$C_{12}H_{16}BrFO_7$ (M = 371.15 g/mol) [370.01]

ESI-MS (positiv), m/z : 371.14 ($[M+H]^+$, ber.: 371.01), 373.13 ($[M^*+H]^+$, ber.: 373.01).

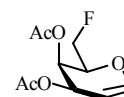
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.71 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, 1-H), 5.57 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, 4-H), 5.40 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 10.6$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, 3-H), 5.06 (dd, 1 H, $J_{H2,H3} = 10.6$ Hz, $J_{H2,H1} = 4.0$ Hz, 2-H), 4.59-4.32 (m, 3 H, 5-H, 6a/b-H), 2.14, 2.11, 2.01 (3 x s, 9 H, CH₃ (Ac)).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.0, 169.8, 169.7 (3 x s, C=O (Ac)), 87.9 (C1), 80.3 (d, $J_{C6,F} = 173.2$ Hz, C6), 71.5 (d, $J_{C5,F} = 23.6$ Hz, C5), 67.9 (C2), 67.7 (C3), 66.9 (d, $J_{C4,F} = 5.4$ Hz, C4), 20.7, 20.5, 20.5 (3 x CH₃ (Ac)).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -232.1 (dt, $J_{F,H6a/b} = 46.2$ Hz, $J_{F,H5} = 14.6$ Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[276]

3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**78**)^[Fehler! Textmarke nicht definiert.,285]



Es wurden 9.66 g (0.15 mol) Zink-Staub mit verdünnter Salzsäure (1 M) aktiviert und je zweimal mit dest. Wasser, Diethylether und Essigsäureethylester gewaschen. Das aktivierte Zink wurde in 50 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt, mit 1.11 mL (14.0 mmol) *N*-Methylimidazol versetzt und unter Rückfluss erhitzt. Innerhalb einer halben Stunde wurden 5.00 g (13.48 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranosylbromid (**77**), gelöst in 50 mL Essigsäureethylester, zutropft. Das Gemisch wurde noch eine weitere Stunde unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen durch *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 75 mL verd. Salzsäure (1 M) und 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.70 g (86%, 11.62 mmol), farbloser kristalliner Feststoff

$R_f = 0.55$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1)

$[\alpha]_D^{23} = -51.9$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.: [Fehler! Textmarke nicht definiert.] $[\alpha]_D^{23} = -35.8$ (1.00 , CHCl_3)

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FO}_5$ ($M = 232.21$ g/mol) [232.07]

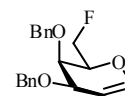
ESI-MS (positiv), m/z : 255.10 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 255.06), 487.20 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 487.14).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.46 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 6.3$ Hz, $J_{\text{H}_1,\text{H}_3} = 1.6$ Hz, 1-H), 5.54-5.48 (m, 1 H, 3-H), 5.46-5.40 (m, 1 H, 4-H), 4.76-4.72 (m, 1 H, 2-H), 4.70-4.42 (m, 2 H, 6a/b-H), 4.42-4.32 (m, 1 H, 5-H), 2.10, 2.00 (2 x s, 6 H, CH_3 (Ac)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.1, 169.9 (2 x s, $\text{C}=\text{O}$ (Ac)), 145.4 (C1), 99.7 (C2), 81.0 (d, $J_{\text{C}_6,\text{F}} = 170.7$ Hz, C6), 73.5 (d, $J_{\text{C}_5,\text{F}} = 22.0$ Hz, C5), 63.7 (d, $J_{\text{C}_4,\text{F}} = 6.8$ Hz, C4), 63.6 (C3), 20.7, 20.5 (2 x CH_3 (Ac)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 Hz, CDCl_3), δ (ppm): -229.9 (dt, $J_{\text{F},\text{H}_{6\text{a/b}}} = 46.0$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}_5} = 11.7$ Hz).

3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (79)



Es wurden 2.41 g (10.37 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**78**) in 40 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und durch Zugabe einer methanolischen NaOMe-Lösung (1%) ein pH Wert von 10 eingestellt. Nach 3 h Rühren bei Raumtemp. wurde mit Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde noch zweimal mit jeweils 50 mL Toluol kdestilliert, bevor es in 40 mL trockenem DMF aufgenommen wurde. Unter Argonatmosphäre und Eisbadkühlung wurden portionsweise 1.44 g (36.0 mmol, 60% in Mineralöl) Natriumhydrid zugegeben. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurden langsam 3.70 mL (31.15 mmol) Benzylbromid zugetropft, bevor weitere 18 h bei Raumtemp. gerührt wurden. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zur Hydrolyse auf eine Mischung aus 100 mL Toluol und 100 mL Eiswasser (1:1) gegossen und die wässrige Phase wurde zweimal mit jeweils 75 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren der Lösungsmittel wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.23 g (95%, 9.85 mmol), farbloses Öl

$R_f = 0.52$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 5:1)

$[\alpha]_D^{23} = -76.8$ ($c = 1.00$, CHCl_3)

$C_{20}H_{21}FO_3$ (M = 328.38 g/mol) [328.15]

ESI-MS (positiv), m/z : 351.17 ($[M+Na]^+$, ber.: 351.14).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 351.1367 ($[M+Na]^+$, ber.: 351.1373).

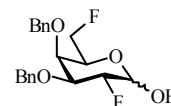
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 7.42-7.29 (m, 10 H, H_{Ar}), 6.38 (dd, 1 H, $J_{H1,H2} = 6.2$ Hz, $J_{H1,H3} = 0.9$ Hz, 1-H), 4.96-4.90 (m, 2 H, 2-H {4.95}, 6a-H {4.84 (ddd, 1 H, $J_{H6a,F} = 89.1$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.5$ Hz, $J_{H6a,H5} = 8.1$ Hz)}), 4.83 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.8$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.73 (ddd, 1 H, $J_{H6b,F} = 89.1$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.4$ Hz, $J_{H6b,H5} = 3.0$ Hz, 6b-H), 4.71 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.1$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.68 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.7$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.65 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.9$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.47-4.38 (m, 1 H, 5-H), 4.13-4.09 (m, 1 H, 3-H), 3.97 (dt, 1 H, $J_{H4,H5} = 3.9$ Hz, $J_{H4,H3} = 2.0$ Hz, 4-H).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, DEPT, HMQC), δ (ppm): 143.9 (C1), 138.3, 137.8 (C_q (Bn)), 128.4, 128.4, 127.9, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5 (C_{Ar} (Bn)), 99.5 (C2), 82.3 (CH_2 (Bn)), 81.5 (d, $J_{C6,F} = 165.5$ Hz, C6), 80.7 (CH_2 (Bn)), 74.9 (d, $J_{C5,F} = 20.8$ Hz, C5), 74.4 (d, $J_{C4,F} = 7.6$ Hz, C4), 68.1 (C3).

^{19}F -NMR (376.6 Hz, $CDCl_3$), δ (ppm): -224.8 - -225.8 (m).

3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (80)

(α/β Bn₂Gal2,6F₂-OH)



Es wurden 671.1 mg (2.05 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**79**) in 50 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) gelöst und mit 1.24 g (3.48 mmol) Selectfluor[®] versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde zur Vervollständigung des Umsatzes eine halbe Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit 150 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 250 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 569.4 mg (76%, 1.56 mmol), blassgelbes Öl. Aus den Integralen des ^{19}F -Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:2$ bestimmt.

$R_f = 0.31$ (^cHex/EtOAc, 3:1)

$C_{20}H_{22}F_2O_4$ M = 364.38 g/mol [364.15]

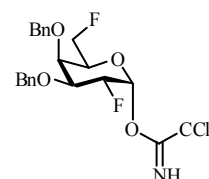
ESI-MS (positiv), m/z : 387.16 ($[M+Na]^+$, ber.: 387.14).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 387.1395 ($[M+Na]^+$, ber.: 387.1384).

9H -NMR: Aufgrund des Anomerengemisches war keine Zuordnung der Signale möglich.

^{19}F -NMR (376.6 Hz, $CDCl_3$), δ (ppm): **α -Anomer**: - 204.7 (dd, $J_{F_2,H_2} = 53.7$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 12.1$ Hz, 2-F), - 229.2-229.7 (m, 6-F), **β -Anomer**: - 206.8 (dd, $J_{F_2,H_2} = 50.1$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 10.3$ Hz, 2-F), - 229.2-229.7 (m, 6-F).

3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**81**) ($\alpha Bn_2Gal2,6F_2-TCI$)



Es wurden 926.1 mg (2.54 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- α/β -D-galactopyranose **80** in 60 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 0.51 mL (5.09 mmol) Trichloracetonitril und mit wenigen Tropfen DBU versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt, bevor die Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurden. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 782.1 mg (61%, 1.54 mmol), blassgelbes Öl

$R_f = 0.72$ (c Hex/EtOAc, 3:1)

$[\alpha]_D^{23} = +77.9$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$)

$C_{22}H_{22}Cl_3F_2NO_4$ $M = 508.77$ g/mol [507.06]

ESI-MS (positiv), m/z : 530.07 ($[M+Na]^+$, ber.: 530.05), 532.07 ($[M^*+Na]^+$, ber.: 532.05).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 530.0488 ($[M+Na]^+$, ber.: 530.0480), 532.0450 ($[M^*+Na]^+$, ber.: 532.0451).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 8.68 (s, 1 H, NH), 7.42-7.29 (m, 10 H, H_{Ar}), 6.59 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, 1-H), 5.18 (ddd, 1 H, $J_{H_2,F} = 49.2$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 9.9$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.7$ Hz, 2-H), 5.00 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.3$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.87 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.9$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.75 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.9$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.64 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.3$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.49 (ddd, 1 H, $J_{H_{6a},F} = 45.4$ Hz, $J_{H_{6a},H_{6b}} = 10.3$ Hz, $J_{H_{6a},H_5} = 6.4$ Hz, 6a-H), 4.38 (ddd, 1 H, $J_{H_{6b},F} = 46.0$ Hz, $J_{H_{6b},H_{6a}} = 8.4$ Hz, $J_{H_{6b},H_5} = 6.3$ Hz, 6b-H), 4.24-4.17 (m, 1 H, 3-H), 4.13 (dt, 1 H, $J_{H_5,H_{6a/b}} = 9.9$ Hz, $J_{H_5,H_4} = 2.9$ Hz, 5-H), 4.03 (pt, 1 H, $J_{H_4,H_5} = 3.5$ Hz, 4-H).

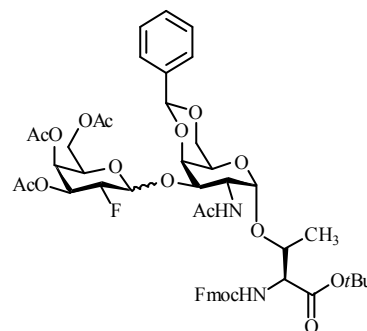
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 160.7 (TCl), 137.7, 137.6 (C_q (Bn)), 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.9 (C_{Ar} (Bn)), 93.8 (d, $J_{\text{C1,F2}} = 23.4$ Hz, C1), 91.0 (CCl_3), 88.3 (d, $J_{\text{C2,F2}} = 189.7$ Hz, C2), 81.1 (d, $J_{\text{C6,F6}} = 168.0$ Hz, C6), 75.9 (d, $J_{\text{C5,F6}} = 16.1$ Hz, C5), 75.0 (CH_2 (Bn)), 74.4 (dd, $J_{\text{C4,F2}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{C4,F6}} = 4.4$ Hz, C4), 73.2 (CH_2 (Bn)), 71.6 (d, $J_{\text{C3,F2}} = 24.8$ Hz, C4).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 MHz, CDCl_3), δ (ppm): - 208.9 (ddd, $J_{\text{F2,H2}} = 49.2$ Hz, $J_{\text{F2,H3}} = 9.7$ Hz, $J_{\text{F2,H1}} = 3.2$ Hz, 2-F), - 230.4 (dt, $J_{\text{F6,H6a/b}} = 46.5$ Hz, $J_{\text{F6,H5}} = 10.8$ Hz, 6-F).

5.4 Synthese der fluorierten Disaccharide aus Kap. 3.3

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**44**)^[285]

(Fmoc-Thr(α/β Ac₃Gal2F-(1→3)- α 4,6-BznGalNAc)-*Or*Bu)



Variante A:

Es wurden 1.05 g (0.87 mmol) Fmoc-Thr(α/β PMB₃Gal2F-(1→3)- α 4,6-BznGalNAc)-*Or*Bu **68** in 42 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Wasser (20:1) gelöst und mit 760.7 mg (3.35 mmol) DDQ versetzt. Die sich rot färbende Lösung wurde über Nacht bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit 100 mL Dichlormethan und 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Die organische Phase wurde dreimal mit je 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit jeweils 75 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung acetyliert. Dazu wurde das Rohprodukt in 12 mL einer 2:1-Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid gelöst und über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Eiswasser gegossen und fünfmal mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 70 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit jeweils 70 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 358.3 mg (42%, 0.37 mmol), farbloser amorpher Feststoff. Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:8$ bestimmt.

Variante B:

Eine Mischung aus 449.8 mg (0.99 mmol, 1.6 eq.) α Ac₃Gal2F-TCI **43**, 420.0 mg (0.61 mmol) Fmoc-Thr(α 4,6-Bzn-GalNAc)-*Or*Bu **13** und 615 mg frisch aktiviertes Molekularsieb (4Å) wurde 30 min unter Argonatmosphäre in 40 mL absol. Dichlormethan gerührt. Nach Kühlen auf -5 °C wurden 30 μ L (0.17 mmol) TMSOTf zugegeben und die Reaktionsmischung wurde

innerhalb von 18 h auf Raumtemp. erwärmt. Durch die Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat wurde die Lösung neutralisiert und anschließend durch *Hyflo* filtriert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 75 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat- und einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 466.5 g (78%, 0.48 mmol), farbloser amorpher Feststoff

Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von α:β = 2:1 bestimmt.

α-Anomer: $[\alpha]_D^{23} = +116.5$ (c = 0.99, CHCl₃), **β-Anomer:** $[\alpha]_D^{23} = +85.1$ (c = 1.01, CHCl₃), $R_f = 0.33$ (^cHex /EtOAc, 1:2), Analytische RP-HPLC: **α:** $R_t = 6.55$ min, **β:** $R_t = 5.80$ min (PerfectSil C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (75:25)→(85:15), 30 min, (100:0) nach 10 min)

C₅₀H₅₉FN₂O₁₇ (M = 979.01 g/mol) [978.38]

ESI-MS (positiv), m/z: 979.38 ([M+H]⁺, ber.: 979.39), 1001.35 ([M+Na]⁺, ber.: 1001.37), 1017.34 ([M+K]⁺, ber.: 1017.48).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1001.3723 ([M+Na]⁺, ber.: 1001.3695).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): **α-Anomer:** 7.77 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.54-7.50 (m, 2 H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.44-7.27 (m, 7 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar} (Bzn)), 6.59 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.8$ Hz, NH (Fmoc)), 5.98 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 10.0$ Hz, NH (GalNAc)), 5.59 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.52-5.48 (m, 1 H, 4'-H), 5.35-5.26 (m, 2 H, 1'-H {5.33}, 3'-H {5.29}), 4.94 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.5$ Hz, 1-H), 4.84-4.67 (m, 2 H, 2-H, 2'-H {4.74, ddd, $J_{H_2',F} = 32.7$ Hz, $J_{H_2',H_3'} = 10.3$ Hz, $J_{H_2',H_1'} = 3.5$ Hz}), 4.60-4.40 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc) {4.57, dd, $J_{CH_2,CH} = 10.8$ Hz, $J_{CH_2,CH_2} = 6.4$ Hz}), {4.44, dd, $J_{CH_2,CH} = 10.8$ Hz, $J_{CH_2,CH_2} = 6.4$ Hz}), 4.38-4.18 (m, 7 H, T^α {4.31}, T^β {4.27}, 4-H, 5'-H, 6a-H {4.28, d, $J_{H_{6a},H_5} = 12.1$ Hz}, 6'a-H {4.25}, CH (Fmoc) {4.22}), 4.09 (d, $J_{H_{6b},H_5} = 11.5$ Hz, 6b-H), 4.00-3.88 (m, 2 H, 3-H {3.97}, 6'b-H {3.93}), 3.74 (s, 1 H, 5-H), 2.18 (s, 3 H, CH₃ (Ac)), 2.02 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 2.01, 1.98 (2 x s, 6 H, 2 x CH₃ (Ac)), 1.43 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ). **β-Anomer:** 7.78 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.2$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.2$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.57-7.53 (m, 2 H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.46-7.31 (m, 7 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar} (Bzn)), 5.85 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.6$ Hz, NH (GalNAc)), 5.56 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.53 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, NH (Fmoc)), 5.41-5.38 (m,

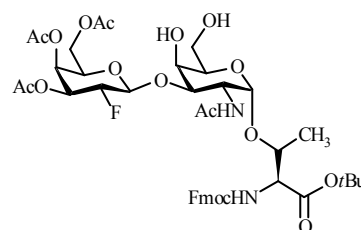
1 H, 4'-H), 5.11-5.03 (m, 1 H, 3'-H), 4.99 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.83-4.76 (m, 1 H, 2-H), 4.74-4.45 (m, 4 H, 1'-H {4.70}, 2'-H, CH₂ (Fmoc) {4.54}), 4.35-4.31 (m, 1 H, 4-H), 4.30-4.15 (m, 5 H, T^α {4.23}, T^β {4.22}, 6a-H {4.16}, 6'a-H {4.23}, CH (Fmoc) {4.28}), 4.12-4.02 (m, 2 H, 6b-H {4.10}, 6b'-H {4.05}), 3.94-3.88 (m, 1 H, 5-H), 3.87-3.78 (m, 1 H, 3-H), 3.70 (s, 1 H, 5'-H), 2.11 (s, 3 H, CH₃ (Ac)), 2.05, 2.04 (2 s, 6 H, 2 x CH₃ (Ac)), 1.97 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.1$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): **α-Anomer**: 172.8, 170.0, 170.0, 169.7, 169.5 (5 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.3 (C_q (Bzn)), 128.7, 128.2, 126.3 (C_{Ar} (Bzn)), 127.8, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.0, 126.9 (C2-, C7-Fmoc), 126.0 (C_{Ar} (Bzn)), 124.8, 124.8 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.7 (CH (Bzn)), 100.5 (C1), 92.6 (d, $J_{C1',F} = 21.2$ Hz, C1'), 84.7 (d, $J_{C2',F} = 193.4$ Hz, C2'), 83.0 (C_q (*t*Bu)), 76.6 (T^β), 71.5 (C3), 71.3 (C4), 69.2 (C6), 68.5 (d, $J_{C3',F} = 19.1$ Hz, C3'), 68.2 (d, $J_{C4',F} = 7.3$ Hz, C4'), 66.5 (CH₂ (Fmoc)), 66.0 (C5'), 63.2 (C5), 61.6 (C6'), 59.2 (T^α), 47.3 (CH (Fmoc)), 47.1 (C2), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.0 (CH₃ (NHAc)), 20.6, 20.6, 20.5 (3 x CH₃ (Ac)), 19.4 (T^γ). **β-Anomer**: 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0 (5 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.5 (C_q (Bzn)), 129.0, 128.2 (C_{Ar} (Bzn)), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C_{Ar} (Bzn)), 126.4 (C2-, C7-Fmoc), 126.1 (C_{Ar} (Bzn)), 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.9 (d, $J_{C1',F} = 21.2$ Hz, C1'), 101.0 (CH (Bzn)), 100.8 (C1), 87.4 (d, $J_{C2',F} = 186.9$ Hz, C2'), 83.2 (C_q (*t*Bu)), 78.3 (C3), 77.2 (T^β), 75.8 (C4), 71.0 (d, $J_{C3',F} = 19.1$ Hz, C3'), 70.5 (C5), 69.1 (C6), 67.3 (d, $J_{C4',F} = 8.8$ Hz, C4'), 66.8 (CH₂ (Fmoc)), 63.6 (C5'), 61.0 (C6'), 59.1 (T^α), 47.8 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.2 (CH₃ (NHAc)), 20.7, 20.6, 20.6 (3 x CH₃ (Ac)), 19.4 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 MHz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer**: - 208.9 (dd, $J_{F2,H2} = 48.9$ Hz, $J_{F2,H3} = 7.5$ Hz), **β-Anomer**: - 206.3 (dd, $J_{F2,H2} = 50.8$ Hz, $J_{F2,H3} = 11.3$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (49)**

(Fmoc-Thr(β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)-GalNAc)-OtBu)



Variante A:

In 20 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol

(4:1) wurden 201.5 mg (0.21 mmol) Fmoc-Thr(α / β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu **44** gelöst und mit 250 mg aktiviertem Natriumhydrogensulfat-Kieselgel-Katalysator^[96] versetzt. Die Suspension wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt, bevor mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und das Kieselgel abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde anschließend dreimal mit je 50 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL ges. Natriumchlorid-lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 141.2 mg (77%, 0.16 mmol), farbloser amorpher Feststoff, der noch geringe Anteile an α -Produkt enthielt

Variante B:

Es wurden 251.0 mg (0.26 mmol) Fmoc-Thr(α / β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu **44** in 20 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst, mit wenig Iod versetzt und im Wasserbad bei 60 °C 6 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung mit 100 mL Essigsäureethylester verdünnt und dreimal mit je 50 mL ges. Natriumsulfit-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 67.0 mg (29%, 0.08 mmol), farbloser amorpher Feststoff, der noch geringe Mengen an α -Produkt enthält.

α -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = + 88.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), **β -Anomer:** $[\alpha]_D^{23} = + 105.6$ ($c = 1.01$, CHCl₃), **α :** $R_f = 0.23$, **β :** $R_f = 0.12$ (^cHex/EtOAc, 1:6), Analytische RP-HPLC: **α :** $R_t = 9.96$ min, **β :** $R_t = 9.12$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH:H₂O (50:50) \rightarrow (100:0) in 45 min).

C₄₃H₅₅FN₂O₁₇ (M = 890.90 g/mol) [890.35]

ESI-MS (positiv), m/z : 913.33 ($[M+Na]^+$, ber.: 913.34), 1803.65 ($[2M+Na]^+$, ber.: 1803.69).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 913.3391 ($[M+Na]^+$, ber.: 913.3382), 929.3199 ($[M+K]^+$, ber.: 929.3122).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): **α -Anomer**: 7.75 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.58 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2 H, $J_{H_3,H_2/H_4} = J_{H_6,H_5/H_7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33–7.27 (m, 2 H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.31 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 6.14 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.8$ Hz, NH (GalNAc)), 5.47 (s, 1 H, 4'-H), 5.31 (d, 1 H, $J_{H_1',H_2'} = 3.2$ Hz, 1'-H), 5.27 (dd, 1 H, $J_{H_3',H_2'} = 10.6$ Hz, $J_{H_3',H_4'} = 3.1$ Hz, 3'-H), 4.86 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.6$ Hz, 1-H), 4.77 (ddd, 1 H, $J_{H_2',F} = 49.6$ Hz, $J_{H_2',H_3'} = 10.0$ Hz, $J_{H_2',H_1'} = 3.5$ Hz, 2'-H), 4.66 (dd, 1 H, $J_{H_2,H_3} = 10.3$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.3$ Hz, 2-H), 4.54 (dd, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 10.8$ Hz, $J_{CH_2,CH} = 6.7$ Hz, (CH_2) (Fmoc)), 4.44 (dd, 1 H, $J_{CH_2,CH} = 10.8$ Hz, $J_{CH_2,CH_2} = 6.5$ Hz, (CH_2) (Fmoc)), 4.33–4.24 (m, 2 H, 5'-H {4.28}, T^α {4.27}), 4.24–4.08 (m, 4 H, T^β {4.22}, CH (Fmoc) {4.20}, 5-H {4.16}, 6a/b'-H {4.15}), 4.02–3.77 (m, 5 H, 6a/b'-H {3.95}, 3-H {3.89}, 6a/b-H {3.90, 3.82}, 4-H {3.84}), 3.30 (bs, 1 H, OH), 2.88 (bs, 1 H, OH), 2.16 (s, 3 H, CH_3 (Ac)), 2.01 (s, 6 H, 2 x CH_3 (Ac)), 1.98 (s, 3 H, CH_3 (AcNH)), 1.43 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

β -Anomer: 7.75 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.58 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2 H, $J_{H_3,H_2/H_4} = J_{H_6,H_5/H_7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33–7.27 (m, 2 H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.95 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.8$ Hz, NH (GalNAc)), 5.52 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.3$ Hz, NH (Fmoc)), 5.39–5.36 (m, 1 H, 4'-H), 5.11–5.03 (m, 1 H, 3'-H), 4.89 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.66–4.57 (m, 2 H, 1-H, 2-H), 4.66–4.45 (m, 3 H, 2'-H, CH_2 (Fmoc)), 4.28–4.09 (m, 6 H, T^α {4.24}, T^β {4.16}, CH (Fmoc) {4.25}, 4-H {4.15}, 6a/b-H {4.12}, 6a/b'-H {4.04}), 3.94–3.85 (m, 3 H, 6'a/b-H {3.91}, 6'a/b-H {3.81}, 5'-H), 3.72 (dd, 1 H, $J_{H_3,H_4} = 2.84$ Hz, $J_{H_3,H_2} = 10.8$ Hz, 3-H), 2.91 (bs, 1 H, OH), 2.71 (bs, 1 H, OH), 2.13 (s, 3 H, CH_3 (Ac)), 2.04 (s, 6 H, 2 x CH_3 (Ac)), 1.98 (s, 3 H, CH_3 (AcNH)), 1.45 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, DEPT, HMQC), δ (ppm): **α -Anomer**: 172.0, 170.1, 170.1, 169.9, 169.8 (5 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 156.7 (C=O (Urethan)), 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.0, 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 124.9, 124.8 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 100.1 (C1), 92.5 (d, $J_{C_1',F} = 20.8$ Hz, C1'), 85.0 (d, $J_{C_2',F} = 190.8$ Hz, C2'), 82.9 (C_q (*t*Bu)), 76.7 (T^β), 74.3 (C3), 70.2 (C4), 68.2 (d, $J_{C_3',F} = 11.8$ Hz, C3'), 68.1 (d, $J_{C_4',F} = 7.2$ Hz, C4'), 66.6 (CH_2

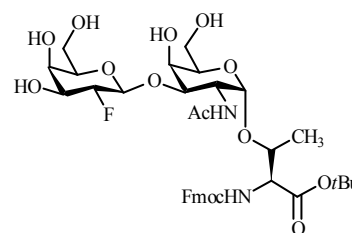
(Fmoc)), 66.4 (C5'), 66.2 (C5), 62.4 (C6), 61.6 (C6'), 59.1 (T^α), 47.2 (CH (Fmoc)), 46.6 (C5), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 22.9 (CH₃ (NHAc)), 20.6, 20.5, 20.5 (3 x CH₃ (Ac)), 19.0 (T^γ).

β-Anomer: 170.4, 170.0, 170.0, 169.8 (4 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.0 (d, $J_{C1',F} = 23.2$ Hz, C1'), 100.2 (C1), 87.4 (d, $J_{C2',F} = 186.6$ Hz, C2'), 83.2 (C_q (*t*Bu)), 80.8 (C3), 77.2 (T^β), 70.8 (d, $J_{C3',F} = 18.1$ Hz, C3'), 70.8 (C5), 69.8 (C5'), 67.4 (d, $J_{C4',F} = 8.8$ Hz, C4'), 66.6 (CH₂ (Fmoc)), 62.6 (C6'), 61.2 (C6), 59.0 (T^α), 47.3 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 23.1 (CH₃ (NHAc)), 20.5, 20.5 (3 x CH₃ (Ac)), 18.7 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer:** - 207.7 (dd, $J_{F2,H2} = 48.9$ Hz, $J_{F2,H3} = 7.5$ Hz), **β-Anomer:** - 206.3 (dd, $J_{F2,H2} = 49.9$ Hz, $J_{F2,H3} = 9.6$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (52)**

(Fmoc-Thr(βGal2F-(1→3)-αGalNAc)-OtBu)



Es wurden 358.3 mg (0.37 mmol) eines Anomerengemisches von Fmoc-Thr(α/βAc₃Gal2F-(1→3)α4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu **44** in 50 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol

(4:1) gelöst und mit 375 mg aktiviertem Natriumhydrogensulfat-Kieselgel-Katalysator^[96] versetzt. Die Suspension wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt, bevor mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert wurde und das Kieselgel abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde anschließend dreimal mit je 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung in 40 mL Methanol aufgenommen und mit einer frisch hergestellten methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Lösung wurde mit Amberlyst IR 120 (H⁺) neutralisiert bevor die Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurden. Zur erneuten Einführung der *N*-terminalen Schutzgruppe wurde der Rückstand zweimal mit jeweils 30 mL Toluol kdestilliert und in 50 mL absol. Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 178.0 mg (0.53 mmol) FmocOSu wurde mit DIPEA ein pH-Wert von 9.5 eingestellt und

die Reaktionsmischung wurde 3 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde mit saurem Ionentauscher Amberlyst IR 120 (H^+) neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde durch semipräparative RP-HPLC gereinigt ($R_t = 20.76$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (25:75)→(100:0) in 40 min).

Ausbeute: 146.1 mg (52%, 0.19 mmol, bezogen auf das β -Anomer), farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = +45.4 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$R_f = 0.76$ (CH₂Cl₂/MeOH, 2:1), Analytische RP-HPLC: $R_t = 11.60$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA MeCN/H₂O + 0.1% TFA (25:75)→(100:0) in 40 min)

C₃₇H₄₉FN₂O₁₄ (M = 764.79 g/mol) [764.32]

ESI-MS (positiv), m/z : 765.33 ([M+H]⁺, 765.32), 787.32 ([M+Na]⁺, 787.31), 803.30 ([M+K]⁺, 803.42), 1551.64 ([2M+Na]⁺, 1551.62), 1567.63 ([2M+K]⁺, 1567.73).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 787.3080 ([M+Na]⁺, 787.3066).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, COSY), δ (ppm): 7.91 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.7$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.74 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.55 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 10.0$ Hz, NH (Fmoc)), 7.43 (d, 2 H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.6$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc, NH (GalNAc)), 7.32 (d, 2 H, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 7.6$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 4.59 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, 1-H), 4.55 (d, $J_{H1',H2'} = 3.6$ Hz, 1'-H), 4.52-4.38 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.32 (t, 1 H, $J_{CH,CH2} = 5.4$ Hz, CH (Fmoc)), 4.30-4.19 (m, 2 H, 2-H {4.26}, T ^{β} {4.20}), 4.22-4.09 (m, 1 H, 2'-H), 4.09 (dd, 1 H, $J_{T\alpha,NH} = 10.0$ Hz, $J_{T\alpha,T\beta} = 1.5$ Hz, T ^{α}), 3.94 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.3$ Hz, 4-H), 3.70 (t, 1 H, $J_{H4',H3'} = J_{H4',H5'} = 3.0$ Hz, 4'-H), 3.66 (t, 1 H, $J_{H5',H6a'} = J_{H5',H6b'} = 6.1$ Hz, 5'-H), 3.60 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 11.0$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.8$ Hz, 3-H), 3.57-3.45 (m, 5 H, 6a/b-H {3.52}, 3'-H {3.51}, 6'a/b-H {3.48}), 3.42 (t, 1 H, $J_{H5,H6} = 6.2$ Hz, 5-H), 1.78 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.35 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.14 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

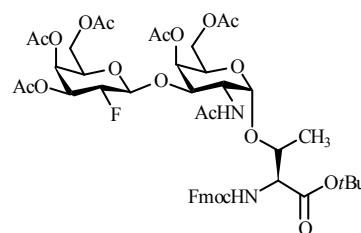
¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO, DEPT, HMQC), δ (ppm): 169.9, 169.7 (2 x C=O (NHAc, Ester), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 140.8, 140.8 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1, 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.3, 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 102.2 (d, $J_{C1',F} = 23.2$ Hz, C1'), 99.5 (C1), 91.7 (d, $J_{C2',F} = 181.0$ Hz, C2'), 81.3 (C_q (tBu)), 77.3 (C3), 75.3 (C5), 74.1 (T ^{β}), 71.5 (d, $J_{C3',F} = 16.4$ Hz, C3'), 68.7 (d, $J_{C4',F} = 9.0$ Hz, C4'), 67.8 (C4), 65.6 (CH₂ (Fmoc)), 60.8 (C6'), 60.2

(C6), 59.4 (T^α), 47.2 (C2), 46.8 (CH (Fmoc)), 27.6 (CH₃ (*t*Bu)), 22.8 (CH₃ (NHAc)), 19.1 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, DMSO): - 205.2 (dd, $J_{F_2,H_2} = 52.6$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 14.5$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (50)**

(Fmoc-Thr(βAc₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-*Ot*Bu)**



Variante A:

Es wurden 170.0 mg (0.19 mmol) Fmoc-Thr(βAc₃Gal2F-(1→3)-αGalNAc)-*O**t*Bu **49** in 4.5 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (2:1) gelöst und 12 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Eiswasser gegossen und die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (Hex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 166.5 mg (89%, 0.17 mmol), farbloser amorpher Feststoff

Variante B:

Es wurden 127.0 mg (0.11 mmol) des Fmoc-Thr(βBn₃Gal2F-(1→3)-α4,6-BznGalNAc)-*O**t*Bu **56** in 25 mL Methanol, 5 mL Essigsäure und 0.3 mL Wasser gelöst und durch Anlegen von Vakuum und Spülen mit Argon entgast. Anschließend wurde eine Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (w=10%) zugegeben und erneut entgast. Die Argonatmosphäre wurde mehrfach gegen Wasserstoff ausgetauscht, bevor das Reaktionsgemisch 2 d bei Raumtemp. unter Wasserstoffatmosphäre gerührt wurde. Anschließend wurde die Suspension durch *Hyflo* filtriert, der Rückstand wurde mehrfach mit Methanol (insgesamt 500 mL) gewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde dreimal mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert und in 30 mL absol. Dichlormethan unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde mit 41.9 mg (0.12 mmol) Fmoc-OSu versetzt und mit DIPEA auf einen pH Wert von 9.5-10 gebracht. Es wurde 12 h bei Raumtemp. gerührt, bevor mit saurem Ionentauscher (Amberlyst IR120) neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak.

abdestilliert wurde. Der Rückstand wurde dreimal mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert und anschließend in 6 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (2:1) gelöst. Nach 18 h Rühren bei Raumtemp. wurde die Lösung auf 100 mL Eiswasser gegossen und viermal mit je 75 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit jeweils 75 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat- und zweimal mit jeweils 75 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 88.0 mg (80%, 0.09 mmol), farbloser amorpher Feststoff

Variante C:

Es wurden 239.6 mg (0.28 mmol) Fmoc-Thr(βGal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-OtBu **72** in 6 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (2:1) gelöst und 2 d bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 200 mL Eiswasser gegossen und dreimal mit jeweils 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit jeweils 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat- und zweimal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde mittels Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 215.9 mg (78%, 0.22 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +55.7$ (c = 1.00, CHCl₃)

$R_f = 0.52$ (^cHex/EtOAc, 1:4), Analytische RP-HPLC: $R_t = 14.60$ min (PerfectSil C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O (50:50)→(90:10), 30 min, (100:0) nach 10 min).

C₄₇H₅₉FN₂O₁₉ (M = 974.97 g/mol) [974.37]

ESI-MS (positiv), m/z: 997.34 ([M+Na]⁺, ber.: 997.36), 1971.76 ([2M+Na]⁺, ber.: 1971.73).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 997.3610 ([M+Na]⁺, ber.: 997.3594).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.2$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41 (t, 2 H, $J_{H_3,H_2/H_4} = J_{H_6,H_5/H_7} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2 H, $J_{H_2,H_1/H_3} = J_{H_7,H_6/H_8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.93 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.8$ Hz, NH (GalNAc)), 5.52 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, NH (Fmoc)), 5.43 (d, 1 H, $J_{H_4,H_3} = 2.0$ Hz, 4-H), 5.36-5.32 (m, 1 H, 4'-H), 5.10-5.00 (m, 1 H, 3'-H), 4.87 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.5$ Hz, 1-H), 4.65 (dt, 1 H, $J_{H_2,H_1} = 3.6$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.6$ Hz, 2-H), 4.60-4.37 (m, 4 H, 1'-H {4.57}, 2'-H, CH₂ (Fmoc) {4.52}), 4.29-4.08 (m, 6 H, T^α

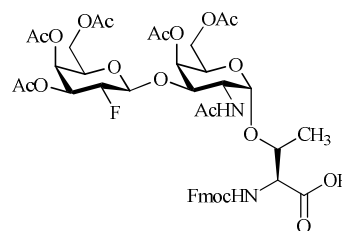
{4.23}, T^β {4.16}, 6a-H {4.11}, 5'-H {4.13}, 6'a-H {4.21}, CH (Fmoc) {4.22}, 4.03-3.84 (m, 3 H, 5-H, 6b-H, 6'b-H), 4.03-3.4 (m, 3 H, 3-H), 3.79 (dd, 1 H, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, $J_{H3,H2} = 11.0$ Hz, 3-H), 2.12, 2.10, 2.03 (3 x s, 15 H, 5 x CH₃ (Ac)), 1.97 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.44 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.1$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.5, 170.4, 170.0, 170.0, 170.0, 169.9 (6 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8, 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 101.9 (d, $J_{C1',F} = 23.5$ Hz, C1'), 100.3 (C1), 87.8 (d, $J_{C2',F} = 186.2$ Hz, C2'), 83.2 (C_q (*t*Bu)), 77.5 (C3), 77.2 (T^β), 70.8 (d, $J_{C3',F} = 19.1$ Hz, C3'), 70.5 (C5), 69.0 (C4), 68.1 (C5'), 67.2 (d, $J_{C4',F} = 8.0$ Hz, C4'), 66.8 (CH₂ (Fmoc)), 63.2 (C6'), 60.8 (C6), 59.0 (T^α), 48.0 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 23.0 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.5 (5 x CH₃ (Ac)), 18.5 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -206.9 (dd, $J_{F2,H2} = 52.7$ Hz, $J_{F2,H3} = 11.3$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin (**51**)**

(Fmoc-Thr(βAc₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-OH)



Es wurden 194.6 mg (0.20 mmol) Disaccharid **50** in 20 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 0.4 mL (3.66 mmol) Anisol und 4.0 mL (22.85 mmol) TFA versetzt. Die Lösung wurde 4 h bei Raumtemp. gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert wurde. Der Rückstand wurde dreimal mit jeweils 20 mL Toluol kdestilliert und anschließend flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH, 5:0.3:<0.01) gereinigt.

Ausbeute: 162.8 mg (89%, 0.18 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = +120.4 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

R_f = 0.77 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH, 5:0.3 mit 3 Tropfen), Analytische RP-HPLC: R_t = 10.91 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (50:50)→(90:10), 30 min, (100:0) nach 10 min)

C₄₃H₅₁FN₂O₁₉ (M = 918.86 g/mol) [918.31]

ESI-MS (positiv), m/z : 919.38 ($[M+H]^+$, ber.: 919.31), 941.32 ($[M+Na]^+$, ber.: 941.30).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 957.2675 ($[M+K]^+$, ber.: 957.2707).

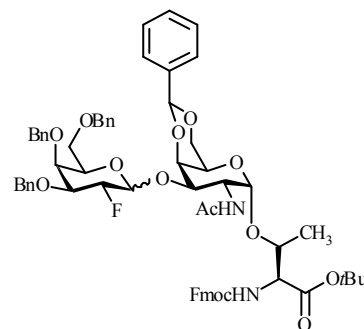
1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 12.97 (bs, 1 H, OH), 7.91 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.74 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.47 (d, 2 H, $J_{NH,H2} = J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, NH (Fmoc), NH (GalNAc)), 7.43 (t, 2 H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.5$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33 (t, 2 H, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 6.8$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.35 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 3.1$ Hz, 4-H), 5.25 (s, 1 H, 4'-H), 5.21-5.18 (m, 1 H, 3'-H), 4.87 (dd, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.6$ Hz, $J_{H1',F} = 3.6$ Hz, 1'-H), 4.72 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, 1-H), 4.58-4.39 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.37-4.07 (m, 7 H, 2'-H {4.34, 4.21}, CH (Fmoc) {4.31}, T ^{β} {4.25}, 2-H {4.20}, 5-H {4.18}, 5'-H {4.14}, T ^{α} {4.12}, 6'a-H {4.11}), 4.01 (dd, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.3$ Hz, $J_{CH_2,CH_2} = 6.2$ Hz, 6a-H), 3.96-3.79 (m, 3 H, 3-H {3.92}, 6b-H {3.88}, 6'b-H {3.83}), 2.10, 2.06, 2.00, 1.99, 1.98 (5 x s, 15 H, 5 x CH₃ (Ac)), 1.80 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.12 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 171.7, 170.1, 170.0, 169.9, 169.8, 169.6, 169.2 (7 x C=O (NHAc, Ac, Carboxyl)), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 140.9, 140.8 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.3, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 100.3 (d, $J_{C1',F} = 22.8$ Hz, C1'), 99.2 (C1), 88.1 (d, $J_{C2',F} = 185.2$ Hz, C2'), 75.4 (C3), 75.1 (T ^{β}), 70.6 (d, $J_{C3',F} = 18.5$ Hz, C3'), 69.6 (C5), 69.6 (C5'), 69.4 (C4), 67.6 (d, $J_{C4',F} = 8.4$ Hz, C4'), 65.4 (CH₂ (Fmoc)), 63.2 (C6'), 60.7 (C6), 58.5 (T ^{α}), 47.5 (C2), 46.9 (CH (Fmoc)), 22.7 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.5, 20.5, 20.4, 20.3 (5 x CH₃ (Ac)), 19.4 (T ^{γ}).

^{19}F -NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -206.7 (d, $J_{F2,H2} = 49.4$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (56)**

(Fmoc-Thr(α/β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-BznGalNAc)-OtBu)



Es wurden 1.02 g (1.46 mmol) T_N-Akzeptor **13** und 1.41 g (2.36 mmol, 1.6 eq.) α Bn₃Gal2F-TCI **55** in 80 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 1.34 g frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei Raumtemp. gerührt, bevor auf -5 °C gekühlt wurde. Anschließend wurden 50 μ L (0.28 mmol) TMSOTf zugegeben und die Mischung wurde 18 h unter Erwärmen auf Raumtemp. gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und die organische Phase wurde dreimal mit je 70 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 60 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt. Ausbeute: 1.51 g (92%, 1.35 mmol), farbloser amorpher Feststoff. Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:9$ bestimmt.

β -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = +62.8$ (c = 1.00, CHCl₃)

R_f = 0.71 (^cHex/EtOAc, 1:1), Analytische RP-HPLC: α : R_t = 19.57 min, β : R_t = 16.64 min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O (50:50) \rightarrow (90:10), 30 min, (100:0) nach 10 min)

C₆₅H₇₁FN₂O₁₄ (M = 1123.26 g/mol) [1122.49]

ESI-MS (positiv), m/z: 1145.48 ([M+Na]⁺, ber.: 1145.48).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1147.4796 ([M+Na]⁺, ber.: 1145.4787).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): **α -Anomer:** 7.78 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.60-7.55 (m, 2 H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.41 (t, 2 H, $J_{H_2,H_1/H_3} = J_{H_7,H_6/H_8} = 7.3$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.13 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.6$ Hz, NH (GalNAc)), 5.64 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.5$ Hz, NH (Fmoc)), 5.61 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.19 (d, 1 H, $J_{H_1',H_2'} = 3.4$ Hz, 1'-H), 4.99 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.5$ Hz, 1-H), 4.97 (ddd, 1 H, $J_{H_2',F} = 50.7$ Hz, $J_{H_2',H_3'} = 9.8$ Hz, $J_{H_2',H_1'} = 3.6$ Hz 2'-H), 4.91 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.5$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.80 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.7$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.77-4.68

(m, 1 H, 2-H), 4.64 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.7$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.57 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.1$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.53 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.5$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.43 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.4$ Hz, CH₂ (Fmoc)), 4.38 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.1$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.34-4.20 (m, 5 H, 3'-H {4.30}, 4-H {4.30}, 6'a-H {4.27}, T^α {4.24}, CH (Fmoc) {4.21}), 4.14-4.05 (m, 4 H, 6'b-H {4.10}, T^β {4.09}, 5-H {4.08}), 3.92 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 3.0$ Hz, 3-H), 3.88 (s, 1 H, 4'-H), 3.71 (s, 1 H, 5'-H), 3.52 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_{6a},\text{H}_{6b}} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H}_{6a},\text{H}_5} = 7.0$ Hz, 6a-H), 3.35 (dd, 1 H, $J_{\text{H}_{6b},\text{H}_{6a}} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H}_{6b},\text{H}_5} = 5.21$ Hz, 6b-H), 1.99 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.47 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{\text{T}_\gamma,\text{T}_\beta} = 6.4$ Hz, T^γ). **β-Anomer**: 7.81-7.75 (m, 2 H, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.65 (d, 2 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.55 (d, 2 H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 7.3$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.44-7.22 (m, 22 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.75 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.0$ Hz, NH (GalNAc)), 5.57 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{T}_\alpha} = 10.9$ Hz, NH (Fmoc)), 5.51 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.03 (d, 1 H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.92 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.89-4.70 (m, 3 H, 2'-H {4.89, 4.82}, CH₂ (Bn), 2-H {4.75}), 4.67 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 12.1$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.61-4.55 (m, 2 H, CH₂ (Bn) {4.58, d, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.6$ Hz}, 1'-H {4.58}), 4.54-4.45 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.44-4.40 (m, 2 H, CH₂ (Bn)), 4.37-4.14 (m, 4 H, 4-H {4.34}, T^α {4.23}, T^β {4.22}, 6'a-H {4.18, d, $J_{\text{H}_{6'a},\text{H}_{6'b}} = 12.4$ Hz}), 3.98-3.84 (m, 3 H, 4'-H {3.89}, 3-H {3.88}, 6'b-H {3.94, d, $J_{\text{H}_{6'b},\text{H}_{6'a}} = 12.1$ Hz}), 3.65-3.50 (m, 5 H, 5'-H {3.63}, 6a/b-H {3.62, 3.55}, 5-H {3.61}, 3'-H {3.58}), 2.00 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{\text{T}_\gamma,\text{T}_\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): **α-Anomer**: 170.2, 170.0 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.4, 138.2, 137.7, 137.3 (C_q (Bzn, Bn)), 128.7, 128.4, 128.4, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0 (C_{Ar}), 127.8, 127.7 (C2-, C7-Fmoc), 127.6, 127.5, 127.1 (C_{Ar}), 126.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.7 (CH (Bzn)), 100.3 (C1), 96.6 (d, $J_{\text{C}_1',\text{F}} = 22.6$ Hz, C1'), 88.9 (d, $J_{\text{C}_2',\text{F}} = 188.0$ Hz, C2'), 83.0 (C_q (*t*Bu)), 77.2 (T^β), 75.9 (d, $J_{\text{C}_4',\text{F}} = 8.0$ Hz, C4'), 75.2 (C3), 74.9, 73.6, 73.5 (CH₂ (Bn)), 73.4 (d, $J_{\text{C}_3',\text{F}} = 20.3$ Hz, C3'), 73.3 (C4), 70.5 (C5), 69.2 (C6, C6'), 67.1 (CH₂ (Fmoc)), 63.6 (C5'), 59.0 (T^α), 47.7 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 19.1 (T^γ).

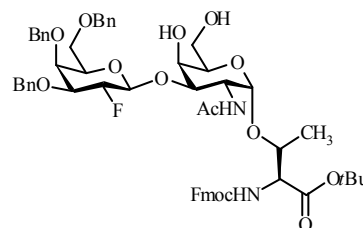
β-Anomer: 170.3, 169.9 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.2, 137.9, 137.7, 137.6 (C_q (Bzn, Bn)), 128.7, 128.4, 128.4, 128.2, 128.0, 127.7, 127.7 (C_{Ar}), 127.6, 127.5 (C2-, C7-Fmoc), 127.2, 127.0 (C_{Ar}), 126.4 (C3-, C6-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc),

102.8 (d, $J_{C1',F} = 23.3$ Hz, C1'), 100.7 (CH (Bzn)), 100.6 (C1), 91.2 (d, $J_{C2',F} = 183.4$ Hz, C2'), 83.0 (C_q (*t*Bu)), 80.1 (d, $J_{C3',F} = 15.8$ Hz, C3'), 76.6 (C3), 76.4 (T^β), 75.8 (C4), 74.6 (CH₂ (Bn)), 74.1 (d, $J_{C4',F} = 8.8$ Hz, C4'), 73.7 (C5), 73.5, 72.6 (CH₂ (Bn)), 69.0 (C6'), 68.7 (C6), 67.0 (CH₂ (Fmoc)), 63.7 (C5'), 59.2 (T^α), 48.0 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 19.1 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer**: - 207.7 (ddd, $J_{F2,H2} = 50.7$ Hz, $J_{F2,H3} = 9.6$ Hz, $J_{F2,H1} = 3.8$ Hz), **β-Anomer**: - 204.4 (dd, $J_{F2,H2} = 51.6$ Hz, $J_{F2,H3} = 12.2$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (61)**

(Fmoc-Thr(βBn₃Gal2F-(1→3)-αGalNAc)-OtBu)



Es wurden 991.0 mg (0.88 mmol) Fmoc-Thr(α/βBn₃Gal2F-(1→3)-α4,6-BznGalNAc)-OtBu **56** in 50 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (4:1) gelöst und mit 760 mg aktiviertem Natriumhydrogensulfat-Kieselgel-Katalysator^[96] versetzt. Die Suspension wurde 4 d bei Raumtemp. gerührt, bevor mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und anschließend das Kieselgel abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde zweimal mit je 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat- und einmal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 775.0 mg (85%, 0.75 mmol), farbloser amorpher Feststoff, der noch geringe Anteile an α-Produkt enthielt (α: R_f = 0.58 (°Hex/EtOAc, 1:10)).

$[\alpha]_D^{23} = + 33.4$ (c = 1.00, CHCl₃)

R_f = 0.43 (°Hex/EtOAc, 1:10), Analytische RP-HPLC: R_t = 13.25 min (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeOH/H₂O (80:20)→(100:0) in 30 min).

C₅₈H₆₇FN₂O₁₄ (M = 1035.16 g/mol) [1034.46]

ESI-MS (positiv), m/z: 1035.49 ([M+H]⁺, ber.: 1035.49), 1057.47 ([M+Na]⁺, ber.: 1057.45), 2091.90 ([2M+Na]⁺, ber.: 2091.91).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1057.4476 [M+Na]⁺, ber.: 1057.4474).

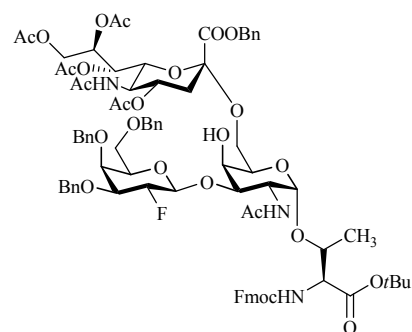
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 6.7$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2 H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.3$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.37–7.23 (m, 17 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.77 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.5$ Hz, NH (GalNAc)), 5.46 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, NH (Fmoc)), 4.90 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.2$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.90 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 4.0$ Hz, 1-H), 4.82–4.69 (m, 1 H, 2'-H), 4.77 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.2$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.67 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.64–4.57 (m, 1 H, 2-H), 4.55 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.4$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.52–4.45 (m, 3 H, 1'-H {4.51}, CH₂ (Fmoc)), 4.41 (s, 2 H, CH₂ (Bn)), 4.27 (t, 1 H, $J_{CH,CH_2} = 6.7$ Hz, CH (Fmoc)), 4.24–4.13 (m, 3 H, T^α {4.23}, T^β {4.18}, 4-H {4.15}), 3.92–3.85 (m, 2 H, 6a-H {3.90}, 4'-H {3.87}), 3.84–3.79 (m, 1 H, 5-H), 3.76–3.65 (m, 2 H, 6b-H {3.72}, 3-H {3.68}), 3.61–3.52 (m, 3 H, 5'-H {3.59}, 3'-H {3.58}, 6'a-H {3.56}), 3.51–3.44 (m, 1 H, 6'b-H {3.49}), 2.01 (s, 3 H, CH₃ (Ac)), 1.45 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.4, 170.1 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 137.8, 137.6 (C_q (Bn)), 128.5, 128.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.8, 127.6, 127.1 (C_{Ar} (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.5 (d, $J_{C_1',F} = 22.6$ Hz, C1'), 100.3 (C1), 91.4 (d, $J_{C_2',F} = 184.7$ Hz, C2'), 83.1 (C_q (tBu)), 80.0 (C5'), 79.8 (C3), 76.6 (T^β), 74.8 (CH₂ (Bn)), 74.0 (d, $J_{C_4',F} = 9.5$ Hz, C4'), 74.0 (d, $J_{C_3',F} = 14.4$ Hz, C3'), 73.6 (CH₂ (Bn)), 72.7 (CH₂ (Bn)), 69.7 (C5), 69.6 (C4), 68.8 (C6'), 67.0 (CH₂ (Fmoc)), 63.1 (C6), 59.0 (T^α), 47.5 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (tBu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 18.9 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -205.1 (dd, $J_{F_2,H_2} = 51.6$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 12.2$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (73)**
(Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)-[α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2,6)]- α GalNAc)-*O*tBu)

Es wurden 303.5 mg (0.29 mmol) Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-*O*tBu **61** und 678.0 mg Sialinsäurexanthogenat **22** (1.01 mmol, 3.4 eq.) in 18 mL einer Mischung aus absol. Nitromethan und Dichlormethan (2:1) gelöst und mit 1.1 g frisch aktiviertem Molekularsieb 3 Å versetzt. Nach einer halben Stunde Rühren bei Raumtemp.



wurde die Suspension auf -65 °C gekühlt und mit 370.0 mg (1.44 mmol) Silbertriflat versetzt. Anschließend wurden 0.90 mL (1.44 mmol) einer 1.6 M Methylsulfonylbromid-Lösung,⁸ welche vorher auf 0 °C gekühlt wurde, innerhalb von 15 min zugetropft. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer RP-HPLC, da die Edukte und das Produkt einen nahezu identischen R_f -Wert besitzen. Nach 3.5 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.80 mL DIPEA bei -65 °C abgebrochen und die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemp. erwärmt, mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und durch Hyflo filtriert. Das Filtrat wurde i. Vak. eingengt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (^cHex/EtOAc, 1:6 \rightarrow EtOAc). Zur vollständigen Charakterisierung wurde das Rohprodukt mittels semi-präparativer RP-HPLC gereinigt (R_t = 43.08 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O (25:75) \rightarrow (100:0) nach 40 min)).

Ausbeute: 16.1 mg (3%, 0.01 mmol), farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.43 (EtOAc), Analytische RP-HPLC: R_t = 36.72 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O (25:75) \rightarrow (100:0) in 40 min).

C₈₄H₉₈FN₃O₂₆ M = 1584.68 g/mol [1583.64]

$[\alpha]_D^{23}$ = +19.2 (c = 1.00, CHCl₃)

ESI-MS (positiv), m/z : 1584.77 ([M+H]⁺, ber.: 1584.65), 1629.76 ([M+Na]⁺, ber.: 1629.62).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1606.6321 ([M+Na]⁺, ber.: 1606.6321).

⁸ Herstellung siehe Seite 135.

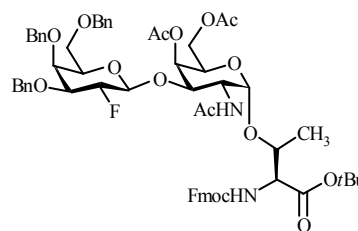
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.2$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.3$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.37–7.19 (m, 22 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.77 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.8$ Hz, NH (GalNAc)), 5.44 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, NH (Fmoc)), 5.36–5.28 (m, 2 H, 8''-H {5.33, dd, $J_{H_8'',H_9''a} = 5.5$ Hz, $J_{H_8'',H_7''} = 2.3$ Hz}, 7''-H {5.31}), 5.21 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.2$ Hz, CH₂ (Bn)), 5.15 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.1$ Hz, CH₂ (Bn)), 5.10 (d, 1 H, $J_{NH,H_5''} = 9.5$ Hz, NH (NeuNAc)), 4.91 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.4$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.96–4.73 (m, 3 H, 4''-H {4.82}, 1-H {4.80}, CH₂ (Bn) {4.77, d, $J_{CH_2,CH_2} = 12.6$ Hz}), 4.82–4.66 (m, 1 H, 2'-H), 4.67 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.2$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.60–4.44 (m, 5 H, 2-H {4.57}, CH₂ (Bn) {4.54, d, $J_{CH_2,CH_2} = 11.4$ Hz}, 1'-H {4.49, d, $J_{H_1',H_2'} = 2.4$ Hz}, CH₂ (Fmoc) {4.49}), 4.36 (d, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 10.2$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.33–4.25 (m, 2 H, 9''a-H {4.30, d, $J_{H_9''a,H_9''b} = 12.6$ Hz, $J_{H_9''a,H_8''} = 2.6$ Hz}, CH Fmoc {4.27}), 4.20–4.03 (m, 5 H, T^α {4.18}, T^β {4.14}, 9''b-H {4.09}, 5''-H {4.06}, 6''-H {4.06}), 3.99 (bs, 1 H, 4-H), 3.95–3.86 (m, 2 H, 6'a-H {3.91}, 4'-H {3.90, d, $J_{H_4',H_3'} = 3.0$ Hz}), 3.82 (t, 1 H, $J_{H_5',H_6'a/b} = 5.8$ Hz, 5'-H), 3.64–3.48 (m, 6 H, 3-H {3.63}, 3'-H {3.58}, 5-H {3.58}, 6'b-H {3.54}, 6a/b-H {3.50}), 2.58 (dd, 1 H, $J_{H_3''eq,H_3''ax} = 12.7$ Hz, $J_{H_3''eq,H_4''} = 4.5$ Hz, 3''-H_{eq}), 2.10, 2.10, 2.00, 2.00 (4 x s, 12 H, CH₃ (Ac)), 1.98–1.85 (m, 1 H, 3''-H_{ax}), 1.98, 1.86 (2 x s, 6 H, CH₃ (AcNH)), 1.45 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.27 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC, HMBC), δ (ppm): 170.7, 170.3, 170.3, 170.2, 170.1 (7 x C=O (NHAc, Ac, Ester)), 167.3 (C1''), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.1, 137.9, 137.6, 134.9 (C_q (Bn)), 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 (C_{Ar} (Bn), C2-, C7-Fmoc), 127.1, 127.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.7 (d, $J_{C_1',F} = 23.4$ Hz, C1'), 100.5 (C1), 98.7 (C2''), 91.4 (d, $J_{C_2',F} = 183.2$ Hz, C2'), 83.0 (C_q (tBu)), 80.0 (d, $J_{C_3',F} = 16.8$ Hz, C3'), 79.9 (C3), 76.9 (T^β), 74.8 (CH₂ (Bn)), 74.0 (C4'), 73.7 (C5), 73.5 (CH₂ (Bn)), 72.8 (C6''), 72.6 (CH₂ (Bn)), 69.2 (C8''), 69.0, 68.9 (C4'', C5'), 68.2 (C6), 68.1 (C4), 67.8 (CH₂ (Bn)), 67.5 (C7''), 67.0 (CH₂ (Fmoc)), 63.7 (C6'), 62.3 (C9''), 59.3 (T^α), 49.2 (C5''), 47.5 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 37.5 (C3''), 28.1 (CH₃ (tBu)), 23.3, 23.2 (CH₃ (NHAc)), 21.0, 20.8, 20.8 (CH₃ (Ac)), 18.9 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -204.3 (dd, $J_{F_2,H_2} = 51.7$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 12.2$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (62)**

(Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-*O*tBu)



Es wurden 235.7 mg (0.23 mmol) Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-*O*tBu **61** in 9 mL einer Mischung aus Pyridin und Acetanhydrid (2:1) gelöst und 18 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Eiswasser gegossen und fünfmal mit jeweils 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 70 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit jeweils 70 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 199.6 mg (78%, 0.18 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +50.9$ (c = 1.00, CHCl₃)

$R_f = 0.37$ (^cHex/EtOAc, 1:1), Analytische RP-HPLC: $R_t = 20.10$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH/H₂O (70:30) \rightarrow (100:0) in 40 min)

C₆₂H₇₁FN₂O₁₆ (M = 1119.23 g/mol) [1118.48]

ESI-MS (positiv), m/z : 1119.49 ([M+H]⁺, ber.: 1119.49), 1141.44 ([M+Na]⁺, ber.: 1141.47), 1157.44 ([M+K]⁺, ber.: 1157.58), 2259.92 ([2M+Na]⁺, ber.: 2259.95).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1141.4691 ([M+Na]⁺, ber.: 1141.4685).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.3$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 6.7$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.3$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.36–7.24 (m, 17 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.83 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 7.4$ Hz, NH (GalNAc)), 5.51 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.2$ Hz, NH (Fmoc)), 5.43 (s, 1 H, 5'-H), 4.90 (d, 1 H, $J_{H_1',H_2'} = 4.0$ Hz, 1'-H), 4.88 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.76–4.57 (m, 4 H, CH₂ (Bn) {4.73}, 2'-H {4.75, 4.63}, CH₂ (Bn) {4.64}, 2-H {4.61}), 4.55 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.51–4.45 (m, 4 H, CH₂ (Bn) {4.50}, CH₂ (Fmoc) {4.48}, 1-H {4.48}), 4.40 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.27 (t, 1 H, $J_{CH,CH_2} = 6.7$ Hz, CH (Fmoc)), 4.24–4.15 (m, 3 H, T ^{α} {4.23}, 6a-H {4.19}, T ^{β} {4.19}), 4.12–4.06 (m, 1 H, 5-H), 3.94 (dd, 1 H, $J_{H_{6b},H_{6a}} = 11.1$ Hz, $J_{H_{6b},H_5} = 8.0$ Hz, 6b-H), 3.90 (t, 1 H, $J_{H_{4'},H_{3'}} = J_{H_{4'},F'} =$

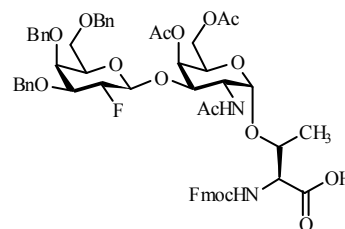
2.8 Hz, 4'-H), 3.80 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 11.1$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.8$ Hz, 3-H), 3.60-3.52 (m, 4 H, 6'a/b-H {3.55}, 4-H {3.55}, 3'-H {3.53}), 2.10, 2.03 (2 x s, 6 H, CH₃ (Ac)), 1.92 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.30 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.5, 170.4, 170.2, 169.9 (4 x C=O (Ac, NHAc, Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.4, 137.9, 137.8 (C_q (Bn)), 128.4, 128.2, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.1 (C_{Ar} (Bn), C3-, C6-Fmoc, C2-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.2 (d, $J_{C1',F} = 24.0$ Hz, C1'), 100.2 (C1), 91.5 (d, $J_{C2',F} = 182.3$ Hz, C2'), 83.1 (C_q (*t*Bu)), 79.8 (d, $J_{C3',F} = 15.5$ Hz, C3'), 77.0 (T^β), 76.2 (C3), 74.6 (CH₂ (Bn)), 74.0 (d, $J_{C4',F} = 8.7$ Hz, C4'), 73.6 (CH₂ (Bn)), 73.6 (C4), 72.4 (CH₂ (Bn)), 69.4 (C5'), 68.2 (C6'), 68.2 (C5), 67.1 (CH₂ (Fmoc)), 63.4 (C6), 59.1 (T^α), 48.4 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 20.9, 20.7 (CH₃ (Ac)), 18.7 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -204.4 (dd, $J_{F2,H2} = 51.6$ Hz, $J_{F2,H3} = 12.2$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin (**63**)**

(Fmoc-Thr(βBn₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-OH)



Es wurden 281.7 mg (0.25 mmol) Fmoc-Thr(βBn₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-*O**t*Bu **62** in 8.0 mL TFA und 0.8 mL

Anisol gelöst und 1.5 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde mit 30 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde viermal mit je 30 mL Toluol kodestilliert und danach flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 5:0.3:<0.01) gereinigt.

Ausbeute: 188.3 mg (70%, 0.17 mmol), farbloser amorpher Feststoff, der noch das monodebenzylierte Produkt **63a** in geringen Mengen enthielt.

$[\alpha]_D^{23} = +64.1$ (c = 1.00, CHCl₃),

$R_f = 0.09$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc, 5:0.3 + 3 Tropfen), Analytische RP-HPLC: $R_t = 26.07$ min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (50:50)→(90:10), 30 min, (100:0) nach 10 min).

$C_{58}H_{63}FN_2O_{16}$ ($M = 1063.12$ g/mol) [1062.42]

ESI-MS (positiv), m/z : 1063.45 ($[M+H]^+$, ber.: 1063.42), 1085.41 ($[M+Na]^+$, ber.: 1085.41), 1101.42 ($[M+K]^+$, ber.: 1101.51).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1085.4034 ($[M+Na]^+$, ber.: 1085.4060).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 12.94 (s, 1 H, COOH), 8.32 (s, 1 H, OH), 7.90 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.73 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.48-7.38 (m, 4 H, 3-H-, 6-H-Fmoc, NH (Fmoc) {7.45}, NH (GalNAc) {7.40}), 7.38-7.25 (m, 17 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.31 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 3.0$ Hz, 4-H), 4.79-4.68 (m, 3 H, CH_2 (Bn) {4.77}, CH_2 (Bn) {4.72}, 1-H {4.71}), 4.66-4.59 (m, 2 H, 1'-H {4.71}, CH_2 (Bn) {4.62}), 4.55-4.41 (m, 5 H, CH_2 (Bn) {4.53}, CH_2 (Fmoc) {4.51}, CH_2 (Bn) {4.52, 4.44, $J_{CH_2,CH_2} = 11.9$ Hz}), 4.33-4.22 (m, 2 H, CH (Fmoc) {4.31}, T^{β} {4.27}), 4.30-4.13 (m, 1 H, 2'-H {4.28, 4.15}), 4.19-4.11 (m, 2 H, 2-H {4.18}, T^{α} {4.14}), 4.07-3.99 (m, 3 H, 5-H {4.04}, 4'-H {4.03}, 6a-H {4.02}), 3.91-3.78 (m, 2 H, 3-H {3.86}, 6b-H {3.81}), 3.76-3.67 (m, 2 H, 5'-H {3.73}, 3'-H {3.71}), 3.55-3.46 (m, 2 H, 6'a/b-H {3.51}), 2.02, 1.97, (2 x s, 6 H, CH_3 (Ac)), 1.81 (s, 3 H, CH_3 (NHAc)), 1.12 (d, 3 H, $J_{T^{\gamma},T^{\beta}} = 6.4$ Hz, T^{γ}).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, DMSO- d_6 , DEPT, HMQC), δ (ppm): 171.7, 170.0, 169.8 (3 x C=O (NHAc, Ac, Carboxyl, Ester), 156.9 (C=O (Urethan), 143.8, 143.7 ($C1a-$, $C8a-Fmoc$), 140.8, 140.8 ($C4a-$, $C5a-Fmoc$), 138.6, 138.3, 138.2 (C_{Ar} (Bn)), 128.3, 128.2, 127.6, 127.5, 127.4, 127.1 ($C2-$, $C7-$, $C3-$, $C6-Fmoc$, C_{Ar} (Bn)), 125.2, 125.1 ($C1-$, $C8-Fmoc$), 120.2, 120.2 ($C4-$, $C5-Fmoc$), 101.2 (d, $J_{C1',F} = 23.2$ Hz, $C1'$), 99.3 ($C1$), 90.8 (d, $J_{C2',F} = 183.4$ Hz, $C2'$), 79.1 (d, $J_{C3',F} = 12.1$ Hz, $C3'$), 75.1 (T^{β}), 75.0 ($C3$), 74.1 (CH_2 (Bn)), 73.8 ($C5$), 72.7 (CH_2 (Bn)), 72.6 ($C5'$), 71.0 (CH_2 (Bn)), 67.9 ($C6'$), 67.4 ($C4'$), 65.4 (CH_2 (Fmoc)), 63.1 ($C6$), 58.3 (T^{α}), 47.1 ($C2$), 46.8 (CH (Fmoc)), 22.7 (CH_3 (NHAc)), 20.7, 20.5 (CH_3 (Ac)), 18.5 (T^{γ}).

^{19}F -NMR (376.6 Hz, DMSO- d_6), δ (ppm): - 204.8 (d, $J_{F2,H2} = 44.4$ Hz).

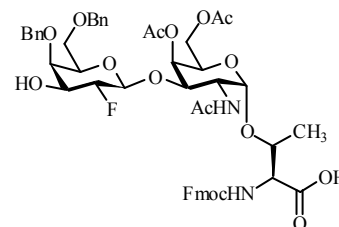
***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[4,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (63a)**

(Fmoc-Thr(β Bn₂Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH)

C₅₁H₅₇FN₂O₁₆ (M = 973.00 g/mol) [972.37]

ESI-MS (positiv), *m/z*: 973.38 ([M+H]⁺, ber.: 973.38),

995.35 ([M+Na]⁺, ber.: 996.36), 1011.34 ([M+K]⁺, ber.: 1011.47).



HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 995.3600 ([M+Na]⁺, ber.: 995.3590).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 12.94 (s, 1 H, COOH), 8.32 (s, 1 H, OH), 7.89 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H4,H6} = 7.3$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.72 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.47-7.24 (m, 16 H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, NH (Fmoc) {7.46}, NH (GalNAc) {7.41}, H_{Ar}), 5.32 (d, $J_{H4,H3} = 2.7$ Hz, 4-H), 5.02 (bs, 1 H, OH), 4.71 (s, 1 H, 1-H), 4.70 (d, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.1$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.59 (dd, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.5$ Hz, $J_{H1',F} = 3.6$ Hz, 1'-H), 4.55-4.48 (m, 5 H, CH₂ (Fmoc) {4.50}, CH₂ (Bn), CH₂ (Bn)), 4.33-4.24 (m, 2 H, CH (Fmoc) {4.30}, T ^{β} {4.26}), 4.35-4.12 (m, 1 H, 2'-H {4.29, 4.18}), 4.22-4.12 (m, 2 H, 2-H {4.17}, T ^{α} {4.13}), 4.05-3.99 (m, 3 H, 5'-H {4.03}, 4'-H {4.01}, 6a-H {4.01}), 3.90-3.76 (m, 2 H, 3-H {3.85}, 6b-H {3.81}), 3.68-3.60 (m, 2 H, 5-H {3.65}, 6'a-H {3.64}), 3.56-3.47 (m, 2 H, 6'-H {3.53}, 3'-H {3.52}), 2.06, 1.97, (2 x s, 6 H, CH₃ (Ac)), 1.81 (s, 3 H, CH₃ (NHAc)), 1.11 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, DEPT, HMQC), δ (ppm): 171.7, 170.0, 169.8 (3 x C=O (NHAc, Ac, Carboxyl), 156.8 (C=O (Urethan), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 140.8, 140.8 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.5, 138.4 (C_{Ar} (Bn)), 128.2, 128.2, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.1 (C2-, C7-, C3-, C6-Fmoc, C_{Ar} (Bn)), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 101.7 (d, $J_{C1',F} = 24.1$ Hz, C1'), 99.3 (C1), 90.3 (d, $J_{C2',F} = 182.1$ Hz, C2'), 78.5 (d, $J_{C3',F} = 15.8$ Hz, C3'), 75.1 (T ^{β}), 75.0 (C3), 73.5 (C5), 72.6 (CH₂ (Bn)), 70.0 (C4), 69.7 (CH₂ (Bn)), 68.6 (C6'), 67.5 (C5'), 65.4 (CH₂ (Fmoc)), 65.1 (d, $J_{C4',F} = 7.3$ Hz, C4'), 63.1 (C6), 58.5 (T ^{α}), 47.8 (C2), 46.8 (CH (Fmoc)), 22.7 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.5 (CH₃ (Ac)), 18.5 (T ^{γ}).

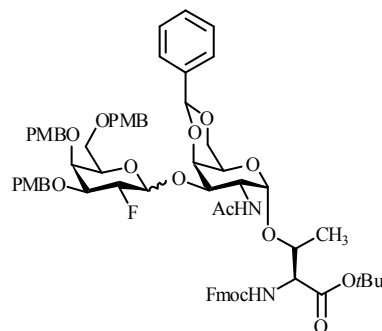
¹⁹F-NMR (376.6 Hz, DMSO-d₆), δ (ppm): -204.3-205.3 (m)

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxybenzyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (68)**

(Fmoc-Thr(α/β PMB₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu)

Variante A:

Es wurden 215.1 mg (0.31 mmol) T_N-Akzeptor **13** und 403.9 mg (0.59 mmol) α PMB₃Gal2F-TCI **67** in 30 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 400 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 16 μ L (0.09 mmol) TMSOTf versetzt.



Es wurde 24 h bei dieser Temperatur gerührt, bevor mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert wurde. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 30 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt. Das Produkt enthielt noch Anteile an α -Anomer (α : R_f = 0.33 (^cHex/EtOAc, 1:1)).

Ausbeute: 253.1 mg (66%, 0.21 mmol), farbloser amorpher Feststoff. Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von α : β = 1:7 bestimmt.

Variante B:

Es wurden 150.0 mg (0.22 mmol) T_N-Akzeptor **13** und 262.4 mg (0.39 mmol) *para*-Chlorphenyl-3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor-1-thio- α/β -D-galactopyranose (**64**) in 30 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 298 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å versetzt. Die Suspension wurde nach 30 min rühren auf 0 °C gekühlt und mit 196 mg (0.87 mmol) *N*-Iodsuccinimid sowie 10 mL (0.11 mmol) Trifluormethansulfonsäure versetzt. Nach 2 d Rühren bei Raumtemp. wurde die Reaktionsmischung mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und dreimal mit jeweils 50 mL ges. Natriumthiosulfat-Lösung, zweimal mit jeweils 50 mL dest. Wasser und zweimal mit jeweils 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel

(⁶Hex/EtOAc, 1:2) gereinigt. Das Produkt enthielt noch Anteile an α -Anomer (α : $R_f = 0.33$ (⁶Hex/EtOAc, 1:1)).

Ausbeute: 140.0 mg (55%, 0.12 mmol), farbloser amorpher Feststoff. Aus den Integralen des ¹⁹F-Spektrum wurde ein Anomerenverhältnis von α : $\beta = 1$:8 bestimmt.

$[\alpha]_D^{20} = +57.3$ (c = 1.00, CHCl₃)

$R_f = 0.26$ (⁶Hex/EtOAc, 1:1), Analytische RP-HPLC: α : $R_t = 16.72$ min, β : $R_t = 13.88$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH/H₂O (80:20)→(90:10), 20 min, (100:0) nach 10 min).

C₆₈H₇₇FN₂O₁₇ (M = 1213.34 g/mol) [1212.52]

ESI-MS (positiv), m/z : 1235.51 ([M+Na]⁺, ber.: 1235.51), 1251.50 ([M+K]⁺, ber.: 1251.62).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1235.5127 ([M+Na]⁺, ber.: 1235.5104).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.57-7.55 (m, 2 H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H_2,H_1} = J_{H_7,H_8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 7.35-7.25 (m, 7 H, H_{Ar} (Bzn), *o*-H_{Ar}), 7.21-7.14 (m, 4 H, *o*-H_{Ar}), 6.91-6.77 (m, 6 H, *m*-H_{Ar}), 5.75 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 7.4$ Hz, NH (GalNAc)), 5.61 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 8.5$ Hz, NH (Fmoc)), 5.51 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.03 (d, 1 H, $J_{H_1,H_2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.81 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.3$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.81-4.68 (m, 1 H, 2'-H), 4.77-4.62 (m, 2 H, 2-H {4.72}, CH₂ (PMB) {4.69, d, $J_{CH_2,CH_2} = 11.5$ Hz}), 4.61-4.53 (m, 2 H, CH₂ (PMB) {4.58, d, $J_{CH_2,CH_2} = 12.0$ Hz}, 1'-H {4.56}), 4.52-4.40 (m, 3 H, CH₂ (PMB) {4.50, d, $J_{CH_2,CH_2} = 11.3$ Hz}, CH₂ (Fmoc)), 4.39-4.14 (m, 7 H, CH₂ (PMB) {4.35}, 4-H {4.32}, CH (Fmoc) {4.27}, T ^{β} {4.25}, T ^{α} {4.22}, 6'a/b-H {4.18}), 3.96 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂ (PMB)), 3.90-3.84 (m 1 H, 3-H), 3.83-3.75 (m, 10 H, 4'-H {3.81}, CH₃ (OMe)), 3.65 (s, 1 H, 5'-H), 3.58-3.42 (m, 4 H, 5-H {3.55}, 6a/b-H {3.54, 3.47}, 3'-H {3.52}), 1.99 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.0$ Hz, T ^{γ}).

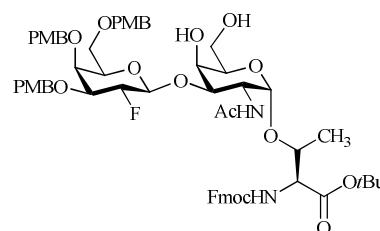
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.4, 169.9 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 159.3, 159.2, 159.2 (3 x CH₃ (OMe)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.6 (C_q (Bzn)), 130.3, 130.0, 129.9, 129.5, 129.2, 128.7 (C_{Ar} (Bzn, Bn)), 128.0, 127.7 (C2-, C7-Fmoc), 126.4, 126.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 113.8, 113.6 (C_{Ar} (*m*-C)), 102.8 (d, $J_{C1',F} = 23.2$ Hz, C1'), 100.7 (CH (Bzn)), 100.5 (C1), 91.2 (d, $J_{C2',F} = 183.3$ Hz, C2'), 83.0 (C_q (*t*Bu)), 79.8 (d, $J_{C3',F} = 15.0$ Hz, C3'), 76.4 (C3), 76.4 (T ^{β}), 75.8 (C4), 74.1 (CH₂ (PMB)), 73.8 (C5),

73.6 (d, $J_{C4',F} = 8.4$ Hz, C4'), 73.1, 72.3 (CH₂ (PMB)), 69.1 (C6'), 68.5 (C6), 67.0 (CH₂ (Fmoc)), 63.7 (C5'), 59.2 (T^α), 55.2 (CH₃ (OMe)), 48.1 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 19.1 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -204.5 (dd, $J_{F2,H2} = 52.0$ Hz, $J_{F2,H3} = 11.6$ Hz).

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

(Fmoc-Thr(βPMB₃Gal2F-(1→3)-αGalNAc)-*Ot*Bu)**



Es wurden 815.4 mg (0.67 mmol) Fmoc-Thr(βPMB₃Gal2F-(1→3)-α4,6-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **68** in 50 mL einer

Mischung aus Dichlormethan und Methanol (4:1) gelöst und mit 900 mg aktiviertem Natriumhydrogensulfat-Kieselgel-Katalysator^[96] versetzt. Die Suspension wurde 20 h bei Raumtemp. gerührt, bevor das Kieselgel abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde zweimal mit je 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt. Zur vollständigen Charakterisierung wurde ein kleiner Teil mittels semi-präparativer RP-HPLC gereinigt (α: $R_t = 49.29$ min, β: $R_t = 43.28$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH/H₂O (70:30)→(85:15), 40 min, (100:0) nach 20 min)). Das Produkt enthielt noch Anteile des α-Anomers.

Ausbeute: max. 756 mg (quant., 0.67 mmol), farbloser amorpher Feststoff

α-Anomer: $[\alpha]_D^{23} = +72.5$ (c = 1.00, CHCl₃), **β-Anomer:** $[\alpha]_D^{23} = +30.7$ (c = 1.00, CHCl₃)

α: $R_f = 0.36$, β: $R_f = 0.48$ (^cHex/EtOAc, 1:10), Analytische RP-HPLC: α: $R_t = 33.37$ min, β: $R_t = 28.39$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH/H₂O (70:30)→(85:15), 40 min, (100:0) nach 20 min).

C₆₁H₇₃FN₂O₁₇ (M = 1125.23 g/mol) [1124.49]

ESI-MS (positiv), m/z : 1147.44 ([M+Na]⁺, ber.: 1147.48), 2271.89 ([2M+Na]⁺, ber.: 2271.97).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1147.4771 ([M+Na]⁺, ber.: 1147.4791).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): **α -Anomer:** 7.76 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (t, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2 H, $J_{H3,H4} = J_{H7,H8} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34-7.27 (m, 5 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, *o*-H_{Ar}), 7.20-7.11 (m, 4 H, *o*-H_{Ar}), 6.92-6.77 (m, 6 H, *m*-H_{Ar}), 6.13 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.8$ Hz, NH (GalNAc)), 5.57 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 5.15 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, 1-H),

5.12 (ddd, 1 H, $J_{H2,F} = 51.3$ Hz, $J_{H2,H3} = 9.7$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.7$ Hz, 2'-H), 4.89 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.78 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.2$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.64-4.56 (m, 2 H, 2-H {4.61}, CH₂ (PMB) {4.60 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.2$ Hz)}), 4.51-4.35 (m, 4 H, CH₂ (PMB) {4.48, d, $J_{CH2,CH2} = 11.6$ Hz}, CH₂ (PMB) {4.43, d, $J_{CH2,CH2} = 11.1$ Hz}, CH₂ (Fmoc) {4.45}), 4.31-4.18 (m, 4 H, CH₂ (PMB) {4.27, d, $J_{CH2,CH2} = 11.7$ Hz}, T ^{α} {4.24}, CH (Fmoc) {4.21, t, $J_{CH,CH2} = 7.1$ Hz}, T ^{β} {4.20}), 4.08-3.90 (m, 4 H, 4-H {4.07}, 3'-H {3.99}, 5-H {3.98}, 6a-H {3.94}), 3.88-3.73 (m, 13 H, 6b-H {3.94, 3.80}, 5-H {3.85}, 4'-H {3.84}, 3-H {3.84}, OMe {3.80, 3.78, 3.76}), 3.45 (dd, 1 H, $J_{H6'a,H6'b} = 9.3$ Hz, $J_{H6'a,H5'} = 7.1$ Hz, 6a'-H), 3.27 (dd, 1 H, $J_{H6b',H6a'} = 9.4$ Hz, $J_{H6b',H5'} = 5.0$ Hz, 6b'-H), 2.97 (bs, 1 H, OH), 2.46 (bs, 1 H, OH), 1.97 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}). **β -Anomer:** 7.77 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35-7.22 (m, 5 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, *o*-H_{Ar}), 7.21-7.13 (m, 4 H, *o*-H_{Ar}), 6.92-6.78 (m, 6 H, *m*-H_{Ar}), 5.77 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.6$ Hz, NH (GalNAc)), 5.56 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.1$ Hz, NH (Fmoc)), 4.90 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.4$ Hz, 1-H), 4.82-4.54 (m, 5 H, CH₂ (PMB) {4.80 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.1$ Hz)}, 2'-H {4.76, 4.63}, CH₂ (PMB) {4.67, d, $J_{CH2,CH2} = 11.8$ Hz}, CH (Fmoc) {4.61}), 4.34 (d, 2 H, $J_{CH2,CH2} = 3.07$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.30-4.07 (m, 4 H, CH (Fmoc) {4.26}, T ^{α} {4.24}, T ^{β} {4.19}, 4-H {4.14}), 3.93-3.64 (m, 13 H, 6a/b-H {3.89, 3.73}, 4'-H {3.81}, OMe {3.79}, 3-H {3.68, dd, $J_{H3,H2} = 10.9$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.5$ Hz}), 3.57-3.47 (m, 3 H, 5'-H {3.54}, 3'-H {3.52}, 6a'-H {3.51}), 3.42 (dd, 1 H, $J_{H6b',H6a'} = 8.8$ Hz, $J_{H6b',H5'} = 5.8$ Hz, 6b'-H), 2.98 (bs, 1 H, OH), 2.01 (bs, 1 H, OH), 2.01 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.45 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): **α -Anomer:** 170.4, 170.1 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 159.3 (3 x CH₃ (OMe)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 130.1, 129.8, 129.3 (C_{Ar} (PMB)), 127.7 (C2-, C7-Fmoc), 127.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 113.8,

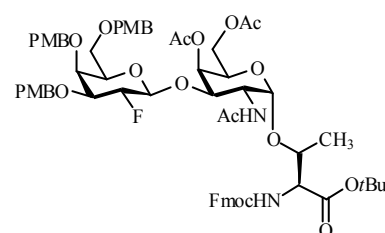
113.7, 113.7 (*m*-C_{Ar}), 99.9 (C1), 94.6 (d, $J_{C1',F} = 21.8$ Hz, C1'), 89.1 (d, $J_{C2',F} = 185.9$ Hz, C2'), 83.0 (C_q (*t*Bu)), 76.8 (C5'), 76.4 (T^β), 76.1 (C3), 74.3, 73.1, 72.2 (CH₂ (PMB)), 70.7 (C3'), 69.8 (C5), 68.8 (C6'), 67.5 (C4), 67.2 (CH₂ (Fmoc)), 63.0 (C6), 59.0 (T^α), 55.3, 55.2, 55.2 (CH₃ (OMe)), 47.1 (CH (Fmoc)), 46.9 (C2), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 18.8 (T^γ). **β-Anomer**: 170.3, 170.0 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 159.3, 159.2 (3 x CH₃ (OMe)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 130.1, 129.9, 129.6, 129.5, 129.2 (C_{Ar} (PMB)), 127.7 (C2-, C7-Fmoc), 126.9 (C3-, C6-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 113.8, 113.8, 113.6 (*m*-C_{Ar}), 102.4 (d, $J_{C1',F} = 23.6$ Hz, C1'), 100.2 (C1), 91.3 (d, $J_{C2',F} = 183.5$ Hz, C2'), 83.0 (C_q (*t*Bu)), 79.8 (C3), 79.5 (d, $J_{C3',F} = 15.6$ Hz, C3'), 76.5 (T^β), 74.3 (CH₂ (PMB)), 73.9 (C5'), 73.4 (d, $J_{C4',F} = 8.6$ Hz, C4'), 73.1, 72.2 (CH₂ (PMB)), 69.7 (C5), 69.5 (C4), 68.4 (C6'), 67.0 (CH₂ (Fmoc)), 62.9 (C6), 59.1 (T^α), 55.2 (CH₃ (OMe)), 47.5 (C2), 47.1 (CH (Fmoc)), 28.0 (CH₃ (*t*Bu)), 23.2 (CH₃ (NHAc)), 18.8 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, DMSO), δ (ppm): **α-Anomer**: - 204.8 (dd, $J_{F2,H2} = 50.2$ Hz, $J_{F2,H3} = 9.4$ Hz).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): **β-Anomer**: - 204.8 (dd, $J_{F2,H2} = 51.9$ Hz, $J_{F2,H3} = 12.5$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-*para*-methoxybenzyl-2-desoxy-2-fluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonin (71)**

(Fmoc-Thr(βPMB₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-*Ot*Bu)**



Es wurden 650.0 mg (0.58 mmol) Fmoc-Thr(βPMB₃Gal2F-(1→3)-αGalNAc)-*O**t*Bu (enthält noch geringe Mengen des α-

Anomers) in 30 mL Pyridin gelöst und unter Eisbadkühlung mit 15 mL Acetanhydrid versetzt. Die Mischung wurde über Nacht auf Raumtemp. erwärmt und dann auf Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit

Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4).

Ausbeute: 539.5 mg (77%, 0.45 mmol), farbloser amorpher Feststoff, der noch Anteile des α -Anomers enthielt (α : $R_f = 0.80$ (^cHex/EtOAc, 1:4)).

$$[\alpha]_D^{23} = +53.2 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

$R_f = 0.64$ (^cHex/EtOAc, 1:4), Analytische RP-HPLC: α : $R_t = 38.13$ min, β : $R_t = 33.66$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH/H₂O (70:30)→(85:15), 40 min, (100:0) nach 20 min).

C₆₅H₇₇FN₂O₁₉ (M = 1209.31 g/mol) [1208.51]

ESI-MS (positiv), m/z : 1231.55 ([M+Na]⁺, ber.: 1231.50).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1231.4982 ([M+Na]⁺, ber.: 1231.5003).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.77 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.2$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.32 (t, 2 H, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 7.2$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 7.28-7.16 (m, 8 H, *o*-H_{Ar}), 6.89-6.79 (m, 6 H, *m*-H_{Ar}), 5.74 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.4$ Hz, NH (GalNAc)), 5.47 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, NH (Fmoc)), 5.42 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.3$ Hz, 4-H), 4.91 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.5$ Hz, 1-H), 4.77 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.2$ Hz, CH₂ (PMB)), 4.74-4.53 (m, 4 H, 2'-H {4.71, 4.52}, CH₂ (PMB) {4.60, 4.57}), 4.49-4.40 (m, 4 H, CH₂ (Fmoc) {4.47}, CH₂ (PMB) {4.46, d, $J_{CH2,CH2} = 11.2$ Hz}, CH₂ (PMB) {4.43}), 4.33 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.2$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.30-4.02 (m, 5 H, CH (Fmoc) {4.27}, T ^{α} {4.24}, 6a/b-H {4.21}, T ^{β} {4.19}), 3.94 (dd, 1 H, $J_{H6a,H6b} = 11.6$ Hz, $J_{H6a,H5} = 8.0$ Hz, 6a-H), 3.83 (t, 1 H, $J_{H4',H3'} = 3.1$ Hz, 4'-H), 3.54-3.44 (m, 4 H, 6'a/b-H {3.52}, 5'-H {3.50}, 3'-H {3.48}), 2.01 (bs, 1 H, OH), 2.10, 2.03 (2 x s, 6 H, CH₃ (Ac)), 2.00 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.30 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

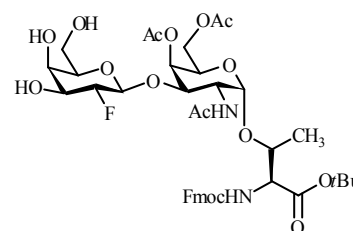
¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.4, 170.2, 169.8 (3 x C=O (NHAc, Ester, Ac)), 159.3, 159.2, 159.1 (3 x CH₃ (OMe)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 130.6, 130.0, 129.9, 129.9, 129.6, 129.1 (C_{Ar} (PMB)), 127.8 (C2-, C7-Fmoc), 127.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 113.8, 113.8, 113.5 (*m*-C_{Ar}), 102.2 (d, $J_{C1',F} = 23.7$ Hz, C1'), 100.2 (C1), 91.4 (d, $J_{C2',F} = 182.5$ Hz, C2'), 83.1 (C_q (*t*Bu)), 79.5 (d, $J_{C3',F} = 15.4$ Hz, C3'), 77.2 (T ^{β}), 76.1 (C3), 74.1 (CH₂ (Bn)), 73.5 (C5'), 73.4 (d, $J_{C4',F} = 8.8$ Hz, C4'), 73.2, 72.0 (CH₂ (Bn)), 69.4 (C4), 68.2 (C5), 68.0 (C6'), 67.1 (CH₂ (Fmoc)), 63.4 (C6), 59.1 (T ^{α}), 55.2 (CH₃ (OMe)),

48.2 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 20.9, 20.7 (CH₃ (Ac)), 18.8 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -204.8 (dd, $J_{F_2,H_2} = 52.0$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 12.5$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin (72)**

(Fmoc-Thr(βGal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-*Ot*Bu)**



Zu einer Lösung von 480.6 mg (0.40 mmol) Fmoc-Thr(βPMB₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-*O**t*Bu **71** in 42 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Wasser (20:1) wurden 380.0 mg (1.67 mmol) DDQ gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 h bei Raumtemp. gerührt und danach mit 150 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung verdünnt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 75 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit jeweils 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit jeweils 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 289.6 mg (86%, 0.34 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +85.2$ (c = 1.00, CHCl₃)

$R_f = 0.40$ (°Hex/EtOAc, 1:10), Analytische RP-HPLC: $R_t = 7.89$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH/H₂O (70:30)→(100:0) in 40 min)

C₄₁H₅₃FN₂O₁₆ (M = 848.8617 g/mol) [848.3379]

ESI-MS (positiv), m/z : 849.38 ([M+H]⁺, ber.: 849.35), 871.37 ([M+Na]⁺, ber.: 871.33)

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 849.3439 ([M+H]⁺, ber.: 849.3458).

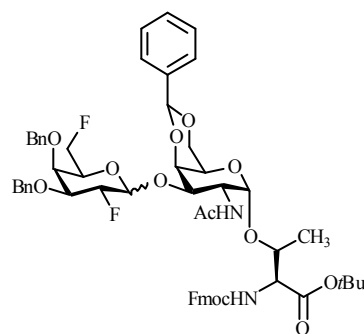
¹H-NMR (400 MHz, DMSO, COSY), δ (ppm): 7.89 (d, 2 H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.84 (d, 2 H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.56 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz, NH (Fmoc)), 7.47 (d, 1 H, $J_{NH,H_2} = 9.7$ Hz, NH (GalNAc)), 7.41 (t, 2 H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.4$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.34 (t, 2 H, $J_{H_2,H_1} = J_{H_7,H_8} = 7.2$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.28 (s, 1 H, OH), 5.31 (d, 1 H, $J_{H_4,H_3} = 3.1$ Hz, 4-H), 4.76 (d, 1 H, $J_{OH,F} = 4.5$ Hz, OH), 4.69 (d,

1 H, $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, 1-H), 4.65 (dd, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.7$ Hz, $J_{H1',H3'} = 3.3$ Hz, 1'-H), 4.55-4.48 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.31 (t, 1 H, $J_{CH,CH2} = 6.6$ Hz, CH (Fmoc)), 4.24-4.17 (m, 1 H, 2-H), 4.15-4.04 (m, 2 H, 5'-H {4.13}, 6'a-H {4.07}), 4.10-3.92 (m, 1 H, 2'-H), 3.99-3.92 (m, 1 H, T^β), 3.90-3.80 (m, 2 H, 3-H {3.87}, 6'b-H {3.84}), 3.69 (bs, 1 H, 4'-H), 3.53-3.44 (m, 3 H, 3'-H {3.49}, 6a/b-H {3.49}), 3.38 (pt, 1 H, 5-H), 3.06 (d, 1 H, $J_{T\alpha,T\beta} = 2.8$ Hz, T^α), 2.07, 1.99 (2 x s, 6 H, CH₃ (Ac)), 1.79 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.37 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.25 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO, HMQC), δ (ppm): 173.2, 170.1, 169.1 (3 x C=O (NHAc, Ester, Ac)), 156.9 (C=O (Urethan)), 142.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 129.0 (C3-, C6-Fmoc), 127.3 (C2-, C7-Fmoc), 121.4 (C4-, C5-Fmoc), 120.1 (C1-, C8-Fmoc), 101.3 (d, $J_{C1',F} = 23.2$ Hz, C1'), 99.3 (C1), 91.5 (d, $J_{C2',F} = 181.1$ Hz, C2'), 80.2 (C_q (*t*Bu)), 77.0 (T^β), 75.5 (C5), 73.6 (C3), 73.5 (C5'), 71.5 (d, $J_{C3',F} = 16.6$ Hz, C3'), 70.4 (C4), 68.7 (d, $J_{C4',F} = 9.0$ Hz, C4'), 67.5 (C5'), 65.4 (CH₂ (Fmoc)), 63.2 (C6'), 60.1 (C6), 59.9 (T^α), 48.2 (C2), 46.7 (CH (Fmoc)), 27.7 (CH₃ (*t*Bu)), 22.7 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.5 (CH₃ (Ac)), 19.0 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, DMSO), δ (ppm): - 205.4 (dd, $J_{F2,H2} = 52.4$ Hz, $J_{F2,H3} = 14.3$ Hz).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- α/β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (82)
(Fmoc-Thr(α/β Bn₂Gal2,6F₂-(1→3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu)**



Es wurden 355.4 mg (0.70 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**81**) und 377.8 mg (0.55 mmol) T_N-Akzeptor **13** in

20 ml absol. Dichlormethan gelöst und mit 588 mg frisch aktiviertem Molekularsieb 4 Å versetzt. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt, bevor auf 0 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 15 µL (0.08 mmol) TMSOTf gegeben und die Lösung wurde innerhalb von 20 h auf Raumtemp. erwärmt. Anschließend wurde mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und mit 50 mL

Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde dreimal mit jeweils 80 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 80 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 411.8 mg (72%, 0.40 mmol), farbloser amorpher Feststoff. Durch analytische RP-HPLC wurde ein Anomerenverhältnis von α : β = 1:3 bestimmt.

α -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = +99.37$ (c = 1.00, CHCl₃), **β -Anomer:** $[\alpha]_D^{23} = +67.52$ (c = 1.00, CHCl₃)

α : $R_f = 0.48$, **β :** $R_f = 0.43$ (^cHex/EtOAc, 1:1), Analytische RP-HPLC: **α :** $R_t = 21.05$ min, **β :** $R_t = 17.88$ min (Phenomenex Jupiter C18(2), Grad.: MeOH:H₂O (70:30)→(100:0) in 30 min)

C₅₈H₆₄F₂N₂O₁₃ (M = 1035.13 g/mol) [1034.44]

ESI-MS (positiv), m/z : 1057.41 ([M+Na]⁺, ber.: 1057.43), 1073.39 ([M+K]⁺, ber.: 1073.54).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1057.4304 ([M+Na]⁺, ber.: 1057.4274).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): **α -Anomer:** 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.65 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.56 (d, 2 H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 6.6$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.41 (t, 2 H, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 7.5$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 7.44–7.22 (m, 15 H, H_{Ar}), 5.97 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH (GalNAc)), 5.60 (s, 1 H, CH (Bzn)), 5.47 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 5.19 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, 1'-H), 4.97 (d, 1 H, $J_{H1',H2'} = 3.2$ Hz, 1'-H), 4.92 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.90 (ddd, 1 H, $J_{H2,F} = 51.2$ Hz, $J_{H2,H3} = 9.9$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.5$ Hz, 2'-H), 4.81 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.73 (t, 1 H, $J_{H2,H3} = J_{H2,H1} = 10.7$ Hz, 2-H), 4.61 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.7$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.54 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.5$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.56–4.15 (m, 2 H, 6'a/b-H), 4.49–4.41 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.31–4.06 (m, 8 H, 4-H {4.29}, 6a/b-H {4.27, 4.09}, CH (Fmoc) {4.26}, T ^{α} {4.26}, T ^{β} {4.20}, 5'-H {4.18}, 3'-H {4.11}), 3.89 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 10.8$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.1$ Hz, 3-H), 3.84 (s, 1 H, 5'-H), 3.71 (s, 1 H, 5-H), 1.99 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}). **β -Anomer:** 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 6.9$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.54 (d, 2 H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 6.6$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.44–7.22 (m, 17 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.77 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.3$ Hz, NH (GalNAc)), 5.60–5.51 (m, 2 H, NH (Fmoc), CH (Bzn)), 5.02 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, 1-H), 4.96–4.56 (m, 6 H, CH₂ (Bn) {4.92, d, $J_{CH2,CH2} = 11.5$ Hz}, CH₂ (Bn) {4.82, d, $J_{CH2,CH2} = 12.2$ Hz}, CH₂ (Bn) {4.67, d, $J_{CH2,CH2} = 12.3$ Hz}, CH₂ (Bn) {4.59, d, $J_{CH2,CH2} = 11.5$ Hz}, 2'-H {4.85, 4.73}, 1'-H {4.63}),

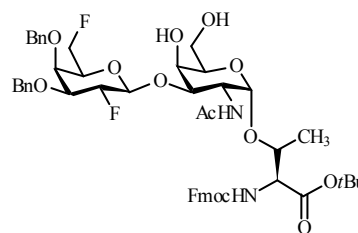
4.64-4.52 (m, 1 H, 6'a-H), 4.52-4.25 (m, 1 H, 6'b-H), 4.56-4.44 (m, 2 H, CH₂ (Fmoc)), 4.40-4.18 (m, 5 H, 4-H {4.36}, CH (Fmoc) {4.27}, T^β {4.24}, T^α {4.22}, 6a-H {4.21}), 4.08-3.98 (m, 1 H, 6b-H), 3.90 (dd, 1 H, $J_{H3,H2} = 11.3$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.5$ Hz, 3-H), 3.82 (s, 1 H, 4'-H), 3.74-3.67 (m, 2 H, 5-H {3.70}, 5'-H {3.69}), 3.61 (t, 1 H, $J_{H3',H2'} = 10.7$ Hz, 3'-H), 2.01 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.28 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): **α-Anomer**: 170.2 (2 x C=O (Ester, NHAc)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.3, 137.7 (C_q (Bn)), 128.8, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6, 127.1 (C_{Ar} (Bn), C2-, C7-Fmoc), 126.2 (C3-, C6-Fmoc), 125.1, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.8 (CH (Bzn)), 100.5 (C1), 96.5 (d, $J_{C1',F2} = 22.4$ Hz, C1'), 88.8 (d, $J_{C2',F2} = 188.7$ Hz, C2'), 83.3 (d, $J_{C6',F6} = 168.6$ Hz, C6'), 83.2 (C_q (*t*Bu)), 77.0 (C3'), 76.6 (T^β), 75.4 (d, $J_{C4',F6} = 7.3$ Hz, C4), 74.7, 73.9 (2 x CH₂ (Bn)), 73.2 (C4), 70.3 (d, $J_{C5',F6} = 22.0$ Hz, C5'), 69.2 (C6), 67.2 (CH₂ (Fmoc)), 63.6 (C5), 58.9 (T^α), 47.6 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.4 (CH₃ (NHAc)), 19.0 (T^γ). **β-Anomer**: 170.3, 170.1 (2 x C=O (Ester, NHAc)), 156.5 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.8, 137.6 (C_q (Bn)), 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.1, 126.4 (C_{Ar} (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.2, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.3 (d, $J_{C1',F2} = 24.2$ Hz, C1'), 100.8 (CH (Bzn)), 100.0 (C1), 90.9 (d, $J_{C2',F2} = 183.7$ Hz, C2'), 83.1 (C_q (*t*Bu)), 82.2 (d, $J_{C6',F6} = 167.9$ Hz, C6'), 79.5 (d, $J_{C3',F2} = 16.0$ Hz, C3'), 76.5 (C3, T^β), 75.8 (C4), 74.4 (CH₂ (Bn)), 73.4 (C4'), 73.3 (d, $J_{C5',F6} = 22.1$ Hz, C5'), 72.9 (CH₂ (Bn)), 69.1 (C6), 67.0 (CH₂ (Fmoc)), 63.8 (C5), 59.2 (T^α), 48.0 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.4 (CH₃ (NHAc)), 19.1 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer**: - 207.6 (dd, $J_{F2,H2} = 50.4$ Hz, $J_{F2,H3} = 5.5$ Hz, 2-F), - 227.6 (dt, $J_{F6,H6a/b} = 47.4$ Hz, $J_{F6,H5} = 14.9$ Hz, 6-F), **β-Anomer**: - 203.6 (d, $J_{F2,H2} = 49.4$ Hz, 2-F), - 228.7 (dt, $J_{F6,H6a/b} = 46.4$ Hz, $J_{F6,H5} = 10.8$ Hz, 6-F).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester**

(Fmoc-Thr(β Bn₂Gal2,6F₂-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-OtBu)



Es wurden 413.5 mg (0.40 mmol) Fmoc-Thr(β Bn₂Gal2,6F₂-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-OtBu **82** in 50 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (4:1) gelöst und mit 450 mg aktiviertem Natriumhydrogensulfat-Kieselgel-Katalysator^[96] versetzt. Die Suspension wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt, bevor mit 150 mL Dichlormethan verdünnt und mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert wurde. Das Kieselgel wurde abfiltriert und das Filtrat wurde dreimal mit je 100 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 287.7 mg (76%, 0.30 mmol), farbloser amorpher Feststoff. Das Produkt enthielt noch Anteile an α -Produkt (R_f = 0.36 (^cHex/EtOAc, 1:10)).

$$[\alpha]_D^{23} = +42.8 \text{ (c = 1.00, CHCl}_3\text{)}$$

R_f = 0.24 (^cHex/EtOAc, 1:10), Analytische RP-HPLC: α : R_t = 17.48 min, β : R_t = 14.32 min (Phenomenex Jupiter C18(2), Grad.: MeOH:H₂O (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min)

C₅₁H₆₀F₂N₂O₁₃ (M = 947.02 g/mol) [946.41]

ESI-MS (positiv), m/z : 947.45 ([M+H]⁺, ber.: 947.41), 969.44 ([M+Na]⁺, ber.: 969.40), 1915.88 ([2M+Na]⁺, ber.: 1915.80).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 947.4120 ([M+H]⁺, ber.: 947.4142), 969.3967 ([M+Na]⁺, ber.: 969.3961).

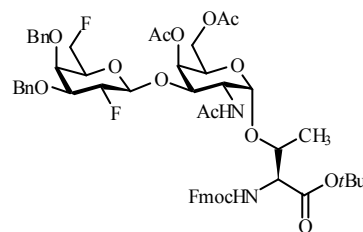
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.63 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.0$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41 (t, 2 H, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 6.0$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 7.38–7.24 (m, 12 H, H_{Ar}), 5.80 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH (GalNAc)), 5.45 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH (Fmoc)), 4.93 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.90 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.4$ Hz, 1-H), 4.83–4.70 (m, 1 H, 2'-H), 4.81 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.1$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.68 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 12.0$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.64 (dd, 1 H, $J_{H2,H3} = 10.6$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.5$ Hz, 2-H), 4.58 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 11.4$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.56–4.52

(m, 1 H, 1'-H), 4.49 (d, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 6.6$ Hz, CH₂ (Fmoc)), 4.44 (ddd, 1 H, $J_{\text{H6}'a,\text{F6}} = 74.4$ Hz, $J_{\text{H6}'a,\text{H6}'b} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H6}'a,\text{H5}'} = 5.1$ Hz, 6'a-H), 4.32 (ddd, 1 H, $J_{\text{H6}'b,\text{F6}} = 69.8$ Hz, $J_{\text{H6}'b,\text{H6}'a} = 9.6$ Hz, $J_{\text{H6}'b,\text{H5}'} = 6.9$ Hz, 6'b-H), 4.31-4.08 (m, 3 H, CH (Fmoc) {4.27}, T^α {4.23}, T^β {4.19}), 3.97-3.90 (m, 1 H, 6a-H), 3.88-3.75 (m, 2 H, 4'-H {3.85}, 5'-H {3.82}), 3.73-3.62 (m, 2 H, 3-H {3.71}, 5-H {3.66}), 3.58 (pt, 1 H, 3'-H), 2.81 (bs, 1 H, OH), 2.50 (bs, 1 H, OH), 2.01 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)), 1.29 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.4, 170.1 (2 x C=O (NHAc, Ester)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.6, 137.5 (C_q (Bn)), 128.5, 128.4, 128.0, 127.9, 127.9, 127.6, 127.1 (C_{Ar} (Bn), C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.5 (d, $J_{\text{C1}',\text{F2}} = 24.3$ Hz, C1'), 100.3 (C1), 91.2 (d, $J_{\text{C2}',\text{F2}} = 184.1$ Hz, C2'), 83.1 (C_q (*t*Bu)), 81.7 (d, $J_{\text{C6}',\text{F6}} = 168.9$ Hz, C6'), 80.0 (C3), 79.6 (d, $J_{\text{C3}',\text{F2}} = 15.5$ Hz, C3'), 76.6 (T^β), 74.7 (CH₂ (Bn)), 73.4 (C5), 73.3 (d, $J_{\text{C5}',\text{F6}} = 22.0$ Hz, C5'), 73.0 (CH₂ (Bn)), 69.8 (C4, C4'), 67.0 (CH₂ (Fmoc)), 63.0 (C6), 59.1 (T^α), 47.4 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 18.9 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃): -204.7 (dd, $J_{\text{F2},\text{H2}} = 51.2$ Hz, $J_{\text{F2},\text{H3}} = 10.6$ Hz, 2-F), -229.4 (dt, $J_{\text{F6},\text{H6a}} = 46.8$ Hz, $J_{\text{F6},\text{H6b}} = 46.5$ Hz, $J_{\text{F6},\text{H5}} = 11.0$ Hz, 6-F).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (85)
(Fmoc-Thr(βBn₂Gal2,6F₂-(1→3)-αAc₂GalNAc)-*O**t*Bu)**



Es wurden 233.6 mg (0.25 mmol) Fmoc-Thr(βBn₂Gal2,6F₂-(1→3)-αGalNAc)-*O**t*Bu in 12 mL einer Mischung aus Pyridin

und Acetanhydrid (2:1) gelöst und 20 h bei Raumtemp gerührt. Anschließend wurde auf 100 mL Eiswasser gegossen und fünfmal mit je 60 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 75 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 75 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit

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

Ausbeute: 165.3 mg (65%, 0.16 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +67.1$ (c = 1.00, CHCl₃)

R_f = 0.61 (^cHex/EtOAc, 1:2), Analytische RP-HPLC: R_t = 16.63 min (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 208 nm, Grad.: MeOH/H₂O (70:30)→(100:0) in 40 min).

C₅₅H₆₄F₂N₂O₁₅ (M = 1031.10 g/mol) [1030.43]

ESI-MS (positiv), m/z: 1053.43 ([M+Na]⁺, ber.: 1053.42), 1069.43 ([M+K]⁺, ber.: 1069.53), 2083.88 ([2M+Na]⁺, ber.: 2083.84).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1053.4207 ([M+Na]⁺, ber.: 1053.4173).

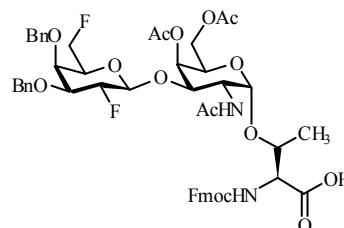
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.78 (d, 2 H, J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.64 (d, 2 H, J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41 (t, 2 H, J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.3 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.37–7.24 (m, 12 H, 2-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}), 5.80 (d, 1 H, J_{NH,H2} = 9.6 Hz, NH (GalNAc)), 5.46 (d, 1 H, J_{NH,Tα} = 9.5 Hz, NH (Fmoc)), 5.43 (s, 1 H, 4-H), 4.93–4.88 (m, 2 H, CH₂ (Bn) {4.91, d, J_{CH2,CH2} = 11.4 Hz}, 1-H {4.90}), 4.77 (d, 2 H, J_{CH2,CH2} = 11.8 Hz, CH₂ (Bn)), 4.78–4.61 (m, 1 H, 2'-H), 4.69–4.36 (m, 6 H, CH₂ (Bn) {4.67, d, J_{CH2,CH2} = 12.2 Hz}, CH₂ (Bn) {4.58, d, J_{CH2,CH2} = 11.5 Hz}, 6'a-H {4.56, 4.40}, 1'-H {4.51}, CH₂ (Fmoc) {4.49}), 4.47–4.25 (m, 1 H, 6'b-H), 4.30–4.09 (m, 5 H, CH (Fmoc) {4.27}, T^α {4.23}, 6a-H {4.21}, T^β {4.20}, 5-H {4.13}), 3.95 (dd, 1 H, J_{H6b,H6a} = 11.5 Hz, J_{H6b,H5} = 7.8 Hz, 6b-H), 3.84 (d, 1 H, J_{H4',H3'} = 2.9 Hz, 4'-H), 3.81 (d, 1 H, J_{H3,H4} = 2.9 Hz, 3-H), 2.08, 2.04 (2 x s, 6 H, CH₃ (Ac)), 2.01 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.46 (s, 9 H, CH₃ (tBu)), 1.30 (d, 3 H, J_{Tγ,Tβ} = 6.3 Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.4, 170.1 (4 x C=O (Ac, Ester, NHAc)), 156.4 (C=O (Urethan)), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 137.7 (C_q (Bn)), 128.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6, 127.1 (C_{Ar} (Bn), C3-, C6-Fmoc, C2-, C7-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 101.8 (d, J_{C1',F2} = 24.0 Hz, C1'), 100.2 (C1), 91.3 (d, J_{C2',F2} = 183.0 Hz, C2'), 83.1 (C_q (tBu)), 81.1 (d, J_{C6',F6} = 167.5 Hz, C6'), 79.5 (d, J_{C3',F2} = 15.9 Hz, C3'), 77.0 (T^β), 76.1 (C3), 74.5 (CH₂ (Bn)), 73.3 (dd, J_{C4',F2} = 9.1 Hz, J_{C4',F6} = 3.5 Hz, C4'), 72.9 (d, J_{C5',F6} = 25.0 Hz, C5'), 72.7 (CH₂ (Bn)), 69.2 (C4), 68.1 (C5), 67.1 (CH₂ (Fmoc)), 63.2 (C6), 59.1 (T^α), 48.3 (C2), 47.2 (CH (Fmoc)), 28.1 (CH₃ (tBu)), 23.3 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.7 (2 x CH₃ (Ac)), 18.6 (T^γ).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 Hz, CDCl_3), δ (ppm): - 204.7 (d, $J_{\text{F}_2, \text{H}_2} = 51.5$ Hz, $J_{\text{F}_2, \text{H}_3} = 10.8$ Hz, 2-F), - 229.9 (dt, $J_{\text{F}_6, \text{H}_6\text{a/b}} = 46.6$ Hz, $J_{\text{F}_6, \text{H}_5} = 9.9$ Hz, 6-F).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-bisfluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (**86**)**

(Fmoc-Thr(β Bn₂Gal2,6F₂-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH)



Es wurden 183.6 mg (0.18 mmol) Fmoc-Thr(β Bn₂Gal2,6F₂-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH **85** in 10 mL TFA gelöst und mit

1.0 mL Anisol versetzt. Die Lösung wurde 3 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend mit 40 mL Toluol verdünnt. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert und mehrfach mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 5:0.3) gereinigt. Dabei wurde ein Produktgemisch aus **86** und kleinen Mengen an **86a** erhalten.

Ausbeute: 153.8 mg (88%, 0.16 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{23} = +72.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3),

$R_f = 0.24$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 5:0.3), Analytische RP-HPLC: $R_t = 18.47$ min + 9.95 min (-1 x Bn) (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA (50:50) \rightarrow (90:10), 30 min, (100:0) nach 10 min)

$\text{C}_{51}\text{H}_{56}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{15}$ ($M = 974.99$ g/mol) [974.36]

ESI-MS (positiv), m/z : 975.39 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 975.37), 997.37 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 997.35).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 997.3524 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 997.3547).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , COSY), δ (ppm): 12.94 (bs, 1 H, COOH), 7.91 (d, 2 H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.73 (d, 2 H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = J_{\text{H}_8, \text{H}_7} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.49–7.23 (m, 16 H, 2-H-, 3-H-, 6-H-7-H-Fmoc, H_{Ar} , NH (GalNAc), NH (Fmoc)), 5.32 (d, 1 H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = 3.1$ Hz, 4-H), 4.79 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.6$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.75 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 12.4$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.70 (d, 1 H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 4.0$ Hz, 1-H), 4.68–4.62 (m, 2 H, 1'-H {4.66}, CH_2 (Bn) {4.65}), 4.56 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 11.6$ Hz, CH_2 (Bn)), 4.51 (d, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}} = 6.5$ Hz, CH_2 (Fmoc)), 4.46 (d, 1 H, $J_{\text{H}_6' \text{a}, \text{H}_5'} = 6.0$ Hz, 6'a-H), 4.37–4.23 (m, 3 H, 6'a-H {4.35, d, $J_{\text{H}_6' \text{b}, \text{H}_5'} = 6.0$ Hz}, CH (Fmoc) {4.31}, T^β {4.26}), 4.28–3.80 (m, 1 H, 2'-H),

4.20-4.03 (m, 5 H, 2-H {4.18}, T^α {4.13}, 5-H {4.10}, 4'-H {4.08}, 6a-H {4.06}), 3.90-3.72 (m, 4 H, 3-H {3.88}, 5'-H {3.86}, 6b-H {3.82}, 3'-H {3.74}), 2.02, 2.01 (2 x s, 6 H, CH₃ (Ac)), 1.80 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.11 (d, 3 H, $J_{T^{\gamma},T^{\beta}} = 6.4$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, DEPT, HMQC), δ (ppm): 170.9, 169.8 (4 x C=O (Ac, Carboxyl, NHAc)), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.8 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.4, 138.2 (C_q (Bn)), 129.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.3, 127.7, 127.6, 127.5, 127.1 (C_{Ar} (Bn), C3-, C6-Fmoc, C2-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 100.9 (d, $J_{C1',F2} = 23.9$ Hz, C1'), 99.3 (C1), 90.6 (d, $J_{C2',F2} = 183.5$ Hz, C2'), 81.6 (d, $J_{C6',F6} = 165.5$ Hz, C6'), 78.8 (d, $J_{C3',F2} = 18.3$ Hz, C3'), 75.1 (T^β), 74.9 (C3), 73.9 (CH₂ (Bn)), 73.4 (C5), 72.2 (d, $J_{C5',F6} = 23.7$ Hz, C5'), 71.0 (CH₂ (Bn)), 69.6 (C4), 67.3 (C4'), 65.4 (CH₂ (Fmoc)), 63.0 (C6), 58.5 (T^α), 47.7 (C2), 46.8 (CH (Fmoc)), 22.7 (CH₃ (NHAc)), 20.7, 20.5 (CH₃ (Ac)), 18.5 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, DMSO-d₆), δ (ppm): - 204.5 (d, $J_{F2,H2} = 52.7$ Hz, $J_{F2,H3} = 12.7$ Hz, 2-F), - 227.9 (dt, $J_{F6,H6a/b} = 46.9$ Hz, $J_{F6,H5} = 12.3$ Hz, 6-F).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[4-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-6-desoxy-6-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin (86a)**

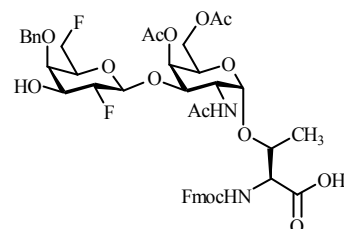
(Fmoc-Thr(β4-*O*-BnGal2,6F₂-(1→3)-αAc₂GalNAc)-OH)

$[\alpha]_D^{23} = + 73.7$ (c = 1.00, CHCl₃)

ESI-MS (positiv), *m/z*: 885.35 ([M+H]⁺, ber.: 885.35), 907.33 ([M+Na]⁺, ber.: 907.31).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 907.3097 ([M+Na]⁺, ber.: 907.3077).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY), δ (ppm): 12.94 (bs, 1 H, COOH), 7.91 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.73 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.47-7.26 (m, 11 H, 2-H-, 3-H-, 6-H-, 7-H-Fmoc, H_{Ar}, NH (GalNAc), NH (Fmoc)), 5.33 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 3.2$ Hz, 4-H), 4.71 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, 1-H), 4.69 (d, 1 H, $J_{CH2,CH2} = 11.6$ Hz, CH₂ (Bn)), 4.62 (dd, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.6$ Hz, $J_{H1',F2} = 3.7$ Hz, 1'-H), 4.61-4.46 (m, 1 H, 6'a-H), 4.53-4.44 (m, 3 H, CH₂ (Bn) {4.51}, CH₂ (Fmoc) {4.50}), 4.48-4.33 (m, 1 H, 6'b-H), 4.31 (t, 1 H, $J_{CH,CH2} = 8.5$ Hz, CH (Fmoc)), 4.33-4.15 (m, 1 H, 2'-H), 4.22-4.02 (m, 5 H, T^β {4.25}, 2-H {4.19}, T^α {4.14}, 6a-H {4.07}, 4'-H {4.04}), 3.90-3.72



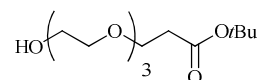
(m, 3 H, 3-H {3.87}, 6b-H {3.83}, 5'-H {3.75}), 3.58-3.49 (m, 1 H, 3'-H), 2.06, 1.99 (2 x s, 6 H, CH₃ (Ac)), 1.80 (s, 3 H, CH₃ (AcNH)), 1.11 (d, 3 H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, DEPT, HMQC), δ (ppm): 171.7, 170.1, 169.8, 169.1 (4 x C=O (Ac, Carboxyl, NHAc)), 156.9 (C=O (Urethan)), 143.8, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 140.8, 140.8 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.3 (C_q (Bn)), 128.2, 127.7, 127.7, 127.5, 127.5, 127.1 (C_{Ar} (Bn), C3-, C6-Fmoc, C2-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 101.2 (d, $J_{C1', F2} = 23.2$ Hz, C1'), 99.3 (C1), 90.2 (d, $J_{C2', F2} = 182.8$ Hz, C2'), 82.0 (d, $J_{C6', F6} = 164.8$ Hz, C6'), 78.1 (d, $J_{C3', F2} = 15.8$ Hz, C3'), 75.1 (T^β), 74.9 (C3), 72.7 (d, $J_{C5', F6} = 22.4$ Hz, C5'), 69.8 (C4), 69.7 (CH₂ (Bn)), 67.4 (C5), 65.4 (CH₂ (Fmoc)), 64.7 (C4'), 63.1 (C6), 58.5 (T^α), 47.8 (C2), 46.8 (CH (Fmoc)), 22.7 (CH₃ (NHAc)), 20.8, 20.5 (CH₃ (Ac)), 18.5 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, DMSO-d₆), δ (ppm): - 205.1 (dd, $J_{F2, H2} = 52.5$ Hz, $J_{F2, H3} = 13.7$ Hz, 2-F), - 228.5 (dt, $J_{F6, H6a/b} = 46.9$ Hz, $J_{F6, H5} = 13.0$ Hz, 6-F).

12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (89)^[220,259]

(HO-PEG-*Or*Bu)



Es wurden 32.0 mL (239.0 mmol) wasserfreies Triethylenglykol zu 130 mL absol. THF gegeben und mit 0.35 g (0.02 mmol) Natrium versetzt. Nachdem das Natrium vollständig gelöst war, wurden 12.0 mL (83.30 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zugesetzt und die Reaktionsmischung wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 1 mL verd. Salzsäure (1 M) neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde in 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 70 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit jeweils 50 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Durch anschließende Trocknung am Hochvakuum wurde eine farblose Flüssigkeit erhalten, die ohne Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

Ausbeute: 14.59 g (63%, 52.40 mmol), farblose Flüssigkeit

$R_f = 0.36$ (EtOAc)

C₁₃H₂₆O₆ (M = 278.34 g/mol) [278.17]

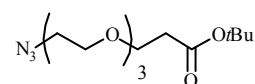
ESI-MS (positiv), m/z : 301.15 ([M+Na]⁺, ber.: 301.16), 317.14 ([M+K]⁺, ber.: 317.27).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 3.73-3.66 (m, 4 H, 3a/b-H, 14a/b-H), 3.64-3.56 (m, 10 H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H), 2.65 (bs, OH), 2.48 (t, 1 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 6.6$ Hz, 2a/b-H), 1.42 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[286]

12-Azido-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester (90)^[259]

(N_3 -PEG-*OBu*)



Es wurden 14.50 g (52.10 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**89**) in 20 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 18.0 mL (130.0 mmol) Triethylamin versetzt. Unter Eisbadkühlung wurden anschließend langsam 8.2 mL (107.0 mmol) Methansulfonsäurechlorid zugetropft und die Reaktionslösung wurde 2 d gerührt. Das gebildete Triethylammoniumhydrochlorid wurde durch *Hyflo* abfiltriert und der Rückstand wurde mit 100 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 40 mL Eiswasser und einmal mit 40 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde in 20 mL absol. DMF aufgenommen und mit 22.3 g (0.34 mol) Natriumazid versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 60 °C erhitzt und 15 h bei dieser Temperatur gehalten. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand wurde viermal mit jeweils 50 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) erhalten.

Ausbeute: 9.08 g (58%, 29.94 mmol), farbloses Öl

$R_f = 0.34$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1)

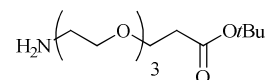
$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$ (M = 303.36 g/mol) [303.18]

ESI-MS (positiv), m/z : 326.18 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 326.20).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.76-3.62 (m, 12 H, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H), 3.38 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 5.1$ Hz, 12a/b-H), 2.49 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 6.6$ Hz, 2a/b-H), 1.44 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.9 (C=O), 80.5 (C_q (*t*Bu)), 70.7, 70.6, 70.6, 70.4 (C5, C6, C8, C9), 70.0 (C11), 66.9 (C3), 50.7 (C12), 36.2 (C2), 28.1 (CH_3 (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

12-Amino-4,7,10-trioxadecansäure-*tert*-butylester (91)^[259]**(H₂N-PEG-*Or*Bu)**

Eine Suspension von 8.0 g Raney-Nickel wurde mehrmals mit dest. Wasser und Isopropanol gewaschen. Anschließend der Katalysator in 10 mL Isopropanol aufgenommen und mit 9.08 g (29.94 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**90**), gelöst in 100 mL Isopropanol, versetzt. Durch Anlegen eines Vakuums und Belüften mit Argon wurde die Reaktionsmischung von Sauerstoff befreit und anschließend wurde die Argonatmosphäre durch eine Wasserstoffatmosphäre ausgetauscht. Die Suspension wurde 18 h bei Raumtemp. gerührt, durch Celite filtriert und das Filtrat wurde i. Vak. eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 8.30 g (quant., 29.90 mmol), blassgelbes Öl

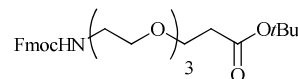
$R_f = 0.12$ (Et₂O/MeOH, 1:1)

C₁₃H₂₇NO₅ (M = 277.36 g/mol) [277.19]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.72-3.62 (m, 12 H, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H), 3.38 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 5.0$ Hz, 12a/b-H), 2.49 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 6.6$ Hz, 2a/b-H), 1.43 (s, 9 H, CH₃ (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.9 (C=O), 80.5 (C_q (*t*Bu)), 73.5 (C11), 70.7, 70.6, 70.6, 70.5 (C5, C6, C8, C9), 66.9 (C3), 41.8 (C12), 36.2 (C2), 28.1 (CH₃ (*t*Bu)).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadecansäure-*tert*-butylester (92)**^[259]**(Fmoc-PEG-*Or*Bu)**

Zu einer Lösung von 8.00 g (28.84 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxa-decansäure-*tert*-butylester (**91**) in 400 mL einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) werden 2.50 g (29.75 mmol) Natriumhydrogencarbonat gegeben, bevor die Reaktionsmischung portionsweise mit 10.70 g (31.10 mmol) Fmoc-OSu versetzt und 20 h stark gerührt wurde. Anschließend wurde die Lösung mit verd. Salzsäure (2 M) auf einen pH-Wert von 6 angesäuert, wobei sich das Produkt als gelbliches Öl abschied. Das Aceton wurde i. Vak. abdestilliert und das Produkt wurde viermal mit jeweils 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen wurden einmal mit 150 mL einer verd. Salzsäure (1 M) und mit 150 mL dest. Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 10.31 g (71%, 20.64 mmol), farbloses Öl

$R_f = 0.28$ (^cHex/EtOAc, 1:1)

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

ESI-MS (positiv), m/z : 522.12 ($[M+Na]^+$, ber.: 522.25).

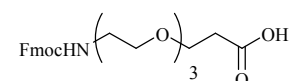
¹H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.76 (d, 2 H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2 H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.1$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.31 (t, 2 H, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 4.40 (d, 2 H, $J_{CH_2,CH} = 6.8$ Hz, CH_2 (Fmoc)), 4.22 (t, 1 H, $J_{CH,CH_2} = 6.9$ Hz, CH (Fmoc)), 3.69 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz, 11a/b-H), 3.66–3.53 (m, 10 H, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H), 3.40 (dd, 2 H, $J_{CH,CH_2} = 5.5$ Hz, $J_{CH,CH_2} = 10.4$ Hz, 12a/b-H), 2.49 (t, 2 H, $J_{CH_2,CH_2} = 6.6$ Hz, 2a/b-H), 1.43 (s, 9 H, CH_3 (*t*Bu)).

¹³C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 171.0 (C=O (Ester)), 156.5 (C=O (Urethan)), 144.0 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.6, 127.0 (C6-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 80.5 (C_q (*t*Bu)), 77.2 (C11), 70.5, 70.5, 70.4, 70.0 (C5, C6, C8, C9), 66.9 (C3), 66.5 (CH_2 (Fmoc)), 47.2 (CH (Fmoc)), 40.9 (C12), 36.2 (C2), 28.1 (CH_3 (*t*Bu))).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxadecansäure (93)**^[259]

(Fmoc-PEG-OH)



Es wurden 10.23 g (20.48 mmol) *N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**92**) 3 h in einer Mischung aus 80 mL TFA und 8 mL Wasser bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 80 mL Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wurde viermal mit jeweils 50 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($CH_2Cl_2/MeOH/HOAc$, 40:1:0.5) gereinigt.

Ausbeute: 10.0 g (quant., 22.74 mmol), blassgelbes Öl

$R_f = 0.25$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$, 40:1:0.5)

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ ($M = 443.49$ g/mol) [443.19]

ESI-MS (positiv), m/z : 466.18 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 466.18), 482.17 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 482.29).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.76 (d, 2 H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2 H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.5$ Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2 H, $J_{\text{H3,H2/H4}} = J_{\text{H6,H5/H7}} = 7.2$ Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35 (t, 2 H, $J_{\text{H2,H1/H3}} = J_{\text{H7,H6/H8}} = 7.4$ Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 4.41 (d, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.0$ Hz, CH_2 (Fmoc)), 4.22 (t, 1 H, $J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 6.6$ Hz, CH (Fmoc)), 3.73 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.2$ Hz, 11a/b-H), 3.68–3.51 (m, 10 H, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H), 3.47–3.28 (m, 2 H, 12a/b-H), 2.60 (t, 2 H, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6.1$ Hz, 2a/b-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 175.4 (C=O), 156.6 (C=O (Urethan)), 144.0 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.6, 127.0 (C6-, C7-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 77.2 (C11), 70.5, 70.3, 70.2, 70.1 (C5, C6, C8, C9), 66.5 (C3), 66.3 (CH_2 (Fmoc)), 47.3 (CH (Fmoc)), 40.9 (C12), 34.7 (C2).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[287]

5.5 Festphasensynthesen zu Kapitel 3.3.3 und 3.3.4

Allgemeines Protokoll der automatisierten Glycopeptid-Festphasensynthese

Die automatisierten Peptidsynthesen wurden in einem *Perkin-Elmer* ABI 433A Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems durchgeführt (Standardprogramm Fastmoc 0.1 mmol). Zur Glycopeptidsynthese wurden Fmoc-Prolin vorbeladene TentaGel-Harze, wie Fmoc-Pro-*O*-Trt TentaGel R- bzw. TentaGel S-Harz, sowie ein Polystyrol-2-Chlor-Fmoc-Pro-*O*-Trt Harz (*Rapp Polymere* Tübingen) verwendet. Die für die Kupplung verwendeten Aminosäuren, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Asp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH und Fmoc-Val-OH wurden von der *Fa. Orpegen Pharma*, Heidelberg, bezogen. Die Abspaltung der temporären Fmoc-Schutzgruppe erfolgte in sich wiederholenden Syntheseyklen durch Behandlung (3 x 2.5 min) des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin (NMP). Durch die Messung der Leitfähigkeit des gebildeten Dibenzofulven/Piperidin-Addukts in NMP wird mittels integrierter Leitfähigkeitsdetektors der Syntheseverlauf verfolgt. Ebenso wurde die UV-Absorption des Adduktes mit einem externen Perkin-Elmer Series 200 UV/Vis Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm bestimmt. Die Kupplungen der Aminosäuren erfolgten jeweils in einer Lösung aus 1.00 mmol (oder 10 mmol bezogen auf die Beladung des Harzes) der Fmoc-geschützten Aminosäure-Bausteine, 1.00 mmol 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorophosphat (HBTU), 1.00 mmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 2.00 mmol *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) in DMF unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min). Nicht umgesetzte Aminosäuren wurden nach jedem Kupplungsschritt durch Behandlung mit einer Lösung aus Acetanhydrid (0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBt (0.015 M) in NMP (*Capping*-Reagenz) acetyliert. Nach jedem Teilschritt wurde das Harz gründlich mit NMP gespült. Die Kupplung der glycosylierten Threonin-Bausteine wurde unter Verwendung von HATU (1.1 Äquiv. bezogen auf die eingesetzte Glycosylaminosäure), HOAt (1.1 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (2.2 Äquiv.) zur Aktivierung durchgeführt. Die Kupplungszeit betrug 8 h (mit Intervallen von jeweils 30 s Vortex und 30 s Stillstand). Die weiteren Aminosäuren wurden nach dem Standardprotokoll gekuppelt. Wurde die Aminosäuresequenz nicht durch einen Triethylenglycolspacers verlängert, so wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten und das freie Amin mit *Capping*-

Reagenz acetyliert. Die Anbindung des Triethylenglycolspacer **93** (1.00 mmol, 10 Äquiv.) wurde, wenn nicht anders angegeben mit den Kupplungsreagenzien HBTU (1.00 mmol), HOBt (1.00 mmol) und DIPEA (2.00 mmol) in DMF durchgeführt (Vortex, 20-30 min). Die terminale Fmoc-Schutzgruppe des Triethylenglycolspacers wurde durch Behandlung des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten, um das freie Amin zu erhalten. Nach Beendigung der Synthese wurde noch zusätzlich mit Dichlormethan gewaschen und in einem Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Abspaltung des Glycopeptids vom Harz und der gleichzeitigen Abspaltung der säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen wurde das Harz in einen Festphasenreaktor nach *Merrifield* überführt und 3 h mit einer Mischung aus 10 mL Dichlormethan, 10 mL TFA, 0.5 mL Triisopropylsilan und 0.5 mL Wasser geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren wurde das Harz dreimal mit jeweils 5 mL TFA und dreimal mit jeweils 5 mL Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden i. Vak. eingeengt und fünfmal mit jeweils 30 mL Toluol kdestilliert. Der Rückstand wurde in 20 mL Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

5.5.1 Synthese der unfluorierten Glycopeptide

N-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (94)^[222]

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Festphasen-Glycopeptidsynthese wurde ausgehend von 588.0 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-*O*-Trt beladenen TentaGel R-Harzes (Rapp Polymere, Beladung: 0.17 mmol/g) im Peptidesynthesizer nach dem Standardprotokoll (siehe Seite 204) durchgeführt. Die Anbindung von 240.0 mg (0.250 mmol) der glycosylierten Aminosäure 17 erfolgte halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidesynthesizers.

Das Lyophilisat wurde durch semipräparative HPLC (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90) \rightarrow (100:0) in 40 min, R_t = 24.52 min) gereinigt.

Ausbeute: 95.0 mg (37% bezogen auf die Beladung des Harzes, 0.373 mmol), farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = -88.0$ (c = 1.00, H₂O)

Analytische RP-HPLC: R_t = 20.11 min (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90) \rightarrow (100:0) in 40 min).

C₁₀₈H₁₆₄N₂₆O₄₅ (M = 2546.61 g/mol) [2545.13]

ESI-MS (positiv), m/z : 1273.59 ([M+2H]²⁺, ber.: 1273.58), 1285.10 ([M+2H+Na]²⁺, ber.: 1285.07), 2546.19 ([M+H]⁺, ber.: 2546.14).

MALDI-MS (DHB, positiv), m/z : 2547.98 ([M+H]⁺, ber.: 2547.62).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC), δ (ppm): 8.59 (d, 1 H, $J_{H\epsilon, H\delta} = 1.3$ Hz, H ϵ), 7.28 (s, 1 H, H δ), 5.44 (d, 1 H, $J_{H4, H3} = 2.1$ Hz, 4-H), 5.38 (d, 1 H, $J_{H4', H3'} = 2.1$ Hz, 4'-H), 5.13 (dd, 1 H, $J_{H3', H2'} = 10.2$ Hz, $J_{H3', H4'} = 3.4$ Hz, 3'-H), 4.99-4.91 (m, 2 H, 2'-H {dd, $J_{H2', H3'} = 10.0$ Hz, $J_{H2', H1'} = 8.1$ Hz}, 1-H {4.93}), 4.85 (d, 1 H, $J_{H1', H2'} = 8.1$ Hz, 1'-H), 4.69 (dd, 1 H, $J_{D\alpha, D\beta a} = 12.6$ Hz, $J_{D\alpha, D\beta b} = 6.0$ Hz, D α), 4.66 (dd, 1 H, $J_{H\alpha, H\beta a} = 8.7$ Hz, $J_{H\alpha, H\beta b} = 5.4$ Hz, H α), 4.63-4.40 (m, 7 H, T α^* {4.62}, R α {4.61}, A₍₂₋₄₎ α {4.56, 4.52, 4.44}, S₁ α {4.48, t, $J_{S1\alpha, S1\beta}$

= 5.4 Hz}, S_2^α {4.43}), 4.39-4.08 (m, 19 H, 5'-H {4.34}, $P_{(1-5)}^\alpha$ {4.37, 4.35, 4.31}, $T_{(1,2)}^\alpha$ {4.31}, $T^{\beta*}$ {4.31}, V^α {4.27}, 2-H {4.25}, A_1^α {4.23}, 6'a-H {4.19}, 3-H {4.17}, $T_{(1,2)}^\beta$ {4.18, 4.16}, 6'a/b-H {4.14}, 5-H {4.12}), 4.02 (dd, 1 H, $J_{H6'b,H6'a} = 11.6$ Hz, $J_{H6'b,H5'}$ = 7.7 Hz, 6'-b), 3.97-3.39 (m, 20 H, G_1^α {3.95}, G_2^α {3.92}, S_1^β {3.86}, $P_{(1-5)}^\delta$ {3.78, 3.76, 3.63, 3.59, 3.56/3.46}, S_2^β {3.77}), 3.28 (dd, 1 H, $J_{H\beta a,H\beta b} = 16.1$ Hz, $J_{H\beta a,H\alpha} = 5.0$ Hz, $H^{\beta a}$), 3.21-3.11 (m, 3 H, $H^{\beta b}$ {3.18}, R^δ {3.17}), 2.97-2.81 (m, 2 H, D^β), 2.35-2.18 (m, 4 H, $P_{(1,2)}^\beta$ {2.29, 2.22}), 2.17-2.10 (m, 6 H, CH_3 (Ac)), 2.09-1.76 (m, 35 H, 4 x CH_3 (Ac), $P_{(1-5)}^\gamma$ {2.05, 2.00, 1.92}, V^β {2.05}, $P_{(3-5)}^\beta$ {2.00, 1.90, 1.84}, CH_3 (NHAc) {1.97, 1.90}, $R^{\beta a}$ {1.79}), 1.75-1.57 (m, 3 H, $R^{\beta b}$ {1.68}, R^γ {1.63}), 1.34 (d, 3 H, $J_{A4\beta,A4\alpha} = 7.4$ Hz, A_4^β), 1.32 (d, 6 H, $J_{A2/3\beta,A2/3\alpha} = 7.2$ Hz, $A_{(2,3)}^\beta$), 1.28 (d, 3 H, $J_{A1\beta,A1\alpha} = 7.4$ Hz, A_1^β), 1.22 (d, 3 H, $J_{T\gamma^*,T\beta^*} = 6.3$ Hz, T^{γ^*}), 1.16 (d, 3 H, $J_{T2\gamma,T2\beta} = 6.5$ Hz, T_2^γ), 1.14 (d, 3 H, $J_{T1\gamma,T1\beta} = 6.5$ Hz, T_1^γ), 0.93 (d, 3 H, $J_{V\gamma a,V\beta} = 6.6$ Hz, $V^{\gamma a}$), 0.92 (d, 3 H, $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.6$ Hz, $V^{\gamma b}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , HMQC), δ (ppm): 175.5, 174.9, 174.9, 174.4, 173.9, 173.7, 173.4, 173.4, 173.3, 173.1, 172.6, 172.4, 172.0, 171.1, 170.9, 170.7 (29 x C=O (Carboxyl, NAc, NHAc, Ac)), 156.6 (C=NH (Arg)), 133.4 (H^ϵ), 128.4 (H^γ), 117.2 (H^δ), 100.5 (C1), 98.9 (C1'), 77.2 ($T^{\beta*}$), 74.4 (C3), 71.0 (C3'), 70.2 (C5'), 70.2 (C4), 69.2 (C2'), 67.9 (C4'), 67.4 (C5), 67.0 ($T_{(1,2)}^\beta$), 63.3 (C6'), 61.6 (C6), 61.3, 61.1 ($S_{(1,2)}^\beta$), 61.0, 60.8, 60.5, 60.0, 60.0 ($P_{(1-5)}^\alpha$), 59.4 (V^α), 59.3, 58.9 ($T_{(1,2)}^\alpha$), 56.8 ($T^{\alpha*}$), 55.5 (S_1^α), 54.9 (S_2^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.0 (D^α), 49.6 (A_1^α), 48.7 (C2), 47.8, 47.8, 47.7, 47.6, 47.6, 47.4 ($P_{(1-5)}^\delta$), ($A_{(2-4)}^\alpha$), 42.4 ($G_{(1,2)}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 34.9 (D^β), 30.1 (V^β), 29.8, 29.3, 29.3, 29.1, 28.7 ($P_{(1-5)}^\beta$), 27.4 (R^β), 26.1 (H^β), 24.7, 24.6, 24.6, 24.5, 24.3 ($P_{(1-5)}^\gamma$), 23.9 (R^γ), 22.5, 22.2 (CH_3 (NHAc)), 20.3, 20.2, 20.1, 20.1, 19.9 (CH_3 (Ac)), 18.8, 18.7 ($T_{(1,2)}^\gamma$), 18.4 ($V^{\gamma b}$), 18.2 ($V^{\gamma a}$), 17.9 ($T^{\gamma*}$), 16.1 ($A_{(1)}^\beta$), 15.1, 15.1 ($A_{(2-4)}^\beta$).

***N*-Acetyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (95)^[222]**

(Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Es wurden 55.0 mg (0.022 mmol) Ac-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Ac₃Gal-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Ala-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **94** wurden in 30 mL absol. Methanol gelöst und durch Zugabe einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) wurde ein pH-Wert von 9.5 eingestellt. Die Lösung wurde 2 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt. Durch Zugabe von drei Tropfen Essigsäure wurde die Lösung neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95) \rightarrow (40:60), 30 min (100:0) nach 10 min, R_t = 17.30 min) gereinigt.

Ausbeute: 40.0 mg (80%, 0.017 mmol), farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = -103.4$ ($c = 1.00$, H₂O)

Analytische RP-HPLC: $R_t = 11.07 + 11.60$ min (Rotamer) (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95) \rightarrow (40:60), 30 min (100:0) nach 10 min)

C₉₆H₁₅₂N₂₆O₃₉ (M = 2294.38 g/mol) [2293.07]

ESI-MS (positiv), m/z : 1147.56 ([M+2H]²⁺, ber.: 1147.54).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2295.01 ([M+H]⁺, ber.: 2295.39), 2316.94 ([M+Na]⁺, ber.: 2317.37).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1147.5471 ([M+2H]²⁺, ber.: 1147.5434).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.60 (d, 1 H, $J_{H\epsilon, H\delta} = 1.3$ Hz, H ϵ), 7.29 (d, 1 H, $J_{H\delta, H\epsilon} = 1.0$ Hz, H δ), 4.92 (d, 1 H, $J_{H1, H2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.75-4.27 (m, 19 H, D $^\alpha$ {4.70}, H $^\alpha$ {4.67, dd, 1 H, $J_{H\alpha, H\beta a} = 7.5$ Hz, $J_{H\alpha, H\beta b} = 4.4$ Hz}, T $^{\alpha*}$ {4.62}, R $^\alpha$ {4.62}, S 1^α {4.50, t, $J_{S1\alpha, S1\beta} = 5.4$ Hz}, A 2^α {4.46}, S 2^α {4.44}, 1'-H {4.40}, P $_{(1-5)}^\alpha$ {4.39, 4.38, 4.31}, V $^\alpha$ {4.30}), 4.26-4.13 (m 5 H, A 1^α {4.23}, T $_{(1,2)}^\beta$ {4.19, 4.18}, 2-H {4.19}, 4-H {4.14}), 4.04-3.54 (m, 26 H, 5-H {4.01}, 3-H {4.00}, G $_{(1,2)}^\alpha$ {3.94}, 4'-H {3.86}, S 1^β {3.86}, S 2^β {3.76}, P $_{(1-5)}^\delta$ {3.79, 3.76, 3.64, 3.58, 3.56}, 5'-H {3.60}, 6a/b-H {3.73}, 6'a/b-H {3.72}, 3'-H {3.57}),

3.47 (dd, 2 H, $J_{H2',H3'} = 9.9$ Hz, $J_{H2',H1'} = 7.7$ Hz, 2'-H, P_1^δ {3.47}), 3.29 (dd, 1 H, $J_{H\beta a,H\beta b} = 15.5$ Hz, $J_{H\beta a,H\alpha} = 5.5$ Hz, $H^{\beta a}$), 3.22-3.12 (m, 3 H, $H^{\beta b}$ {3.18}, R^δ {3.18}), 2.95 (dd, 1 H, $J_{D\beta a,D\beta b} = 17.1$ Hz, $J_{D\beta a,D\alpha} = 6.3$ Hz, $D^{\beta a}$), 2.87 (dd, 1 H, $J_{D\beta b,D\beta a} = 17.1$ Hz, $J_{D\beta b,D\alpha} = 6.8$ Hz, $D^{\beta b}$), 2.35-2.17 (m, 4 H, $P_{(1,2)}^\beta$ {2.28, 2.23}), 2.10-1.78 (m, 24 H, CH_3 (NHAc, NAc) {2.07, 1.98}, V^β {2.06}, $P_{(1-5)}^\gamma$ {2.03, 2.00, 1.96, 1.93}, $P_{(3-5)}^\beta$ {2.00, 1.89, 1.84}, $R^{\beta a}$ {1.80}), 1.75-1.59 (m, 3 H, $R^{\beta b}$ {1.71}, R^γ {1.64}), 1.37-1.32 (m, 9 H, $A_{(2,3)}^\beta$ {1.34, d, $J_{A2,3\beta,A2,3\alpha} = 7.1$ Hz, $A_{(2,3)}^\beta$, A_4^β), 1.30 (d, 3 H, $J_{A1\beta,A1\alpha} = 7.3$ Hz, A_1^β), 1.24 (d, 3 H, $J_{T\gamma^*,T\beta^*} = 6.3$ Hz, T^{γ^*}), 1.18 (d, 3 H, $J_{T2\gamma,T2\beta} = 6.5$ Hz, T_2^γ), 1.15 (d, 3 H, $J_{T1\gamma,T1\beta} = 6.4$ Hz, T_1^γ), 0.95 (d, 3 H, $J_{V\gamma a,V\beta} = 7.1$ Hz, $V^{\gamma a}$), 0.93 (d, 3 H, $J_{V\gamma b,V\beta} = 7.0$ Hz, $V^{\gamma b}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , HMQC), δ (ppm): 175.8, 174.9, 174.9, 174.5, 174.0, 173.9, 173.7, 173.6, 173.5, 173.1, 172.7, 172.5, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 170.7 (23 x C=O (Carboxyl, NAc, NHAc)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.4 (H^ϵ), 128.4 (H^γ), 117.2 (H^δ), 104.6 ($C1'$), 99.1 ($C1$), 77.1 ($C3$), 76.9 (T^{β^*}), 75.0 ($C5'$), 72.5 ($C3'$), 70.9 ($C5$), 70.6 ($C2'$), 68.9 ($C4$), 68.5 ($C4'$), 67.0 ($T_{(1,2)}^\beta$), 61.4, 61.3 ($S_{(1,2)}^\beta$), 61.1, 61.0, 60.8, 60.5, 60.1, 59.9 ($C6$, $C6'$, $P_{(1-5)}^\alpha$), 59.3 (V^α), 58.9 (T_2^α), 58.8 (T_1^α), 57.0 (T^{α^*}), 55.5 (S_1^α), 55.0 (S_2^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6 (A_1^α), 48.3 ($C2$), 47.8, 47.7, 47.7, 47.4, 47.1 ($P_{(1-5)}^\delta$, $A_{(2-4)}^\alpha$), 42.4 ($G_{(1,2)}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 34.9 (D^β), 30.2 (V^β), 29.9, 29.3, 29.3, 29.2, 28.7 ($P_{(1-5)}^\beta$), 27.4 (R^β), 26.1 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 ($P_{(1-5)}^\gamma$), 24.0 (R^γ), 22.3, 21.4 (CH_3 (NHAc, NAc)), 18.8, 18.7 ($T_{(1,2)}^\gamma$), 18.5, 18.3 ($V^{\gamma\alpha b}$), 17.8 (T^{γ^*}), 16.2 ($A_{(1)}^\beta$), 15.2, 15.2, 15.1 ($A_{(2-4)}^\beta$).

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl}}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (96)^[240]

($H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CONH$ -Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Ac₄Gal-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Festphasen-Glycopeptidsynthese wurde ausgehend von 238.0 mg (0.05 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt beladenen TentaGel S-Harzes (Rapp Polymere,

Beladung: 0.21 mmol/g) im Peptidesynthesizer nach dem Standardprotokoll (siehe Seite 204) durchgeführt. Die Anbindung von 120.0 mg (0.125 mmol) der glycosylierten Aminosäure Fmoc-Thr(β Ac₄Gal-(1→3)- α Ac₂GalNAc)-OH **17** erfolgte halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0) in 60 min, R_t = 31.78 min) gereinigt.

Ausbeute: 33.0 mg (24% bezogen auf die Beladung des Harzes, 0.012 mmol), farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = -63.2 \text{ (c = 1.00, H}_2\text{O)}$$

Analytische RP-HPLC: R_t = 19.13 min (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0) in 40 min).

C₁₁₅H₁₇₉N₂₇O₄₈ (M = 2707.80 g/mol) [2706.24]

ESI-MS (positiv), m/z : 902.75 ([M+3H]³⁺, ber.: 902.75), 1354.16 ([M+2H]²⁺, ber.: 1354.13).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1354.1218 ([M+2H]²⁺, ber.: 1354.1277).

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl}}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (98**)**

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1→3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Es wurden 33.0 mg (0.012 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(Ac₄Gal-(1→3)-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **96** in 50 mL absol. Methanol gelöst und durch Zugabe einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) ein pH-Wert von 10 eingestellt. Die Lösung wurde 2 d bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt (Reaktionskontrolle durch RP-HPLC). Durch Zugabe von drei Tropfen Essigsäure wurde die Lösung neutralisiert und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch semipräparative HPLC (Phenomenex Luna C18(2), λ = 210 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(60:40), 30 min (100:0) nach 10 min, R_t = 17.17 min) gereinigt.

Ausbeute: 17.0 mg (57%, 0.007 mmol), farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = -104.9 \text{ (c = 1.00, H}_2\text{O)}$$

Analytische RP-HPLC: $R_t = 11.26$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 210$ nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(60:40), 60 min (100:0) nach 40 min)

C₁₀₃H₁₆₇N₂₇O₄₂ (M = 2455.58 g/mol) [2454.18]

ESI-MS (positiv), m/z : 819.09 ([M+3H]³⁺, ber.: 819.07), 1228.15 ([M+2H]²⁺, ber.: 1228.10).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2455.87 ([M+H]⁺, ber.: 2456.59).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1228.0923 ([M+2H]²⁺, ber.: 1228.0960).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, NOESY, TOCSY), δ (ppm): 8.60 (d, 1 H, $J_{\text{H}\epsilon, \text{H}\delta} = 1.4$ Hz, H ^{ϵ}), 7.30 (d, 1 H, $J_{\text{H}\delta, \text{H}\epsilon} = 1.2$ Hz, H ^{δ}), 4.93 (d, 1 H, $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.75-4.28 (m, 19 H, D ^{α} {4.70}, H ^{α} {4.70, dd, 1 H, $J_{\text{H}\alpha, \text{H}\beta\alpha} = 11.2$ Hz, $J_{\text{H}\alpha, \text{H}\beta\beta} = 4.6$ Hz}, T ^{$\alpha*$} {4.64}, R ^{α} {4.62}, A_(3,4) ^{α} {4.57, 4.52}, S₁ ^{α} {4.51, t, $J_{\text{S}1\alpha, \text{S}1\beta} = 5.4$ Hz}, A₂ ^{α} {4.47}, S₂ ^{α} {4.44}, 1'-H {4.42}, P₍₁₋₅₎ ^{α} {4.39, 4.38, 4.35}, T₁ ^{α} {4.35}, T ^{$\beta*$} {4.32}, T₂ ^{α} {4.30}, V ^{α} {4.30}), 4.27-4.14 (m, 5 H, A₁ ^{α} {4.23}, T_(1,2) ^{β} {4.20, 4.19}, 2-H {4.20}, 4-H {4.16}), 4.05-3.55 (m, 38 H, 5-H {4.03}, 3-H {4.01}, G_(1,2) ^{α} {3.95}, S₁ ^{β} {3.88}, 4'-H {3.86}, 6a/b-H {3.80}, S₂ ^{β} {3.76}, P₍₁₋₅₎ ^{δ} {3.81, 3.78, 3.66, 3.64, 3.58}, 6'a/b-H {3.76}, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H (Spacer) {3.76, 3.73, 3.68, 3.64}, 5'-H {3.61}, 3'-H {3.58}), 3.47 (dd, 2 H, $J_{\text{H}2', \text{H}3'} = 9.9$ Hz, $J_{\text{H}2', \text{H}1'} = 7.7$ Hz, 2'-H, P₁ ^{δ} {3.50}), 3.29 (dd, 1 H, $J_{\text{H}\beta\alpha, \text{H}\beta\beta} = 15.5$ Hz, $J_{\text{H}\beta\alpha, \text{H}\alpha} = 5.5$ Hz, H ^{$\beta\alpha$}), 3.22-3.13 (m, 5 H, R ^{δ} {3.19}, 12a/b-H (Spacer) {3.19}, H ^{$\beta\beta$} {3.18}), 2.94 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\alpha, \text{D}\beta\beta} = 17.0$ Hz, $J_{\text{D}\beta\alpha, \text{D}\alpha} = 6.5$ Hz, D ^{$\beta\alpha$}), 2.85 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\beta, \text{D}\beta\alpha} = 17.1$ Hz, $J_{\text{D}\beta\beta, \text{D}\alpha} = 6.9$ Hz, D ^{$\beta\beta$}), 2.75 (dt, 1 H, $J_{\text{CH}2\text{a}, \text{CH}2\text{b}} = 16.2$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{a}, \text{CH}2} = 6.5$ Hz, 2a-H (Spacer)), 2.64 (dt, 1 H, $J_{\text{CH}2\text{b}, \text{CH}2\text{a}} = 16.2$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{b}, \text{CH}2} = 5.9$ Hz, 2b-H (Spacer)), 2.35-2.18 (m, 4 H, P_(1,2) ^{β} {2.30, 2.23}), 2.11-1.78 (m, 21 H, V ^{β} {2.08}, P₍₁₋₅₎ ^{γ} {2.05, 2.02, 1.98, 1.95}, P₍₃₋₅₎ ^{β} {1.99, 1.92, 1.84}, CH₃ (NHAc) {1.98}, R ^{$\beta\alpha$} {1.82}), 1.75-1.60 (m, 3 H, R ^{$\beta\beta$} {1.73}, R ^{γ} {1.65}), 1.38-1.33 (m, 9 H, A_(2,3) ^{β} {1.35, d, $J_{\text{A}2, \text{3}\beta, \text{A}2, \text{3}\alpha} = 7.1$ Hz, A_(2,3) ^{β} , A₄ ^{β}), 1.31 (d, 3 H, $J_{\text{A}1\beta, \text{A}1\alpha} = 7.2$ Hz, A₁ ^{β}), 1.25 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma^*, \text{T}\beta^*} = 6.3$ Hz, T ^{$\gamma*$}), 1.18 (d, 3 H, $J_{\text{T}2\gamma, \text{T}2\beta} = 6.5$ Hz, T₂ ^{γ}), 1.16 (d, 3 H, $J_{\text{T}1\gamma, \text{T}1\beta} = 6.5$ Hz, T₁ ^{γ}), 0.96 (d, 3 H, $J_{\text{V}\gamma\alpha, \text{V}\beta} = 7.2$ Hz, V ^{$\gamma\alpha$}), 0.94 (d, 3 H, $J_{\text{V}\gamma\beta, \text{V}\beta} = 7.0$ Hz, V ^{$\gamma\beta$}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, DEPT, HMQC), δ (ppm): 176.2, 174.9, 174.4, 174.2, 173.9, 173.7, 173.6, 173.5, 173.1, 172.6, 172.3, 172.0, 171.9, 171.5, 171.4, 171.2, 171.0, 170.9, 170.7 (23 x C=O (Carboxyl, NHAc)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.4 (H ^{ϵ}), 128.4 (H ^{γ}), 117.3 (H ^{δ}), 104.6 (C1'), 99.1 (C1), 77.0 (C3), 77.0 (T ^{$\beta*$}), 75.0 (C5'), 72.5 (C3'), 70.9 (C5), 70.5 (C2'), 69.6, 69.5, 69.4, 69.4 (C5, C6, C8, C11 (Spacer)), 68.9 (C4), 68.5 (C4'), 67.0 (T_(1,2) ^{β}), 66.3, 66.0 (C3, C9 (Spacer)), 61.4, 61.3 (C6, C6'), 61.1, 61.0 (S_(1,2) ^{β}), 60.8, 60.5, 60.0, 60.0,

59.7 (P₍₁₋₅₎^α), 59.3 (V^α), 58.9 (T₂^α), 58.7 (T₁^α), 57.0 (T^{α*}), 55.5 (S₁^α), 54.9 (S₂^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.2 (D^α), 49.6 (A₁^α), 48.3 (C₂), 48.0, 47.9, 47.8, 47.7 (P₍₂₋₅₎^δ), 47.6, 47.6 (A₍₂₋₄₎^α), 47.4 (P₁^δ), 42.4 (G_(1,2)^α), 40.5 (R^δ), 39.0 (C₁₂ (Spacer)), 35.2 (D^β), 34.0 (C₂ (Spacer)), 30.2 (V^β), 29.6, 29.3, 29.3, 29.2, 28.8 (P₍₁₋₅₎^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P₍₁₋₅₎^γ), 23.9 (R^γ), 22.3 (CH₃ (NHAc)), 18.8, 18.7 (T_(1,2)^γ), 18.5, 18.3 (V^{γa/b}), 17.8 (T^{γ*}), 16.3 (A₁^β), 15.2, 15.1 (A₍₂₋₄₎^β).

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (97)^[114]

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βAc₄Gal-(1→3)-[αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)]-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Festphasen-Glycopeptidsynthese wurde ausgehend von 435.0 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt beladenen TentaGel S-Harzes (Rapp Polymere, Beladung: 0.23 mmol/g) im Peptidesynthesizer nach dem Standardprotokoll (siehe Seite 204) durchgeführt. Die Anbindung von 120.0 mg (0.125 mmol) der glycosylierten Aminosäure Fmoc-Thr(βAc₄Gal-(1→3)-[αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)]-αGalNAc)-OH **30** erfolgte halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch semipräparative HPLC (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0) in 60 min, R_t = 41.33 min) gereinigt.

Ausbeute: 59.0 mg (19%, bezogen auf die Beladung des Harzes 0.019 mmol), farbloses Lyophilisat

C₁₃₇H₂₀₆N₂₈O₅₈ (M = 3173.25 g/mol) [3171.40]

[α]_D²³ = - 86.7 (c = 1.00, H₂O)

Analytische RP-HPLC: R_t = 23.01 min (Phenomenex Jupiter C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90)→(100:0) in 40 min)

ESI-MS (positiv), m/z : 1058.09 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1058.14), 1586.62 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1586.71).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 3172.41 ($[M-H]^+$, ber.: 3172.25).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1586.7123 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1586.7095).

1H -NMR (400 MHz, D_2O , COSY), δ (ppm): 8.58 (d, 1 H, $J_{H6,H8} = 1.3$ Hz, H^6), 7.42 (bs, 5 H, H_{Ar}), 7.26 (s, 1 H, H^8), 5.46 (d, 1 H, $J_{H4',H3'} = 3.3$ Hz, 4'-H), 5.39-5.25 (m, 4 H, CH_2 (Bn) {5.34}, 7''-H {5.33}, 8''-H {5.28}), 5.23 (d, 1 H, $J_{CH_2,CH_2} = 9.6$ Hz, CH_2 (Bn)), 5.20 (dd, 1 H, $J_{H3',H2'} = 10.5$ Hz, $J_{H3',H4'} = 3.2$ Hz, 3'-H), 5.08 (dd, 1 H, $J_{H2',H3'} = 10.1$ Hz, $J_{H2',H1'} = 8.0$ Hz, 2'-H), 4.91-4.82 (m, 3 H, 1'-H {4.88}, 1-H {4.88}, 4''-H {4.83}), 4.74-4.13 (m, 28 H, D^α {4.71, t, $J_{D\alpha,D\beta} = 6.6$ Hz}, H^α {4.64}, $T^{\alpha*}$ {4.63}, R^α {4.62}, $A_{(3,4)}^\alpha$ {4.60}, A_2^α {4.57, q, $J_{A2\alpha,A2\beta} = 7.1$ Hz}, S_1^α {4.51, t, $J_{S1\alpha,S1\beta} = 5.4$ Hz}, S_2^α {4.44}, $P_{(1-5)}^\alpha$ {4.39, 4.36, 4.31}, V^α {4.37}, T_1^α {4.35}, T_2^α {4.30}, 9''-H {4.28, 4.17}, $T^{\beta*}$ {4.26}, 6'a/b-H {4.23, 4.18}, A_1^α {4.21}, $T_{(1,2)}^\beta$ {4.20, 4.18}, 5'-H {4.18}, 6''-H {4.16}, 2-H {4.16}), 4.07-3.54 (m, 35 H, G_1^α {3.97, t, $J_{G1\alpha,G1\beta} = 10.6$ Hz}, G_2^α {3.90}, S_1^β {3.89}, 5''-H {3.87}, 6a-H {3.86}, 3-H {3.85}, 5-H {3.83}, 4-H {3.82}, S_2^β {3.79}, $P_{(1-5)}^\delta$ {3.81, 3.76, 3.65, 3.61, 3.55}, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H (Spacer) {3.75, 3.72, 3.68, 3.65}), 3.40-3.06 (m, 6 H, 6b-H {3.38}, H^{bb} {3.23}, R^δ {3.19}, 12a/b-H (Spacer) {3.18}, H^{ba} {3.11, dd, $J_{H^{ba},H^{bb}} = 15.5$ Hz, $J_{H^{ba},H^\alpha} = 5.5$ Hz}), 2.95 (dd, 1 H, $J_{D^{ba},D^{bb}} = 17.3$ Hz, $J_{D^{ba},D^\alpha} = 6.2$ Hz, D^{ba}), 2.87 (dd, 1 H, $J_{D^{bb},D^{ba}} = 17.1$ Hz, $J_{D^{bb},D^\alpha} = 7.1$ Hz, D^{bb}), 2.74 (dt, 2 H, $J_{CH_2a,CH_2b} = 12.9$ Hz, $J_{CH_2a,CH_2} = 6.2$ Hz, 2a-H (Spacer), 3''- H_{ax} {2.72}), 2.64 (dt, 1 H, $J_{CH_2b,CH_2a} = 11.5$ Hz, $J_{CH_2b,CH_2} = 6.0$ Hz, 2b-H (Spacer)), 2.37-2.21 (m, 4 H, $P_{(1,2)}^\beta$ {2.29, 2.25}), 2.11-1.79 (m, 49 H, CH_3 (Ac) {2.20, 2.12, 2.11, 2.06, 2.02, 2.02, 2.00}, V^β {2.09}, $P_{(1-5)}^\gamma$ {2.04, 1.99, 1.95}, $P_{(3-5)}^\beta$ {2.00, 1.91, 1.84}, CH_3 (NHAc) {2.00, 1.88}, 3''- H_{eq} {1.91}, R^{ba} {1.83}), 1.79-1.59 (m, 3 H, R^{bb} {1.73}, R^γ {1.65}), 1.35 (d, 9 H, $J_{A_2-4\beta,A_2-4\alpha} = 7.1$ Hz, $A_{(2-4)}^\beta$), 1.30 (d, 3 H, $J_{A_1\beta,A_1\alpha} = 7.2$ Hz, A_1^β), 1.22 (d, 3 H, $J_{T\gamma^*,T\beta^*} = 6.0$ Hz, $T^{\gamma*}$), 1.19 (d, 3 H, $J_{T_2\gamma,T_2\beta} = 6.5$ Hz, T_2^γ), 1.16 (d, 3 H, $J_{T_1\gamma,T_1\beta} = 6.4$ Hz, T_1^γ), 0.96 (d, 3 H, $J_{V\gamma a,V\beta} = 6.8$ Hz, $V^{\gamma a}$), 0.94 (d, 3 H, $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.8$ Hz, $V^{\gamma b}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , DEPT), δ (ppm): 133.4 (H^6), 128.9 (C_{Ar}), 128.8 (H^γ), 117.2 (H^8), 101.1 (C1), 99.1 (C1'), 98.9 (C2''), 77.2 ($T^{\beta*}$), 77.1 (C3), 71.8 (C6''), 71.3 (C3'), 70.3 (C5'), 69.6, 69.5, 69.4, 69.4 (C5, C6, C8, C11 (Spacer)), 69.2 (C4, C2', C4''), 68.7 (C5, C8''), 68.3 (CH_2 (Bn)), 67.9 (C4'), 67.4 (C7''), 67.0 ($T_{(1,2)}^\beta$), 66.3, 66.0 (C3, C9 (Spacer)), 64.7 (C6), 61.4, 61.4, 61.3 (C9'', C6', $S_{(1,2)}^\beta$), 60.7, 60.5, 60.0, ($P_{(1-5)}^\alpha$), 59.5 (V^α), 58.8 (T_2^α),

58.7 (T₁^α), 56.8 (T^{α*}), 55.5 (S₁^α), 54.9 (S₂^α), 52.2 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6 (A₁^α), 48.7 (C5''), 48.0, 48.0 (P₍₂₋₅₎^δ), 47.7, 47.6, 47.6 (A₍₂₋₄₎^α), 47.6 (C2), 47.4 (P₁^δ), 42.3 (G_(1,2)^α), 40.5 (R^δ), 39.0 (C12 (Spacer)), 36.5 (C3''), 35.2 (D^β), 34.0 (C2 (Spacer)), 30.5 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.7 (P₍₁₋₅₎^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P₍₁₋₅₎^γ), 24.0 (R^γ), 22.3, 21.7 (CH₃ (NHAc)), 20.5, 20.4, 20.2, 20.1, 20.0, 19.9, 19.9 (CH₃ (Ac)), 18.8, 18.7 (T_(1,2)^γ), 18.5 (V^{γa}), 18.4 (T^{γ*}), 17.7 (V^{γb}), 16.2 (A₍₁₎^β), 15.2, 15.1, 15.0 (A₍₂₋₄₎^β).

5.5.2 Synthese der fluorierten Glycopeptide von Kap. 3.3.4

***N*-Acetyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparatyl-L-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-argininyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (99)**
(Ac-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(βAc₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Festphasen-Glycopeptidsynthese wurde ausgehend von 129.7 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Prolin beladenen Polystyrol-2-Chlor-Trityl-Harzes (Rapp Polymere, Beladung: 0.77 mmol/g) im Peptidesynthesizer nach Standardprotokoll (siehe Seite 204) durchgeführt. Die Anbindung von 105.0 mg (0.250 mmol) der glycosylierten Aminosäure Fmoc-Thr(βAc₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-OH **51** erfolgte halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidesynthesizers. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch semi-präparative HPLC (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (20:80)→(40:60), 20 min, (100:0) nach 20 min, R_t = 18.47 min).

Ausbeute: 125.3 mg (81% bezogen auf die Beladung des Harzes, 0.082 mmol), farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = +41.7 \text{ (c = 0.10, H}_2\text{O)}$$

Analytische RP-HPLC: R_t = 12.12 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(100:0) in 40 min)

C₆₄H₉₆FN₁₃O₂₉ (M = 1530.51 g/mol) [1529.64]

ESI-MS (positiv), m/z: 1530.68 ([M+H]⁺, ber.: 1530.65), 1971.76 ([2M+Na]⁺, ber.: 1971.73).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 1531.07 ($[M+H]^+$, ber.: 1530.65), 1553.36 ($[M+Na]^+$, ber.: 1552.63)

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1530.6509 ($[M+H]^+$, ber.: 1530.6500).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY), δ (ppm): 8.28 (d, 1 H, $J_{NH,R\alpha} = 7.7$ Hz, R^{NH}), 8.13 (d, 1 H, $J_{NH,D\alpha} = 7.7$ Hz, D^{NH}), 8.05 (d, 2 H, $J_{NH,A\alpha} = 6.9$ Hz, $A_{(2,8)}^{NH}$), 7.93 (d, 1 H, $J_{NH,S\alpha} = 8.0$ Hz, S^{NH}), 7.64 (d, 1 H, $J_{NH,T\alpha} = 9.1$ Hz, T_5^{NH}), 7.61-7.54 (m, 1 H, NH (Arg)), 6.98 (d, 1 H, $J_{NH,H2} = 9.4$ Hz, NH (GalNAc), C=NH (Arg)), 5.32 (d, 1 H, $J_{H4,H3} = 2.7$ Hz, 4-H), 5.28-5.19 (m, 2 H, 4'-H {5.26, d, $J_{H4',H3} = 2.9$ Hz}, 3'-H {5.22}), 4.88 (dd, 1 H, $J_{H1',H2'} = 7.3$ Hz, $J_{H1',F} = 3.6$ Hz, 1'-H), 4.73 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.69 (dd, 1 H, $J_{D\alpha,D\beta a} = 14.1$ Hz, $J_{D\alpha,NH} = 7.5$ Hz, D^α), 4.52 (pt, 1 H, A_8^α), 4.50-4.07 (m, H, A_2^α {4.42}, R^α {4.46}, $T^{\alpha*}$ {4.46}, $P_{(1,3,7)}^\alpha$ {4.46, 4.35, 4.20}, 2'-H {4.28, 4.14}, S^α {4.26}, 2-H {4.18}, 6'a-H {4.11}, 5'-H {4.13}, 5-H {4.15}, $T_5^{\beta*}$ {4.15}), 4.00-3.78 (m, 4 H, 3-H {3.95}, 6a-H {3.97, dd, $J_{H6a,H6b} = 10.9$ Hz, $J_{H6a,H5} = 6.3$ Hz}, 6b-H {3.88, dd, $J_{H6b,H6a} = 11.2$ Hz, $J_{H6b,H5} = 6.9$ Hz}, 6'b-H {3.81}), 3.62-3.45 (m, 8 H, $P_{(1,3,7)}^\delta$ {3.53}, S_9^β {3.52}), 3.13-3.04 (m, 2 H, R^δ), 2.75 (dd, 1 H, $J_{D\beta a,D\beta b} = 16.4$ Hz, $J_{D\beta a,D\alpha} = 5.6$ Hz, $D^{\beta a}$), 2.53-2. (m, 1 H, $D^{\beta b}$), 2.11-1.77 (m, 33 H, $P_{(1,3,7)}^{\beta a}$, 5 x CH_3 (Ac) {2.08, 2.07, 1.99, 1.97}, 2 x CH_3 (NHAc) {1.85, 1.82}, $P_{(1,3,7)}^\gamma$ {1.86}, $P_{(1,3,7)}^{\beta b}$ {2.11, 2.00, 1.80}), 1.74-1.66 (m, 1 H, $R^{\beta a}$), 1.57-1.46 (m, 3 H, R^γ , $R^{\beta b}$ {1.48}), 1.20 (d, 3 H, $J_{A\beta a,A\alpha} = 7.1$ Hz, A_8^β), 1.18 (d, 3 H, $J_{A\beta a,A\alpha} = 7.1$ Hz, A_2^β), 1.10 (d, 3 H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, $T^{\gamma*}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, DEPT, HMQC), δ (ppm): 173.3, 172.0, 171.9, 171.1, 170.9, 170.6, 170.4, 170.1, 170.0, 169.9, 169.8, 169.7, 169.6, 169.4, 169.2 (17 x C=O (NAc, NHAc, Ac, Carboxyl), 156.8 (C=NH (Arg)), 100.2 (d, $J_{C1',F} = 22.2$ Hz, $C1'$), 99.4 ($C1$), 88.3 (d, $J_{C2',F2} = 185.6$ Hz, $C2'$), 76.0 ($C3$), 75.4 ($T^{\beta*}$), 70.5 (d, $J_{C3',F} = 18.7$ Hz, $C3'$), 69.8 ($C4$), 69.5 ($C5$), 67.6 (d, $J_{C4',F} = 6.7$ Hz, $C4'$), 67.3 ($C5'$), 63.2 ($C6'$), 61.8 (S^β), 60.8 ($C6$), 59.6, 59.1, 58.5 ($P_{(1,3,7)}^\alpha$), 55.8 ($T^{\alpha*}$), 55.0 (S^α), 50.1 (R^α), 49.4 (D^α), 47.5 ($C2$), 46.8, 46.7, 46.3, 46.2 ($A_{(2,8)}^\alpha$, $P_{(1,3,7)}^\delta$), 40.5 (R^δ), 36.0 (D^β), 29.1, 28.8, 28.6 ($P_{(1,3,7)}^\beta$), 28.4 (R^β), 24.8 (R^γ), 24.6, 24.3 ($P_{(1,3,7)}^\gamma$), 22.8, 22.6 (2 x CH_3 (NHAc)), 20.8, 20.6, 20.5, 20.4, 20.3 (5 x CH_3 (Ac)), 18.2 ($T^{\gamma*}$), 17.0, 16.7 ($A_{(2,8)}^\beta$).

^{19}F -NMR (376.6 Hz, $CDCl_3$), δ (ppm): -205.7 (dd, $J_{F2,H2} = 52.5$ Hz, $J_{F2,H3} = 13.4$ Hz).

***N*-Acetyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[2-desoxy-2-fluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-argininyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (100)**

(Ac-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(βGal2F-(1→3)-αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-OH)

Es wurden 125.3 mg (0.082 mmol) Ac-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(βAc₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-OH **99** in 50 mL absol. Methanol gelöst und durch Zugabe einer frisch hergestellten methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) wurde ein pH-Wert von 9.0-9.5 eingestellt. Die Lösung wurde 2 d bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt. Durch Zugabe von saurem Ionentauscher Amberlyst 15 wurde die Lösung neutralisiert. Nach Filtrieren wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min, R_t = 18.46 min) gereinigt.

Ausbeute: 24.6 mg (22%, 18.06 μmol), farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = -78.4$ (c = 1.00, H₂O)

Analytische RP-HPLC: R_t = 15.22 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(60:40), 60 min (100:0) nach 40 min)

C₅₆H₈₈FN₁₃O₂₅ (M = 1362.37 g/mol) [1361.60]

ESI-MS (positiv), m/z: 671.83 ([M+Na+H]²⁺, ber.: 671.79), 1320.69 ([M+H]⁺, ber.: 1320.60), 1342.70 ([M+Na]⁺, ber.: 1342.58).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1320.5981 ([M+H]⁺, ber.: 1320.5972).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY, HMQC), δ (ppm): 8.79-8.49 (m, 1 H, NH (Guanidin)), 8.19 (d, 1 H, J_{NH,Dα} = 7.6 Hz, D^{NH}), 8.12 (d, 1 H, J_{NH,Rα} = 8.0 Hz, R^{NH}), 8.08 (d, 1 H, J_{NH,Aα} = 7.2 Hz, A₂^{NH}), 8.03 (d, 1 H, J_{NH,Aα} = 7.2 Hz, A₈^{NH}), 7.93 (d, 1 H, J_{NH,Sα} = 8.0 Hz, S^{NH}), 7.63-7.48 (m, 3 H, T^{NH} {7.58, d, J_{NH,Tα} = 8.9 Hz}, NH (Ac), NH (Arg)), 6.87 (d, 1 H, J_{NH,H2} = 9.7 Hz, NH (GalNAc)), 4.68 (dd, 1 H, J_{Dα,Dβa} = 13.8 Hz, J_{Dα,NH} = 7.3 Hz, D^α), 4.58 (d, 1 H, J_{H1',H2'} = 3.8 Hz, 1'-H), 4.56-3.34 (m, 36 H, A₂^α {4.52}, R^α {4.49}, A₂^α {4.42}, T^{α*} {4.38}, P_(1,3,7)^α {4.33, 4.20}, S^α {4.29}, 2'-H {4.19, 4.06}, 2-H {4.20}, T^{β*} {4.11}, 5'-H {3.65}, 3-H {3.60}, P_(1,3,7)^δ {3.58, 3.53, 3.47}, 3'-H {3.57}, S^β {3.51}, 6'a/b-H {3.49}, 6a/b-H {3.43}, 5-H {3.40}, NH₂ (Arg)), 3.15-3.03 (m, 2 H, R^δ), 2.76 (dd, 1 H, J_{Dβa,Dβb} = 16.5 Hz, J_{Dβa,Dα} = 6.0 Hz, D^{βa}), 2.52-2.48 (m, 1 H, D^{βb}), 2.18-1.98 (m, 3 H,

$P_{(1,3,7)^{\beta a}}$, 1.94-1.68 (m, 16 H, 2 x CH₃ (NHAc) {2 x s, 2.08, 2.07}, $P_{(1,3,7)^{\gamma}}$, $P_{(1,3,7)^{\beta b}}$, $R^{\beta a}$ {1.71}), 1.58-1.43 (m, 3 H, R^{γ} {1.52}, $R^{\beta b}$ {1.49}), 1.28-1.14 (m, 6 H, A_8^{β} {1.20, d, $J_{A\beta a, A\alpha} = 7.1$ Hz}, $A_{(2)^{\beta}}$ {1.18, d, $J_{A\beta a, A\alpha} = 7.1$ Hz}), 1.11 (d, 3 H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, $T^{\gamma*}$).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, DEPT), δ (ppm): 173.3, 171.9, 171.8, 171.1, 170.8, 170.6, 170.5, 169.7, 169.5, 169.5, 169.1 (17 x C=O (NAc, NHAc, Carboxyl), 156.8 (C=NH (Arg)), 102.1 (d, $J_{C1', F} = 22.9$ Hz, C1'), 98.5 (C1), 91.7 (d, $J_{C2', F2} = 181.6$ Hz, C2'), 78.2 (C3), 75.1 (C5), 74.3 ($T^{\beta*}$), 71.6 (C5'), 71.4 (d, $J_{C3', F} = 17.8$ Hz, C3'), 68.8 (C4), 67.8 (d, $J_{C4', F} = 9.0$ Hz, C4'), 61.8 (S^{β}), 60.7 (C6'), 60.7 (C6), 59.5, 59.1, 58.5 ($P_{(1,3,7)^{\alpha}}$), 55.8 ($T^{\alpha*}$), 55.0 (S^{α}), 49.9 (R^{α}), 49.3 (D^{α}), 47.4 (C2), 46.8, 46.6, 46.5, 46.2 ($A_{(2,8)^{\alpha}}$, $P_{(1,3,7)^{\delta}}$), 40.5 (R^{δ}), 35.9 (D^{β}), 29.1, 28.9, 28.6 ($P_{(1,3,7)^{\beta}}$), 28.6 (R^{β}), 24.7 (R^{γ}), 24.6, 24.4, 24.3 ($P_{(1,3,7)^{\gamma}}$), 22.9, 22.6 (2 x CH₃ (NHAc)), 18.3 ($T^{\gamma*}$), 17.1, 16.6 ($A_{(2,8)^{\beta}}$).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, CDCl₃), δ (ppm): -205.9 (dd, $J_{F2, H2} = 52.5$ Hz, $J_{F2, H3} = 14.6$ Hz).

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (101)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Festphasen-Glycopeptidsynthese wurde ausgehend von 476.6 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt beladenen TentaGel S-Harzes (Rapp Polymere, Beladung: 0.21 mmol/g) im Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll (siehe Seite 204) durchgeführt. Die Anbindung von 225.3 mmg (0.245 mmol) der glycosylierten Aminosäure Fmoc-Thr-(β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH **51** erfolgte halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch semipräparative HPLC (Phenomenex Jupiter C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH/H₂O + 0.1% TFA (10:90) \rightarrow (100:0) in 40 min, $R_t = 22.08$ min) gereinigt.

Ausbeute: 55.9 mg (21% bezogen auf die Beladung des Harzes, 21.0 μ mol), farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = -81.6 \text{ (c = 1.00, H}_2\text{O)}$$

Analytische RP-HPLC: $R_t = 12.12$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN/H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min (100:0) nach 10 min)

C₁₁₃H₁₇₆FN₂₇O₄₆ (M = 2667.78 g/mol) [2666.22]

ESI-MS (positiv), m/z : 889.71 ([M+3H]³⁺, ber.: 889.75), 1334.10 ([M+2H]²⁺, ber.: 1334.12).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2668.57 ([M+H]⁺, ber.: 2668.76).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1334.1179 ([M+2H]²⁺, ber.: 1334.1203).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, TOCSY, NOESY), δ (ppm): 8.60 (d, 1 H, $J_{\text{H}\delta, \text{H}\epsilon} = 1.3$ Hz, H ^{ϵ}), 7.29 (d, 1 H, $J_{\text{H}\delta, \text{H}\epsilon} = 1.0$ Hz, H ^{δ}), 5.47 (d, 1 H, $J_{\text{H}4, \text{H}3} = 2.5$ Hz, 4-H), 5.41 (s, 1 H, 4'-H), 5.27-5.18 (m, 1 H, 3'-H), 5.05 (d, 1 H, $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.6$ Hz, 1-H), 4.91-4.86 (m, 1 H, 1'-H), 4.73-4.47 (m, 9 H, D ^{α} {4.72}, H ^{α} {4.69}, T ^{$\alpha*$} {4.66}, R ^{α} {4.62}, A₍₂₋₄₎ ^{α} {4.59, 4.57, 4.54}, S₁ ^{α} {4.49, t, $J_{\text{S}1\alpha, \text{S}1\beta} = 5.4$ Hz}, S₂ ^{α} {4.43}), 4.55-4.42 (m, 1 H, 2'-H), 4.46-4.26 (m, 11 H, P₍₁₋₅₎ ^{α} {4.41, 4.38, 4.38}, 5'-H {4.36}, T₁ ^{α} {4.33}, T ^{$\beta*$} {4.33}, V ^{α} {4.29}, 2-H {4.29}, T₂ ^{α} {4.28}), 4.25-4.07 (m, 8 H, A₁ ^{α} {4.23}, 6'a-H {4.21}, 3-H {4.21}, T_(1,2) ^{β} {4.19}, 5-H {4.16}, 6a/b-H {4.14}), 4.07-3.98 (m, 1 H, 6'b-H {4.04}), 3.97-3.91 (m, 4 H, G₂ ^{α} {3.96}, G₁ ^{α} {3.94}), 3.90-3.52 (m, 26 H, S₁ ^{β} {3.87}, P₍₁₋₅₎ ^{δ} {3.80, 3.64}, S₂ ^{β} {3.77}, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H (Spacer) {3.75, 3.73, 3.66, 3.63}), 3.29 (dd, 1 H, $J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\beta\text{b}} = 15.6$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\alpha} = 5.6$ Hz, H ^{βa}), 3.21-3.12 (m, 5 H, R ^{δ} {3.19}, H ^{βb} {3.18}, 12a/b-H (Spacer) {3.17}), 2.95 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{a}, \text{H}\beta\text{b}} = 17.0$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a}, \text{D}\alpha} = 6.4$ Hz, D ^{βa}), 2.86 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{b}, \text{D}\beta\text{a}} = 17.0$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{b}, \text{D}\alpha} = 6.9$ Hz, D ^{βb}), 2.73 (dt, 1H, $J_{\text{CH}2\text{a}, \text{CH}2\text{b}} = 16.1$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{a}, \text{CH}2} = 6.5$ Hz, 2a-H (Spacer)), 2.63 (dt, 1H, $J_{\text{CH}2\text{b}, \text{CH}2\text{a}} = 16.2$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{b}, \text{CH}2} = 6.0$ Hz, 2b-H (Spacer)), 2.35-1.59 (m, 43 H, P₍₁₋₅₎ ^{β} {2.29, 2.23, 2.01, 1.91, 1.85}, P₍₁₋₅₎ ^{γ} {2.05, 2.02, 1.97, 1.94}, V ^{β} {2.05}, R ^{βa} {1.82}, R ^{βb} {1.71}, R ^{γ} {1.65}, CH₃ (Ac) {2.18, 2.14, 2.05, 2.04, 2.04}, CH₃ (NHAc) {1.94}), 1.33 d, 9 H, $J_{\text{A}2-4\beta, \text{A}2-4\alpha} = 7.2$ Hz, A₂₋₄ ^{β}), 1.30 (d, 3 H, $J_{\text{A}1\beta, \text{A}1\alpha} = 7.2$ Hz, A₁ ^{β}), 1.24 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma^*, \text{T}\beta^*} = 6.2$ Hz, T ^{$\gamma*$}), 1.17 (d, 3 H, $J_{\text{T}1\gamma, \text{T}1\beta} = 6.5$ Hz, T₁ ^{γ}), 1.15 (d, 3 H, $J_{\text{T}2\gamma, \text{T}2\beta} = 6.5$ Hz, T₂ ^{γ}), 0.94 (d, 3 H, $J_{\text{V}\gamma\text{a}, \text{V}\beta} = 6.5$ Hz, V ^{γa}), 0.92 (d, 3 H, $J_{\text{V}\gamma\text{b}, \text{V}\beta} = 6.5$ Hz, V ^{γb}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, DEPT, HMQC), δ (ppm): 176.6, 175.7, 174.9, 174.4, 173.9, 173.6, 173.4, 173.3, 173.1, 173.1, 172.7, 172.6, 172.4, 172.3, 171.9, 171.9, 171.5, 171.3, 171.1, 170.8, 170.8 (28 x C=O (Ac, Carboxyl, NHAc)), 156.6 (C=NH (Arg)), 133.4 (H ^{ϵ}), 128.4 (H ^{γ}), 117.2 (H ^{δ}), 101.7 (C1), 99.1 (C1'), 87.8 (d, $J_{\text{C}2', \text{F}} = 185.4$ Hz, C2'), 77.8 (T ^{$\beta*$}), 76.6 (C3), 71.2 (d, $J_{\text{C}3', \text{F}} = 17.5$ Hz, C3'), 70.3 (C4), 70.3 (C5), 69.5, 69.5, 69.4, 69.4 (C5, C6,

C8, C11 (Spacer)), 68.5 (C4'), 67.5 (C5'), 67.0 (T_(1,2)^β), 66.3, 66.0 (C3, C11 (Spacer)), 63.1 (C6'), 61.6 (C6), 61.3, 61.1 (S_(1,2)^β), 60.7, 60.5, 60.0 (P₍₁₋₅₎^α), 59.3 (V^α), 58.9 (T₂^α), 58.7 (T₁^α), 56.7 (T^{α*}), 55.5 (S₁^α), 54.9 (S₂^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.0 (D^α), 49.6 (A₁^α), 48.4 (C2), 48.0, 47.8, 47.7 (P₍₁₋₅₎^δ), 47.6, 47.6 (A₍₂₋₄₎^α), 47.3 (P₍₁₋₅₎^δ), 42.3, 42.3 (G_(1,2)^α), 40.6 (R^δ), 39.0 (C12 (Spacer)), 34.9 (D^β), 34.0 (C2 (Spacer)), 30.1 (V^β), 29.6, 29.3, 29.1, 28.7 (P₍₁₋₅₎^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P₍₁₋₅₎^γ), 23.9 (R^γ), 21.9 (CH₃ (NHAc)), 20.3, 20.3 (CH₃ (Ac)), 19.9, 19.8 (CH₃ (Ac)), 18.8, 18.7 (T_(1,2)^γ), 18.4 (V^{γb}), 18.1 (T^{γ*}), 17.8 (V^{γa}), 16.2 (A₍₁₎^β), 15.1 (A₍₂₋₄₎^β).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, D₂O) , δ (ppm): - 207.3 (dd, J_{F₂,H₂} = 51.8 Hz, J_{F₂,H₃} = 13.5 Hz).

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (103)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βBn₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Festphasen-Glycopeptidsynthese wurde ausgehend von 454.4 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt beladenen TentaGel S-Harzes (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) im Peptidsyntheser nach dem Standardprotokoll (siehe Seite 204) durchgeführt. Die Anbindung von 208.0 mg (0.195 mmol) der glycosylierten Aminosäure Fmoc-Thr(βBn₃Gal2F-(1→3)-αAc₂GalNAc)-OH **63** erfolgte halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesers. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Ausbeute: 203.3 mg Rohausbeute

Analytische RP-HPLC: R_t = 24.61 (-Bn) + 32.30 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min)

C₁₂₈H₁₈₈FN₂₇O₄₃ (M = 2812.02 g/mol) [2810.33]

ESI-MS (positiv), m/z: 907.77 ([M(-Bn)+3H]³⁺, ber.: 907.77), 937.79 ([M+3H]³⁺, ber.: 937.79), 1361.16 ([M(-Bn)+2H]²⁺, ber.: 1361.15), 1406.19 ([M+2H]²⁺, ber.: 1406.17).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2813.62 ($[M+H]^+$), ber.: 2813.02).

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (102)
(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Variante A:

Es wurden 52.0 mg (0.021 mmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Ac₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **101** in 30 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und durch Zugabe einer frisch hergestellten methanolische Natriummethanolat-Lösung (1%) ein pH-Wert von 9.5 eingestellt. Unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes wurde 6 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend mit drei Tropfen Essigsäure neutralisiert. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde mehrfach mit jeweils 30 mL Toluol kdestilliert. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95) \rightarrow (40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min, R_t = 17.87 min) gereinigt.

Ausbeute: 30.5 mg (60%, 0.012 mmol), farbloses Lyophilisat

Variante B:

Es wurden 200.0 mg H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **103** (Rohprodukt) in 30 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und durch mehrfaches Anlegen eines Vakuums und Spülen mit Argon entgast. Zu dieser entgasten Lösung wurde eine Spatelspitze Pd(OAc)₂ gegeben, bevor wieder mehrfach entgast wurde. Anschließend wurde die Argonatmosphäre durch eine Wasserstoffatmosphäre ausgetauscht und das Reaktionsgemisch 2 d bei Raumtemp. gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde durch *Hyflo* filtriert und mehrfach der Rückstand mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert, der Rückstand wurde in 30 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und mit einer

frisch hergestellten methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) solange versetzt, bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht war. Unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes wurde 18 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend mit fünf Tropfen Essigsäure neutralisiert. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde mehrfach mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min, $R_t = 17.87$ min) gereinigt.

Ausbeute: 83.1 mg (34% bezogen auf die Beladung des Harzes, 0.034 mmol), farbloses Lyophilisat

$$[\alpha]_D^{23} = -89.4 \text{ (c = 1.00, H}_2\text{O)}$$

Analytische RP-HPLC: $R_t = 13.18$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min)

C₁₀₃H₁₆₆FN₂₇O₄₁ (M = 2457.57 g/mol) [2457.16]

ESI-MS (positiv), m/z : 819.74 ([M+3H]³⁺; ber.: 819.73), 1229.13 ([M+2H]²⁺, ber.: 1229.09).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2458.29 ([M+H]⁺, ber.: 2458.58).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1229.0933 ([M+2H]²⁺, ber.: 1229.0890).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, COSY, TOCSY, NOESY), δ (ppm): 12.44 (bs, 2 H, COOH (Arg, Pro)), 8.96 (s, 1 H, H^δ), 8.34-8.18 (m, 4 H, A₁^{NH} {8.31, d, $J_{\text{NH},\text{A}\alpha} = 7.0$ Hz}, D^{NH} {8.25, d, $J_{\text{NH},\text{D}\alpha} = 7.7$ Hz}, G_(1,2)^{NH} {8.21}), 8.14 (d, 3 H, $J_{\text{NH},\text{A}\alpha} = 6.8$ Hz, A_(2,3)^{NH}), 8.13 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{A}\alpha} = 7.0$ Hz, A₄^{NH}), 8.07 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}\alpha} = 7.2$ Hz, H^{NH}), 8.04-7.88 (m, 4 H, T^{NH*} {8.00}, R^{NH} {7.97}, V^{NH} {7.91, d, $J_{\text{NH},\text{V}\alpha} = 7.2$ Hz}, R^{NH} {7.91}), 7.86-7.72 (m, 3 H, S_(1,2)^{NH} {7.78}, T₁^{NH} {7.75, d, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 7.0$ Hz}), 7.52 (t, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}\delta} = 5.5$ Hz, $J_{\text{NH},\text{H}\epsilon} = 5.5$ Hz, NH (Im)), 7.38 (s, 1 H, H^ε), 7.34 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 8.0$ Hz, T₂^{NH}), 6.99 (d, 1 H, $J_{\text{NH},\text{H}2} = 9.3$ Hz, NH (GalNAc)), 4.72 (d, 1 H, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 2.5$ Hz, 1-H), 4.60-4.35 (m, 10 H, 1'-H {4.56}, H^α {4.55}, A_(2,3)^α {4.51, 4.48}, D^α {4.50}, R^α {4.49}, V^α {4.48}, T^{α*} {4.41}, S₁^α {4.37}, S₂^α {4.36}), 4.34-4.01 (m, 13 H, P₍₁₋₅₎^α {4.27, 4.25, 4.21}, A₁^α {4.24}, 2-H {4.23}, 2'-H {4.20, 4.07}, T₁^α {4.18}, T₂^α {4.17}, A₄^α {4.15}, T^{β*} {4.09}, T₁^β {4.04}), 3.97-3.91 (m, 2 H, T₂^β {3.93}, 4-H {3.92}), 3.89-3.30 (m, 34 H, G₁^α {3.85}, G₂^α {3.83}, 5-H {3.70}, 4'-H {3.69}, 3-H {3.66}, 6a/b-H {3.51}, P₍₁₋₅₎^δ {3.62, 3.55, 3.50, 3.45}, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H (Spacer) {3.60, 3.58, 3.54, 3.48}, 3'-H {3.51}, 6'a/b-H {3.45}, 5'-H {3.40}), 3.18-2.92 (m, 6 H, H^{βa} {3.14, dd, $J_{\text{H}\beta\text{a},\text{H}\beta\text{b}} = 15.9$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{a},\text{H}\alpha} = 5.0$ Hz}, R^δ {3.09}, H^{βb} {2.97}, 12a/b-H (Spacer) {2.97}), 2.73 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{H}\beta\text{b}} = 16.1$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\alpha} = 5.3$ Hz,

D^{βa}), 2.62-2.52 (m, 3 H, D^{βb} {2.53}, 2a/b-H (Spacer) {2.52}), 2.19-1.66 (m, 24 H, P₍₁₋₅₎^β {2.13, 1.99}, P₍₁₋₅₎^γ {1.92, 1.89, 1.86, 1.82}, CH₃ (GalNAc) {1.79}, R^{βa} {1.69}), 1.57-1.48 (m, 3 H, R^γ {1.52}, R^{βb} {1.51}), 1.21 d, 3 H, $J_{A1\beta, A1\alpha} = 7.2$ Hz, A₁^β), 1.19 (d, 9 H, $J_{A2-4\beta, A2-4\alpha} = 7.0$ Hz, A₍₂₋₄₎^β), 1.13 (d, 3 H, $J_{T1\gamma^*, T1\beta^*} = 6.2$ Hz, T^{γ*}), 1.03 (d, 3 H, $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.4$ Hz, T₁^γ), 1.00 (d, 3 H, $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.3$ Hz, T₂^γ), 0.90 (d, 3 H, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.6$ Hz, V^{γa}), 0.84 (d, 3 H, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.6$ Hz, V^{βb}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆, DEPT, HMQC), δ (ppm): 173.2, 172.5, 172.2, 172.0, 171.9, 171.9, 171.7, 171.3, 171.1, 170.9, 170.4, 170.3, 170.2, 170.0, 169.5, 169.4, 169.3, 168.8 (23 x C=O (Ac)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.8 (H^ε), 129.2 (H^γ), 117.1 (H^δ), 102.2 (C1'), 98.6 (C1), 91.6 (d, $J_{C2', F} = 175.3$ Hz, C2'), 77.9 (C3), 75.2 (C5'), 74.4 (T^{β*}), 71.6 (C5), 71.5 (d, $J_{C3', F} = 15.1$ Hz, C3'), 68.7 (C4'), 67.9 (C4), 67.0, 69.7, 69.6 (C5, C6, C8, C11 (Spacer)), 66.8 (T₂^β), 66.7, 66.3 (C3, C9 (Spacer)), 66.2 (T₁^β), 61.8 (S_(1,2)^β), 60.8 (C6'), 60.2 (C6), 59.8, 59.5, 59.2, 59.1 (P₍₁₋₄₎^α), 59.3 (T^{α*}), 58.5 (P₅^α), 58.0 (T₂^α), 57.7 (T₁^α), 57.2 (V^α), 54.9 (S₁^α), 54.7 (S₂^α), 51.4 (H^α), 50.1 (D^α), 49.5 (R^α), 48.4 (A₁^α), 47.1 (C2), 47.0, 46.8, 46.7, 46.5 (P₍₁₋₅₎^δ), 46.3, 46.3 (A₍₂₋₄₎^α), 42.0 (G_(1,2)^α), 40.6 (R^δ), 38.6 (C12 (NH₂ Spacer)), 35.5 (D^β), 34.3 (C2 (Spacer)), 31.0 (V^β), 29.3, 29.1, 29.1, 29.0, 28.6 (P₍₁₋₅₎^β), 28.4 (R^β), 26.9 (H^β), 24.6, 24.5, 24.4, 24.3 (P₍₁₋₅₎^γ), 24.4 (R^γ), 22.8 (CH₃ (NHAc)), 19.8 (T₁^γ), 19.6 (T₂^γ), 19.2 (V^{γa}), 18.1 (V^{γb}), 18.1 (T^{γ*}), 17.4 (A₁^β), 16.9, 16.8, 16.6 (A₍₂₋₄₎^β).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, DMSO-d₆): - 205.4 (dd, $J_{F2, H2} = 51.9$ Hz, d, $J_{F2, H3} = 14.6$ Hz).

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[3,4-di-O-benzyl-2,6-didesoxy-2,6-bisfluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (104)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βBn₂Gal-2,6F₂-(1→3)-αAc₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Die automatisierte Festphasen-Glycopeptidsynthese wurde ausgehend von 454.4 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Pro-O-Trt beladenen TentaGel S-Harzes (Rapp Polymere, Beladung: 0.22 mmol/g) im Peptidesynthesizer nach dem Standardprotokoll (siehe Seite 204)

durchgeführt. Die Anbindung von 153.8 mg (0.158 mmol) der glycosylierten Aminosäure Fmoc-Thr(β Bn₂Gal_{2,6}F₂-(1 \rightarrow 3)- α Ac₂GalNAc)-OH **86** erfolgte halbautomatisch im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Ausbeute: 140.0 mg Rohprodukt

Analytische RP-HPLC: $R_t = 19.43$ (-Bn) + 27.90 min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95) \rightarrow (40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min)

C₁₂₁H₁₈₁FN₂₇O₄₂ (M = 2723.88 g/mol) [2722.28]

ESI-MS (positiv), m/z : 878.47 ([M-Bn+3H]³⁺, ber.: 878.42), 908.49 ([M+3H]³⁺, ber.: 908.44), 1317.20 ([M-Bn+2H]²⁺, ber.: 1317.13), 1362.23 ([M+2H]²⁺, ber.: 1362.15).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2723.41 ([M+H]⁺, ber.: 2724.89).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1362.1512 ([M+2H]²⁺, ber.: 1362.1492).

Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[2,6-didesoxy-2,6-bisfluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (105)
(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-2,6F₂-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Es wurden 136.0 mg H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(Bn₂Gal-2,6F₂-(1 \rightarrow 3)-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **104** in 30 mL Methanol gelöst und durch mehrfaches Anlegen eines Vakuums und Spülen mit Argon entgast. Zu dieser entgasten Lösung wurde eine Spatelspitze Pd(OAc)₂ zugegeben und wieder mehrfach entgast. Anschließend wurde die Argonatmosphäre durch eine Wasserstoffatmosphäre ausgetauscht und die Reaktionsmischung wurde 2 d bei Raumtemp. gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde durch *Hyflo* filtriert und der Rückstand wurde mehrfach mit Methanol (500 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde anschließend in 30 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und mit einer frisch hergestellten methanolischen Natriummethanolat-Lösung (1%) solange versetzt bis ein pH-Wert von 9.5 erreicht war. Unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes, wurde 18 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend mit fünf Tropfen Essigsäure

neutralisiert. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. abdestilliert und der Rückstand wurde mehrfach mit jeweils 30 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min, $R_t = 17.87$ min) gereinigt.

Ausbeute: 36.3 mg (15% bezogen auf die Beladung des Herzes, 0.015 mmol), farbloser amorpher Feststoff

$$[\alpha]_D^{23} = -107.9 \text{ (c = 1.00, H}_2\text{O)}$$

Analytische RP-HPLC: $R_t = 11.97$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min).

C₁₀₃H₁₆₅FN₂₇O₄₀ (M = 2459.57 g/mol) [2458.17]

ESI-MS (positiv), m/z : 842.42 ([M+3Na]³⁺, ber.: 842.38), 1263.15 ([M+2Na-H]²⁺, ber.: 1263.04).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2481.77 ([M+Na]⁺, ber.: 2482.56).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1230.0905 ([M+2H]²⁺, ber.: 1230.0917).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, TOCSY, NOESY), δ (ppm): 8.60 (d, 1 H, $J_{\text{He,H}\delta} = 1.3$ Hz, H^ε), 7.30 (d, 1 H, $J_{\text{H}\delta,\text{He}} = 1.1$ Hz, H^δ), 4.96 (d, 1 H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.75-4.27 (m, 22 H, 1'-H {4.73}, D^α {4.70}, H^α {4.68}, 6'a/b-H {4.66, 4.54}, T^{α*} {4.63}, R^α {4.62}, A_(3,4)^α {4.56, q, $J_{\text{A3,4}\alpha,\text{A3,4}\beta} = 7.1$ Hz}, A₂^α {4.55}, S₁^α {4.50, t, $J_{\text{S1}\alpha,\text{S1}\beta} = 5.4$ Hz}, S₂^α {4.45}, P₍₁₋₅₎^α {4.39, 4.36, 4.32, 4.28}, T₁^α {4.34}, T^{β*} {4.31}, T₂^α {4.29}, V^α {4.28}), 4.36-4.20 (m, 1 H, 2'-H), 4.26-4.15 (m, 5 H, A₁^α {4.23}, 2-H {4.21}, T_(1,2)^β {4.20, 4.17}, 4-H {4.12, d, $J_{\text{H4,H3}} = 2.0$ Hz}), 4.03-3.54 (m, 35 H, 4'-H {4.00}, 5-H {3.99}, 3-H {3.98}, G₂^α {3.97}, 5'-H {3.95, 3.91}, G₁^α {3.92}, S₁^β {3.88}, 3'-H {3.88}, P₍₁₋₅₎^δ {3.80, 3.76, 3.63, 3.59, 3.55}, S₂^β {3.77}, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H (Spacer) {3.76, 3.72, 3.67, 3.63}, 6a/b-H {3.72}), 3.29 (dd, 1 H, $J_{\text{H}\beta\text{a,H}\beta\text{b}} = 15.5$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{a,H}\alpha} = 5.5$ Hz, H^{βa}), 3.22-3.13 (m, 5 H, R^δ {3.18}, 12a/b-H (Spacer) {3.18}, H^{βb} {3.17}), 2.94 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{a,H}\beta\text{b}} = 17.0$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a,D}\alpha} = 6.4$ Hz, D^{βa}), 2.86 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{b,D}\beta\text{a}} = 17.1$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{b,D}\alpha} = 6.8$ Hz, D^{βb}), 2.74 (dt, 1 H, $J_{\text{CH2a,CH2b}} = 16.1$ Hz, $J_{\text{CH2a,CH2}} = 6.5$ Hz, 2a-H (Spacer)), 2.64 (dt, 1 H, $J_{\text{CH2b,CH2a}} = 16.2$ Hz, $J_{\text{CH2b,CH2}} = 5.9$ Hz, 2b-H (Spacer)), 2.34-2.17 (m, 4 H, P_(1,2)^β {2.29, 2.24}), 2.10-1.78 (m, 21 H, V^β {2.06}, P₍₁₋₅₎^γ {2.05, 2.00, 1.95, 1.93}, P₍₃₋₅₎^β {1.99, 1.91, 1.85}, CH₃ (NHAc) {1.96}, R^{βa} {1.81}), 1.75-1.59 (m, 3 H, R^{βb} {1.71}, R^γ {1.64}), 1.35 (d, 3 H, $J_{\text{A4}\beta,\text{A4}\alpha} = 6.9$ Hz, A₄^β), 1.34 (d, 6 H, $J_{\text{A2,3}\beta,\text{A2,3}\alpha} = 7.0$ Hz, A_(2,3)^β), 1.31 (d, 3 H, $J_{\text{A1}\beta,\text{A1}\alpha} = 7.2$ Hz, A₁^β),

1.25 (d, 3 H, $J_{T\gamma^*,T\beta^*} = 6.2$ Hz, $T\gamma^*$), 1.18 (d, 3 H, $J_{T1\gamma,T1\beta} = 6.5$ Hz, $T1\gamma$), 1.16 (d, 3 H, $J_{T2\gamma,T2\beta} = 6.5$ Hz, $T2\gamma$), 0.95 (d, 3 H, $J_{V\gamma^a,V\beta} = 6.4$ Hz, $V\gamma^a$), 0.94 (d, 3 H, $J_{V\gamma^b,V\beta} = 6.4$ Hz, $V\gamma^b$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O , DEPT, HMQC), δ (ppm): 176.0, 174.9, 174.4, 174.0, 173.9, 173.7, 173.5, 173.1, 172.6, 172.5, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.1, 170.9 (23 x C=O (Ac, Carboxyl, NHAc)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.4 (H^ϵ), 128.4 (H^γ), 117.3 (H^δ), 102.0 (d, $J_{C1',F2} = 23.6$ Hz, $C1'$), 99.2 ($C1$), 90.8 (d, $J_{C2',F2} = 181.1$ Hz, $C2'$), 82.8 (d, $J_{C6',F6} = 165.8$ Hz, $C6'$), 78.0 ($C3$), 77.2 ($T\beta^*$), 73.2 (d, $J_{C5',F6} = 20.4$ Hz, $C5'$), 71.1 (d, $J_{C3',F2} = 16.3$ Hz, $C3'$), 71.1 (dd, $J_{C4',F6} = 10.9$ Hz, $J_{C4',F2} = 5.3$ Hz, $C4'$), 69.6, 69.5, 69.5, 69.4 ($C5$, $C6$, $C8$, $C11$ (Spacer)), 68.7 ($C4$, $C5$), 67.0 ($T_{(1,2)}^\beta$), 61.4, 61.3, 61.1 ($C6$, $S_{(1,2)}^\beta$), 60.8, 60.5, 60.1, 60.0, 59.5 ($P_{(1-5)}^\alpha$), 59.4 (V^α), 58.9 (T_2^α), 58.8 (T_1^α), 57.0 ($T^{\alpha*}$), 55.5 (S_1^α), 55.0 (S_2^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6 (A_1^α), 48.2 ($C2$), 48.0, 47.9, 47.7 ($P_{(2-5)}^\delta$), 47.7, 47.6 ($\text{A}_{(2-4)}^\alpha$), 47.4 (P_1^δ), 42.4, 42.3 ($G_{(1,2)}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 39.0 ($C12$ (Spacer)), 35.0 (D^β), 34.0 ($C2$ (Spacer)), 30.1 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.8 ($P_{(1-5)}^\beta$), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 ($P_{(1-5)}^\gamma$), 24.0 (R^γ), 22.1 (CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.7 ($T_{(1,2)}^\gamma$), 18.4 ($V\gamma^b$), 18.3 ($T\gamma^*$), 17.8 ($V\gamma^a$), 16.3 (A_1^β), 15.2, 15.1 ($\text{A}_{(2-4)}^\beta$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 MHz, D_2O), δ (ppm): - 207.2 (dd, $J_{F2,H2} = 51.8$ Hz, $J_{F2,H3} = 14.7$ Hz, 2-F), - 228.5 (dt, $J_{F6,H6a/b} = 46.4$ Hz, $J_{F6,H5} = 15.3$ Hz, 6-F).

5.6 Synthesen zu Kapitel 3.4

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl})-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion
(106)^[114]

(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Zu einer Lösung von 13.1 mg (0.053 mmol) von H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **98** in 6 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette 0.79 μ L (0.053 mmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion pipettiert. In jeweils 5 μ L Schritten wurde eine ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben (insgesamt 40 μ L) bis ein pH-Wert von 8 erreicht wurde. Nach 2 h Rühren bei Raumtemp. (Reaktionskontrolle durch analytische RP-HPLC) wurde mit drei Tropfen verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und die Lösung wurde nach Zugabe von Milliporewasser lyophilisiert. Die Reinigung des mit dem Quadratsäuremonoester-funktionalisierten Glycopeptids **106** erfolgte durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95) \rightarrow (40:60) 30 min, (100:0) nach 10 min, R_t = 21.24 min).

Ausbeute: 12.1 mg (88%, 0.047 mmol), farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = -54.3$ (c = 1.00, H₂O)

Analytische RP-HPLC: R_t = 13.47 min (Phenomenex Luna C18(2), λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95) \rightarrow (40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min).

C₁₀₉H₁₇₁N₂₇O₄₅ (M = 2579.68 g/mol) [2578.19]

ESI-MS (positiv), *m/z*: 860.72 ([M+3H]³⁺, ber.: 860.41), 1290.04 ([M+2H]²⁺, ber.: 1290.10).

HR-ESI-MS (positiv), *m/z*: 1290.1042 ([M+2H]²⁺, ber.: 1290.1040).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, NOESY, TOCSY), δ (ppm): 8.60 (s, 1 H, H^f), 7.29 (s, 1 H, H^g), 4.92 (d, 1 H, *J*_{H1,H2} = 3.6 Hz, 1-H), 4.73-4.27 (m, 21 H, CH₂O (Squarat) {4.70}, D ^{α} {4.69}, H ^{α} {4.68}, T ^{α^*} {4.63}, R ^{α} {4.61}, A_(3,4) ^{α} {4.56, q, *J*_{A3,4 α ,A3,4 β} = 7.2 Hz}, S₁ ^{α} {4.50, t, *J*_{S1 α ,S1 β} = 5.4 Hz}, A₂ ^{α} {4.46}, S₂ ^{α} {4.43}, 1'-H {4.40}, P₍₁₋₅₎ ^{α} {4.38, 4.36, 4.34},

T_1^α {4.33}, $T^{\beta*}$ {4.31}, T_2^α {4.30}, V^α {4.29}), 4.27-4.14 (m 5 H, A_1^α {4.22}, $T_{(1,2)}^\beta$ {4.19, 4.18}, 2-H {4.19}, 4-H {4.15}), 4.05-3.55 (m, 42 H, 5-H {4.01}, 3-H {3.99}, $G_{(1,2)}^\alpha$ {3.95}, 6a/b-H {3.88}, S_1^β {3.86}, 4'-H {3.86}, $P_{(1-5)}^\delta$ {3.82, 3.76, 3.65, 3.61, 3.56}, 3a/b-H, 5a/b-H, 6a/b-H, 8a/b-H, 9a/b-H, 11a/b-H, 12a/b-H (Spacer) {3.77, 3.76, 3.66, 3.66, 3.60}, S_2^β {3.76}, 6'a/b-H {3.69}, 5'-H {3.60}, 3'-H {3.56}), 3.47 (dd, 2 H, $J_{H_2',H_3'} = 9.6$ Hz, $J_{H_2',H_1'} = 8.0$ Hz, 2'-H, P_1^δ {3.50}), 3.29 (dd, 1 H, $J_{H\beta a,H\beta b} = 17.1$ Hz, $J_{H\beta a,H\alpha} = 4.5$ Hz, $H^{\beta a}$), 3.22-3.11 (m, 3 H, R^δ {3.18}, $H^{\beta b}$ {3.17}), 2.90 (dd, 1 H, $J_{D\beta a,D\beta b} = 17.2$ Hz, $J_{D\beta a,D\alpha} = 6.6$ Hz, $D^{\beta a}$), 2.82 (dd, 1 H, $J_{D\beta b,D\beta a} = 16.3$ Hz, $J_{D\beta b,D\alpha} = 6.3$ Hz, $D^{\beta b}$), 2.76-2.62 (m, 2 H, 2a/b-H (Spacer)), 2.35-2.18 (m, 4 H, $P_{(1,2)}^\beta$ {2.30, 2.23}), 2.11-1.78 (m, 21 H, V^β {2.06}, $P_{(1-5)}^\gamma$ {2.02, 1.99, 1.94}, CH_3 (NHAc) {1.97}, $P_{(3-5)}^\beta$ {1.96, 1.90, 1.83}, $R^{\beta a}$ {1.80}), 1.75-1.59 (m, 3 H, $R^{\beta b}$ {1.71}, R^γ {1.65}), 1.41 (t, 3 H, $J_{CH_3,CH_2} = 7.0$ Hz, CH_3CH_2 (Squarat)), 1.34 (d, 9 H, $J_{A_{2,3\beta},A_{2,3\alpha}} = 6.9$ Hz, $A_{(2,3)}^\beta$, A_4^β {1.33}), 1.30 (d, 3 H, $J_{A_{1\beta},A_{1\alpha}} = 6.9$ Hz, A_1^β), 1.24 (d, 3 H, $J_{T\gamma^*,T\beta^*} = 6.0$ Hz, $T^{\gamma*}$), 1.17 (d, 3 H, $J_{T_2\gamma,T_2\beta} = 6.6$ Hz, T_2^γ), 1.15 (d, 3 H, $J_{T_1\gamma,T_1\beta} = 7.0$ Hz, T_1^γ), 0.95 (d, 3 H, $J_{V\gamma a,V\beta} = 7.1$ Hz, $V^{\gamma a}$), 0.93 (d, 3 H, $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.9$ Hz, $V^{\gamma b}$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, D_2O , DEPT, HMQC), δ (ppm): 188.8, 184.9 (C=O (Squarat)), 174.5, 174.5, 174.4, 174.3, 173.9, 173.9, 173.7, 173.6, 173.1, 172.7, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.5, 171.2 (25 x C=O (Carboxyl, NHAc), C=C (Squarat)), 156.8 (C=NH (Arg)), 133.5 (H^e), 128.4 (H^γ), 117.3 (H^δ), 104.6 (C1'), 99.1 (C1), 77.0 ($T^{\beta*}$), 76.9 (C3), 75.0 (C5'), 72.5 (C3'), 70.9 (C5), 70.6 (C2'), 70.5 (CH_2O (Squarat)), 69.6 (C5, C6, C8, C11 (Spacer)), 68.9 (C4), 68.5 (C4'), 67.0 ($T_{(1,2)}^\beta$), 66.1, 65.5 (C3, C9 (Spacer)), 61.5, 61.3 (C6, C6'), 61.1, 61.0 ($S_{(1,2)}^\beta$), 60.8, 60.5, 60.1 ($P_{(1-5)}^\alpha$), 59.3 (V^α), 58.9 (T_2^α), 58.7 (T_1^α), 57.1 ($T^{\alpha*}$), 55.5 (S_1^α), 55.0 (S_2^α), 52.1 (H^α), 51.1 (R^α), 50.3 (D^α), 49.6 (A_1^α), 48.3 (C2), 48.0, 47.8, 47.7 ($P_{(2-5)}^\delta$), 47.7, 47.6 ($A_{(2-4)}^\alpha$), 47.4 (P_1^δ), 43.9 (C12 (Spacer)), 42.4 ($G_{(1,2)}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 35.6 (D^β), 34.0 (C2 (Spacer)), 30.3 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 29.1, 28.9 ($P_{(1-5)}^\beta$), 27.5 (R^β), 26.1 (H^β), 24.6, 24.5, 24.3 ($P_{(1-5)}^\gamma$), 23.9 (R^γ), 22.3 (CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.7 ($T_{(1,2)}^\gamma$), 18.5, 18.3 ($V^{\gamma a/b}$), 17.8 ($T^{\gamma*}$), 16.2 ($A_{(1)}^\beta$), 15.2, 15.2 ($A_{(2-4)}^\beta$), 15.0 (CH_3 (Squarat)).

Konjugation von EtO-Squarat-Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl}}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin-OH mit Rinderserumalbumin (BSA) (109)^[114]

Es wurden 3.3 mg (1.28 μ mol) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **106** in 3.0 mL einer Lösung aus Dinatriumhydrogenphosphat (65 mg pro 1 mL Wasser, pH = 9.5) gelöst und mit 4.3 mg (0.065 μ mol) Rinderserumalbumin (BSA) versetzt. Die Lösung wurde 3 d bei Raumtemp. gerührt und anschließend die nicht gekuppelten Glycopeptidmoleküle mit Hilfe einer Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) durch fünfmaliges Filtrieren mit jeweils 50 mL Millipore-Wasser entfernt. Nach Gefriertrocknung wurde das Neoglycoprotein **109** als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 5.6 mg farbloses Lyophilisat

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), *m/z*: 71943.94 Da

Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde eine Belegung von 1–3 Molekülen **106** pro BSA- Molekül ermittelt.

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (107)

(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Zu einer Lösung von 26.0 mg (10.6 μ mol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **102** in 6 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette 1.57 μ L (10.5 μ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion pipettiert.

In jeweils 5 μL Schritten wurde eine ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben (50 μL) bis ein pH-Wert von 8 erreicht wurde. Nach 3 h Rühren bei Raumtemp. (Reaktionskontrolle durch analytische RP-HPLC) wurde mit 5 Tropfen verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Das restliche Wasser wurde durch Gefriertrocknung entfernt und das Quadratsäuremonoester-funktionalisierte Glycopeptid wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min, $R_t = 21.20$ min) gereinigt.

Ausbeute: 16.8 mg (62%, 6.51 μmol), farbloses Lyophilisat

$[\alpha]_D^{23} = -105.8$ ($c = 1.00$, H₂O)

C₁₀₉H₁₇₀FN₂₇O₄₄ ($M = 2581.67$ g/mol) [2580.19]

Analytische RP-HPLC: $R_t = 12.69$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min).

ESI-MS (positiv), m/z : 1291.76 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1291.10).

MALDI-TOF-MS (DHB, positiv), m/z : 2582.76 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 2582.68).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1291.1000 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1291.1019).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, NOESY, TOCSY), δ (ppm): 8.61 (d, 1 H, $J_{\text{H}\epsilon, \text{H}\delta} = 1.4$ Hz, H ϵ), 7.30 (d, 1 H, $J_{\text{H}\delta, \text{H}\epsilon} = 1.2$ Hz, H δ), 4.96 (d, 1 H, $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.74-4.27 (m, 21 H, D α {4.70}, H α {4.69}, 1'-H {4.69}, T α^* {4.64}, R α {4.63}, A_(3,4) α {4.57}, q, $J_{\text{A}3,4\alpha, \text{A}3,4\beta} = 7.2$ Hz}, A₂ α {4.55}, S₁ α {4.51}, t, $J_{\text{S}1\alpha, \text{S}1\beta} = 5.4$ Hz}, S₂ α {4.45}, P₍₁₋₅₎ α {4.39, 4.37, 4.34}, T₁ α {4.34}, T β^* {4.32}, T₂ α {4.30}, V α {4.28}), 4.35-4.20 (m, 1 H, 2'-H), 4.26-4.12 (m, 5 H, A₁ α {4.24}, 2-H {4.21}, T_(1,2) β {4.20, 4.18}, 4-H {4.14}), 4.05-3.54 (m, 41 H, 3-H {4.02}, 5-H {4.01}, G_(1,2) α {3.95}, 4'-H {3.94}, 3'-H {3.88}, S₁ β {3.88}, P₍₁₋₅₎ δ {3.80, 3.76, 3.66, 3.62, 3.56}, 11a/b-H, 3a/b-H (Spacer) {3.77, 3.66}, 6'a/b-H {3.74}, 5a/b-H, 6a/b-H (Spacer) {3.74}, S₂ β {3.75}, 6a/b-H {3.72, 3.69}, 8a/b-H, 9a/b-H, 12a/b-H (Spacer) {3.66, 3.61}, 5'-H {3.66}), 3.30 (dd, 1 H, $J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\beta\text{b}} = 15.7$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{a}, \text{H}\alpha} = 5.5$ Hz, H βa), 3.23-3.12 (m, 3 H, R δ {3.19}, H βb {3.17}), 2.94 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{a}, \text{D}\beta\text{b}} = 17.0$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a}, \text{D}\alpha} = 6.4$ Hz, D βa), 2.86 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{b}, \text{D}\beta\text{a}} = 17.1$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{b}, \text{D}\alpha} = 6.8$ Hz, D βb), 2.78-2.55 (m, 2 H, 2a/b-H (Spacer)), 2.37-2.18 (m, 4 H, P_(1,2) β {2.30, 2.22}), 2.11-1.78 (m, 21 H, V β {2.06}, P₍₁₋₅₎ γ {2.05, 2.02, 1.99, 1.95}, P₍₃₋₅₎ β {1.99, 1.92, 1.84}, CH₃ (NHAc) {1.96}, R βa {1.82}), 1.75-1.58 (m, 3 H, R βb {1.72}, R γ {1.64}), 1.41 (dd, 3 H, $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{a}} = 13.9$ Hz, $J_{\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{b}} = 7.0$ Hz, CH₃CH₂ (Squarat)), 1.35 (d, 3 H, A₄ β , $J_{\text{A}4\beta, \text{A}4\alpha} = 7.0$ Hz, A₄ β), 1.35 (d, 6 H, $J_{\text{A}2,3\beta, \text{A}2,3\alpha} = 7.0$ Hz, A_(2,3) β), 1.31 (d, 3 H, $J_{\text{A}1\beta, \text{A}1\alpha} = 7.2$ Hz, A₁ β), 1.25 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma^*, \text{T}\beta^*} = 6.3$ Hz, T γ^*), 1.18 (d, 3 H, $J_{\text{T}2\gamma, \text{T}2\beta} = 6.5$ Hz,

T_2^γ), 1.16 (d, 3 H, $J_{T_1^\gamma, T_1^\beta} = 6.4$ Hz, T_1^γ), 0.95 (d, 3 H, $J_{V^\gamma a, V^\beta} = 6.6$ Hz, $V^\gamma a$), 0.94 (d, 3 H, $J_{V^\gamma b, V^\beta} = 6.5$ Hz, $V^\gamma b$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, D_2O , DEPT, HMQC, HMBC), δ (ppm): 188.8, 183.3 (C=O (Squarat)), 176.1, 174.9, 174.9, 174.4, 174.1, 173.9, 173.7, 173.7, 173.5, 173.1, 172.6, 172.4, 172.0, 171.9, 171.5, 171.3, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 170.7 (25 x C=O, (Carboxyl, NHAc), C=C (Squarat)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.4 (H^ϵ), 128.4 (H^γ), 117.2 (H^δ), 102.1 (d, $J_{C_1', F} = 25.6$ Hz, C_1'), 99.2 (C_1), 91.0 (d, $J_{C_2', F} = 180.0$ Hz, C_2'), 77.9 (C_3), 77.2 ($T^{\beta*}$), 75.1 (C_5'), 71.3 (d, $J_{C_3', F} = 16.9$ Hz, C_3), 71.0 (C_5), 70.6 (CH_2 (Squarat)), 69.6, 69.4 (C_3 , C_{11} (Spacer)), 69.0 (C_4'), 68.6 (C_4), 67.0 ($T_{(1,2)}^\beta$), 66.1 (C_5 , C_6 , C_8 , C_9 (Spacer)), 61.4, 61.2, 61.1, 60.8 (C_6 , C_6' , $S_{(1,2)}^\beta$), 60.7, 60.5, 60.1, 60.0, 59.6 ($P_{(1-5)}^\alpha$), 59.3 (V^α), 58.9 (T_2^α), 58.7 (T_1^α), 57.0 ($T^{\alpha*}$), 55.5 (S_1^α), 55.0 (S_2^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.1 (D^α), 49.6 (A_1^α), 48.2 (C_2), 48.0, 47.8 ($P_{(2-5)}^\delta$), 47.7, 47.6 ($A_{(2-4)}^\alpha$), 47.4 (P_1^δ), 43.9 (C_{12} (Spacer)), 42.4 ($G_{(1,2)}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 35.1 (D^β), 34.0 (C_2 (Spacer)), 30.2 (V^β), 29.6, 29.3, 29.2, 28.8 ($P_{(1-5)}^\beta$), 27.4 (R^β), 26.1 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 ($P_{(1-5)}^\gamma$), 23.9 (R^γ), 22.1 (CH_3 (NHAc)), 18.8, 18.7 ($T_{(1,2)}^\gamma$), 18.5 ($V^\gamma a$), 18.3 ($T^{\gamma*}$), 17.9 ($V^\gamma b$), 16.2 ($A_{(1)}^\beta$), 15.2, 15.1, 15.0 ($A_{(2-4)}^\beta$), 15.0 (CH_3 (Squarat)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.6 Hz, D_2O), δ (ppm): - 207.1 (dd, $J_{F_2, H_2} = 52.4$ Hz, d, $J_{F_2, H_3} = 15.4$ Hz).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH mit Rinderserum (BSA) (110)

Es wurden 6.0 mg (2.32 μmol) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **107** in 4.0 mL einer Lösung aus Dinatriumhydrogenphosphat (65 mg pro 1 mL Wasser, pH = 9.5) gelöst und mit 6.0 mg (0.09 μmol) Rinderserumalbumin (BSA) versetzt. Die Lösung wurde 3 d bei Raumtemp. gerührt und anschließend die nicht gekuppelten Glycopeptidmoleküle mit Hilfe einer Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) durch fünfmaliges Filtrieren mit jeweils 50 mL Millipore-Wasser entfernt. Nach Gefriertrocknung wurde das Neoglycoprotein **110** als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 6.0 mg farbloses Lyophilisat

MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z : 73876.9 Da

Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde eine Belegung von 2–5 Molekülen pro BSA-Molekül ermittelt.

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal2F-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH 107 mit Tetanus Toxoid (TTox) (112)

Es wurden 2.8 mg (1.09 μmol) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal2F-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **107** in 3.0 mL einer Lösung aus Dinatriumhydrogenphosphat (65 mg pro 1 mL Wasser, pH = 9.5) gelöst und mit 121 μL (0.014 μmol) Tetanus Toxoid (TTox) versetzt. Die Lösung wurde 3 d bei Raumtemp. gerührt und anschließend die nicht gekuppelten Glycopeptidmoleküle mit Hilfe einer Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) durch fünfmaliges Filtrieren mit jeweils 50 mL Millipore-Wasser entfernt. Nach Gefriertrocknung wurde das Neoglycoprotein **112** als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 6.8 mg farbloses Lyophilisat

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-N-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[2,6-dideoxy-2,6-bisfluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (108)

(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal2,6F₂-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH)

Zu einer Lösung von 23.0 mg (9.35 μmol) H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal2,6F₂-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **108** in 6 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette 1.48 μL (9.38 μmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion pipettiert. In jeweils 5μL-Schritten wurde eine ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben

(50 μL) bis ein pH-Wert von 8 erreicht wurde. Nach 2 h Rühren bei Raumtemp. (Reaktionskontrolle durch analytische RP-HPLC) wurde mit 5 Tropfen verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Nach der Entfernung des Wassers durch Gefriertrocknung wurde das Quadratsäuremonoester-funktionalisierte Glycopeptid durch semi-präparative RP-HPLC (Phenomenex Luna C18(2), Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min, $R_t = 21.86$ min) gereinigt.

Ausbeute: 10.7 mg (44%, 4.14 μmol), farbloses Lyophilisat

Analytische RP-HPLC: $R_t = 17.43$ min (Phenomenex Luna C18(2), $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (5:95)→(40:60), 30 min, (100:0) nach 10 min).

C₁₀₉H₁₆₉F₂N₂₇O₄₃ (M = 2583.66 g/mol) [2582.18]

ESI-MS (positiv), m/z : 869.08 ([M+2Na+H]³⁺, ber.: 869.06), 883.75 ([M+3Na]³⁺, ber.: 883.72), 1292.08 ([M+2H]²⁺, ber.: 1292.10).

MALDI-MS (DHB, positiv), m/z : 2583.45 ([M+Na]⁺, ber.: 2584.67).

HR-ESI-MS (positiv), m/z : 1292.1001 ([M+2H]²⁺, ber.: 1292.0997).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY), δ (ppm): 8.63 (d, 1 H, $J_{\text{He},\text{H}\delta} = 1.2$ Hz, H^ε), 7.31 (d, 1 H, $J_{\text{H}\delta,\text{He}} = 0.9$ Hz, H^δ), 4.99 (d, 1 H, $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 3.7$ Hz, 1-H), 4.76-4.29 (m, 22 H, 1'-H {4.75}, CH₂ (Squarat) {4.73}, D^α {4.71}, H^α {4.70}, 6'a/b-H {4.69, 4.56}, T^{α*} {4.66}, R^α {4.64}, A₄^α {4.62}, A_(2,3)^α {4.56, q, $J_{\text{A}2,3\alpha,\text{A}2,3\beta} = 7.2$ Hz}, S₁^α {4.53, t, $J_{\text{S}1\alpha,\text{S}1\beta} = 5.4$ Hz}, S₂^α {4.47}), P₍₁₋₅₎^α {4.42, 4.40, 4.35}, T₁^α {4.37}, T^{β*} {4.34}, T₂^α {4.31}, V^α {4.29}), 4.40-4.20 (m, 1 H, 2'-H), 4.28-4.18 (m, 4 H, A₁^α {4.25}, 2-H {4.24}, T_(1,2)^β {4.22, 4.20}), 4.15 (d, 1 H, $J_{\text{H}4,\text{H}3} = 2.0$ Hz, 4-H), 4.06-3.44 (m, 39 H, 3-H {4.02}, 4'-H {4.02}, 5-H {4.02}, G₂^α {4.00}, 5'-H {3.97, 3.93}, G₁^α {3.95}, 3'-H {3.91}, S₁^β {3.90}, P₍₁₋₅₎^δ {3.83, 3.78, 3.66, 3.64, 3.57+3.50}, 3a/b-H, 11a/b-H (Spacer) {3.79, 3.68}, S₂^β {3.78}, 5a/b-H, 6a/b-H (Spacer) {3.76}, 6a/b-H {3.75, 3.71}, 8a/b-H, 9a/b-H (Spacer) {3.68, 3.62}), 3.32 (dd, 1 H, $J_{\text{H}\beta\text{a},\text{H}\beta\text{b}} = 15.6$ Hz, $J_{\text{H}\beta\text{a},\text{H}\alpha} = 5.5$ Hz, H^{βa}), 3.25-3.14 (m, 3 H, R^δ {3.21}, H^{βb} {3.19}), 2.94 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{H}\beta\text{b}} = 17.0$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\alpha} = 6.4$ Hz, D^{βa}), 2.86 (dd, 1 H, $J_{\text{D}\beta\text{b},\text{D}\beta\text{a}} = 16.8$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{b},\text{D}\alpha} = 6.7$ Hz, D^{βb}), 2.75 (dt, 1H, $J_{\text{CH}2\text{a},\text{CH}2\text{b}} = 16.2$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{a},\text{CH}2} = 6.1$ Hz, 2a-H (Spacer)), 2.64 (dt, 1H, $J_{\text{CH}2\text{b},\text{CH}2\text{a}} = 16.5$ Hz, $J_{\text{CH}2\text{b},\text{CH}2} = 5.8$ Hz, 2b-H (Spacer)), 2.39-2.19 (m, 4 H, P_(1,2)^β {2.30, 2.26}), 2.13-1.79 (m, 21 H, V^β {2.08}, P₍₁₋₅₎^γ {2.06, 2.02, 1.99, 1.97}, P₍₃₋₅₎^β {1.99, 1.97, 1.93}, CH₃ (NHAc) {1.98}, R^{βa} {1.85}), 1.78-1.62 (m, 3 H, R^{βb} {1.75}, R^γ {1.67}), 1.43 (dd, 3 H, $J_{\text{CH}3,\text{CH}2\text{a}} = 13.8$ Hz, $J_{\text{CH}3,\text{CH}2\text{b}} = 6.9$ Hz, CH₃CH₂ (Squarat)), 1.38 (d, 3 H, $J_{\text{A}4\beta,\text{A}4\alpha} = 7.0$ Hz, A₄^β), 1.37 (d, 6 H, $J_{\text{A}2,3\beta,\text{A}2,3\alpha} = 7.1$ Hz, A_{2,3}^β), 1.33 (d, 3 H, $J_{\text{A}1\beta,\text{A}1\alpha} = 7.2$ Hz, A₁^β), 1.28 (d, 3 H, $J_{\text{T}\gamma^*,\text{T}\beta^*} = 6.1$

Hz, T^{γ*}), 1.21 (d, 3 H, $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.5$ Hz, T₁^γ), 1.18 (d, 3 H, $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.5$ Hz, T₂^γ), 0.98 (d, 3 H, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.4$ Hz, V^{γa}), 0.96 (d, 3 H, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.4$ Hz, V^{γb}).

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, DEPT, HMQC), δ (ppm): 188.8, 183.3 (C=O (Squarat)), 174.9, 174.9, 174.4, 174.1, 174.0, 173.7, 173.5, 173.1, 172.7, 172.5, 172.0, 171.9, 171.5, 171.4, 171.2, 171.1, 170.9 (25 x C=O, (Ac, Carboxyl, NHAc), C=C (Squarat)), 156.7 (C=NH (Arg)), 133.4 (H^ε), 128.4 (H^γ), 117.3 (H^δ), 102.2 (d, $J_{C1', F2} = 24.8$ Hz, C1'), 99.5 (C1), 90.8 (d, $J_{C2', F2} = 185.4$ Hz, C2'), 82.7 (d, $J_{C6', F6} = 155.9$ Hz, C6'), 78.0 (C3), 77.2 (T^{β*}), 73.4 (d, $J_{C5', F6} = 21.1$ Hz, C5'), 71.1 (d, $J_{C3', F2} = 15.1$ Hz, C3'), 71.0 (d, $J_{C4', F6} = 11.1$ Hz, C4'), 70.6 (CH₂O (Squarat)), 69.6, 69.4 (C3, C11 (Spacer)), 68.7 (C4, C5), 67.0 (T_(1,2)^β), 66.1 (C5, C6, C8, C9 (Spacer)), 61.3, 61.2, 61.1 (C6, S_(1,2)^β), 60.8, 60.1 (P₍₁₋₅₎^α), 59.4 (V^α), 58.9 (T₂^α), 58.8 (T₁^α), 57.0 (T^{α*}), 55.5 (S₁^α), 55.0 (S₂^α), 52.3 (H^α), 51.1 (R^α), 50.2 (D^α), 49.6 (A₁^α), 48.2 (C2), 48.1, 47.9 (P₍₂₋₅₎^δ), 47.7, 47.6 (A₍₂₋₄₎^α), 47.4 (P₁^δ), 42.3 (G_(1,2)^α), 40.5 (R^δ), 35.6 (C12 (Spacer)), 34.1 (D^β), 33.0 (C2 (Spacer)), 30.1 (V^β), 29.3, 29.2, 29.1, 28.9 (P₍₁₋₅₎^β), 27.4 (R^β), 26.2 (H^β), 24.7, 24.6, 24.5, 24.3 (P₍₁₋₅₎^γ), 24.1 (R^γ), 23.9 (CH₃ (NHAc)), 18.8, 18.7 (T_(1,2)^γ), 18.4 (V^{γa}), 18.3 (T^{γ*}), 17.9 (V^{γb}), 16.2 (A₍₁₎^β), 15.2, 15.1, 15.0 (A₍₂₋₄₎^β), 15.0 (CH₃ (Squarat)).

¹⁹F-NMR (376.6 Hz, D₂O), δ (ppm): - 207.2 (dd, $J_{F2, H2} = 52.1$ Hz, $J_{F2, H3} = 15.2$ Hz, 2-F), - 229.6 (dt, $J_{F6, H6a/b} = 46.2$ Hz, $J_{F6, H5} = 15.0$ Hz, 6-F).

Konjugation von EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-2,6F₂-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH an Rinderserum (BSA) (111)

Es wurden 4.2 mg (1.63 μmol) EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal-2,6F₂-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH **108** in 4.0 mL einer Lösung aus Dinatriumhydrogenphosphat (65 mg pro 1 mL Wasser, pH = 9.5) gelöst und mit 5.9 mg (0.085 μmol, 19 eq) Rinderserum (BSA) versetzt. Die Lösung wurde 5 d bei Raumtemp. gerührt und anschließend die nicht gekuppelten Glycopeptidmoleküle mit Hilfe einer Ultrafiltrationsanlage (Membran 30 kDa) durch fünfmaliges Filtrieren mit jeweils 50 mL Millipore-Wasser entfernt. Nach Gefrier-trocknung wurde das Neoglycoprotein **111** als farbloses Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 9.7 mg farbloses Lyophilisat

Maldi-TOF-MS (Sinapinsäure, positiv), m/z : 74862.22

Durch Maldi-TOF Massenspektrometrie wurde eine Belegung von 2–7 Molekülen **108** pro BSA Molekül ermittelt.

5.7 Daten für die ELISA bzw. Neutralisations-ELISA Experimente

Allgemeine Durchführung des ELISA Tests in Abb. 3.4.8:

1. Beschichtung der Platten mit BSA-Konjugat **110** in Coating-Puffer ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), $50 \mu\text{l/Nute}$, 1 h, 37°C .

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. Blockierung noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit einer Lösung von BSA in PBS (1%-ig) 1 x, 0.5 h, 37°C .

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

3. Titration der Antikörper bzw. des Kulturüberstands des Hybridoms (Kultur 9) ab einer Verdünnung von 1:2, $50 \mu\text{l/well}$, 1 h, 37°C .

Durchführung: Es wurden $50 \mu\text{l}$ einer Lösung von BSA in PBS 1 x in jeder Nute vorgelegt. Anschließend wurden $50 \mu\text{l}$ des entsprechenden Antikörpers (TFA 40.06 (VV = 0.105 mg/mL) und TFA 40.15 (VV = 0.115 mg/mL)) bzw. Kulturüberstands des Hybridoms (Kultur 9) (Verdünnung: 1:2 in einer Lösung von BSA in PBS (1%-ig) 1 x) in die erste Nute einer Reihe der ELISA-Platte (\rightarrow Endverdünnung = 1:4096) pipettiert. Nach gründlichem Mischen wurden $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und zur folgenden Nute gegeben. Diese Prozedur wird bis zum Ende einer Reihe wiederholt. Aus der letzten Vertiefung werden abschließend $50 \mu\text{l}$ der Lösung entnommen und verworfen. Es wird 1 h bei 37°C inkubiert.

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

4. Zugabe des biotinylierten, gegen Maus-Gesamtimmunglobulin gerichteten Antikörpers aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in einer Gelatine Lösung in PBS (1%-ig) 1 x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37°C .

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. Zugabe von $50 \mu\text{l/well}$ SA-HPO (1:10000) in einer Gelatine-Lösung in PBS (1%-ig) 1 x.

Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

6. Zugabe von 50 µl/Nute der ABTS/H₂O₂-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Als Negativkontrolle wird der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Beschichtung mit dem Antigen-Konjugat durchgeführt.

Verdünnung	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1.024	1/2.048	1/4.096
Kultur 9	0,9739	0,8213	0,7664	0,7756	0,8167	0,7356	0,5411	0,3519	0,2224	0,1418	0,0978	0,0717
TFA 40.15	1,1037	1,0388	0,9114	0,8896	0,9221	0,9189	0,9702	1,0245	0,9832	0,9895	0,9595	0,8531
TFA 40.06	1,1048	1,0682	1,0378	1,0521	1,0397	1,0373	1,0634	0,9971	1,0341	1,0440	0,9191	0,7064
(-)-Kontrolle	0,3235	0,2807	0,2222	0,1692	0,0774	0,0750	0,0623	0,0545	0,0608	0,0547	0,0516	0,0473

Tabelle 4: Daten zum ELISA-Test

Allgemeine Durchführung der Neutralisationstests in Abb. 3.4.10 und Abb. 3.4.11:

1. Beschichtung der Platten mit BSA-Konjugat: MUC1-T-BSA **109** in Coating-Puffer (c = 5 µg/ml), 50 µl/Nute, 1 h, 37 °C.

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. Blocken noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit einer Lösung von BSA in PBS (1%-ig) 1 x, 0.5 h, 37 °C.

3. Inkubation des Antikörpers TFA 40.06 bzw. 40.15 mit den Antigenen (siehe Abb. 3.4.9):
Durchführung: Hierzu wurden jeweils 60 µl des Antikörpers TFA 40.06 (VV = 0.105 mg/mL) bzw. TFA 40.15 (VV = 0.115 mg/mL) in der Konzentration von 0.300 in die ersten drei Nute einer Grainer-96-Loch-Mikrotiterplatte eingebracht. In die restlichen 9 Vertiefungen wurden 40 µl PBS (1 x) eingebracht und 1/3 titriert (Endkonzentration: 0.011). Anschließend wurden 10 µl der Inkubationssubstanz in einer Konzentration von c = 100 µg/ml zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

4. 3 x Waschen der mit BSA-Konjugaten beschichteten Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. Übertrag der angesetzten Neutralisationsreihen von der Grainer-Platte (Punkt 3.) in die mit BSA-Konstrukten beschichteten Platte. Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

6. Zugabe des biotinylierten, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten Antikörpers aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in einer Gelatine Lösung in PBS (1%-ig) 1 x) einer Stammlösung mit c = 1.2 µg/ml), 1 h, 37 °C .

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

7. Zugabe von 50 µl/well SA-HPO (1:10000) in einer Gelatine-Lösung PBS (1%-ig) 1 x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

8. Zugabe von 50 µl/Nute der ABTS/H₂O₂-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Die Positiv-Kontrolle erfolgte durch Zugabe des Antikörpers TFA 40.06 bzw. TFA 40.15 in einer Reihe der Platte ohne die Antigen-Konjugate. Als Negativkontrolle wurde der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Zugabe des Antikörpers TFA 40.06 bzw. 40.15 durchgeführt.

Konzentration [µg/mL]	0.300	0.100	0.033	0.011
MUC1 TF 98	0,5317	0,2150	0,1192	0,0940
MUC1 2'FT 102	0,2353	0,1223	0,1020	0,0866
MUC1 2',6'FT 105	0,1792	0,1138	0,1028	0,0946
positiv-Kontrolle	1,4817	0,8597	0,4534	0,2246
negativ-Kontrolle	0,0855	0,0857	0,0813	0,1510

Tabelle 5: Daten des Neutralisationsexperimentes mit Antikörper TFA 40.06

Konzentration [µg/mL]	0.300	0.100	0.033	0.011
MUC1 TF 98	0,5898	0,2271	0,1115	0,0796
MUC1 2'FT 102	0,1943	0,0971	0,0812	0,0760
MUC1 2',6'FT 105	0,1398	0,0892	0,0763	0,0758
positiv-Kontrolle	1,3732	0,7679	0,3494	0,1751
negativ-Kontrolle	0,0686	0,0685	0,0691	0,0745

Tabelle 6: Daten des Neutralisationsexperimentes mit Antikörper TFA 40.15

Allgemeine Durchführung des Neutralisationstests in Abb. 3.4.12:

1. Beschichtung der Platten mit BSA-Konjugat: MUC1-T-BSA **109** in Coating-Puffer (c = 5 µg/ml), 50 µl/Nute, 1 h, 37 °C.

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

2. Blocken noch verbliebener, unspezifischer Bindungsstellen mit einer Lösung von BSA in PBS (1%-ig) 1 x, 0.5 h, 37 °C.

3. Inkubation des Serums von Maus 15 mit den Antigenen (siehe Abb. 3.4.9):

Durchführung: Hierzu wurden jeweils 60 µl des Serums von Maus 15 in der Verdünnung von 1/5000 in die ersten drei Nute einer Grainer-96-Loch-Mikrotiterplatte eingebracht. In die restlichen 9 Vertiefungen wurden 40 µl PBS (1 x) eingebracht und 1/3 titriert (Endverdünnung: 1/135000). Anschließend wurden 10 µl der Inkubationssubstanz in einer Konzentration von $c = 100 \mu\text{g/ml}$ zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

4. 3 x Waschen der mit BSA-Konjugaten beschichteten Platte mit *Wasch-Puffer*.

5. Übertrag der angesetzten Neutralisationsreihen von der Grainer-Platte (Punkt 3.) in die mit BSA-Konstrukten beschichteten Platte. Es wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

6. Zugabe des biotinylierten, gegen Maus-Gesamtimmungglobulin gerichteten Antikörpers aus dem Schaf (sheep anti mouse bio, Verdünnung 1:10000 (in einer Gelatine Lösung in PBS (1%-ig) 1 x) einer Stammlösung mit $c = 1.2 \mu\text{g/ml}$), 1 h, 37 °C .

3 x Waschen der Platte mit *Wasch-Puffer*.

7. Zugabe von 50 µl/well SA-HPO (1:10000) in einer Gelatine-Lösung PBS (1%-ig) 1 x. Inkubation: 0.5 h, 37 °C.

8. Zugabe von 50 µl/Nute der ABTS/H₂O₂-Lösung, Inkubation: ca. 0.5 h bei Raumtemp. Die Positiv-Kontrolle erfolgte durch Zugabe des Serums in einer Reihe der Platte ohne die Antigen-Konjugate. Als Negativkontrolle wurde der ELISA-Test in einer Reihe der Platte ohne Zugabe des Serums durchgeführt.

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	1/5.000	1/15.000	1/45.000	1/135.000
MUC1 TF 98	1,0586	0,7217	0,2618	0,1357
MUC1 2'-FT 102	0,8390	0,3927	0,1533	0,0865
MUC1 2',6'-FT 105	0,7867	0,3545	0,1466	0,0819
MUC1	0,9876	0,5419	0,2146	0,0958
MUC4	1,1817	0,9929	0,5068	0,1780
positiv-Kontrolle	1,1998	1,0478	0,5827	0,2139
negativ-Kontrolle	0,0596	0,0612	0,0663	0,0620

Tabelle 7: Daten zu Neutralisationsexperiment mit Mausserum

6 Literatur

- [1] www.who.int, World Health Organisation, Fakten über Krebs weltweit.
- [2] www.gesundheitsforschung-bmbf.de, Bundesministerium für Forschung und Bildung.
- [3] B. Nosse, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 164-172.
- [4] S. Wittrock, H. Kunz, *BioTec* **2006**, *1*, 2-5.
- [5] S. Dermine, D. E. Gilham, D. M. Shaw, E. J. Davidson, E.-K. Meziane, A. Armstrong, R. E. Hawkins, P. L. Stern, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1704*, 11-35.
- [6] R. R. Koganty, M. A. Reddish, B. M. Longenecker, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 190-198.
- [7] G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198-1206.
- [8] S.-I. Hakomori, *Ann. Rev. Immunol.* **1984**, *2*, 103-126.
- [9] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- [10] G. J. Strous, J. Dekker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *27*, 57-92.
- [11] M. C. Rose, *Am. J. Physiol* **1992**, *263*, L413-L429.
- [12] M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45-60.
- [13] H.-P. Hauber, S. C. Foley, Q. Hamid, *Can. Respir. J.* **2006**, *13*, 327-335.
- [14] L. A. Bobek, H. Tsai, A.R. Biesbrock, M. J. Levine, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20563-20569.
- [15] I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 67-95.
- [16] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [17] A. L. Sorensen, C.A. Reis, M. A. Trap, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitrou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2005**, *16*, 96-107.
- [18] J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1991**, *49*, 1-5.
- [19] S. Müller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A. M. Lawson, G.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24780-24793.
- [20] F. G. M. Snudewint, S. von Mensdorff-Pouilly, A. H. Karantu-Wanamarta, A. A. Verstaeten, P. O. Livingston, J. Hilgers, P. Kenemans, *Int. J. Cancer* **2001**, *93*, 97-106.
- [21] F.-G. Hanisch, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 705-708.
- [22] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitrou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286-15293.
- [23] D. M. Swallow, S. Gendler, B. Griffiths, G. Cornes, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell, *Nature* **1987**, *328*, 82-84.
- [24] J. Hilkins, M. J. L. Ligtenberg, H. L. Vos S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359-363.
- [25] H. Thie, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, **2008**.
- [26] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355-364.
- [27] I. Brockhausen, J.-M- Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Chem*, **1995**, *233*, 607-617.
- [28] P. Jirholt, C. A. K. Borrebaeck, M. Ohlin, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 407-416.

- [29] F. G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconj. J.* **1990**, *7*, 525-543.
- [30] L. Kinarsky, G. Suryanarayanan, O. Prakash, H. Paulsen, H. Clausen, F.-G. Hanisch, M. A. Hollingsworth, S. Sherman, *Glycobiology* **2003**, *13*, 929-939.
- [31] S. Adluri, T. Gilewski, S. Zhang, V. Ramnath, G. Ragupathi, P. Livingston, *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1806-1812.
- [32] D. I. R. Spencer, S. Missailidis, G. Denton, A. Murray, K. Brady, C. I. D. Matteis, M. S. Searle, S. J. B. Tendler, M. R. Price, *Biospectroscopy* **1999**, *5*, 79-91.
- [33] U. Karsten, S. von Mensdorff-Puilly, S. Goletz, *Tumor Biol.* **2005**, *26*, 217-220.
- [34] A. K. Chan, D. C. Lockhart, W. von Bernstorff, R. A. Spanjaard, H.-G. Joo, T. J. Eberlein, *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 721-726.
- [35] Y. J. Kim, A. Varki, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 569-576.
- [36] J. S. Grinstead, R. R. Koganty, M. J. Krantz, B. M. Longenecker, A. P. Campbell, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 9946-9961.
- [37] L. A. Holmberg, B. M. Sandmaier, *Expert Rev. Vaccines* **2004**, *6*, 655-663.
- [38] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688-7692; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7556.
- [39] D. Urban, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *Chem. Commun.* **2009**, 5335-5349.
- [40] C. H. Röhrig, M. Takhi, R. R. Schmidt, *Synlett* **2001**, *7*, 1170-1172.
- [41] J. J. Rich, D. R. Bundle, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 897-900.
- [42] E. Bousquet, A. Spadaro, M. S. Pappaladro, R. Bernadini, R. Romeo, L. Panza, G. Ronsisvalle, *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 527-541.
- [43] U. Tedebark, M. Medal, L. Panza, K. Bock, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1815-1818.
- [44] F. Peri, L. Cipolla, B. La Ferla, P. Dumy, F. Nicotra, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 399-404.
- [45] F. Peri, L. Cipolla, M. Rescigno, B. La Ferla, F. Nicotra, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 325-328.
- [46] L. Cipolla, M. Rescigno, A. Leone, F. Peri, B. La Ferla, F. Nicotra, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1639-1646.
- [47] M. Schlosser, *Enantiocontrolled Synthesis of Fluoro-Organic Compounds: Stereochemical Challenges and Biomedical Targets* (V. A. Soloshonok, Hrsg.), Wiley, Chichester **1999**, 501-541.
- [48] P. Kirsch, *Modern Fluoroorganic Chemistry*, Wiley-VCH Weinheim, **2004**.
- [49] P. Jeschke, *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 570-589.
- [50] M. Shimizu, T. Hiyama, *Angew. Chem.* **2004**, *117*, 218-234; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 214-231.
- [51] K. L. Kirk, *Org. Proc. Res. Develop.* **2008**, *12*, 305-321.
- [52] J. C. Biffinger, H. W. Kim, S. G. DiMagno, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 622-627.
- [53] H. J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 637-643.
- [54] G. Resnati, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9385-9445.
- [55] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 320-330.
- [56] R. U. Lemieux, R. Cromer, U. Spohr, *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 3083-3098.

- [57] J. Xia, J. Xue, R. D. Locke, E. V. Chandrasekaran, T. Srikrishnan, K. L. Matta, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3696-3706.
- [58] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [59] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- [60] M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608.
- [61] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-601.
- [62] J. D. McCarter, W. Yeung, J. Chow, D. Dolphin, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5792-5797.
- [63] S. G. Withers, I. P. Street, P. Bird, D. H. Dolphin, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7531-7533.
- [64] J. D. McCarter, M. J. Adam, C. Braun, M. Namchuk, D. Tull, S. G. Withers, *Carbohydrate. Res.* **1993**, *249*, 77-90.
- [65] S. G. Withers, K. Rupitz, I. P. Street, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7929-7932.
- [66] C. S. Rye, S. G. Withers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573-580.
- [67] J. C. M. Uitdehaag, R. Mosi, K. H. Kalk, B. A. van der Veen, L. Dijkhuizen, S. G. Withers, B. W. Dijkstra, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 432-436.
- [68] J. Xue, V. Kumar, S. D. Khaja, E.V. Chandrasekaran, R. D. Locke, K. L. Matta, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 8325-8335.
- [69] D. D. Marathe, A. Buffone Jr., E. V. Chandrasekaran, J. Xue, R. D. Locke, M. Nasisikenari, J. T. Y. Lau, K. L. Matta, S. Neelamegham, *Blood*, **2010**, *115*, 1303-1312.
- [70] I. P. Street, C. R. Armstrong, S. G. Withers, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6021-6027.
- [71] N. F. Taylor, Carbon-Fluorine Compounds: *Chemistry, Biochemistry and Biological Activities Symposium*, Elsevier, Amsterdam, **1972**, 215-238.
- [72] J. C. Biffinger, H. W. Kim, S. G. DiMagno, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 622-627.
- [73] C. P. J. Glaudemans, P. Kováč, A. S. Rao, *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 267-277.
- [74] B. Holm, S. M. Baquer, L. Holm, R. Holmdahl, J. Kihlberg, *J. Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3981-3987.
- [75] H. Kunz, *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 563-573.
- [76] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629-631; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 618-621.
- [77] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (2nd Ed.), Wiley-VCH, Weinheim **2003**, S. 128.
- [78] T. Becker, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.
- [79] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [80] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Deutsche Patentanmeldung* **1978**, AZ: P 2816340.8.
- [81] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.
- [82] H. Kunz, in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (S. Hanessian, Hrsg.), Marcel Dekker, New York, **1997**, 265.
- [83] G. Braum, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1991**.
- [84] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, *4*, 525-542.
- [85] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89-107.
- [86] H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 17-34.
- [87] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957.

- [88] J. Banoub, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1167-1195.
- [89] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.
- [90] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *8*, 751-769.
- [91] E. Meinjohanns, M. Medal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, *10*, 985-993.
- [92] S. Wittrock, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.
- [93] G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.* **1923**, *46*, 1705-1710.
- [94] S. K. George, B. Holm, C. A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **2001**, 880-885.
- [95] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, *563*, 139-145.
- [96] Y. Niu, N. Wang, X. Cao, Y.S. Ye, *Synlett* **2007**, *13*, 2116-2120.
- [97] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4539-4565.
- [98] T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 16-25.
- [99] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35-42.
- [100] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379-382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366-369.
- [101] S. Dziadek, C. G. Espínola, H. Kunz, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 519-543.
- [102] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. I. Lee, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 480-483.
- [103] K. Furuhashi, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 255-259.
- [104] H. Ando, M. Kiso, *Glycoscience* **2008**, *Part 5*, 1313-1359.
- [105] A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carb. Res.* **1991**, *212*, 277-281.
- [106] C. Brocke, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**.
- [107] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C13-C17.
- [108] V. Matrichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1702-1706.
- [109] P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9-C12.
- [110] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 303-308.
- [111] P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313-4316.
- [112] G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331-1334.
- [113] U. Greilich, R. Brescello, K. H. Jung, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, *5*, 663-672.
- [114] A. Kaiser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2009**.
- [115] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115-116.
- [116] W. Birberg, H. Lönn, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7457-7458.
- [117] I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. du Penhhoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 23-41.
- [118] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694-696.
- [119] R. R. Schmidt, E. Rücker, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1421-1424.
- [120] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981-4993.

- [121] O. T. Schmidt, in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II* (Eds.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, Vol. II, p. 318.
- [122] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6569-6578.
- [123] M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1998**, 1381-1394.
- [124] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 611-617.
- [125] J. N. Watson, D. Indurugella L. L. Cheng, A. A. Narine, A. J. Bennet, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 13264-13275.
- [126] C. Mersch, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**.
- [127] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 47-86.
- [128] M. Albert, B. J. Paul, K. Dax, *Synlett* **1999**, *9*, 1483-1485.
- [129] R. E. Banks, S. N. Mohialdin-Khaffaf, G. Sankar Lal, I. Sharif, R. G. Syvret, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, *8*, 595-596.
- [130] R. E. Banks, M. K. Besheesh, S. N. Mohialdin-Khaffaf, I. Sharif, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, *16*, 2069-2076.
- [131] J. J. Hart, R. G. Syvret, *J. Fluorine Chem.* **1999**, *100*, 157-161.
- [132] P. T. Nyffler, S. Gonzalez Durón, M. D. Burkart, S. P. Vincent, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 196-217; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *44*, 192-212.
- [133] S. P. Vincent, M. D. Burkart, C.-Y. Tsai, Z. Zhang, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5264-5279.
- [134] M. Albert, K. Dax, J. Ortner, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4839-4848.
- [135] M. D. Burkart, Z. Zhang, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11743-11746.
- [136] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *9*, 731-732.
- [137] C. Filser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [138] D. Crich, L. Li, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1681-1690.
- [139] M. J. Adam, B. D. Pate, *Carb. Res.* **1983**, *124*, 215-224.
- [140] S. Wagner, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2009**.
- [141] D. Chrich, B. Wu, *Org. Lett.* **2008**, *18*, 4033-4035.
- [142] R. R. Schmidt, M. Stumpp, *Liebigs Ann. der Chemie* **1983**, 1249-1256.
- [143] S. A. Allman, H. H. Jensen, B. Vijayakrishnan, J. A. Garnett, E. Leon, Y. Liu, D. C. Anthony, N. R. Sibson, T. Feizi, S. Mettews, B. G. Davis, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2522-2529.
- [144] W. A. Ssarek, A. Zamojski, K. N. Tiwari, E. R. Ison, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3827-3830.
- [145] H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, *1*, 75-86.
- [146] L. Ayala, C. G. Lucero, J. A. C. Romero, S. A. Tabacco, K. A. Woerpel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15521-15528.
- [147] J. A. C. Romero, S. A. Tabacco, K. A. Woerpel, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 168-169.
- [148] M. Miljkovic, D. Yeagley, P. Deslongchamps, Y. L. Dory, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7597-7604.
- [149] J. Dinkelaar, A. R. de Jong, R. van Meer, M. Somers, G. Lodder, H. S. Overkleeft, J. D. C. Codée, G. A. van der Marel, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4982-4991.
- [150] I. V. Alabugin, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3910-3919.
- [151] M. T. Yang, K. A. Woerpel, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 545-553.

- [152] M. G. Beaver, K. A. Woerpel, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1107-1118.
- [153] J. I. Seeman, *Chem. Rev.* **1993**, *83*, 83-134.
- [154] S. Koto, K. Asami, M. Hirooka, K. Nagura, M. Takizawa, S. Yamamoto, N. Okamoto, M. Sato, H. Tajima, T. Yoshida, N. Nonaka, T. Sato, S. Zen, K. Yago, F. Tomonaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 765-777.
- [155] W. Lu, L. Navidpour, S. D. Taylor, *Carb. Res.* **2005**, *340*, 1213-1217.
- [156] C. Bucher, R. Gilmour, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1-6.
- [157] K. Baumann, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2007**.
- [158] Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7211-7214.
- [159] Y. Nakahara, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carb. Res.* **1996**, *292*, 71-81.
- [160] G. S. Lal, G. P. Pez, R. G. Syvret, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1737-1755.
- [161] S. K. Madhusudan, G. Agnihotri, D. S. Negi, A. K. Misra, *Carbohydr Res.* **2005**, *340*, 1373-1377.
- [162] P. M. Bujar Barua, P. R. Sahu, E. Mondal, G. Bose, A. T. Khan, *Synlett* **2002**, *1*, 81-84.
- [163] J. Dinkelaar, M. D. Witte, L. J. van den Bos, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, *Carb. Res.* **2006**, *341*, 1723-1729.
- [164] T. Oshtari, M. Sibasaki, T. Yoshizawa, M. Tomita, K. Takao, S. Kobayashi, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10993-11006.
- [165] I. Damager, C. E. Olsen, B. L. Moller, M. S. Motawia, *Carb. Res.* **1999**, *320*, 19-30.
- [166] A. K. Misra, G. Agnihotri, *Carb. Res.* **2004**, *339*, 885-890.
- [167] Y. Oikawa, T. Yoshioka, O. Yonemitsu, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 885-888.
- [168] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (2nd Ed.), Wiley-VCH, Weinheim **2003**.
- [169] C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Roeder, *Synlett* **2009**, *13*, 2167-2171.
- [170] C. Schaab, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2010**.
- [171] H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohru, H. Meguro, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6317-6320.
- [172] C. Crich, O. Vinogradova, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11756-11765.
- [173] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [174] R. B. Merrifield, *Biochemistry*, **1964**, *3*, 1385-1390.
- [175] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 799-810.
- [176] R. J. Payne, C.-H. Wong, *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 21-43.
- [177] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 98-101.
- [178] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180-6183.
- [179] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686-4690.
- [180] P. Schultheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1983**, *95*, 64.
- [181] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Molecular Biotechnology* **2006**, *33*, 239-254.
- [182] I. W. James, *Tetrahedron.* **1999**, *55*, 4855-4946.
- [183] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [184] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451-454.
- [185] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.

- [186] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [187] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [188] J. M. Frechet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055-3056.
- [189] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *114*, 315-319; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 317-321.
- [190] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *107*, 901-904; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 803-805.
- [191] H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 732-734; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 711-713.
- [192] H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 48-49; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 71-72.
- [193] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 610-611.
- [194] F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 355-359.
- [195] E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
- [196] N. Sewald, H. D. Jakubke, "Peptides: Chemistry and Biology", 1. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [197] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, Bienert, Michael, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.
- [198] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [199] J. C. Sheehan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525.
- [200] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [201] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219-1222.
- [202] 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.
- [203] L. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [204] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [205] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- [206] 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.* **2002**, *114*, 1263-1266; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 441-445.
- [207] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [208] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [209] M. Rothe, J. Mazanek, *Angew. Chem.* **1972**, *74*, 290-291; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *11*, 293.
- [210] M. Rothe, J. Mazanek, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 439-459.
- [211] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.
- [212] P. M. Fischer, *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 9-35.
- [213] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 117-133; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 113-129.
- [214] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Molecular Biotechnology* **2006**, *33*, 233-254.

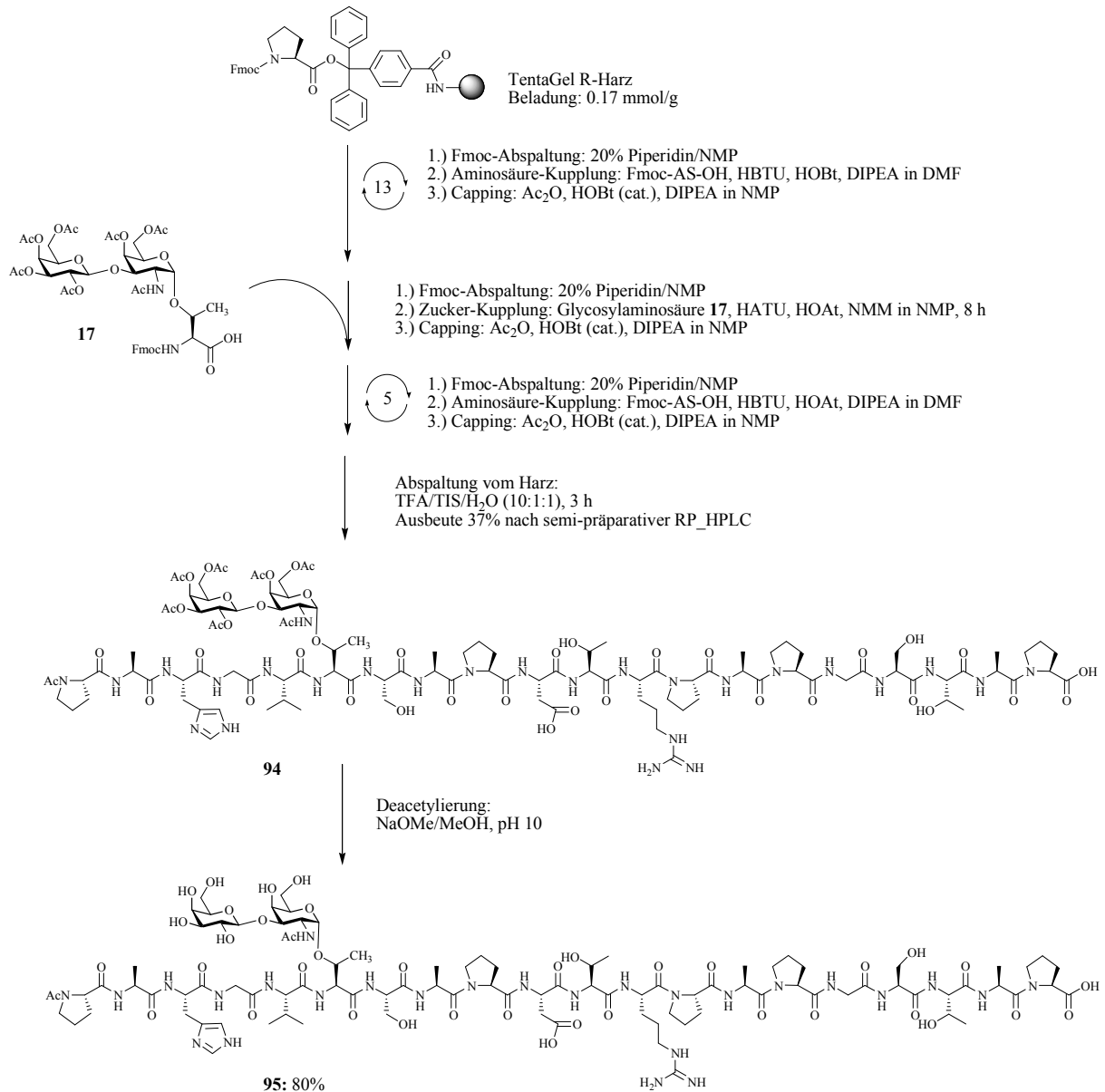
- [215] Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thornqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689-9692.
- [216] R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353-6370.
- [217] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.
- [218] J. Green, O. M. Ogunjobi, R. Ramage, A. S. J. Stewart, S. McCurdy, R. Noble, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4341-4344.
- [219] C. G. Fields, G. B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6661-6664.
- [220] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [221] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901-904.
- [222] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688-7692; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551-7556.
- [223] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **2008**, *120*, 7662-7667; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551-7556.
- [224] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772-3776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688-3692.
- [225] Y. Takano, M. Habiro, M. Someya, H. Hojo, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8395-8399.
- [226] M. Maemura, A. Ohgaki, Y. Nakahara, H. Hojo, Y. Nakahara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1575-1583.
- [227] W. F. Goebel, O. T. Avery, *J. Exp. Med.* **1929**, *50*, 521.
- [228] R. Schneerson, O. Barrera, A. Sutton, J. B. Robbins, *J. Exp. Med.* **1980**, *152*, 361.
- [229] M. H. V. van Regenmortel, J. P. Briand, S. Muller, S. Plaué, *Synthetic Polypeptides as Antigens, Vol.19*, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, **1988**.
- [230] S. Kurikka, H. Käyhty, L. Saarinen, P.-R. Rönberg, J. Eskola, P. H. Mäkelä, *J. Pediatr.* **1995**, *128*, 524-530.
- [231] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, *25*, 8487-8499.
- [232] R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Käyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K. P. Klugman, *Vaccine* **2005**, *23*, 802-806.
- [233] T. Peters Jr., *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161-245.
- [234] K. M. Murphy, A. B. Heimberger, D. Y. Loh, *Science* **1990**, *250*, 1720-1723.
- [235] K. E. van Holde, K. I. Miller, *Adv. Protein Chem.* **1995**, *47*, 1-81.
- [236] J. R. Harris, J. Markl, *Micron* **1999**, *30*, 597-623.
- [237] G. T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", 1. Aufl. Academic Press, San Diego **1996**.
- [238] L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148.
- [239] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M.F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215-1221.
- [240] A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **2010**, *122*, 8676-8681; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8493-8503.
- [241] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630.

- [242] R. Bourbonnais, D. Leech, M. G. Paice, *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**, 1379, 381-390.
- [243] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3 Ed., Pergamonn Press, Oxford **1988**.
- [244] R. Kumar, P. Tiwari, P. R. Maulik, A. K. Misra, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2335-2339.
- [245] G. J. L. Bernardes, E. J. Grayson, S. Thompson, J. M. Chalker, J. C. Errey, F. El Oualid, T. D. W. Claridge, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2276-2279; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2244-2247, supporting information.
- [246] Z. Zhang, G. Magnusson, *Carbohydr. Res.* **1996**, 295, 41-55.
- [247] B. K. Shull, Z. Wu, M. Koreeda, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, 15, 955-964.
- [248] O. Varela, G. M. de Fina, R. M. de Lederkremer, *Carbohydr. Res.* **1987**, 167, 187-196.
- [249] R. Bukowski, L. M. Morris, R. J. Woods, T. Weimar, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 14, 2697-2705.
- [250] M. Liu, V. G. Young, Jr., S. Lohani, D. Live, G. Barany, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1273-1285.
- [251] K. A. Winans, D. A. King, V. Rao, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **1999**, 38, 11700-11710.
- [252] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244.
- [253] H. Paulsen, A. Richter, V. Sinnwell, W. Stenzel, *Carbohydr. Res.* **1978**, 64, 339-362.
- [254] Y. Saito, T. Watanabe, H. Hashimoto, J. Yoshimura, *Carbohydr. Res.* **1987**, 169, 171-188.
- [255] L. Kisfaludy, I. Schön, *Synthesis* **1983**, 4, 325-327.
- [256] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1205-1220.
- [257] D. M. Rothman, M. E. Vazquez, E. M. Vogel, B. Imperiali, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6795-6798.
- [258] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4150-4162.
- [259] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- [260] G. D. K. Kumar, S. Baskaran, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 4520-4523.
- [261] X. Pannecoucke, G. Schmitt, B. Luu, *Tetrahedron* **1994**, 50, 6569-6578.
- [262] J. Xia, T. Srikrishnan, J. L. Alderfer, R. K. Jain, C. F. Piskorz, K. L. Matta, *Carbohydr. Res.* **2000**, 329, 561-577.
- [263] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, *Chem. Berichte* **1965**, 99, 611-617.
- [264] A. Malapelle, A. Coslovi, G. Doisneau, J.-M. Beau, *Euro. J. Org. Chem.* **2007**, 3145-3157.
- [265] S. Prytulla, J. Lauterwein, M. Klessinger, J. Thiem, *Carb. Res.* **1991**, 215, 345-349.
- [266] N. Sugiyama, K. Sugai, N. Yamada, M. Goto, C. Ban, K. Furuhata, H. Takayanagi, H. Ogura, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 1147-1152.
- [267] C. Shimizu, K. Ikeda, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 1772-1778.
- [268] S. Keil, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [269] N. Bézay, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**.
- [270] Y. Niu, N. Wang, X. Cao, Y.S. Ye, *Synlett* **2007**, 13, 2116-2120.
- [271] N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 2359-2368.

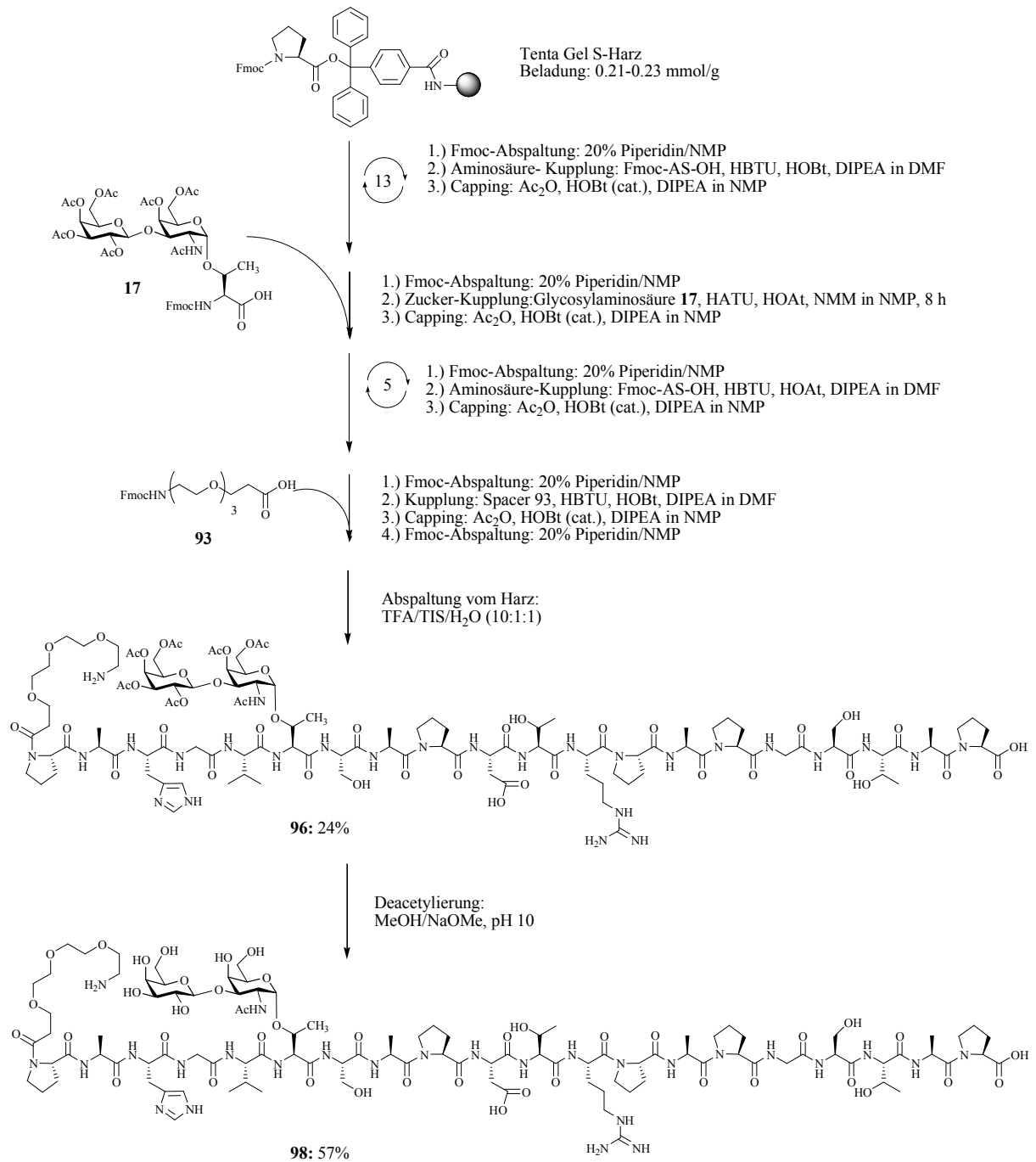
- [272] M. Leuck, H. Kunz, *J. Prak. Chem.* **1997**, 339, 332.
- [273] M. Albert, K. Dax, J. Ortner, *Tetrahedron* **1998**, 54, 4839-4848.
- [274] M. Albert, B. J. Paul, K. Dax, *Synlett* **1999**, 9, 1483-1485.
- [275] T. Oberbillig, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2009**.
- [276] J. G. Shelling, D. Dolphin, *Carbohydr. Res.* **1984**, 132, 241-259.
- [277] N. V. Bovin, S. E. Zurabyan, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1981**, 98, 25-35.
- [278] W. Pilgrim, P. V. Murphy, *Org. Lett.* **2009**, 11, 939-942.
- [279] L. Barbieri, V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, *Euro. J. Org. Chem.* **2005**, 3279-3285.
- [280] N. F. Taylor, P. W. Kent, *J. Chem. Soc.* **1958**, 872-875.
- [281] B. Doboboszewski, G. W. Hay, W. A. Szarek, *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 412-419.
- [282] C.-L. Schengrund, P. Kováč, *Carbohydr. Res.* **1999**, 319, 24-28.
- [283] P. W. Kent, J. R. Wright, *Carbohydr. Res.* **1972**, 22, 193-200.
- [284] T. L. Lowary, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, 249, 163-195.
- [285] C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Roeder, *Synlett* **2009**, 13, 2167-2171.
- [286] S. Dziadek, S. Jacques, D. R. Bundle, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 5908-5917.
- [287] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 8, 1355-1369.

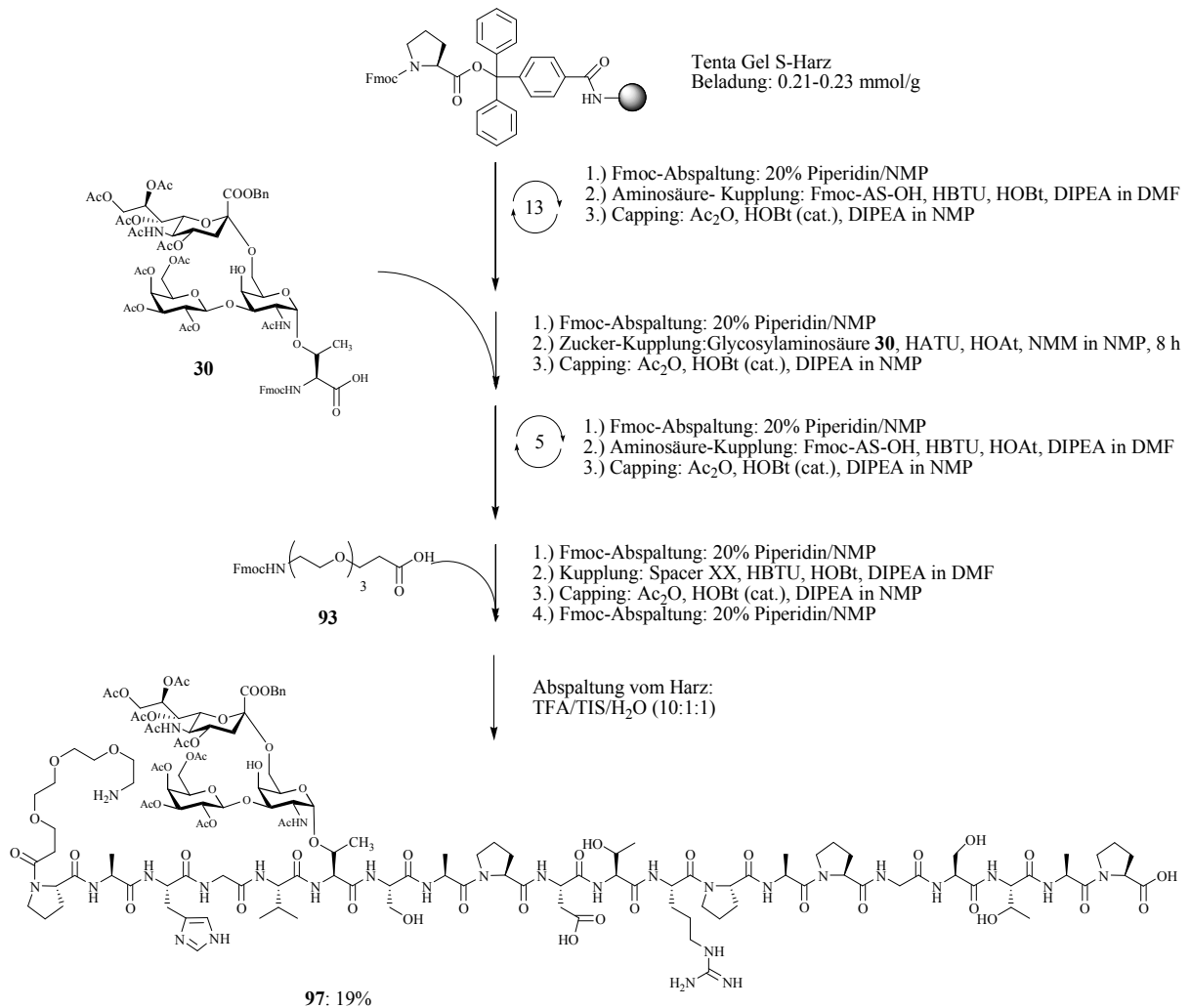
7 Syntheseprotokolle der Festphasensynthese von MUC1-Glycopeptiden

Synthese des Glycopeptids **95**:

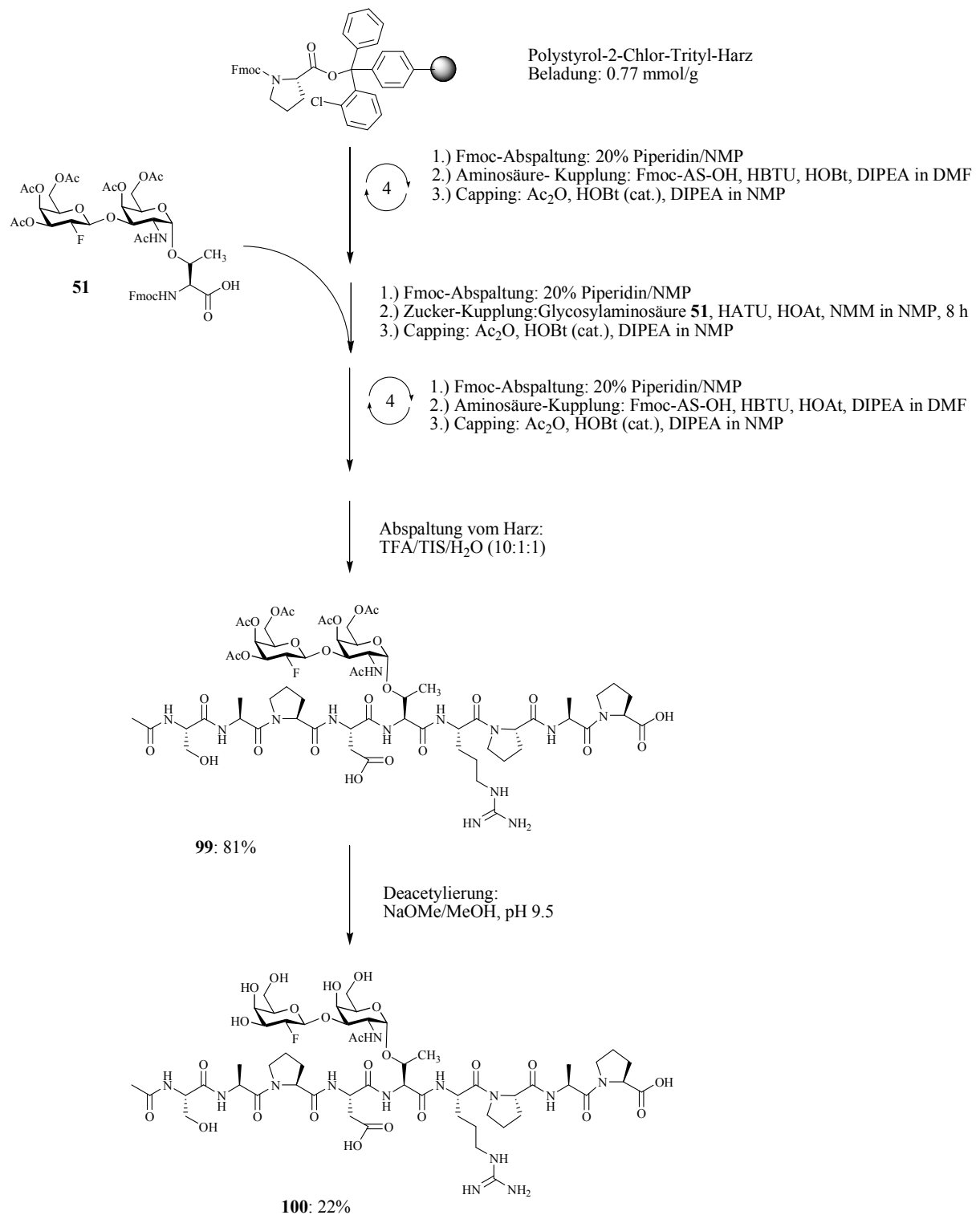


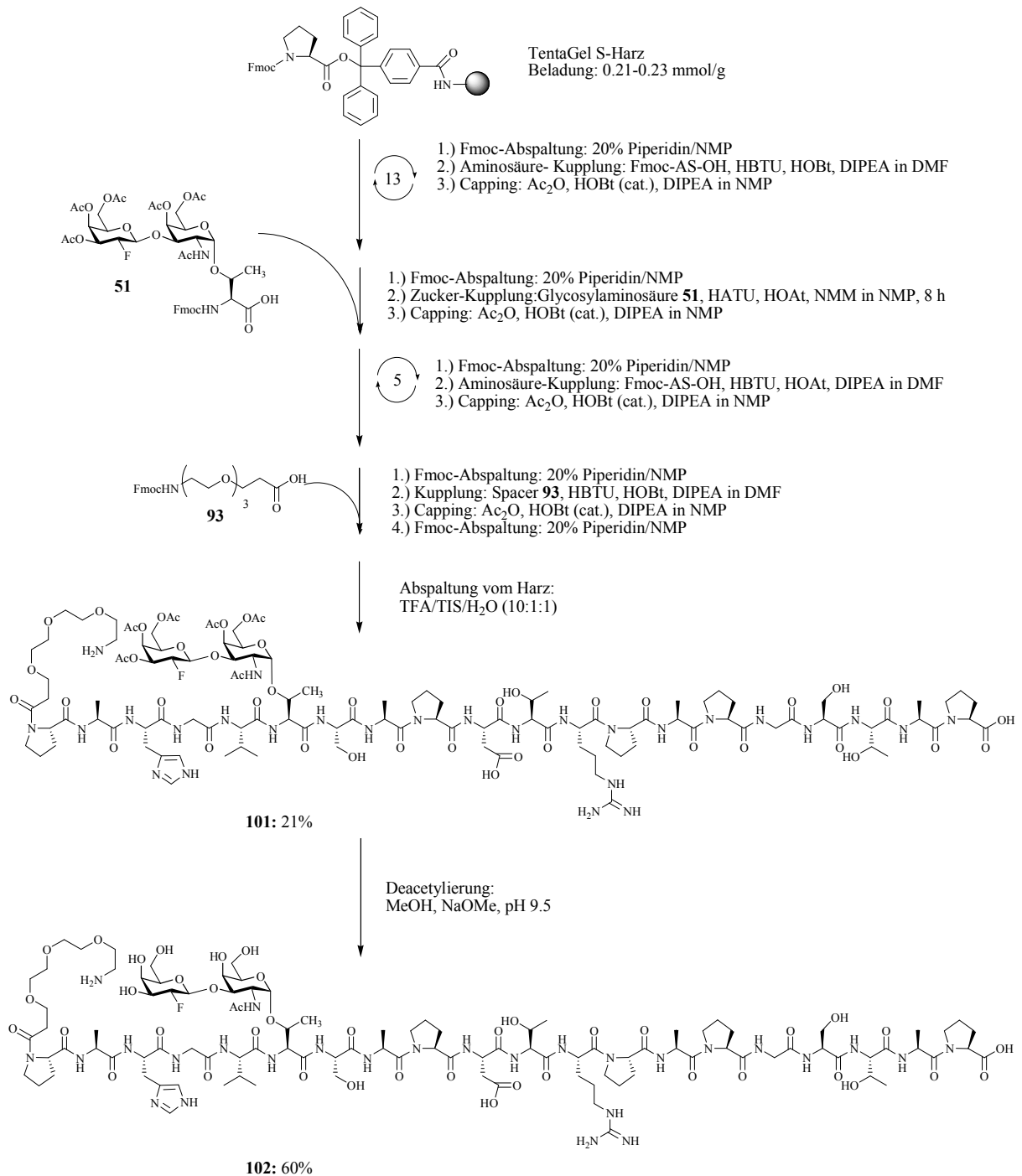
Synthese des Glycopeptids **98**:



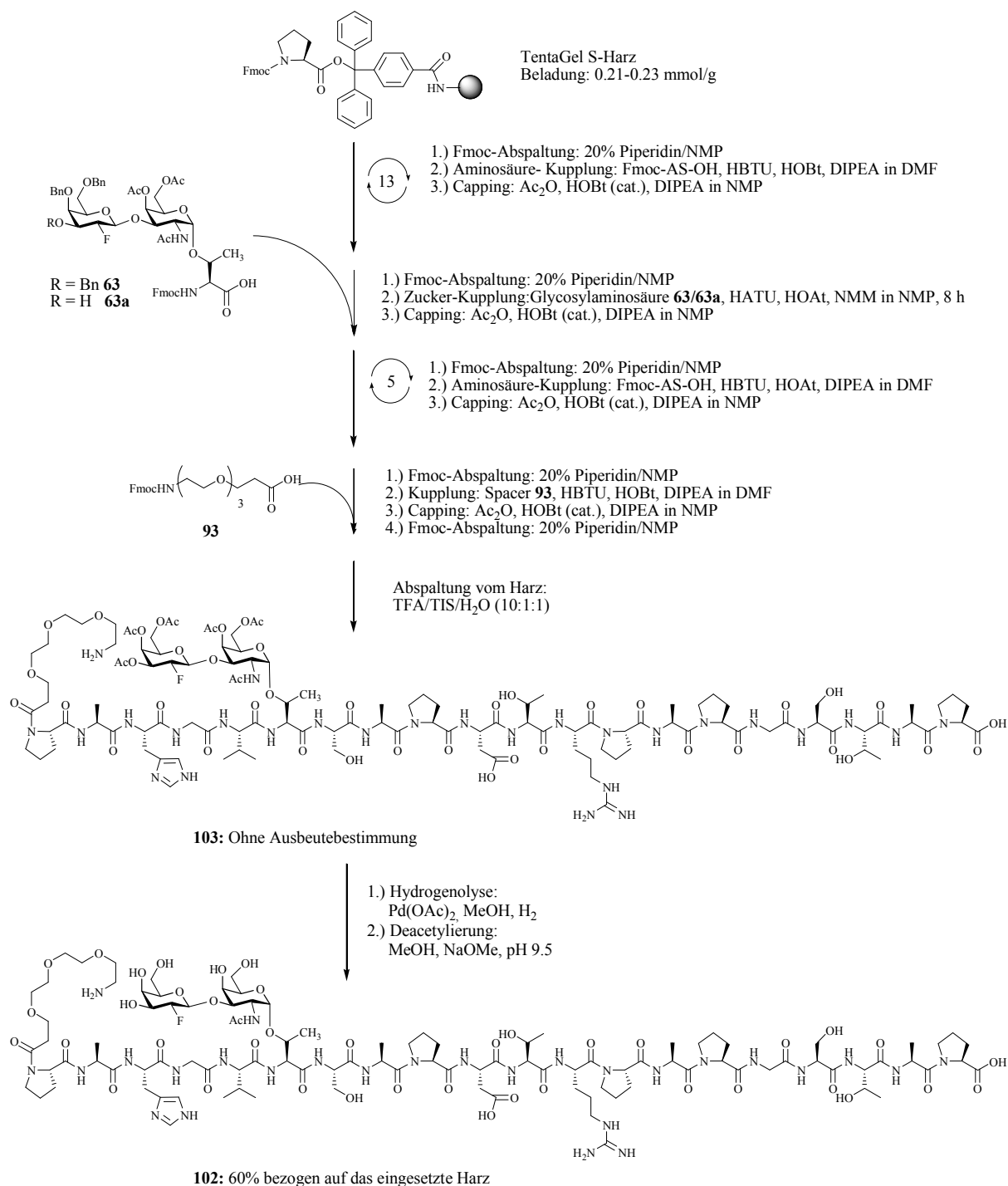
Synthese des Glycopeptids **97**:

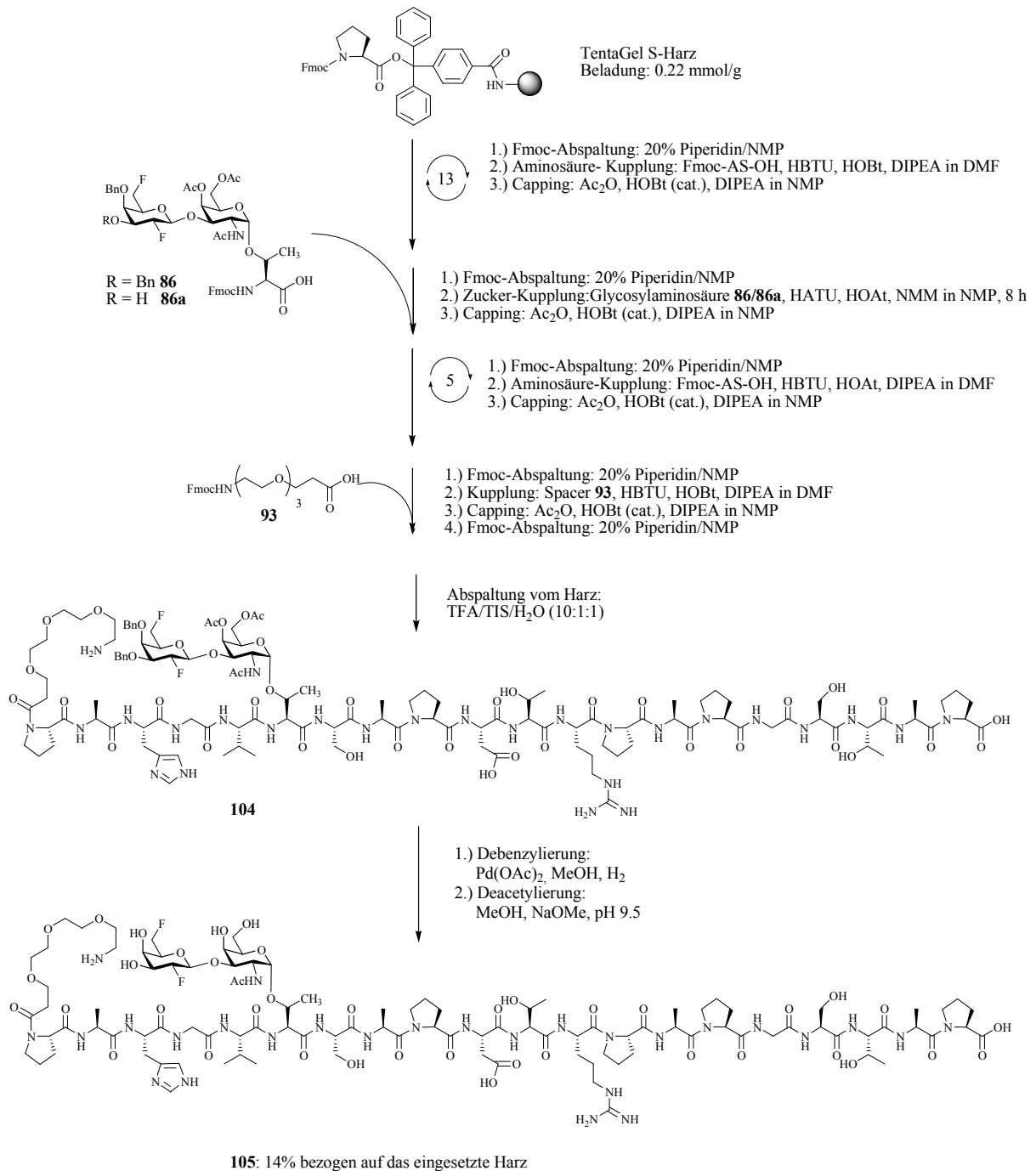
Synthese des Glycopeptids **100**:



Synthese des Glycopeptids **102 Variante A:**

Synthese des Glycopeptids **102 Variante B**:



Synthese des Glycopeptids **105**:

8 Spektroskopischer Anhang

8.1 Übersicht über den Spektrenanhang

3,4,6-Tri- <i>O</i> -benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (55) ^1H , ^{13}C , ^{19}F	XI
3,4,6-Tri- <i>O</i> - <i>para</i> -methoxyphenyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyl- trichloracetimidat (67) ^1H , ^{13}C , ^{19}F	XII
3,4-Di- <i>O</i> -benzyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (81) ^1H , ^{13}C , ^{19}F	XIV
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -benzyliden-3- <i>O</i> - [3,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)- <i>L</i> - threonin- <i>tert</i> -butylester (44) ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, ^{19}F	XV
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -benzyliden-3- <i>O</i> - [3,4,6-tri- <i>O</i> -benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)- <i>L</i> - threonin- <i>tert</i> butylester (56) ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC	XVIII
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -benzyliden-3- <i>O</i> - [3,4,6-tri- <i>O</i> - <i>para</i> -methoxybenzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galacto- pyranosyl)- <i>L</i> -threonin- <i>tert</i> butylester (68) ^1H , ^{13}C , COSY, ^{19}F	XX
<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl- <i>O</i> -(2-acetamido-2-desoxy-4,6- <i>O</i> -benzyliden-3- <i>O</i> - [3,4-di- <i>O</i> -benzyl-2,6-didesoxy-2,6-bisfluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)- <i>L</i> -threonin- <i>tert</i> butylester (82) ^1H , ^{13}C , HMQC, ^{19}F	XXII

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**73**)

¹H, ¹³C, COSY, HMQC, HMBC, ¹⁹F XXIV

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**98**)

¹H, ¹³C, COSY, HMQC XXVII

N-Acetyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-argininyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolin (**100**)

¹H, ¹³C, HMQC, ¹⁹F XXIX

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**102**)

¹H, ¹³C, COSY, HMQC, ¹⁹F XXXI

Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,6-didesoxy-2,6-bisfluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolin (**105**)

¹H, ¹³C, HMQC, ¹⁹F XXXIV

BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β Gal-(1 \rightarrow 3)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**109**)

MALDI XXXVI

BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGalF-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**110**)

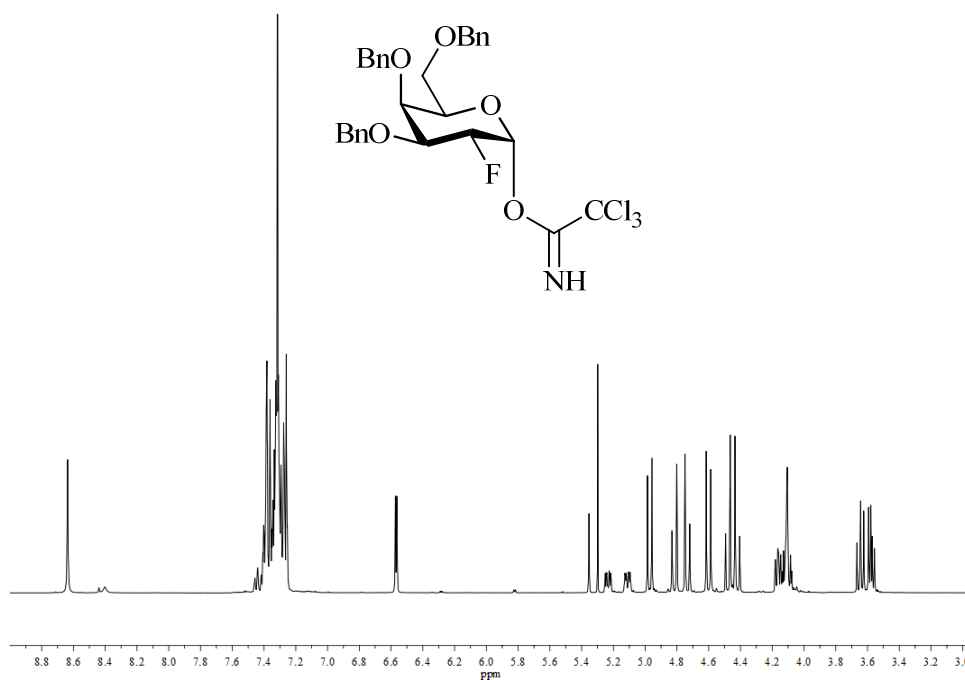
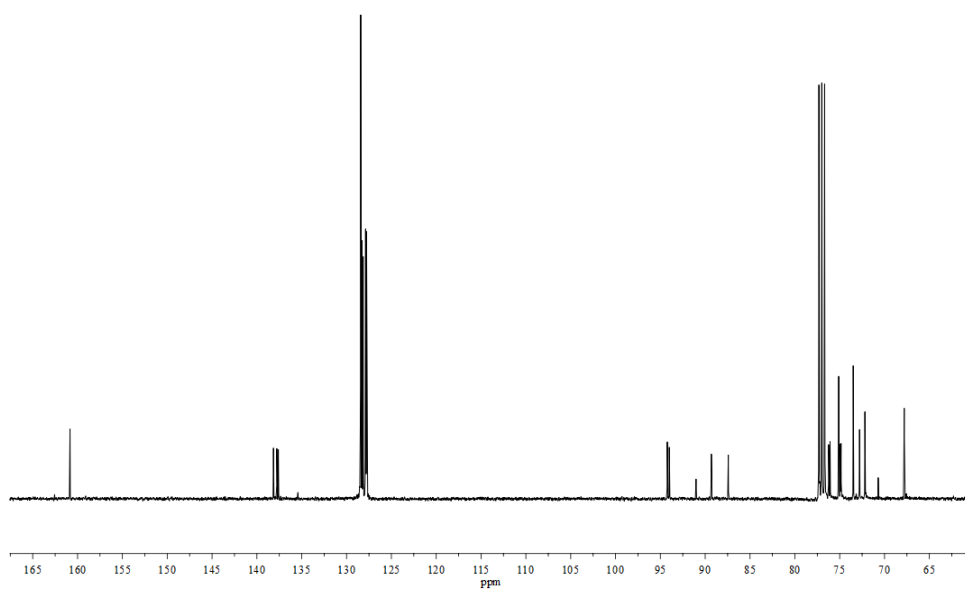
MALDI

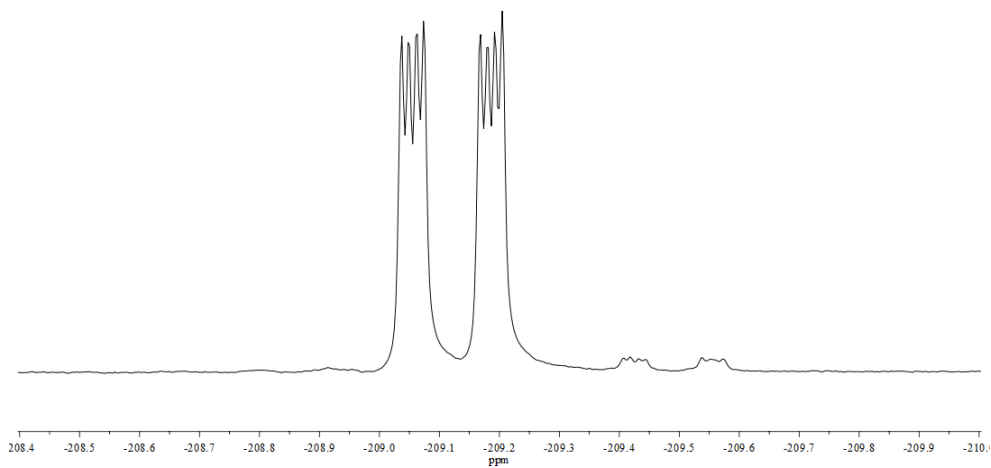
XXXVII

BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(βGal_{2,6}F₂-(1→3)-αGalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (**111**)

MALDI

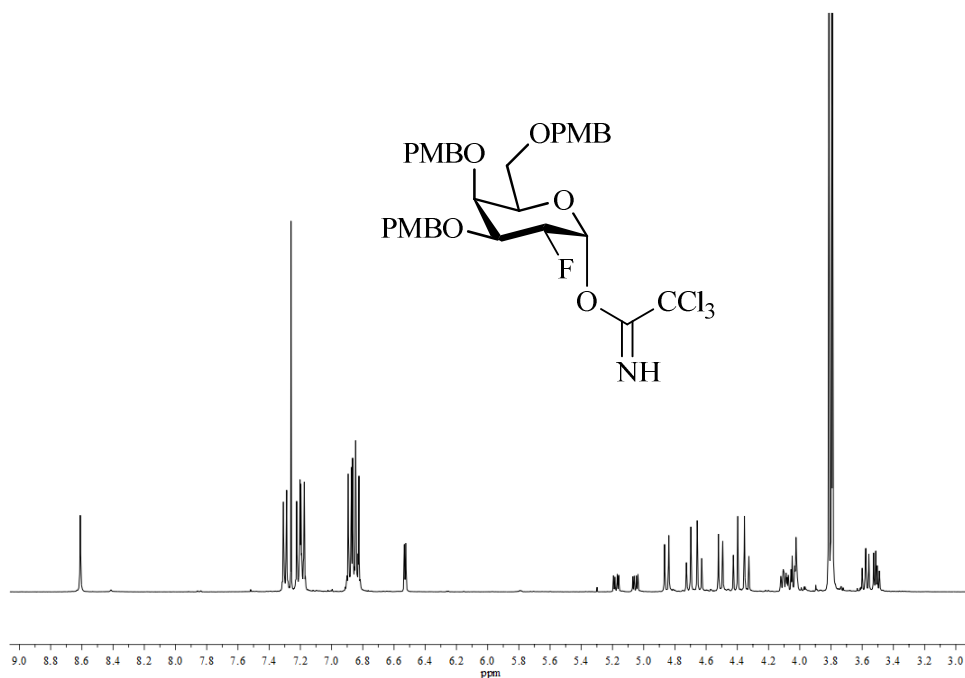
XXXVIII

α Bn₃Gal2F-TCI 55¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃)¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)

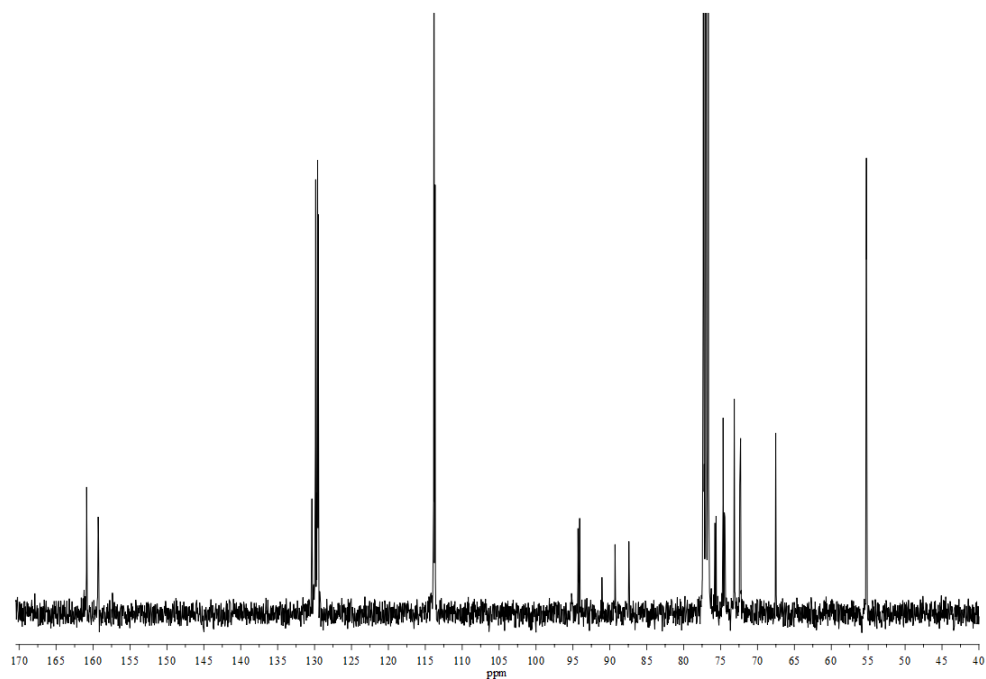


^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

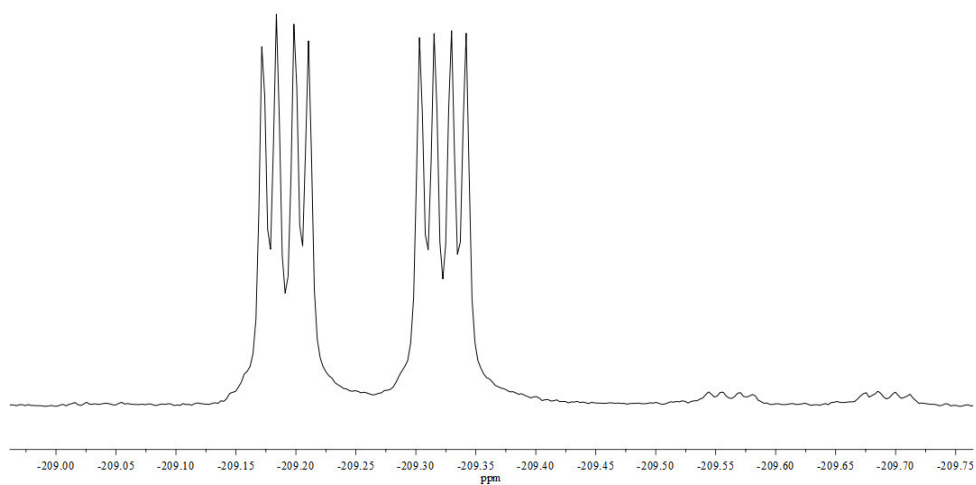
$\alpha\text{PMB}_3\text{Gal}2\text{F-TCl}$ 67



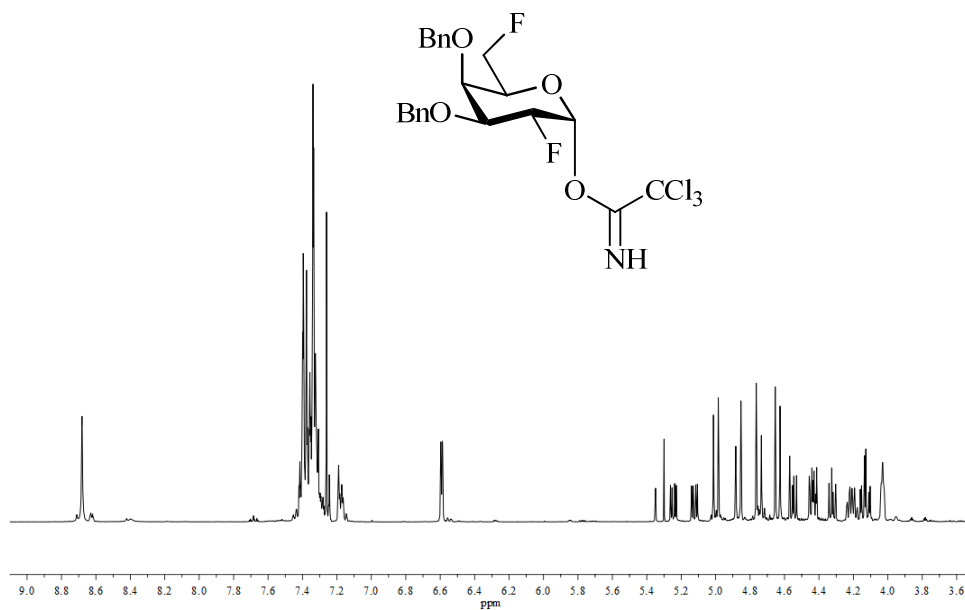
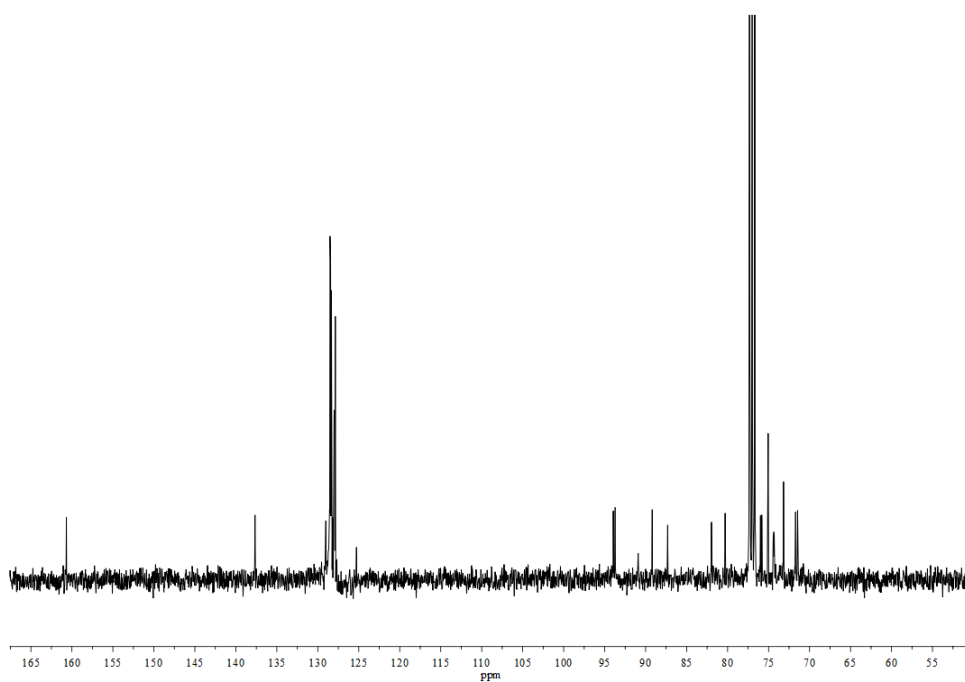
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)

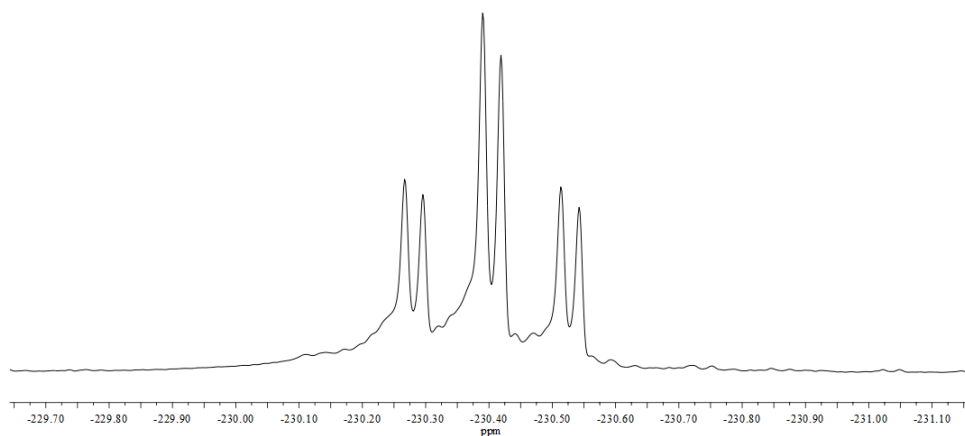


^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



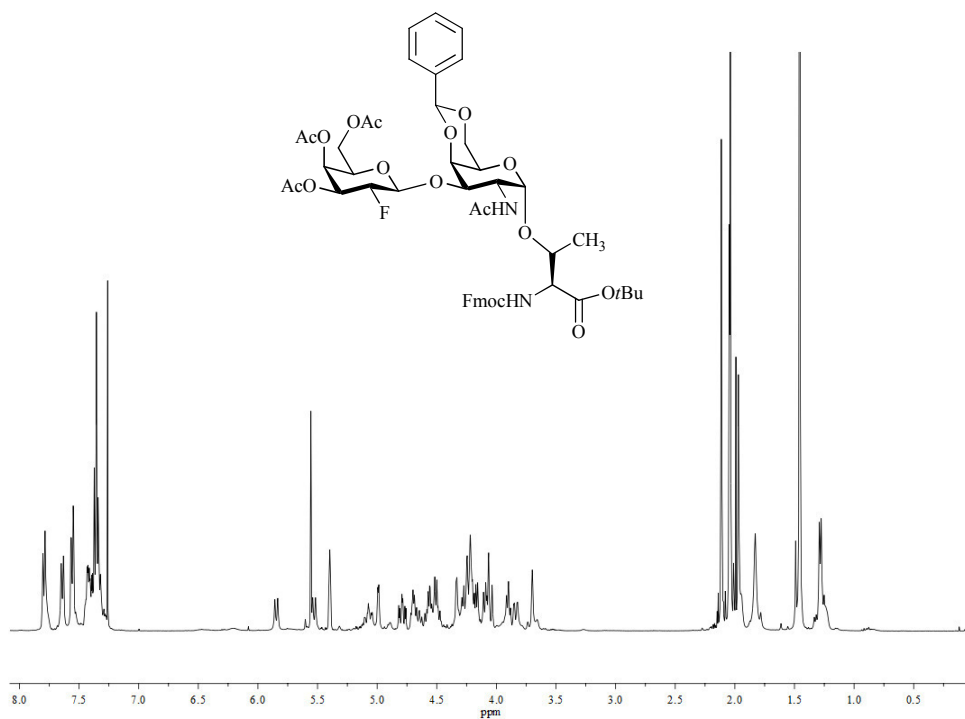
^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

α Bn₂Gal2,6F₂-TCI 81¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃)¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)

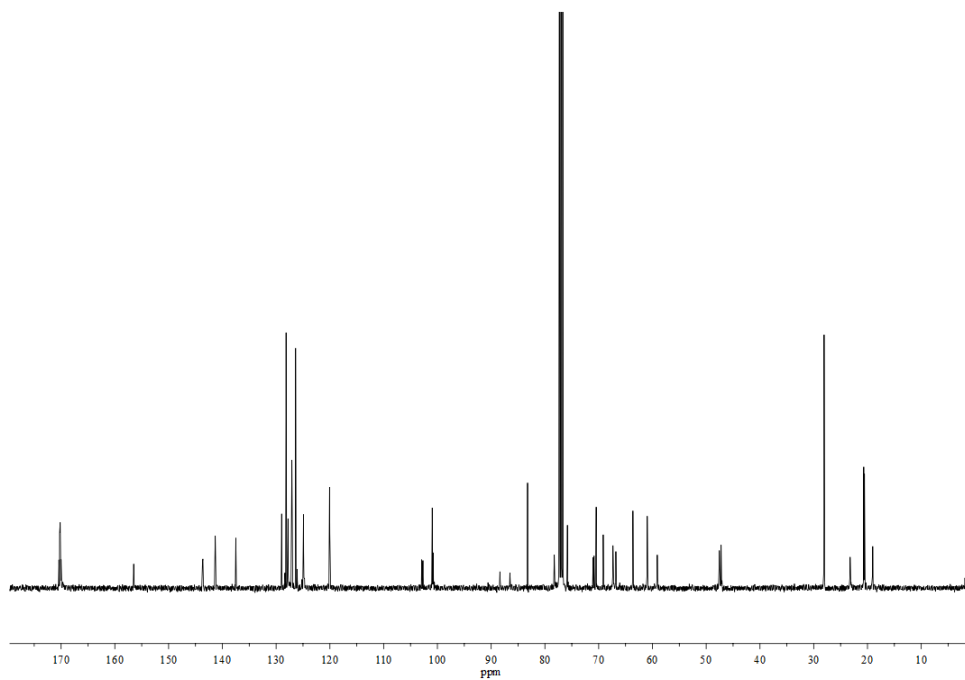


^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

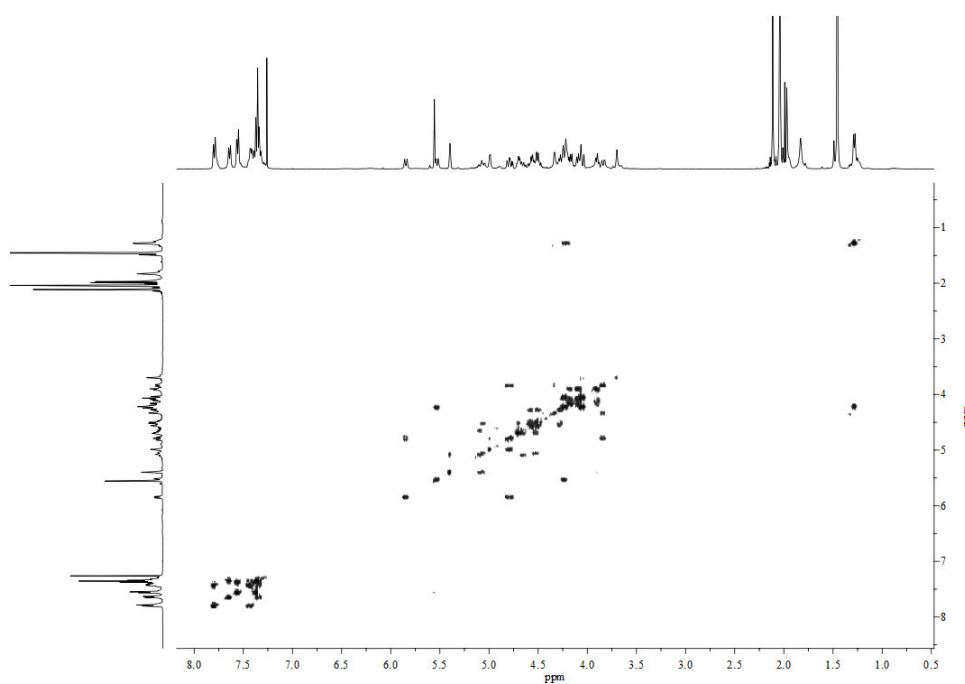
Fmoc-Thr($\beta\text{Ac}_3\text{Gal}2\text{F}$ -(1 \rightarrow 3)- α 4,6-BznGalNAc)-OrBu 44



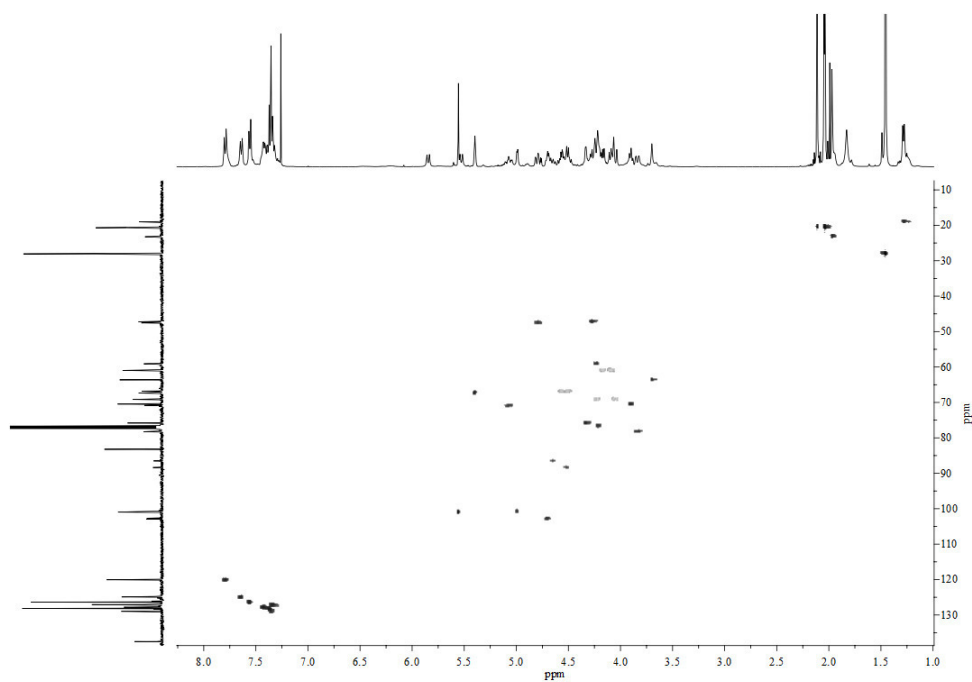
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



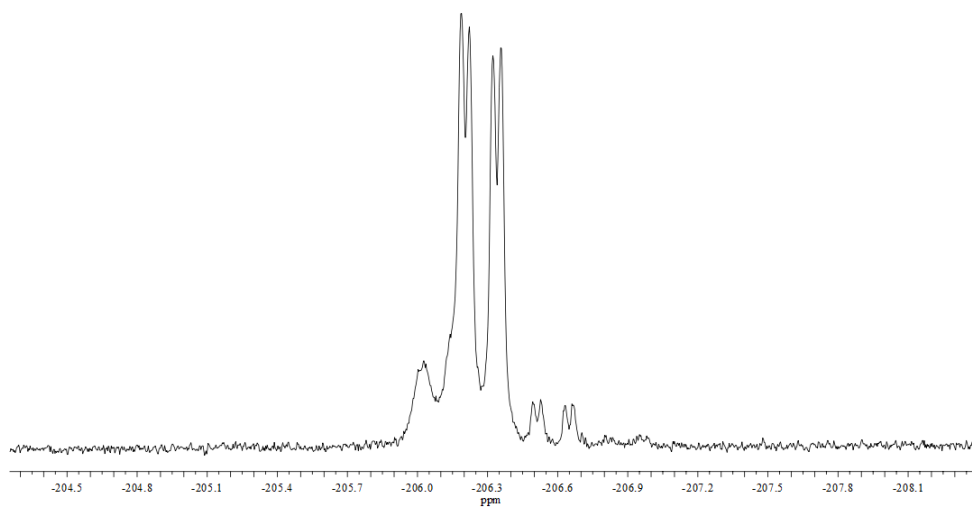
^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



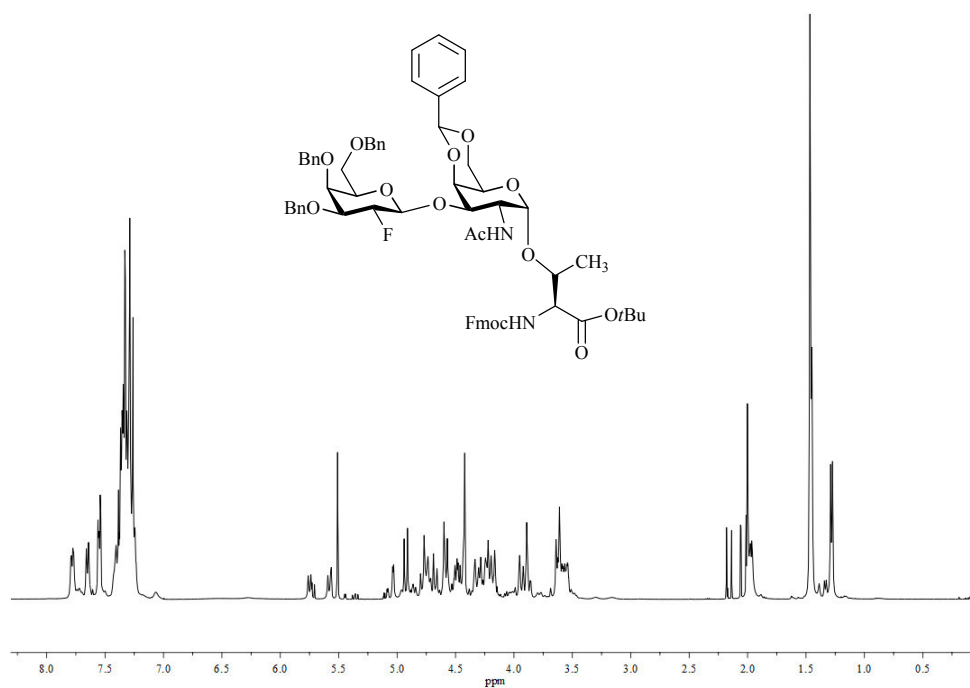
^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3)



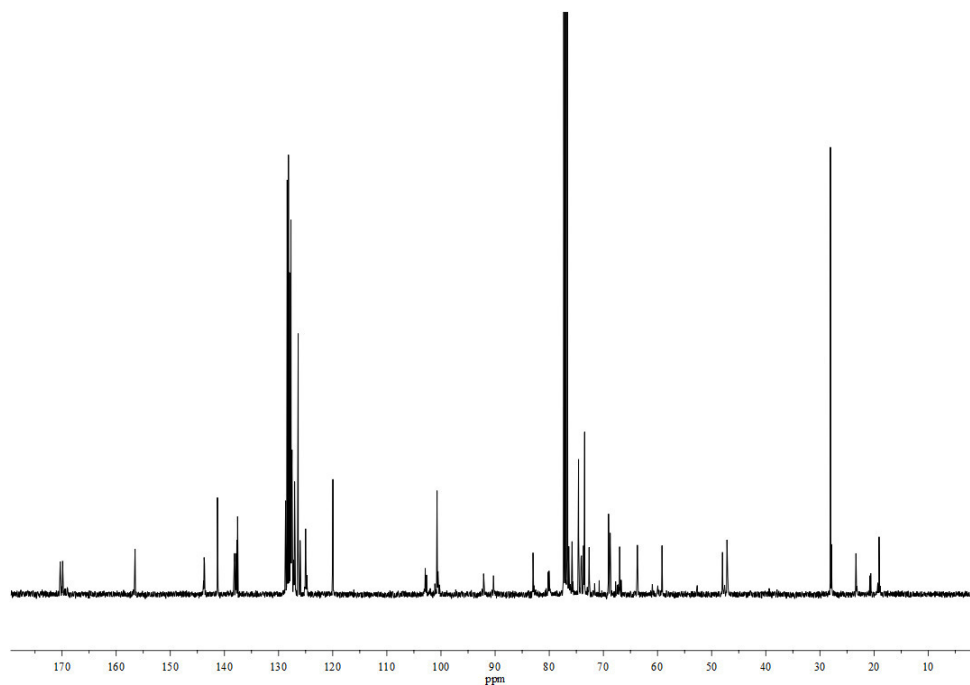
^1H - ^{13}C -HMQC (100.6 MHz, CDCl_3)



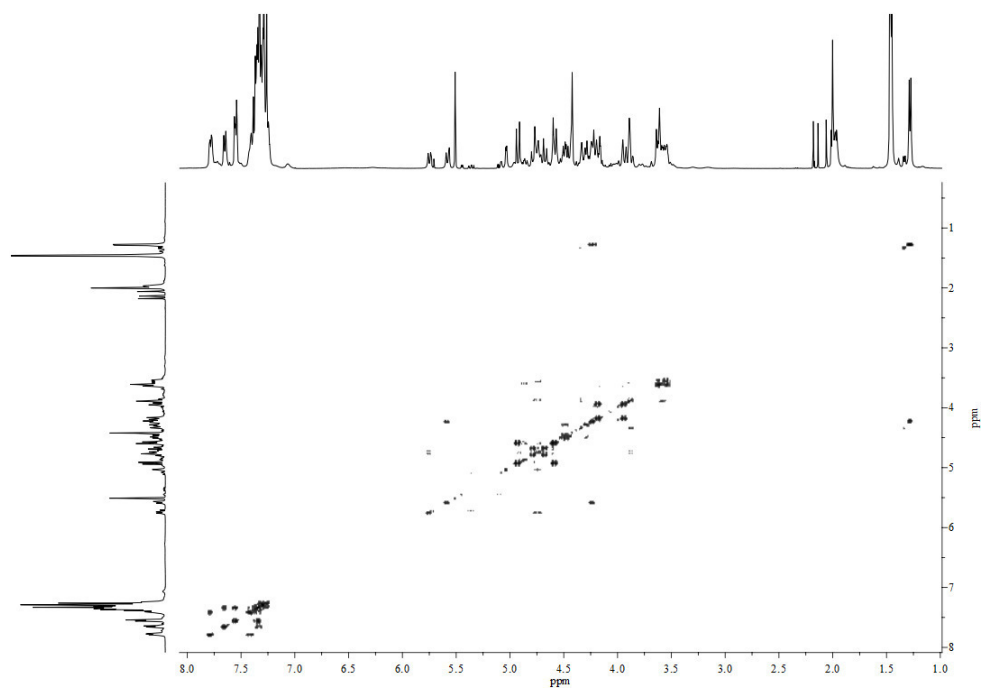
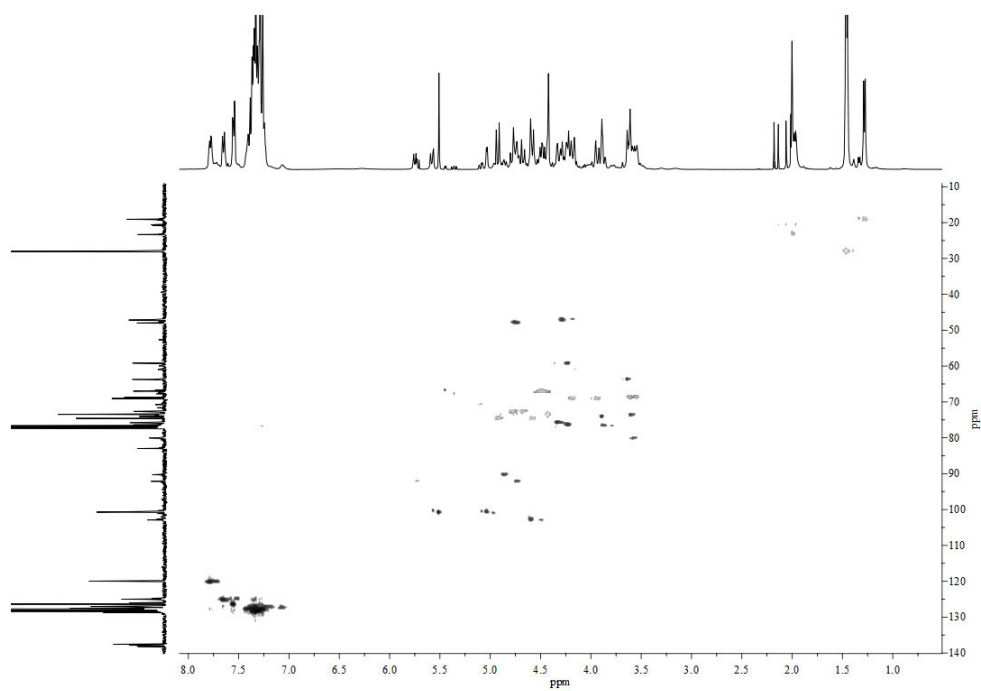
^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

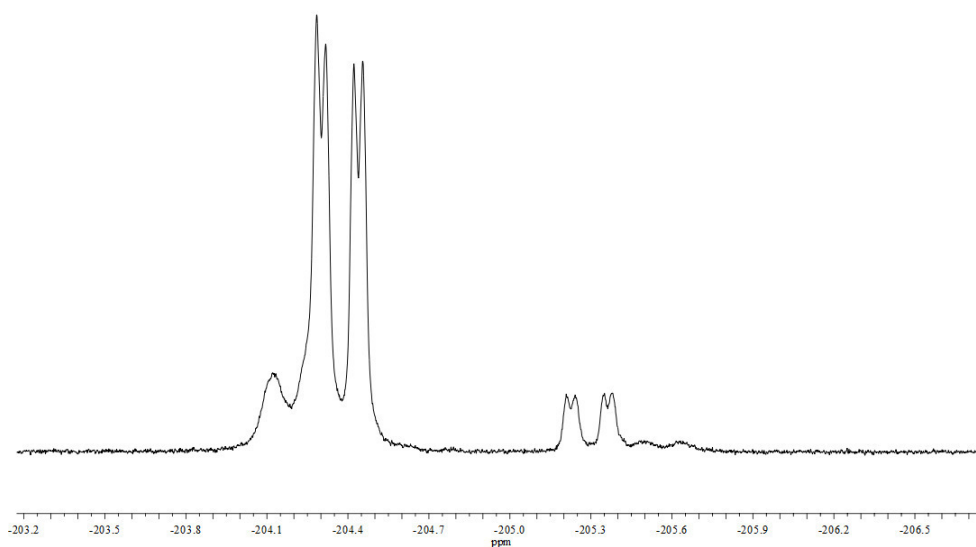
Fmoc-Thr(β Bn₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-BznGalNAc)-OrBu 56

¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



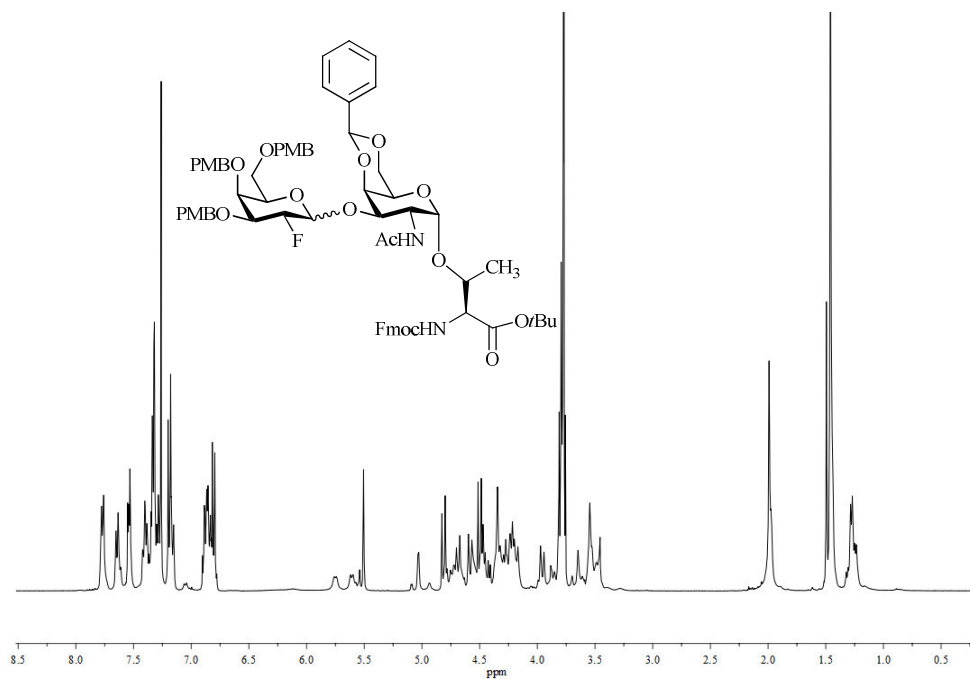
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl₃)

 ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) ^1H - ^{13}C -HMQC (100.6 MHz, CDCl_3)

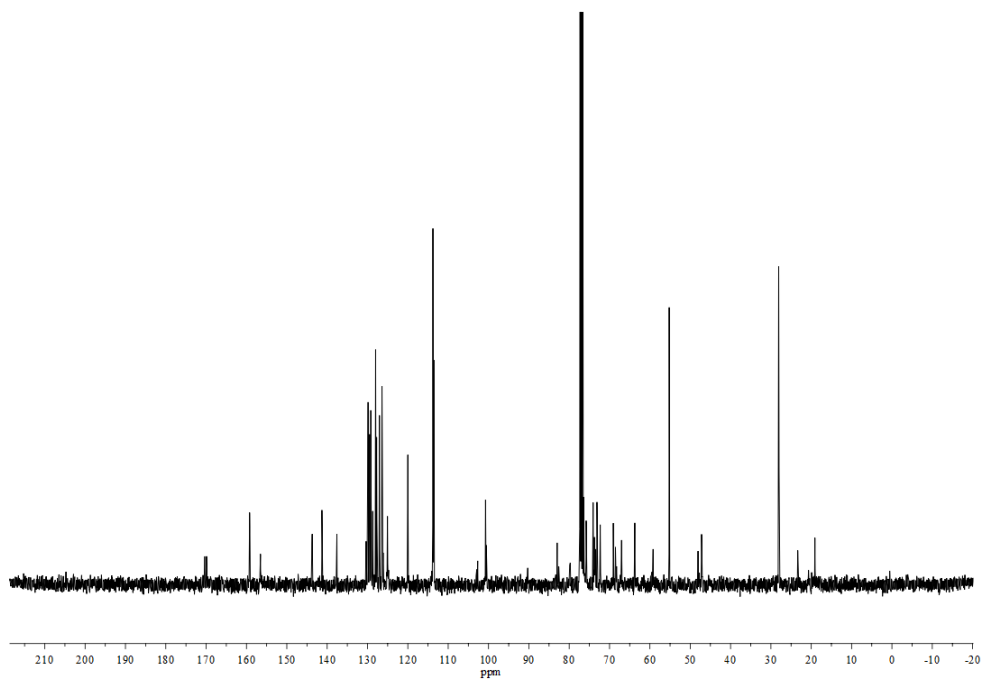


^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

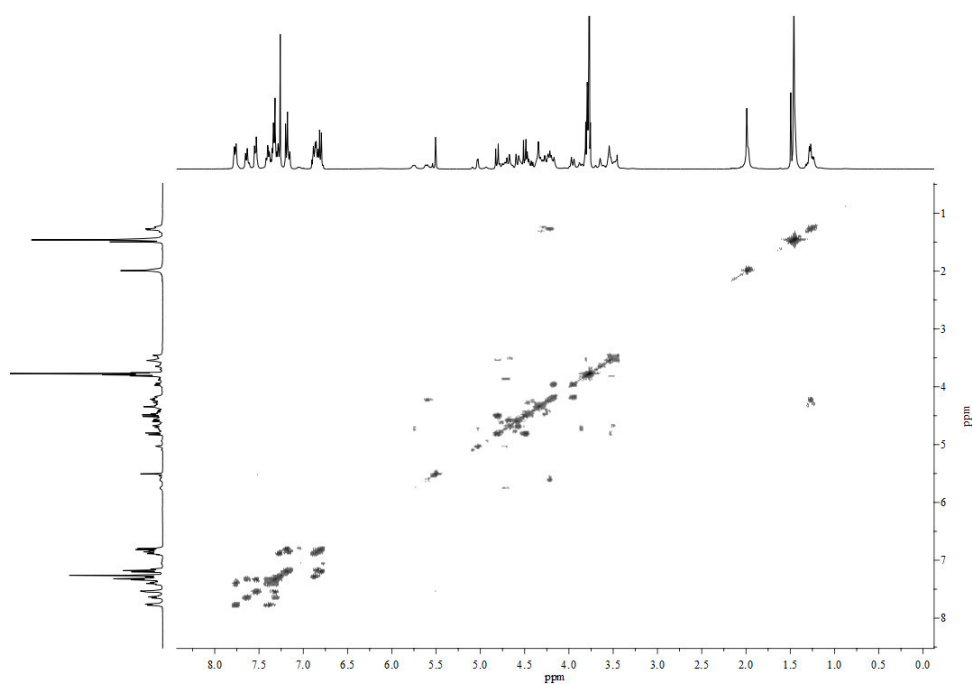
Fmoc-Thr(β PMB₃Gal2F-(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu 68



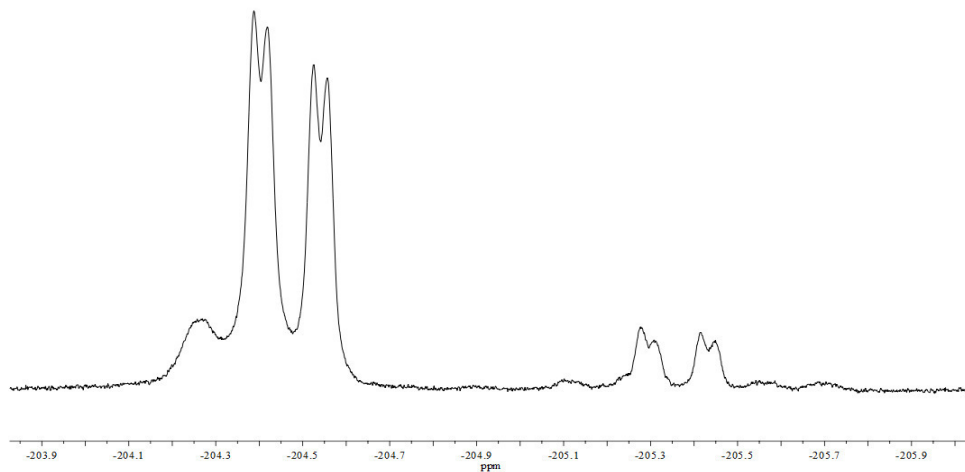
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)

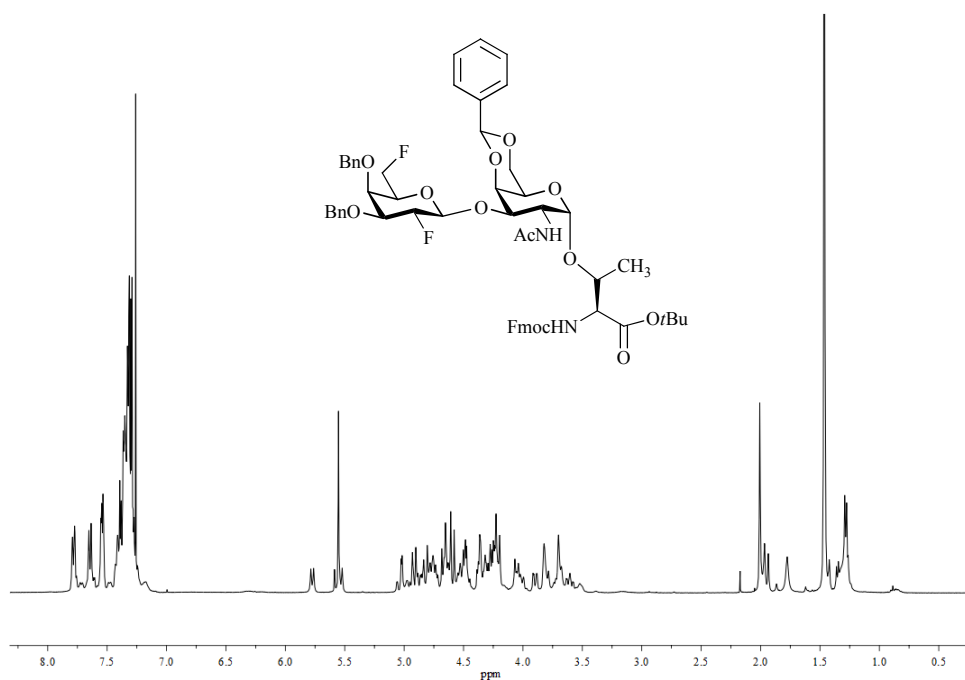


^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3)

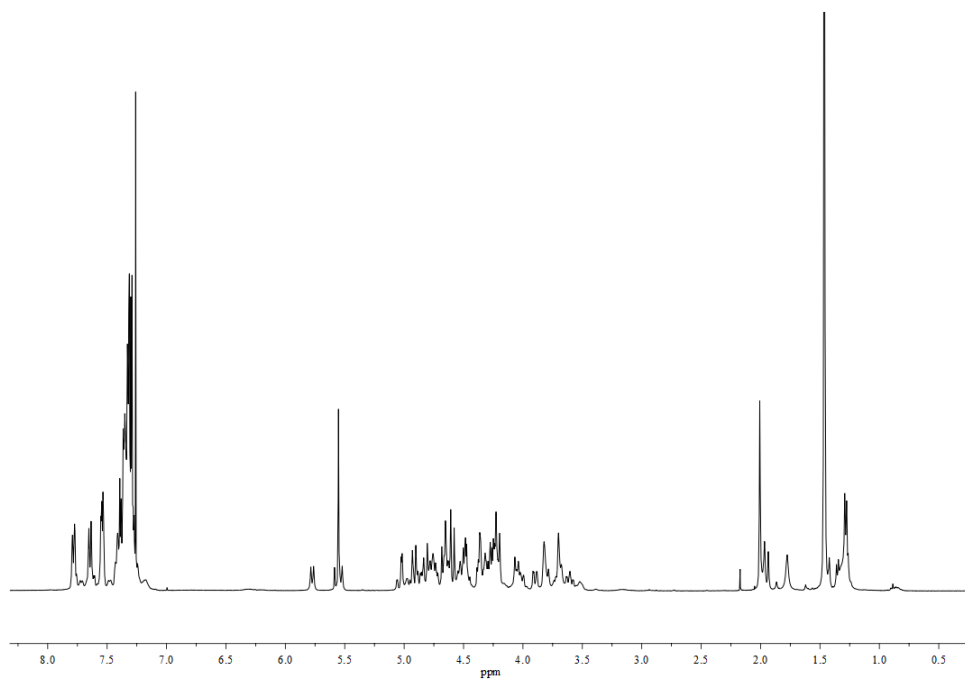
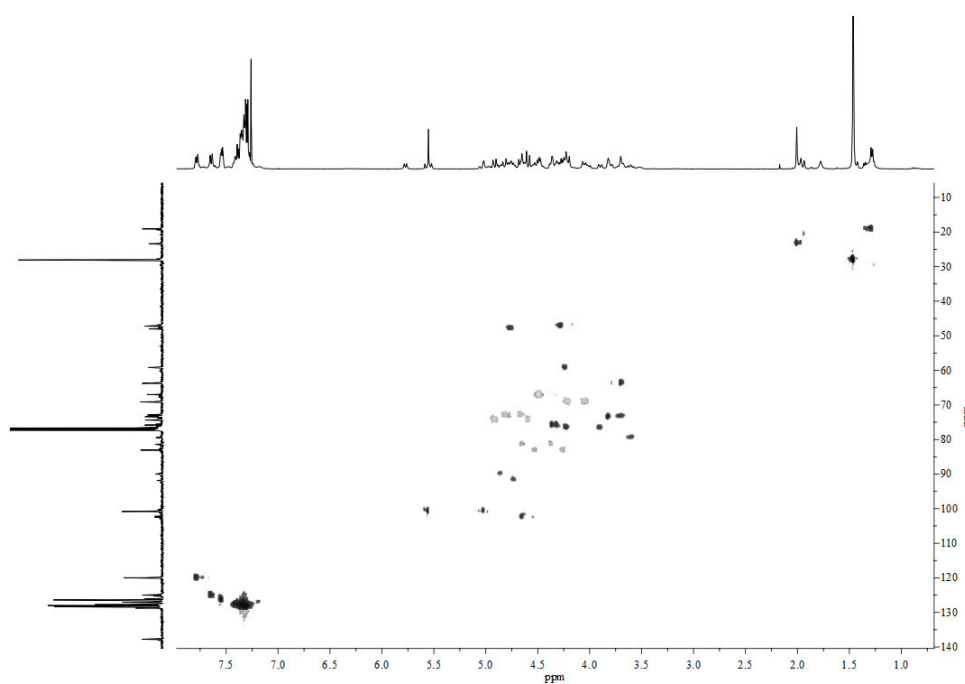


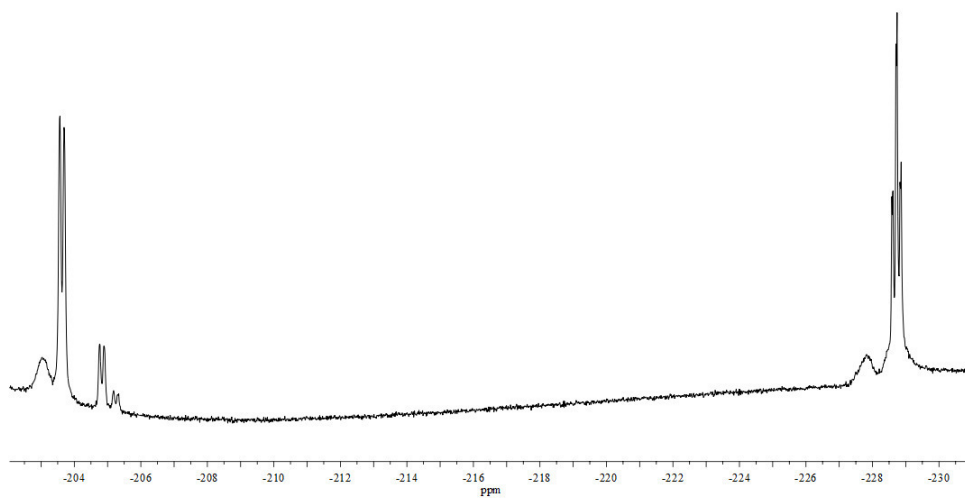
^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

Fmoc-Thr($\beta\text{Bn}_2\text{Gal}2,6\text{F}_2$ -(1 \rightarrow 3)- α 4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu 82



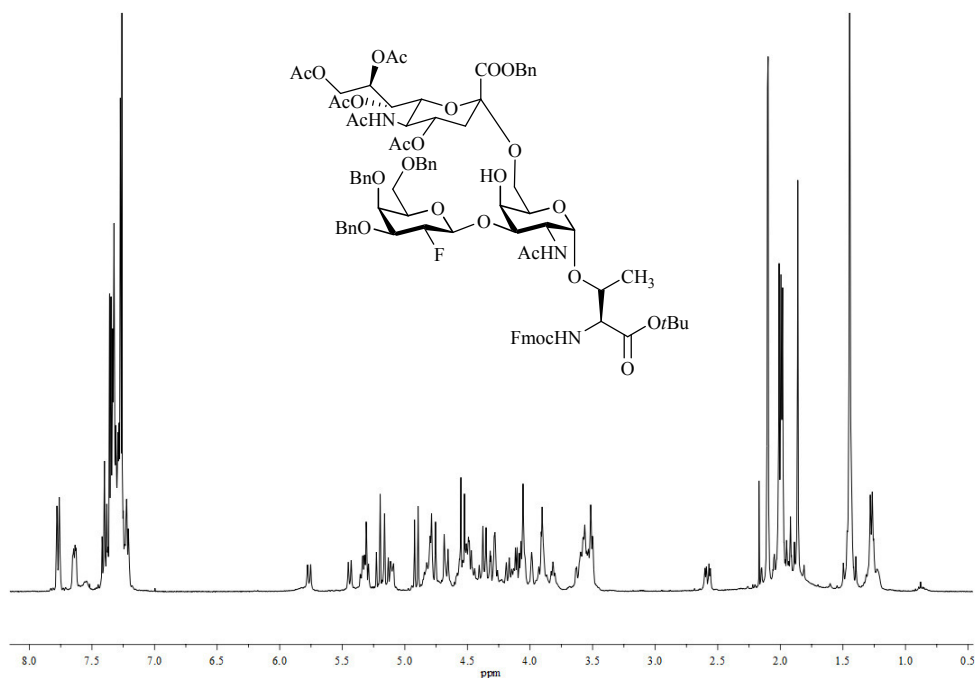
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)

 ^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3) ^1H - ^{13}C -HMOC (100.6 MHz, CDCl_3)

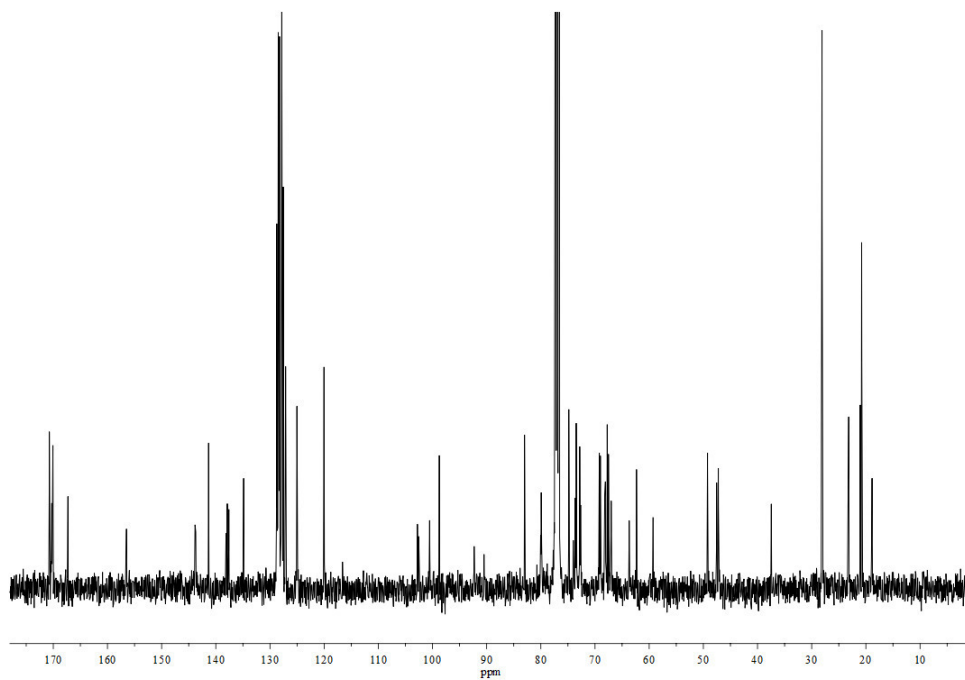


^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

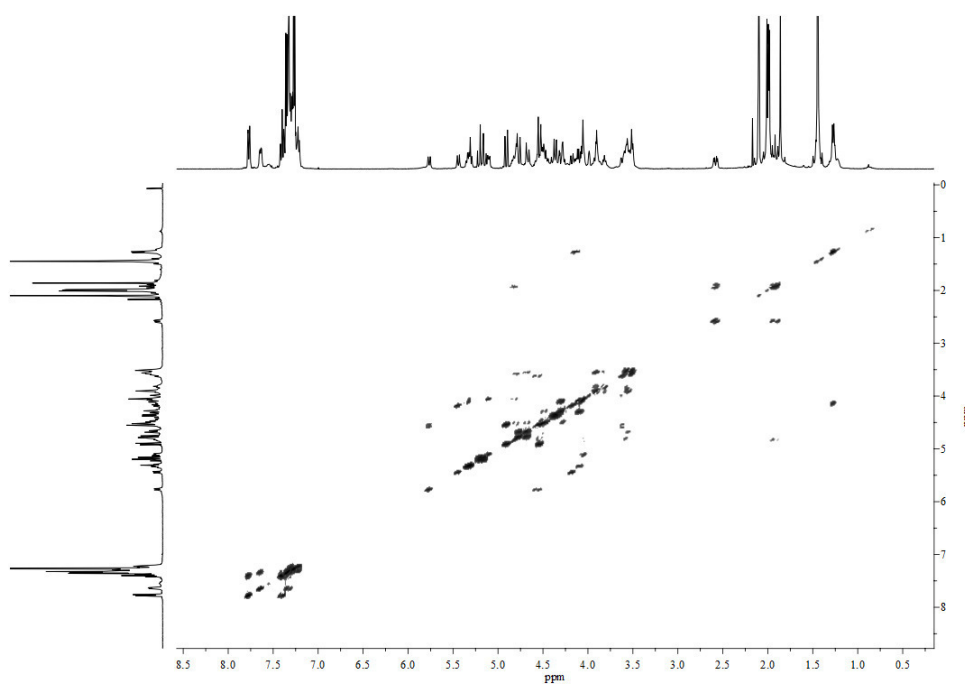
Fmoc-Thr($\beta\text{Bn}_3\text{GalF}$ -(1 \rightarrow 3)-[$\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn}$ -(2,6)]- αGalNAc)-OtBu 73



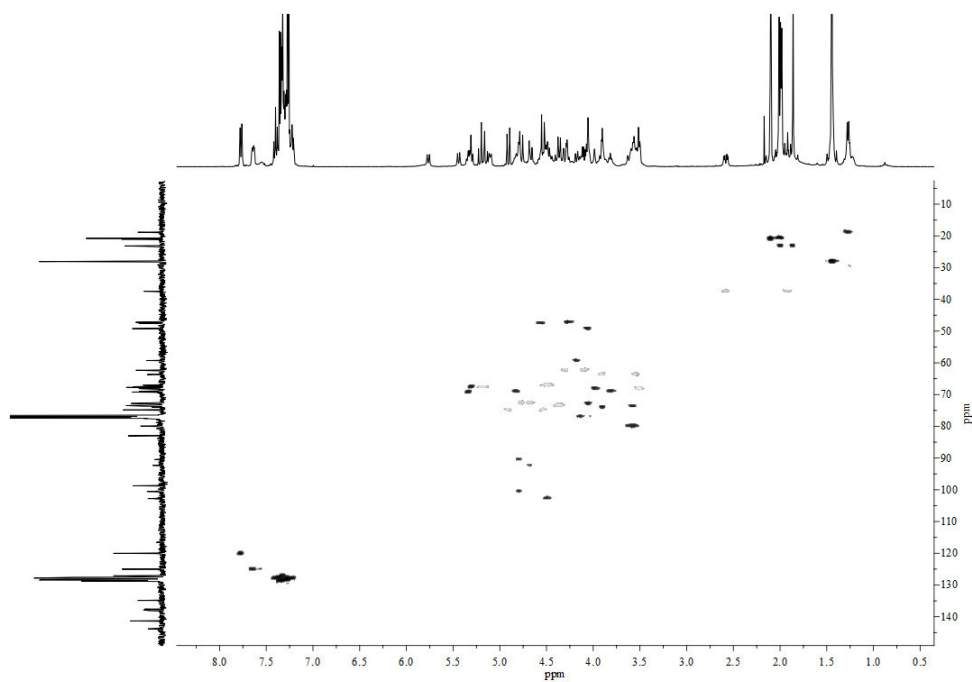
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)



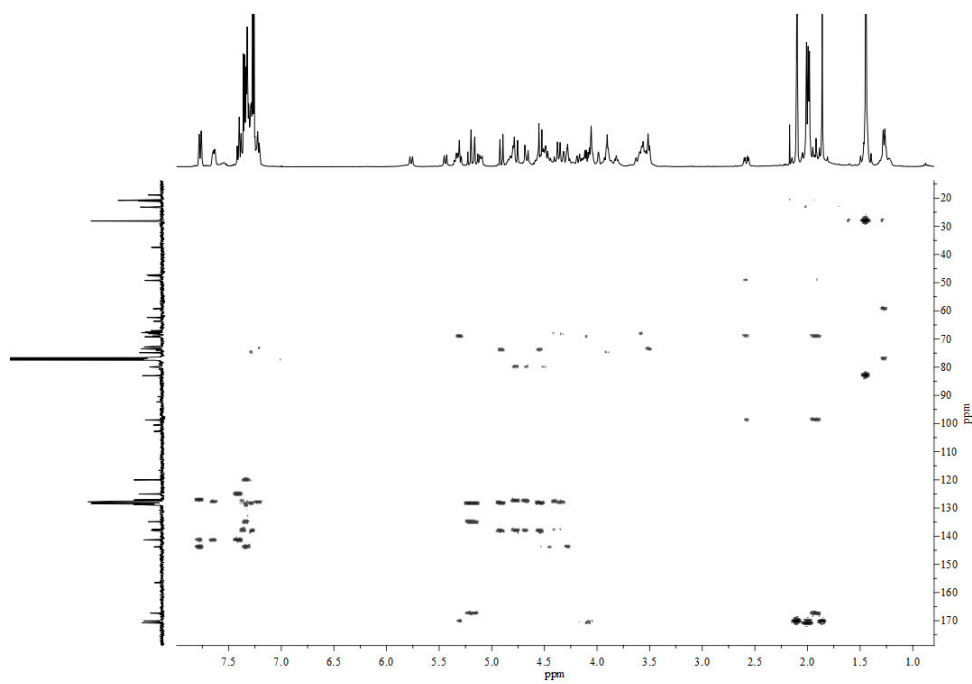
^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, CDCl_3)



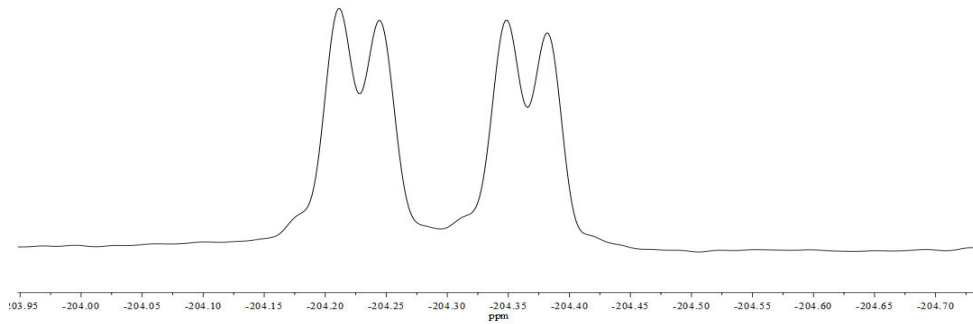
^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3)



^1H - ^{13}C -HMQC (100.6 MHz, CDCl_3)

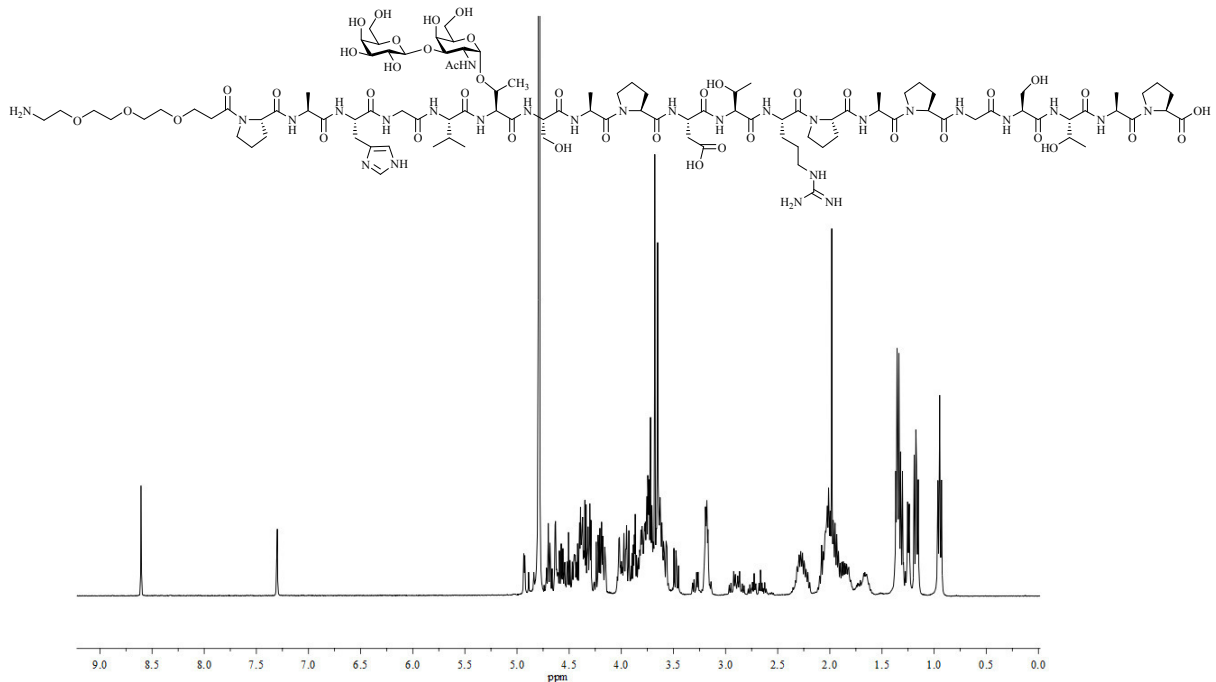


^1H - ^{13}C -HMBC (100.6 MHz, CDCl_3)

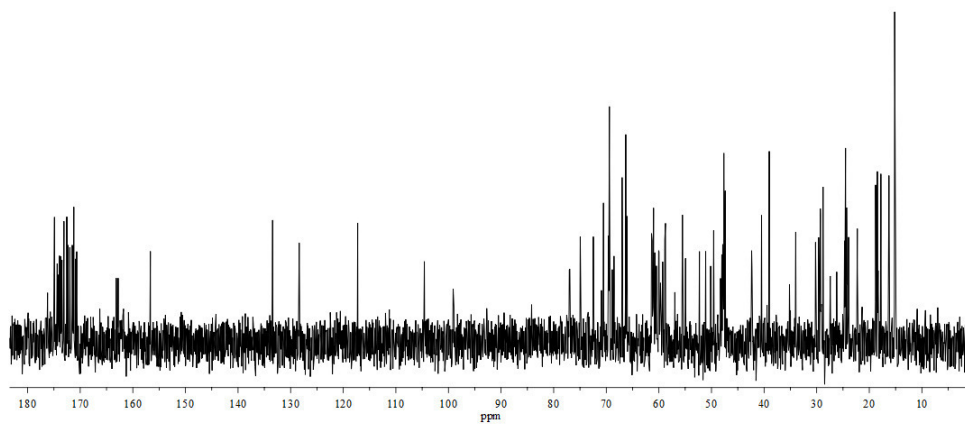


^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, CDCl_3)

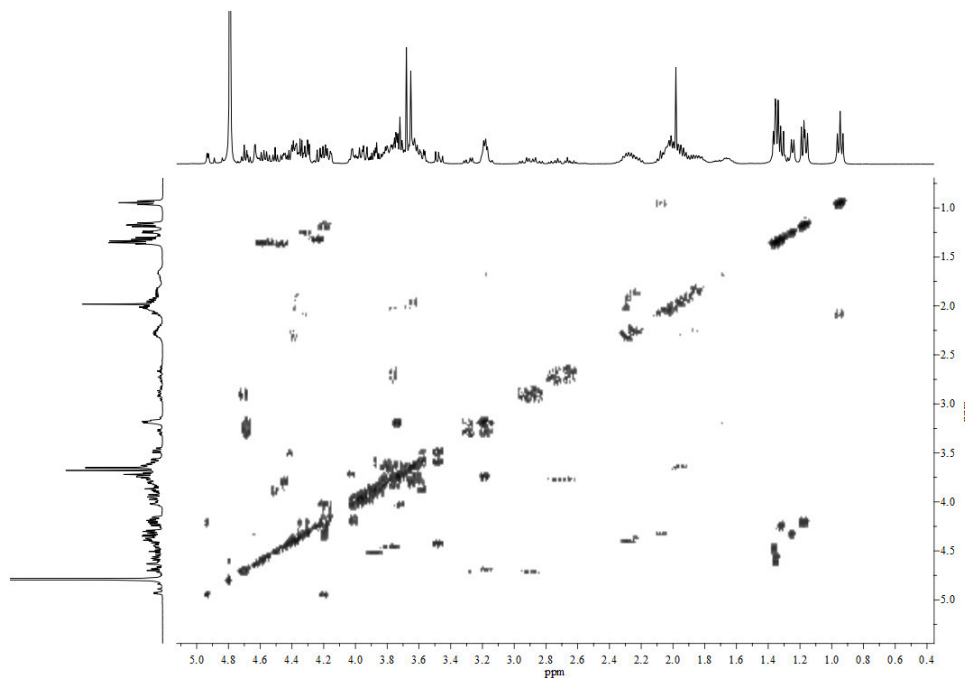
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\beta\text{Gal}(1\rightarrow3)\text{-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH}$ (98)



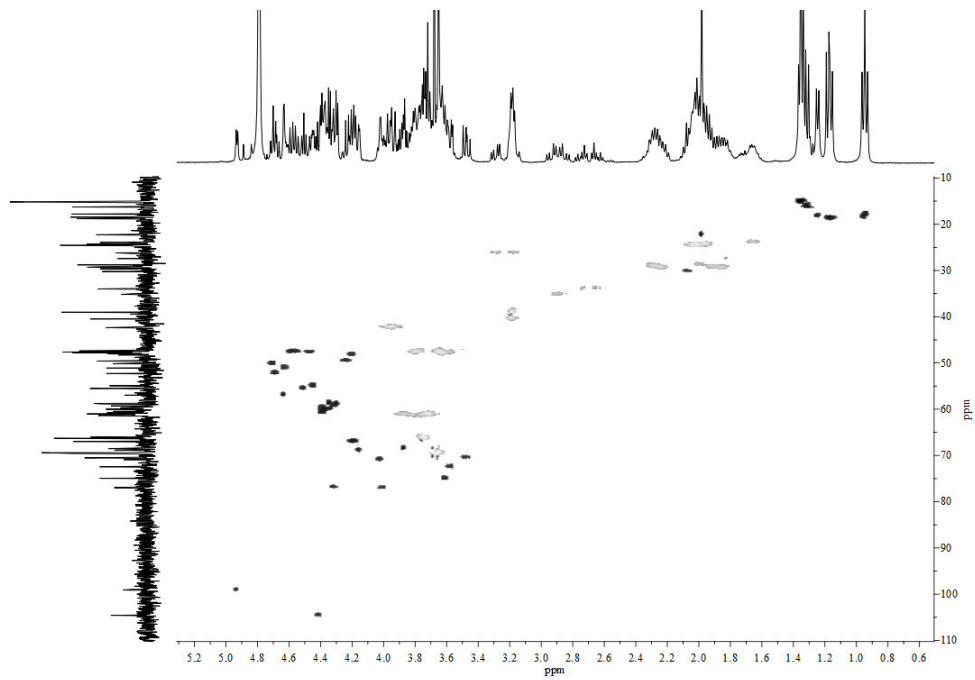
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O)



^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, D_2O)

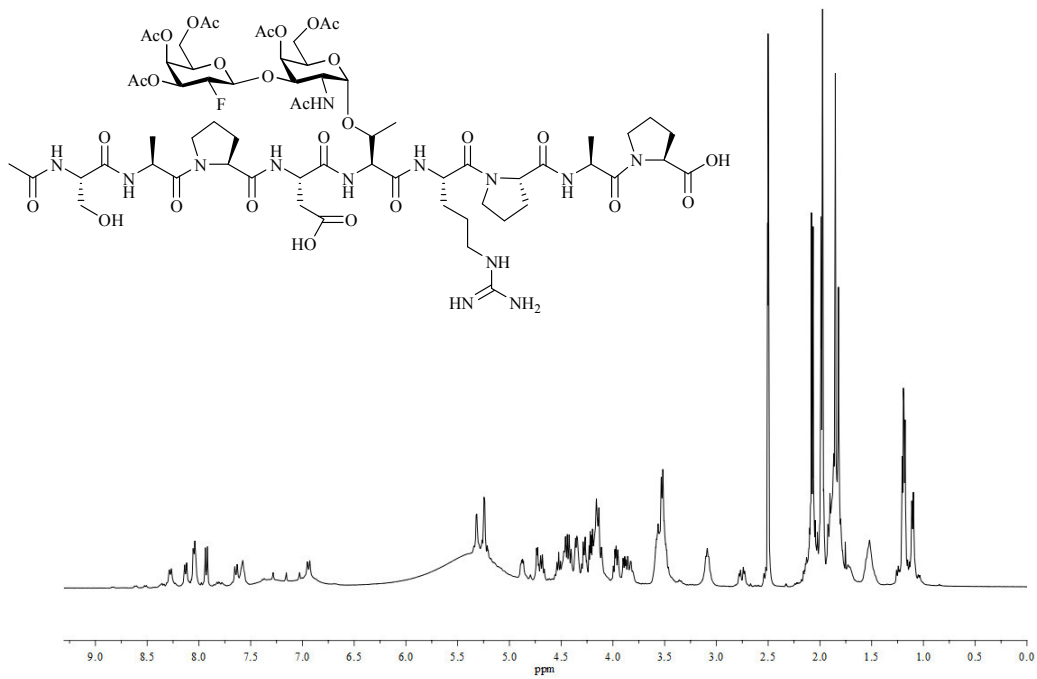


^1H - ^1H -COSY (400 MHz, D_2O)

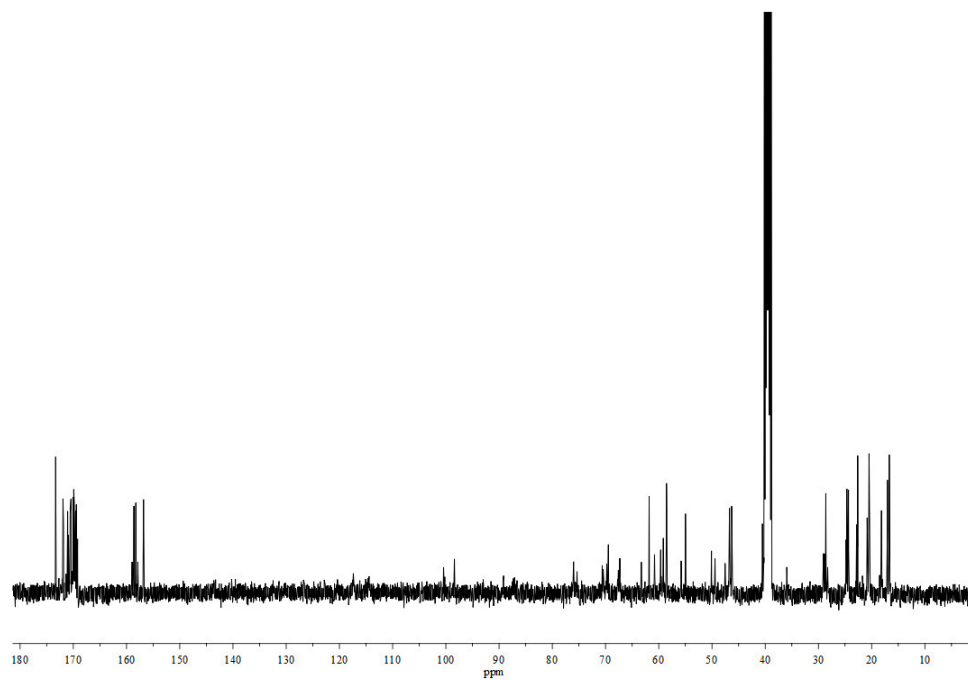


$^1\text{H}-^{13}\text{C}\text{-HMQC}$ (100.6 MHz, D_2O)

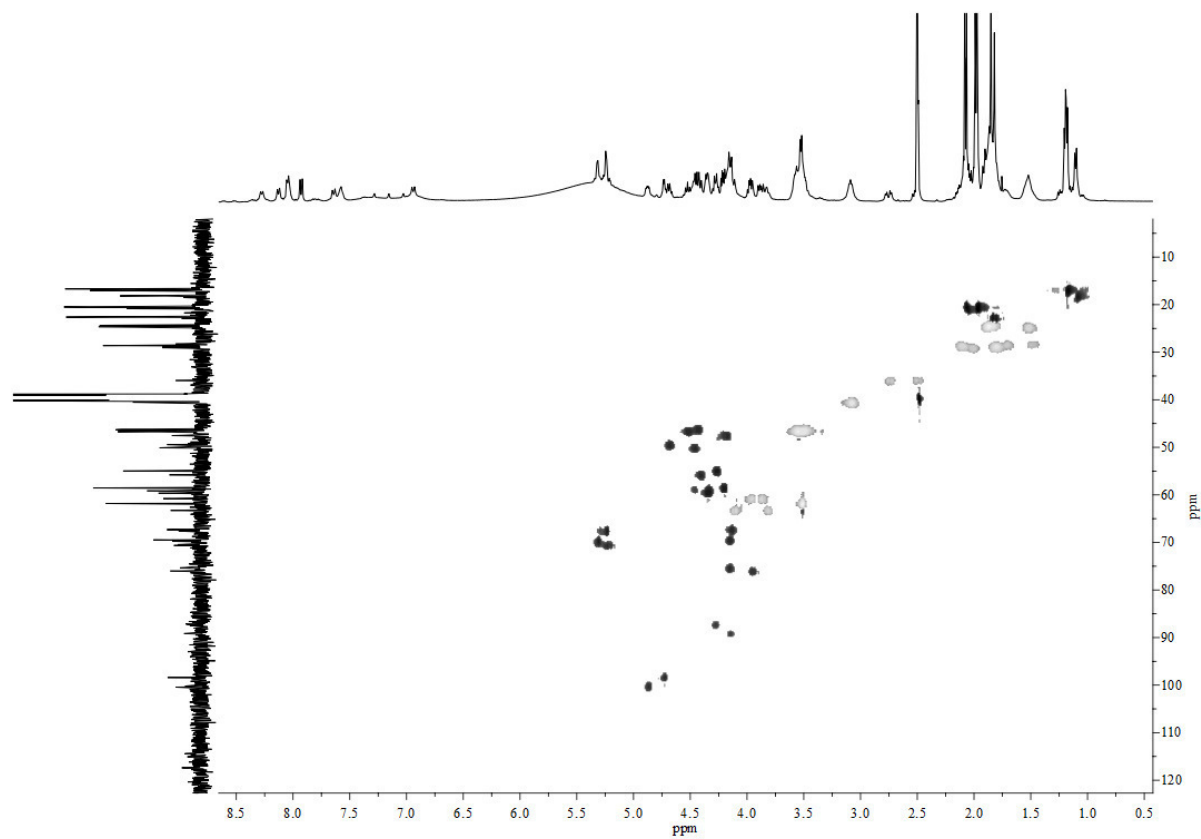
Ac-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(GalF-(1→3)GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-OH (99)



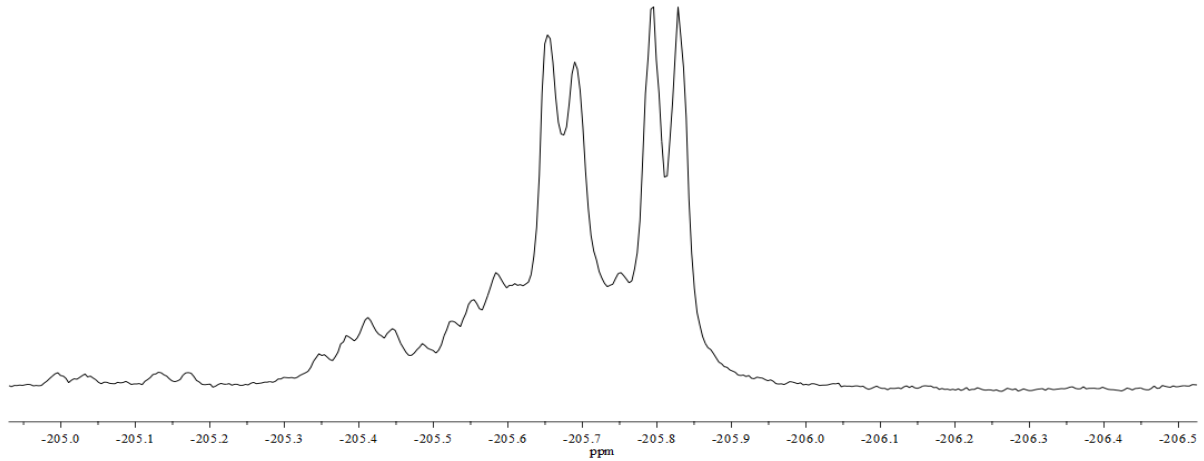
$^1\text{H}\text{-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO}\text{-d}_6$)



^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, DMSO-d6)

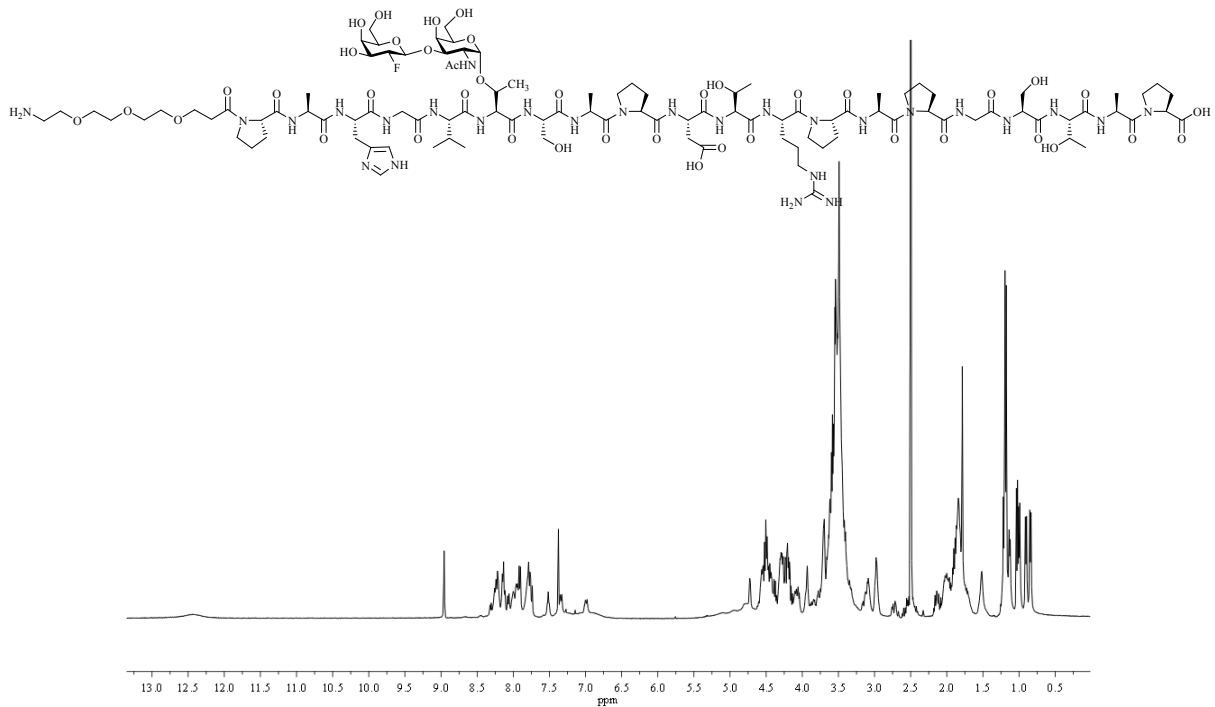


^1H - ^{13}C -HMQC (100.6 MHz, DMSO-d6)

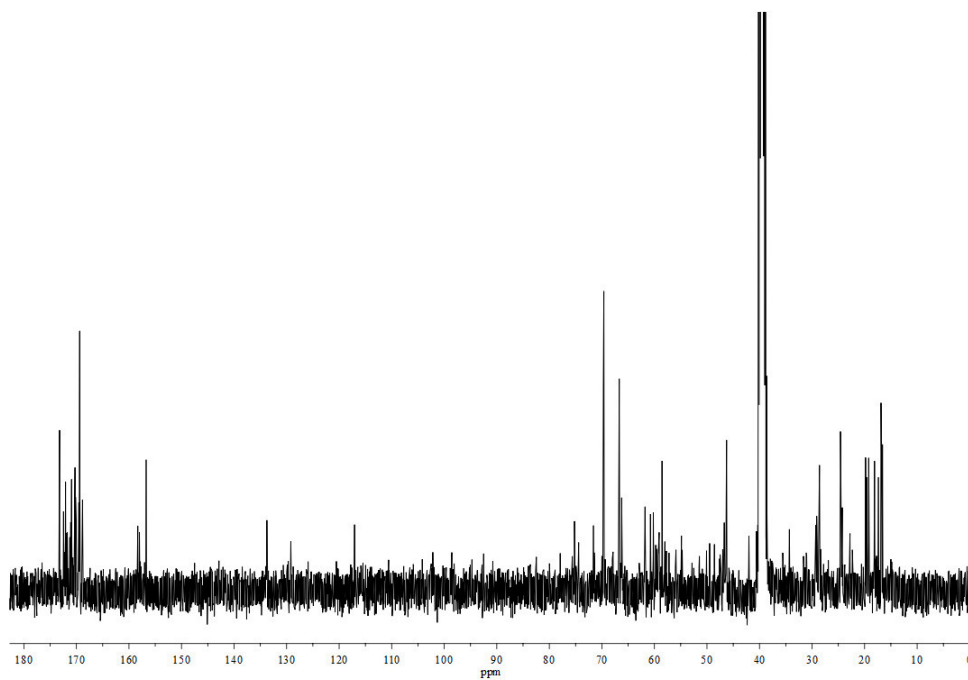


^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, DMSO-d₆)

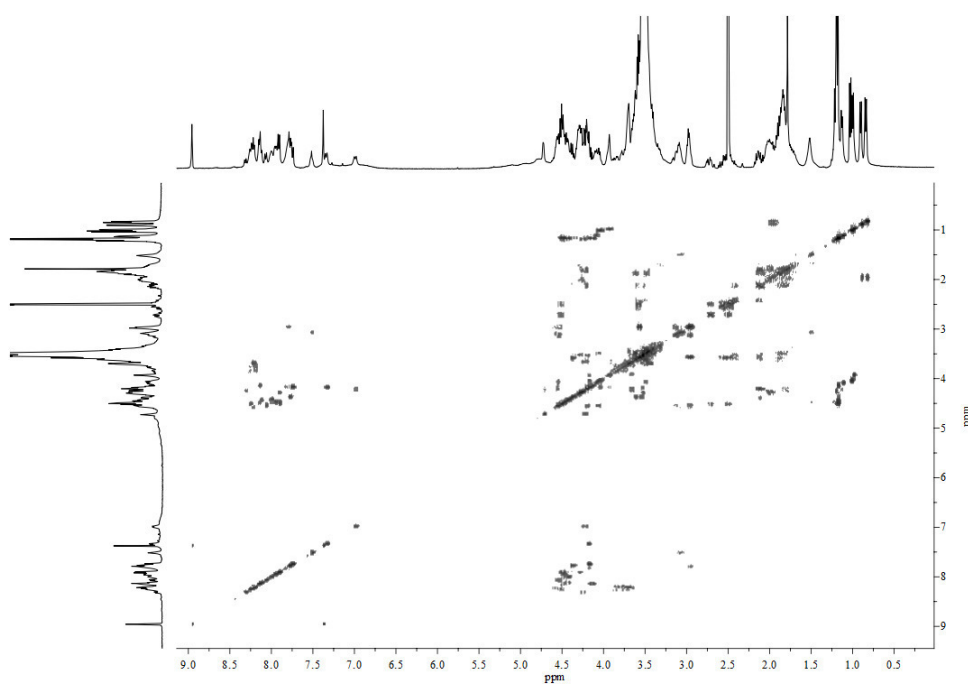
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(GalF-(1→3)-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (102)



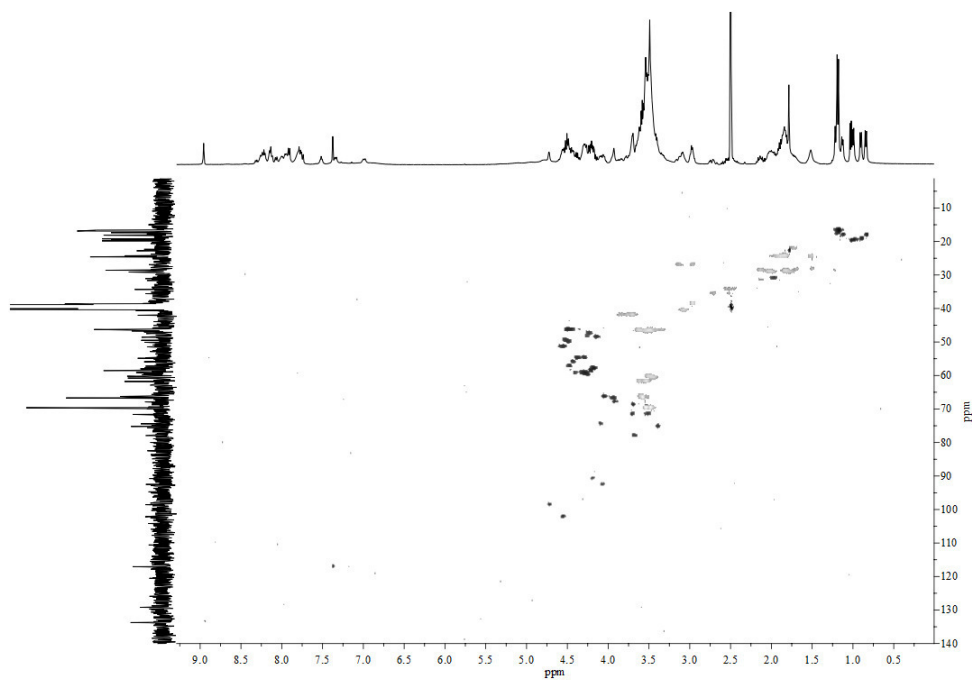
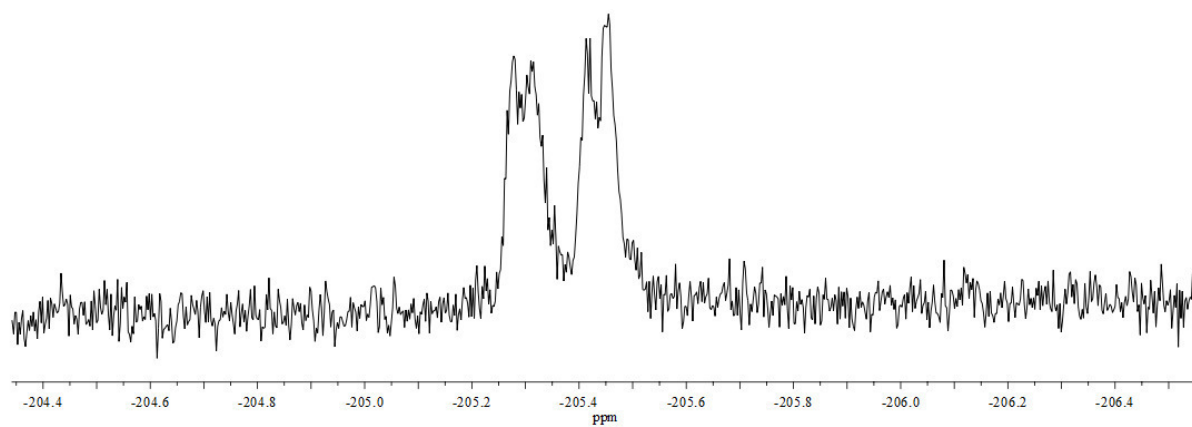
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O)



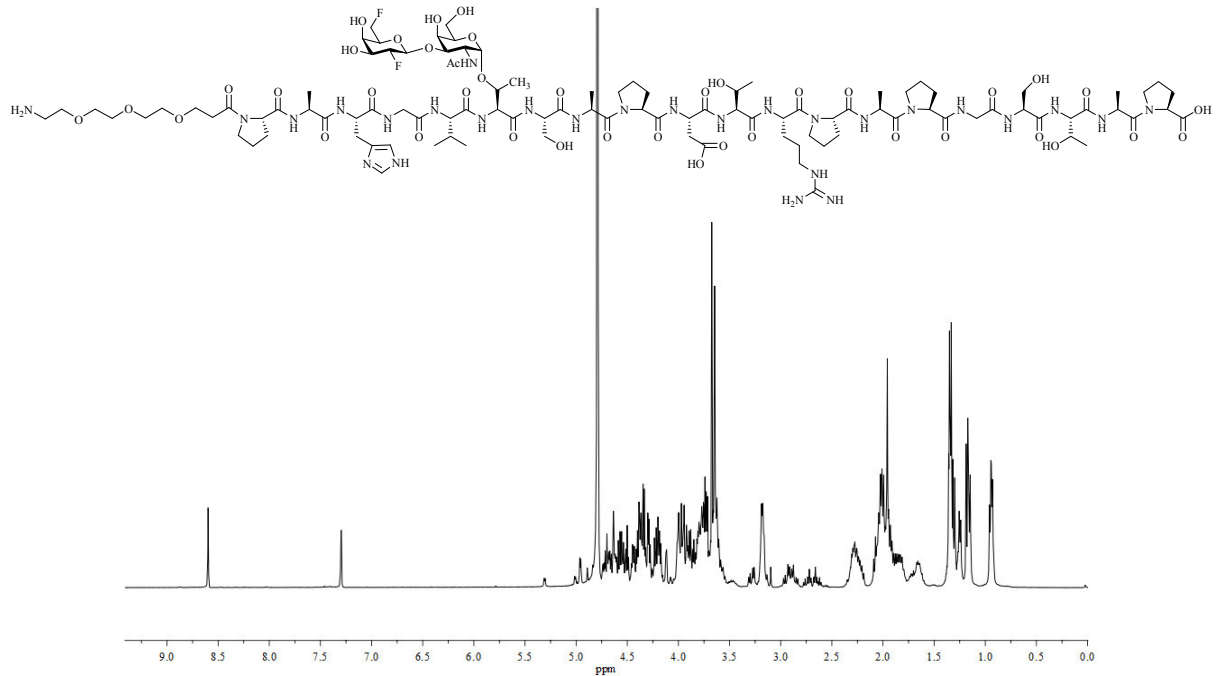
^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, D_2O)



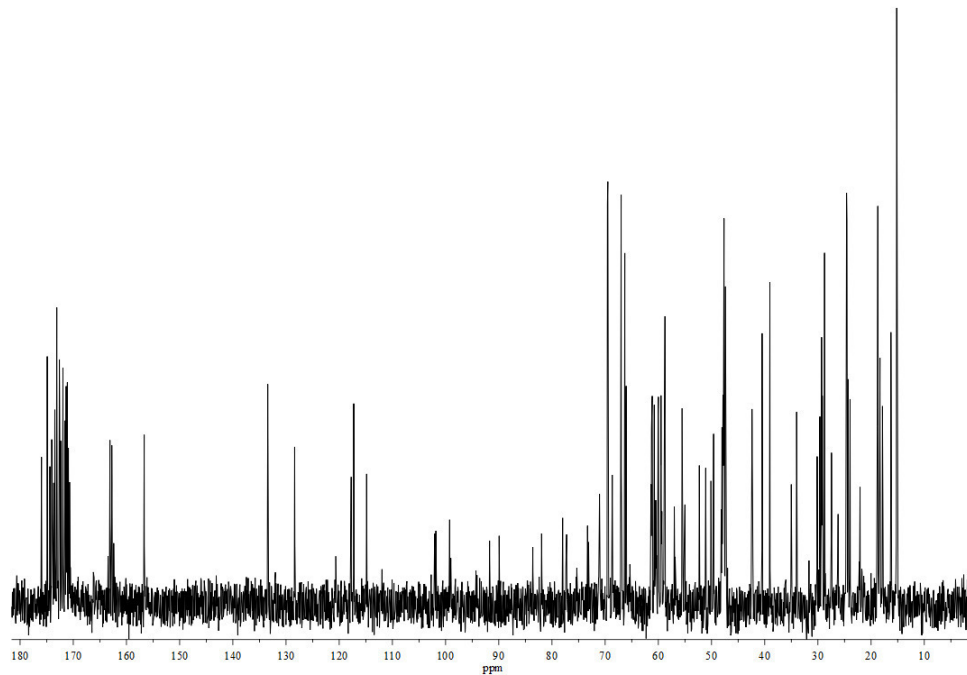
^1H - ^1H -COSY (400 MHz, D_2O)

 ^1H - ^{13}C -HMOC (100.6 MHz, D_2O) ^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, D_2O)

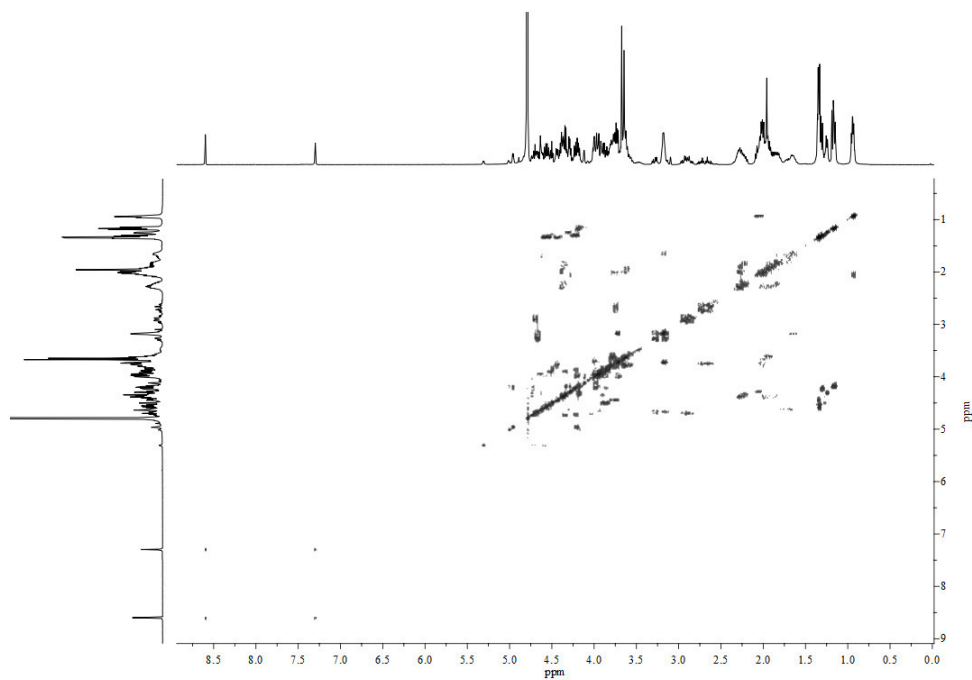
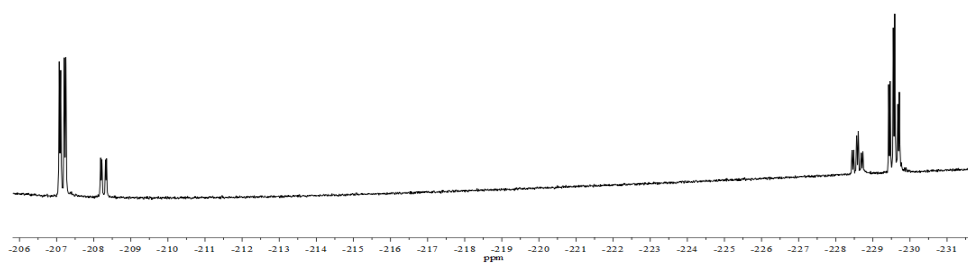
**H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(Gal-2,6F-(1→3)-GalNAc)-
Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (105)**



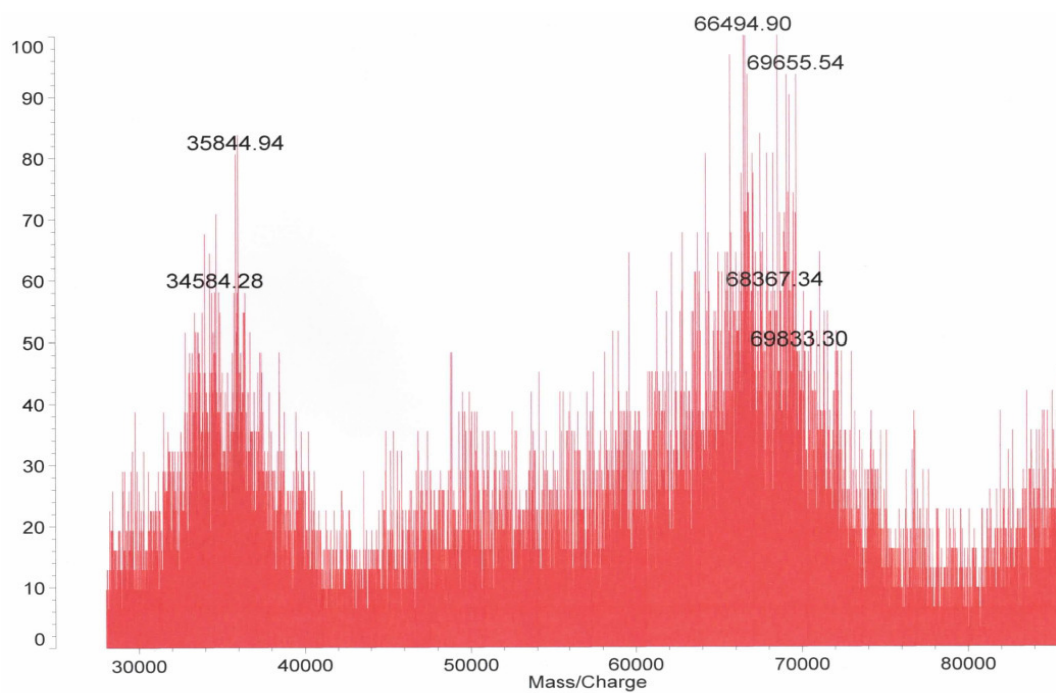
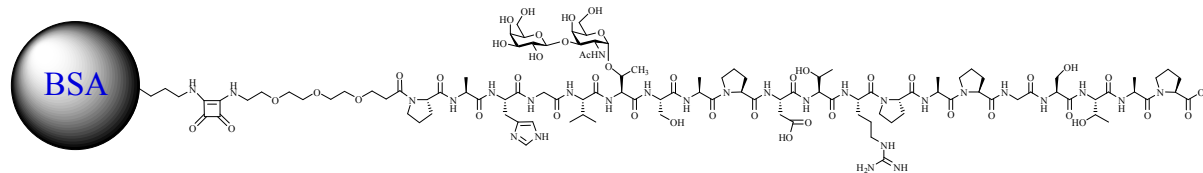
¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O)



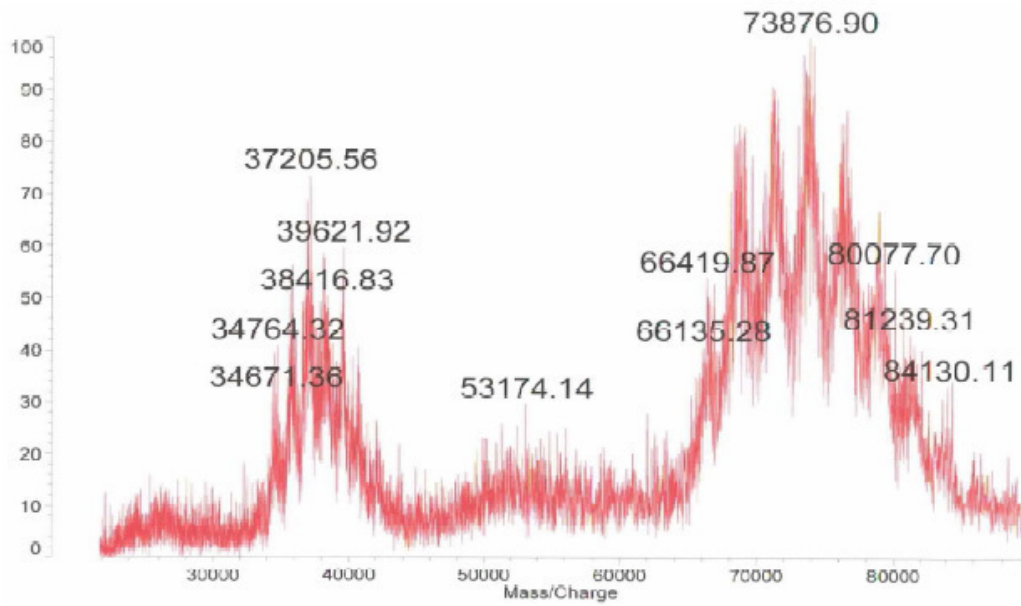
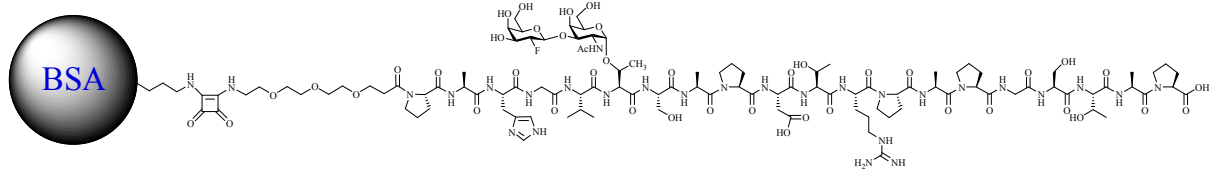
¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, D₂O)

 ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, D_2O) ^{19}F -NMR-Spektrum (376.6 MHz, D_2O)

BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(Gal-(1→3)-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (109)



BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(GalF-(1→3)-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH (110)



**BSA-NH-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CONH-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(Gal-2,6-F₂-(1→3)-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-OH
(111)**

