

Die Synthese von Glycopeptiden und Glycopeptid-Protein-Konjugaten mit einer Partialstruktur des tumorassoziierten Mucins MUC1 zur Entwicklung von Tumorstoffen

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

Sven Wittrock
geb. in Mainz

Mainz, September 2006

Dekan: Prof. Dr.

1. Berichterstatter: Prof. Dr.

2. Berichterstatter: Prof. Dr.

Tag der mündlichen Prüfung:

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

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Tumorthherapie	1
1.2	Das Glycoprotein MUC1 - Struktur und Funktion	2
1.3	Das Glycoprotein MUC1 in malignen und benignen Zellen - ein Vergleich	4
1.4	Die Erkennung von MUC1 durch das Immunsystem	8
1.5	Das Glycoprotein MUC1 als Zielstruktur - Immuntherapeutische Strategien	9
2.	Zielsetzung	14
3.	Allgemeiner Teil	17
3.1	Die Synthese der tumorassoziierten Glycosylaminosäuren	17
3.1.1	Die Synthese des <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Threonin- und des <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Serin-Bausteins (T _N -Antigen)	17
3.1.2	Die Synthese des (2-6)-Sialyl- <i>N</i> -acetylgalactosamin-Threonin-Bausteins (ST _N -Antigen)	22
3.1.3	Die Synthese des (1-3)-Galactosyl- <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Threonin-Bausteins (T-Antigen)	27
3.2	Die Konjugation von Glycopeptiden mit einem Trägerprotein	29
3.2.1	Immunologische Aspekte	29
3.2.2	Konjugationsmethoden zur Erzeugung von Antigen-Protein-Konjugaten	30
3.2.3	Die Synthese von Allylamidoaminosäuren und die Untersuchung der radikalischen Thiol-Addition	35
3.3	Die Synthese von als Allylamide modifizierten Glycopeptiden	48
3.3.1	Die Peptidsynthese an fester Phase	48
3.3.2	Kupplungsreagenzien in der Peptidsynthese	50
3.3.3	Die Synthesestrategie und das allgemeine Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptide	52
3.3.4	Die Synthese der als Allylamide modifizierten Glycopeptide mit einer Partialsequenz aus der Wiederholungseinheit des Glycoproteins MUC1	56
3.4	Die Herstellung der Glycopeptid-Trägerprotein-Konjugate	68
3.5	Die Synthese von cyclischen (Glyco)Peptiden mit einer Partialstruktur	73

	aus der Wiederholungseinheit des tumorassoziierten MUC1	
3.5.1	Synthese von Allylether- und Allylglycin-Aminosäurebausteinen	73
3.5.2	Die Ringschlussmetathese	79
3.5.3	Synthese der cyclischen (Glyco)Peptide	81
3.6	Synthese eines Konjugates aus einer Partialsequenz des MUC1 mit einem C-Glycosid-Analogon des T _N -Antigens und einem Tetanustoxin-Epitop	94
3.6.1	Stereoselektive Synthese des Allyl- α -C-Glycosides des <i>N</i> -Acetylgalactosamins	94
3.6.2	Die Synthese eines C-glycosidischen <i>N</i> -Acetylgalactosylaminosäure- Festphasenbausteins	98
3.6.3	Die Synthese eines MUC1-Tetanustoxin-Konjugates	102
4.	Zusammenfassung	106
5.	Experimenteller Teil	113
5.1	Allgemeines und Messgeräte	113
5.2	Versuche zu Kapitel 3.1.1	117
5.3	Versuche zu Kapitel 3.1.2	130
5.4	Versuche zu Kapitel 3.1.3	136
5.5	Versuche zu Kapitel 3.2.3	139
5.6	Versuche zu Kapitel 3.3.4	167
5.7	Versuche zu Kapitel 3.4	184
5.8	Versuche zu Kapitel 3.5.1	190
5.9	Versuche zu Kapitel 3.5.3	197
5.10	Versuche zu Kapitel 3.6.1	217
5.11	Versuche zu Kapitel 3.6.2	222
5.12	Versuche zu Kapitel 3.6.3	227
6.	Literaturverzeichnis	231
7.	Spektrenanhang	240

Verwendete Abkürzungen

α	spezifischer Drehwert
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
absol.	absolut
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcOH	Essigsäure
ACVA	4,4'-Azobis-(4-cyan-valeriansäure)
Ala, A	Alanin
All	Allyl
Arg, R	Arginin
arom.	Aromatisch
AS	Aminosäure
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
ax.	axial
äq.	äquatorial
Äquiv.	Äquivalente
b	breit
BB	Breitband-Entkopplung
BCR	B-cell receptor
Ber.	Berechnet
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
BroP	Brom-tris-(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CD	Cluster of differentiation
COSY	Correlated Spectroscopy
CTL	Cytotoxische T-Lymphocyten
Cys, C	Cystein
δ	chemische Verschiebung
d	Tag
d, dd	Dublett, Dublett von Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett von Triplett
DVB	Divinylbenzol
EDAC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EM	Exakte Masse
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FD-MS	Field-desorption-Massenspektrometrie
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Gal	D-Galactose
Gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Glc	D-Glucose
Gln, Q	Glutamin

Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
h	Stunde
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
His, H	Histidin
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMPB	4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutansäure
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-MS	High resolution massspectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Ig	Immunglobulin
i. Hochvak.	im Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
IIDQ	1-Isobutyloxy-carbonyl-2-isobutyloxy-1,2-dihydrochinolin
IL	Interleukin
Ile, I	Isoleucin
kDa	Kilo-Dalton
J	Kopplungskonstante
KLH	Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
Leu, L	Leucin
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
Lys, K	Lysin
M	Molarität
m	Multipllett
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight
MBHA	p-Methylbenzhydrylamid
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHC	Major histocompatibility complex
MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektrum
MS	Molekularsieb
Ms	Methansulfonyl-
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl-
MW	Molekulargewicht
NaOMe	Natriummethanolat
NBS	N-Bromsuccinimid
Neu	Neuraminsäure
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP	Normal phase
Pam	Palmitoyl-
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
Phe, F	Phenylalanin
Piv	Pivaloyl-
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-
ppm	parts per million
Pro, P	Prolin
q	Quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
Raumtemp.	Raumtemperatur

R _f	Retentionsfaktor für Dünnschichtchromatogramme
RP	Reversed phase
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
Schmp.	Schmelzpunkt
Ser, S	Serin
SG	Schutzgruppe
Su	Succinimid
t	Triplett
T	T-Antigen
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N, N, N', N'-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat
tBu	tert-Butyl
TCR	T-cell receptor
TES	Triethylsilan
TIS	Triisopropylsilan
tert	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
Thr, T	Threonin
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
Tos	Tosyl-
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
Xaa	Aminosäure

1. Einleitung

1.1 Die Tumorthherapie

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts erkranken jährlich ca. 400.000 Menschen in Deutschland an Krebs und im Jahr 2003 starben knapp 210.000 an den Folgen bösartiger Tumore.

Die Zellen maligner Tumore vermehren sich unkontrolliert (neoplastisch) und halten sich nicht an Gewebsgrenzen. Sie brechen in Organe und Gefäße ein (Infiltration), besiedeln sie und während dieses Wachstums zerstören sie als destruierende Zellen das ursprüngliche Gewebe. Darüber hinaus lassen sie an anderen Stellen des Organismus Sekundärtumore (Tochtergeschwulste, Metastasen) entstehen.

Die Behandlung von Krebs ist eines der Hauptanliegen in der modernen Medizin und erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. Die Therapieansätze sind vielfältig und umfassen chirurgische Eingriffe (Tumorexstirpation), medikamentöse Verfahren (Chemo-, Hormontherapie) und strahlentherapeutische Maßnahmen (Radiotherapie). Oftmals werden diese Formen kombiniert oder sequentiell eingesetzt, um den größtmöglichen Erfolg zu gewährleisten.

Ständiges Bestreben ist es, die bestehenden Verfahren der Tumorthherapie zu verbessern, um die genannten Behandlungsmethoden verträglicher und wirksamer zu gestalten, sowie neue Konzepte zu erarbeiten.

Eine erstrebenswerte, aber auch über die letzten Jahrzehnte kontrovers diskutierte Therapiemöglichkeit wäre es,^[1] Tumorerkrankungen mit Hilfe der körpereigenen Immunabwehr, auf schonende Weise zu behandeln (sog. Immuntherapie). Wegen der hohen Spezifität des Immunsystems würden so nur maligne Zellen zerstört, gesunde Zellen aber nicht angetastet.

Begonnen haben die Untersuchungen zur Immuntherapie von Krebs^[2-14] gegen Ende des 19. Jahrhunderts als bei der Behandlung von Krebspatienten mit einer Zubereitung aus abgetöteten Bakterien (sog. „Coley’s Toxin“) eine erstaunliche Heilungsrate beobachtet werden konnte.^[15] Heute versucht man in unterschiedlichen Ansätzen das Immunsystem für eine Therapie zu nutzen. Als Beispiele seien hier aufgeführt die Hybridzell-Vakzinierungen, Hitzeschock-Proteine, T-Zellen mit chimären Rezeptoren, Immunocytokine, der Einsatz von mit Antigen beladenen Dendritischen Zellen, monoklonale Antikörper,^[16] genetisch modifizierte Tumorzellen.

Einen großen Überblick über die Themengebiete der Immunologie und der Immuntherapie von Krebs geben die Monographien „Cancer Immunology“ und „Cancer Immune Therapy“. [17, 18]

1.2 Das Glycoprotein MUC1 - Struktur und Funktion

Voraussetzung für eine gezielte Immuntherapie ist die Identifizierung einer antigenen Zelloberflächenstruktur, die eine Tumorzelle eindeutig von einer gesunden Zelle unterscheidet oder auf der Tumorzelle in stark überexprimierter Form vorhanden ist. Es sind einige tumorassoziierte Antigene, wie z.B. die Proteine HER-2/neu, MAGE, EBV oder MART-1, die für Tumorzellen typisch sind, identifiziert worden.^[19, 20] Das Glycoprotein Mucin 1 (MUC1)^[21] gehört ebenfalls zu dieser Klasse der tumorassoziierten Antigene.

Mucine^[22] sind hochgradig O-glycosylierte Proteine, die von den meisten Epithelzellen (z.B. Leber, Pankreas, Nieren, Speicheldrüse, Brust, Magen-Darm-Trakt) exprimiert werden. Sie kommen in Schleimen (lat. *mucus* Schleim) vor und dienen als hochviskose, gelartige Schmierstoffe, die die Epithelzellen z.B. des Augapfels, Darmes, Magens oder der Atemwege vor eindringenden viralen oder bakteriellen Pathogenen, proteolytischen Enzymen, hohen ionischen Konzentrationen und niedrigem pH-Wert schützen. Zur Mucin-Familie zählen bisher 14 Glycoproteine, die entweder membrangebunden oder sezerniert vorliegen. In den letzten Jahren sind die Aminosäuren-Sequenzen von einigen tumorassoziierten Glycoproteinen (Mucinen) aufgeklärt worden.^[23] Die Definition und eine Zuordnung zur MUC-Familie gemäß einer cDNA-Klonierung erfolgt dabei nicht immer eindeutig.^[24]

Die Mucine liegen in einer gestreckten und voluminösen Form vor und ragen mit 100-500 nm weit in das Lumen hinein. Dies ist das 5- bis 10fache der Länge anderer bekannter Oberflächenproteine. Dieses für alle Mucine charakteristische Merkmal wird hervorgerufen durch die prolinreiche Sequenz (20 % des Apoproteins), die hochgradig verzweigten, terminal sialylierten Glycanseitenketten der Serine und Threonine (50 % des Apoproteins) und die elektrostatische Abstoßung der Sialinsäurereste. N-Acetylgalactosamin, Fucose, Galactose, N-Acetylglucosamin und Neuraminsäure bilden die Hauptbestandteile der Kohlenhydratseitenketten. Diese O-Saccharidketten (50-80% des Molekulargewichtes des MUC1-Glycoproteins) rufen eine immense strukturelle Diversität hervor.

Neben der sezernierten Form des Glycoproteins MUC1^[25, 26] existiert auch eine immunologisch interessante, nicht gewebespezifisch vorkommende, transmembranständige

Form, das sog. Episialin, PAS-O, DF3-Antigen, oder HMFG-Antigen (human milk fat globale) oder polymorphe epitheliale Mucin (PEM). Die Bezeichnungen werden in der Literatur gleichbedeutend mit MUC1 verwendet. Die Primärstruktur und die Domänenarchitektur des MUC1-Proteins wurden durch Klonierung und Sequenzierung der vollen Länge der cDNA zugänglich.^[27] Für alle Mucine ist eine unterschiedliche Anzahl von sich wiederholenden Aminosäuresequenzen (Variable number of tandem repeats, VNTR) kennzeichnend. Im MUC1 besteht die sich 30–100mal wiederholende Wiederholungseinheit der extrazellulären Domäne aus 20 Aminosäuren mit der Sequenz (TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS)_n.

Aufgrund dieser schwankenden Anzahl unterliegt MUC1 einem inhärenten Polymorphismus. Darüber hinaus können Sequenz-Variationen auftreten, die sich durch den Austausch der Aminosäuren DT→ES, PP→PQ bzw. PA oder PT in der Wiederholungseinheit bemerkbar machen.^[28] Die Relevanz dieser Veränderungen in Bezug auf Krebszellen und bezüglich einer Immuntherapie ist nicht bekannt.

In der Region der Wiederholungseinheit befinden sich die meisten Glycosylierungsstellen für eine posttranslationale Modifikation mit Zuckermolekülen im Golgi-Apparat.^[29] C-Terminal schließt sich an diese Region eine Linker-Domäne bestehend aus 235 Aminosäuren mit fünf Bindungsstellen für N-Glycane mit einer proteolytischen Spaltungsstelle, eine kurze Transmembran-Region (24 Aminosäuren) und der C-terminale cytoplasmatische Teil von ca. 69 Aminosäuren an.

Nach posttranslationaler Modifikation (Proteolytische Prozessierung des Glycoproteins an der Spaltungsstelle) ist der extrazelluläre Teil in normalen Zellen und in Krebszellen über nicht kovalente Wechselwirkungen mit dem abgetrennten Transmembranteil assoziiert und bildet ein Heterodimer an der Zellmembran.^[30-32] In N-terminaler Richtung zu den Wiederholungseinheiten schließt sich eine kurze Domäne an, die eine Signalpeptid-Sequenz enthält. Neben der bereits erwähnten Schutzfunktion (Repulsive Barriere) wird insbesondere dem cytoplasmatischen Teil des MUC1 eine Rolle in der Signaltransduktion zugeschrieben. Dafür stehen potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstellen für eine Bindung mit der Src Homologie 2-Domäne des Adapter-Proteins Grb2 zur Verfügung.^[33] Des weiteren gibt es Hinweise auf eine mögliche Involvierung des MUC1 in die Zell-Zell-Adhäsion.^[34] Eine cytoplasmatische Domäne des MUC1 interagiert direkt mit β -Catenin, steht somit mit dem Cytoskelett in Verbindung und wird reguliert durch eine Glycogensynthase-Kinase.^[35]

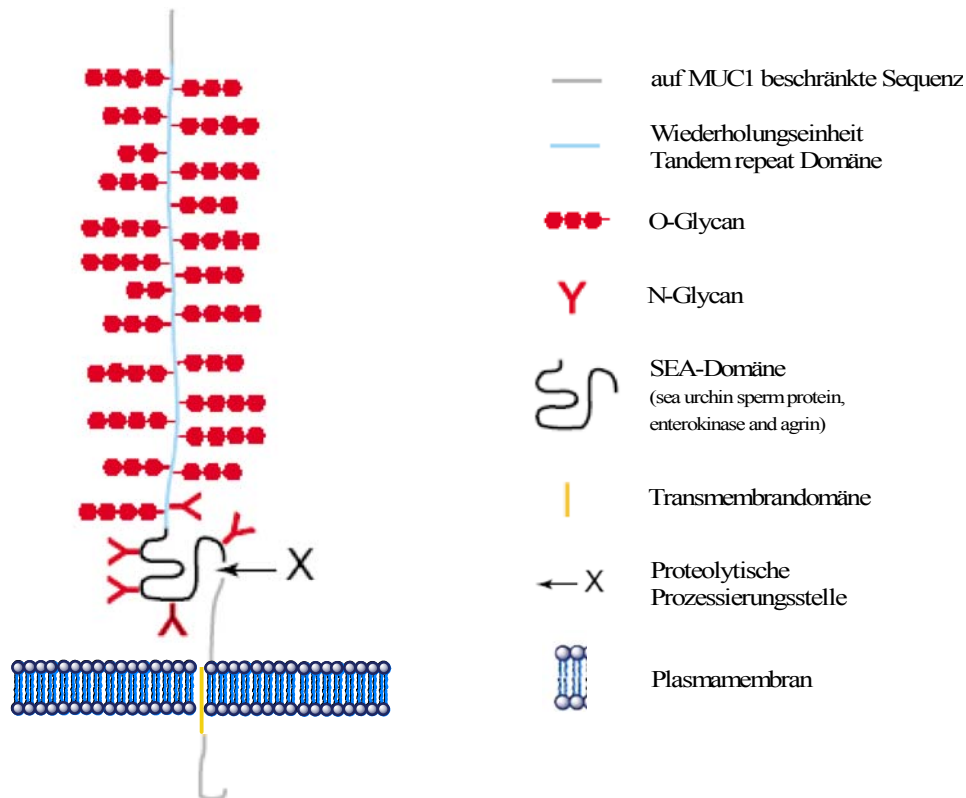


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Domänenarchitektur des Glycoproteins MUC1.

Neben diesen Funktionen konnte gezeigt werden, dass Mucin-Gele biologisch aktive Moleküle einfangen und zurückhalten können, um sie dann wieder zu entlassen. Auf diese Weise können inflammatorische Vorgänge sowie Reparatur- und Heilungsprozesse initiiert werden. Zusammenfassend kann man festhalten, dass Mucine stark in die Kontrolle und den Schutz der molekularen Umgebung von Epithelzelloberflächen involviert sind.^[36]

1.3 Das Glycoprotein MUC1 in malignen und benignen Zellen – ein Vergleich

Das MUC1-Glycoprotein findet man in fast allen humanen Epithelzell-Adenocarcinoma in stark überexprimierter Form.^[37, 38] Die ersten pathologischen Beobachtungen durch histochemische Färbetechniken belegten eine hohe Mucin-Produktion durch Adenocarcinoma.^[39, 40] Eine entscheidende Rolle spielt das MUC1-Glycoprotein bei der Tumorprogression und Metastasierung. Eine hohe MUC1-Expression ist dabei kennzeichnend für ein aggressives Stadium der Tumorprogression^[41] und wird mit einer schlechten Prognose

und hohem metastasierenden Potential in Verbindung gebracht.^[42-45] Man nimmt an, dass die Überexpression von verändertem MUC1 auf der gesamten Zelloberfläche die Zell-Zell-Adhäsion destabilisiert und der Krebszelle erlaubt zu wandern, sich aus dem Zellverband abzuspalten und zu metastasieren.^[46] Ein Aspekt dabei ist, dass durch MUC1 von Integrinen vermittelte Zell-Adhäsion mit der extrazellulären Matrix inhibiert wird.^[47]

Im Gegensatz zu gesunden Zellen ist die MUC1-Expression bei Krebszellen des Epithelialgewebes um bis zu einem Faktor 50 erhöht und erfolgt nun auch auf der basolateralen Epithelzell-Oberfläche, was zu einem für maligne Zellen typischen Verlust der Polarität führt.^[48] Somit ist das Mucin MUC1 auf der ganzen Oberfläche der Tumorzelle exprimiert und kann nun durch zirkulierende Zellen wie z.B. Lymphocyten erkannt werden.

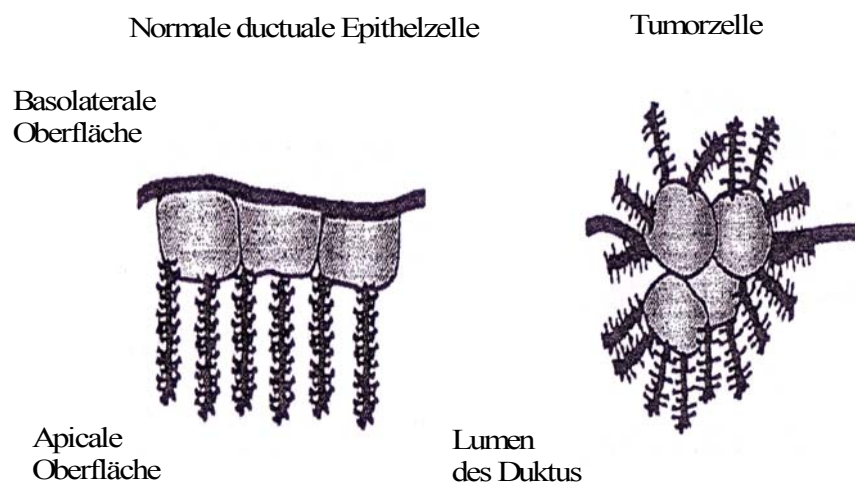
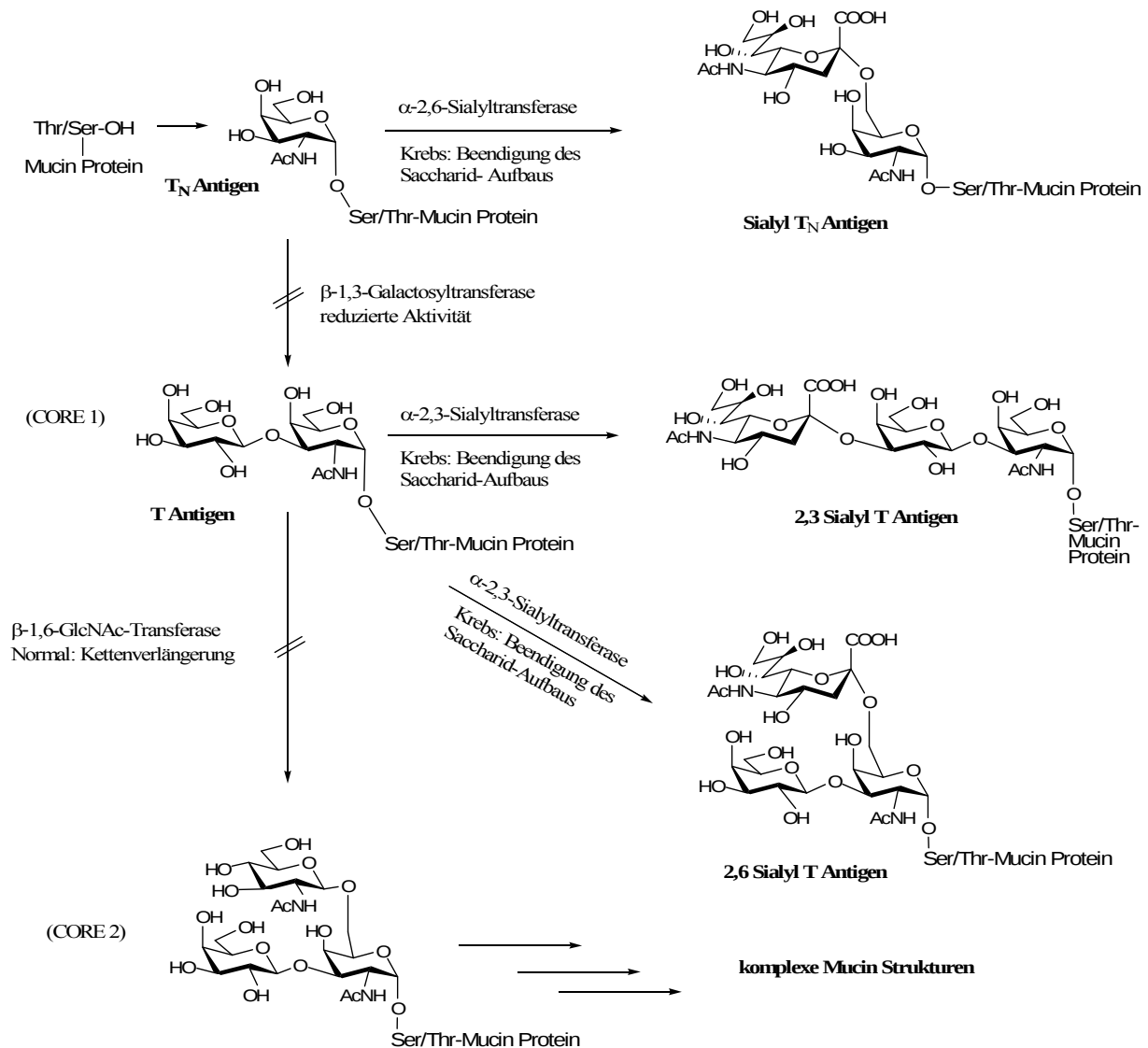


Abb. 1.2: Lokalisation des Glycoproteins MUC1 auf normalen Epithelzellen und Tumorepithelzellen.

Ein Charakteristikum der Mucine ist die hohe Anzahl an O-glycosidisch verknüpften, stark verzweigten Saccharidketten. Bezeichnende Veränderungen im Glycosylierungsmuster dieser Seitenketten sind als weiterer wichtiger Unterschied zwischen MUC1-Glycoproteinen auf der gesunden Zelle und der Tumorzelle zu nennen.^[26, 49] In normalen humanen Brustdrüsenzellen folgt auf die Anheftung von N-Acetylgalactosamin (GalNAc) an Serin- oder Threonin-Reste des Apoproteins im cis-Golgi die Anbindung von Galactose zur Bildung von Core 1, welches dann als Substrat zur Bildung des Core 2 und weiterer hoch verzweigter Glycanstrukturen dient.

Eine fehlerhafte Glycosyltransferaseaktivität,^[50] insbesondere eine Erhöhung der Sialyltransferaseaktivität^[51] führt zu kürzeren, unverzweigten und hochgradig O-sialylierten O-Glycanketten, da während der Biosynthese Sialylierungen im allgemeinen Terminierungsschritte eines Glycan-Core's sind (s. Schema 1.1).



Schema 1.1: O-Glycosylierung des Mucin-Proteins in benignen und malignen Brust-Epithelzellen.

Der tumorassoziierte Zustand ist weiterhin durch einen Wechsel der O-Glycosylierungsstellen gekennzeichnet. Erste Untersuchungen zeigen, dass in normalen Zellen durchschnittlich 2.5 der fünf potentiellen Stellen glycosyliert sind wohingegen in Krebszellen alle fünf O-glycosyliert sein können.^[29] Das genaue Glycosylierungsmuster ist nicht bekannt, was für eine Immuntherapie von Bedeutung sein könnte.

Die verkürzten, neuen bzw. sonst verborgenen Strukturen, die man als T_N -, Sialyl- T_N (ST_N)-, und T-Antigene (Thomsen-Friedenreich-Antigene) bezeichnet, sind nun wegen der verkürzten Glycanketten an der Moleküloberfläche exponiert.^[52, 53] Alle drei Antigene sind stark in allen humanen Krebszellen exprimiert, wobei das ST_N -Antigen im Falle des Brustkrebs immunologisch besonders interessant ist, da es in normalem Brustgewebe nicht vorkommt.^[54] Diese tumorassoziierten Antigene wurden mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachgewiesen.^[55]

Wegen der fehlerhaften Glycosylierung und besonders der kürzeren Struktur der Kohlenhydratbausteine sind sonst abgeschirmte Sequenzen (Epitope) des Apoproteins zugänglich. Diese Epitope sind als immundominant mittels Epitopmapping identifiziert worden, wobei die Motive PDTRPAP und STAPP als immunologisch relevant angesehen werden.^[56]

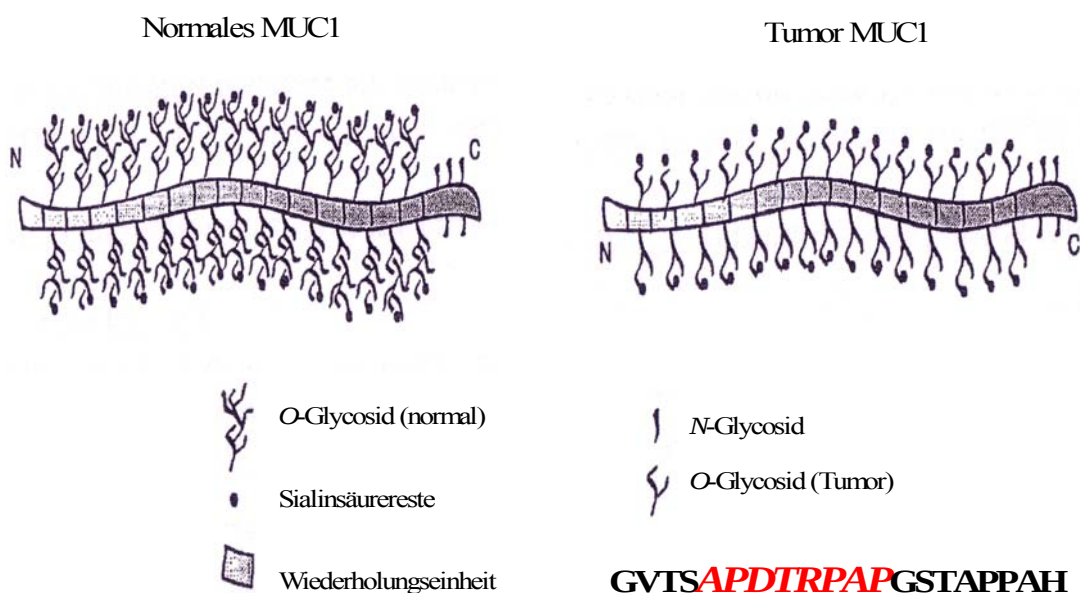


Abb. 1.3: MUC1-Struktur in normalen Epithelzellen und Tumorepithelzellen.

Insbesondere die Region APDTRPA wird von monoklonalen Antikörpern,^[57] normalem Serum^[58] und cytotoxischen T-Zellen^[59] erkannt. Der SM3-Antikörper erkennt das Epitop PDTRPAP und bindet spezifisch an maligne Zellen, jedoch findet keine Bindung SM3-Antikörpers an normale Brust-Epithelzellen statt.^[60] Es bleibt anzumerken, dass auch außerhalb der Wiederholungseinheit kürzlich Epitope beschrieben wurden, die T-Zellen aktivieren können.^[61]

1.4 Die Erkennung von MUC1 durch das Immunsystem

Das unterglycosylierte MUC1-Protein zeigt immunstimulierende Eigenschaften. So wurde es als Ligand für das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) beschrieben und verstärkt dadurch die Antigen-Präsentation für T-Zellen.^[62] Dies geschieht möglicherweise durch eine Interaktion spezieller Kohlenhydrat-Epitope des MUC1 mit Lektin.^[63] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass MUC1 ein Ligand für Sialoadhesin ist, ein auf Makrophagen exprimiertes Adhäsionsmolekül, und damit ist MUC1 in die Rekrutierung von Makrophagen involviert ist, die die Tumorzellen aufnehmen und proteolytisch abbauen.^[64]

MUC1 zeigt aber auch eine immunsuppressive Wirkung, die vermutlich durch mehrere Mechanismen erfolgt. Zellen, die mit MUC1 bedeckt sind, adhäreren weniger effizient mit natürlichen Killerzellen (NK), von Lymphokin aktivierten Killer-Zellen und cytotoxischen T-Zellen (CTL) und sind somit resistent gegen eine Tötung durch diese Zellen.^[65]

Das MUC1-Glycoprotein kann darüber hinaus einen immunsuppressiven Effekt auf T-Zellen ausüben. Aufgrund ihrer multiplen identischen Epitope werden die MUC1-Moleküle MHC-unrestringiert von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen erkannt und quervernetzen dabei deren T-Zellrezeptoren. Dies führt zu einer funktionellen Inaktivierung (Anergisierung) der T-Zellen. Dieser Effekt kann jedoch durch die Zugabe von Interleukin 2 (IL 2) oder kleineren Bruchstücken des MUC1-Glycoproteins aufgehoben werden.

Das Glycoprotein MUC1 stellt trotz dieser bisher nicht genau verstandenen und die Aufklärung seiner Funktion erschwerenden dualen Eigenschaften ein sehr viel versprechendes Zielmolekül der Krebs-Immuntherapie dar. Es wurden nämlich bei Krebspatienten sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten gegen das veränderte MUC1-Zelloberflächenmolekül nachgewiesen.

In Brustkrebspatienten wurden aus Lymphknoten MUC1-spezifische cytotoxische Lymphocyten isoliert. Diese Lymphocyten erkennen MUC1 direkt in einem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) unrestringierter Art. Das Epitop, welches in dieser MUC1-spezifischen CTL-Antwort erkannt wird, ist vermutlich ein unterglycosyliertes MUC1-Rumpfpeptid innerhalb der Wiederholungseinheit, da der monoklonale Antikörper SM-3, der spezifisch an die tumorassoziierte Mucin-Core-Peptidsequenz PDTRP bindet, die CTL-Aktivität blockiert.^[66-69] Ebenfalls wurde eine MHC-I-restringierte Immunantwort sowohl beim Menschen^[59, 63, 68] als auch bei der Maus^[66, 70] beobachtet.

Cytotoxische T-Zellen, die MUC1 exprimierende Zelllinien zerstören, konnten aus Patientinnen mit Eierstock- und Brustkrebs isoliert werden.^[71]

Nicht nur diese zellulären, sondern auch humorale Antworten gegenüber MUC1 wurden bei Krebspatienten gefunden.^[58] So konnten bei Erkrankten mit Brust-, Bauchspeicheldrüsen- und Dickdarmkrebs im Serum Immunglobuline des IgM-Isotyps gegen verändertes MUC1 nachgewiesen werden.^[72] Ebenfalls konnten in Patientinnen mit benignen und malignen Brusttumoren zirkulierende Immunkomplexe gegen das Zelloberflächenprotein MUC1 beobachtet werden.^[58] Bei Patienten mit einem colorektalen Karzinom wies man MUC1-IgG-Antikörper nach.^[73] In diesem Zusammenhang diskutiert man eine höhere Überlebenschance von Krebskranken in einem frühen Stadium der Erkrankung durch den Einfluss einer natürlich vorhandenen Immunantwort gegen MUC1.^[74]

1.5 Das Glycoprotein MUC1 als Zielstruktur – Immuntherapeutische Strategien

Das Vorhandensein von Immunantworten gegen MUC1-Strukturen in Krebspatienten deutet daraufhin, dass solche veränderten Strukturen des MUC1-Glycoproteins vom Immunsystem als nicht eigen erkannt werden können.^[75] Diese vorhandene, allerdings schwache körpereigene Immunantwort gilt es zu verstärken und andere neue Immunantworten hervorzurufen, indem man versucht, mit Strukturausschnitten des Zelloberflächenglycoproteins MUC1 zu vakzinieren.^[76] Hierbei ist zunächst nicht das Ziel einer Schutzimpfung, wie bei viralen Impfstoffen oder Impfstoffen gegen Bakterien oder deren Metaboliten, sondern eine unmittelbare Behandlung. Besonders die Zerstörung von Metastasen und zirkulierenden Tumorzellen, die durch die herkömmlichen Behandlungsmethoden nur schwer zu eliminieren sind, wird hierbei angestrebt.

Es gibt mehrere unterschiedliche Ansätze in der Krebs-Immuntherapie. Die Immunisierung mit Zellen, z.B. modifizierten B-Zellen oder Dendritische Zellen, die MUC1 exprimieren können, stellt einen der molekulargenetischen Ansatzpunkte dar.^[77] Durch die Verabreichung nackter MUC1-cDNA konnten sowohl humorale Immunantworten als auch eine Verbesserung der zellulären Immunantwort erreicht werden.^[78] Nach einem anderen Ansatz wird versucht, mit viralen Vektoren, die die cDNA zur Expression von MUC1 enthalten, das Immunsystem zu aktivieren.^[79-84] Die Verwendung monoklonaler Antikörper gegen MUC1 ist eine weitere Möglichkeit einer Immuntherapie.^[85]

931



Abb. 1.4: KLH-gebundene *N*-Acyl-GM3-Derivate **1** und Lewis^y-Cluster konjugiert mit KLH **2** und Pam₃Cys **3**.

In einer klinischen Vakzinierungsstudie (bis Phase III) wurde intensiv das über einen Linkerarm an KLH gebundene, synthetische Sialyl-T_N-Antigen, welches in DETOX-BSE als Adjuvans emulgiert ist, untersucht (Theratope®).^[85, 94, 95]

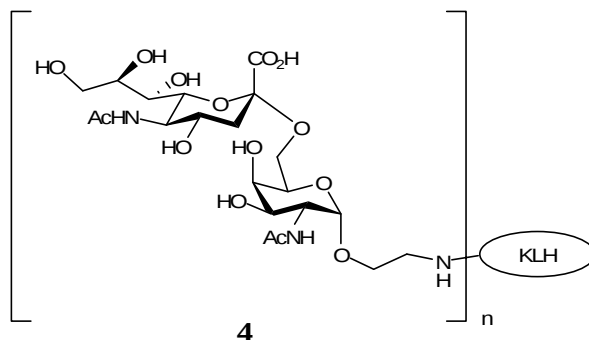


Abb. 1.5: Sialyl-T_N-KLH-Konjugat 4.

Durch die veränderten und verkürzten Oligosaccharidstrukturen in MUC1-Glycoproteinen maligner Zellen sind die in normalen Zellen verborgenen Peptidepitope zugänglich. Darum untersucht man die Vakzinierung mit Peptid-Vakzinen, die insbesondere Sequenzen aus der MUC1-Wiederholungseinheit enthalten. Goydos *et al.*^[96] testeten in einer Phase I Studie ein aus 5 Wiederholungseinheiten bestehendes synthetisches MUC1-Peptid sowie kürzere Peptidfragmente unter Verwendung des Bacillus Calmette-Guérin als Adjuvans. Ergebnis dieser Untersuchung war die Induktion einer erhöhten Mucin spezifischen cytotoxischen T-Zell Antwort.

Ein ähnliches pentameres MUC1-Oligopeptid (GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH)₅ wurde in Kombination mit LeIF als Adjuvans Schimpansen appliziert. LeIF ist ein aus Leishmania stammendes Protein, das Antigenpräsentierende Zellen und humane periphere Blutlymphocyten stimuliert. Die Immunisierung erzeugte eine MUC1-spezifische IFN-γ Expression sowie eine cytotoxische T-Zell Antwort. Allerdings konnten keine Antikörper erzeugt werden. Verabreicht man das Oligopeptid jedoch zusammen mit einer Öl-Wasser-Emulsion so konnte eine MUC1-spezifische humorale Immunantwort erzeugt werden.^[97] In einer anderen Studie wurden Brustkrebspatientinnen mit einer 30 Aminosäure MUC1-Sequenz (C-VTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA) und QS-21 als Adjuvans immunisiert. Die kovalente Anbindung der Struktur an mit *N*-Maleinimido-benzoyl-*N*-hydroxysuccinimid-ester modifiziertes KLH erfolgte über den *N*-terminalen Cysteinrest. Es wurden hohe IgM- und IgG-Antikörpertiter gegen das synthetische MUC1-Fragment nachgewiesen.^[98]

Mit einem Konjugat aus dem MUC1-Peptid (GVTSAPDTRPAPGSTA) und KLH sowie dem DETOX-Adjuvans erreichte man die Bildung von gegen MUC1 gerichteten MHC-I-restringierten cytotoxischen T-Zellen.^[99] Andersson *et al.* studierten die Wirkung eines Konstruktes aus einem die Wiederholungseinheit fünfmal enthaltenden MUC1-Peptid und einem T-Zellepitop aus dem Tetanustoxin. Es konnte hierbei die Bildung von spezifischen Antikörpern beobachtet werden.^[100] Die Immunisierung von Kaninchen mit dem synthetischen Hexapeptid DTRPAP, welches kovalent angebunden an BSA war, erzeugte Antikörper, die mit humanen Ovarial- und Brustkrebszellen, aber nicht mit normalen Brustepithelzellen reagierten.^[101]

Mit einem 24mer aus der humanen MUC1-Wiederholungseinheit, welches mit Hilfe von Poly(D,L-Milchsäure-co-Glycolsäure)-Polymerkügelchen als Präsentationssystem appliziert wurde, konnte eine T-Helferzell-Antwort induziert werden.^[102]

In einem anderen Ansatz wurde die Vakzin-Formulierung bestehend aus einem 25mer MUC1-Wiederholungseinheit Peptid (STAPPAHGVTSAPDTR), welches in Liposomen eingebaut ist und dem Lipid A als Adjuvans eingesetzt.^[103] *In vitro* konnten damit T-Zellen erzeugt werden, die cytotoxisch gegen MUC1 exprimierende Tumorzellen sind. McKenzie *et al.* erzeugten mit einem MUC1-Trägerprotein-Konjugat, bestehend aus der Partialsequenz der MUC1-Wiederholungseinheit (PAHGVTSAPDTRPAPDSTAP)₅, die kovalent an KLH gebunden ist, eine humorale Immunantwort. Allerdings wurden keine zelluläre Immunantwort und nur eine schwache Tumorprotektion beobachtet. Bindet man das gleiche 5mer MUC1-Peptid an die oxidierte Form von Mannan, so konnte man in einer Phase I Studie an Patienten mit Adenocarcinoma eine humorale Antwort (IgG1), proliferierende zelluläre Antworten und in wenigen Fällen auch CTL-Antworten erhalten.^[104-106]

Ein neues Konzept zur Konstruktion von tumorselektiven Antitumor-Vakzinen kombiniert ein synthetisches, tumorassoziiertes MUC1-Glycopeptid-Antigen über einen flexiblen Spacer mit einem synthetischen T-Zell-Epitop aus Tetanustoxin zum Konjugat 5. Die Untersuchungen ergaben, dass durch die MUC1-B-/T-Zellkonstrukte Proliferationen cytotoxischer T-Zellen in Kulturen peripherer Blutlymphocyten induziert werden können.^[107] Immunisierungen von Mäusen mit einem ähnlichen Konstrukt (Austausch des Tetanustoxin T-Zell-Epitops gegen ein Ovalbumin T-Zell-Epitop) konnten eine starke humorale Immunantwort auslösen. Des weiteren zeigten die generierten Antikörper eine hohe Spezifität bezüglich des MUC1-Glycopeptid-Antigens.^[108]

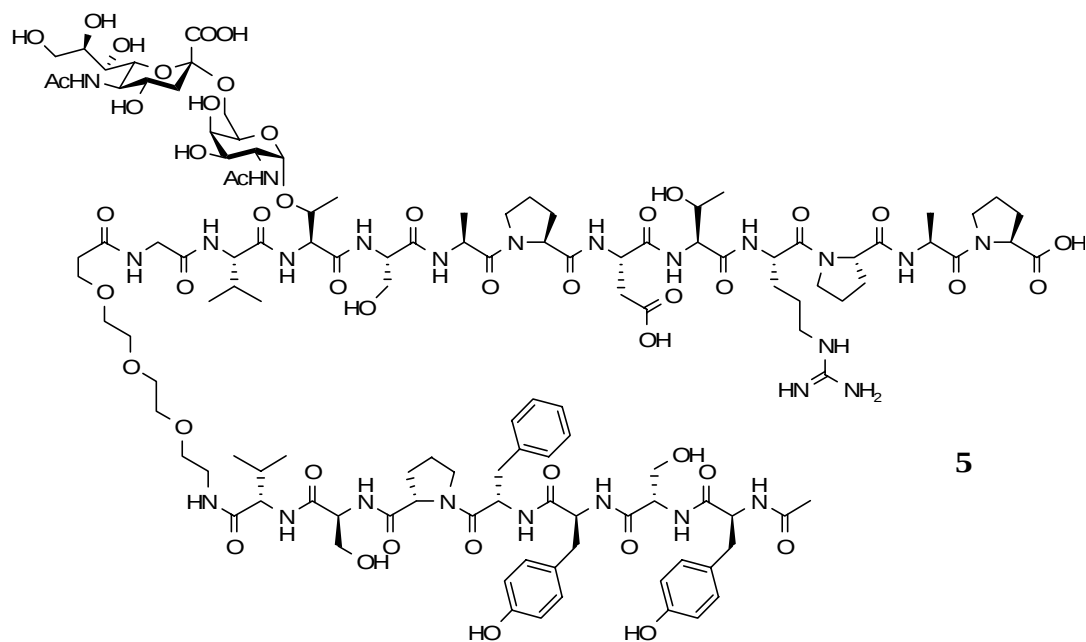
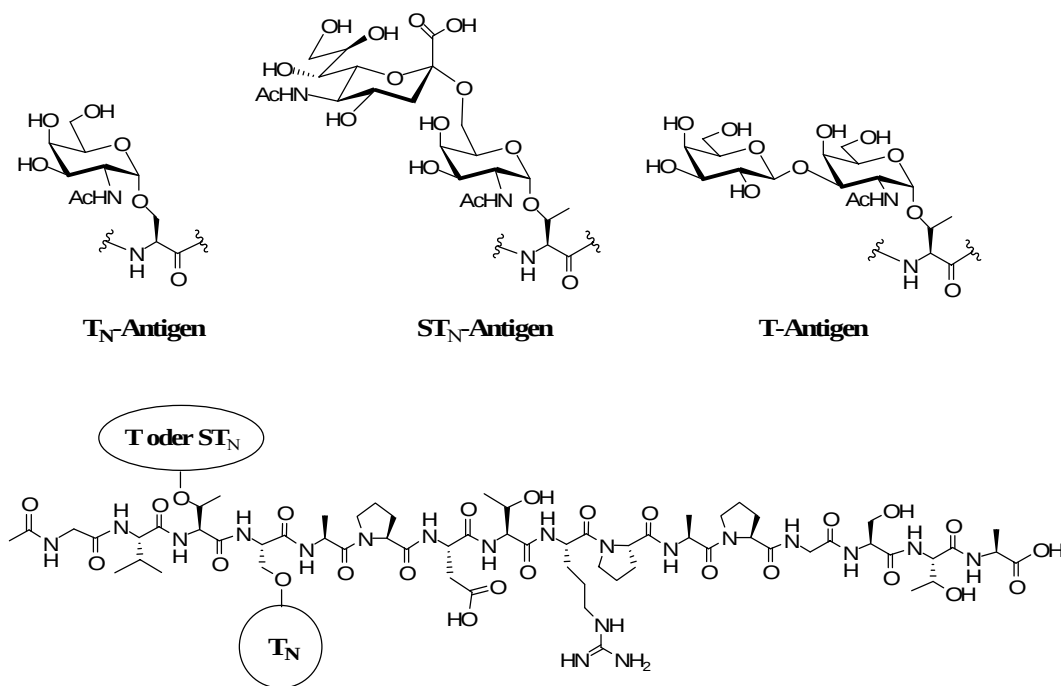


Abb. 1.6: Sialyl-T_N-MUC1-Tetanustoxin-Konjugat 5.

2. Zielsetzung

Das Glycoprotein MUC1 ist in Tumorepithelzellen sonderlich stark überexprimiert. Wegen der vorzeitig einsetzenden Sialylierung, verursacht durch ein verändertes Enzymmuster in Tumorzellen, sind darüber hinaus die O-Glycanketten dieses Membranproteins stark verkürzt. Diese veränderten Saccharidstrukturen werden als tumorassoziierte Antigene bezeichnet. Durch die Expression dieser veränderten Saccharide werden zugleich vorher verborgene Peptidpitope des Glycoprotein-Rückgrates auf der Zelloberfläche der Epithelzellen zugänglich, die als fremd von den Zellen des Immunsystems erkannt werden können. Es sollen diese beiden strukturellen Besonderheiten verbunden werden, indem die veränderten tumorassoziierten Saccharidstrukturen T_N -, ST_N - und T-Antigen als Glycosylaminosäure-Festphasenbausteine synthetisiert werden und mit dem Peptidpitop der Wiederholungseinheit des MUC1 in Form von synthetischen Glycopeptiden durch die Anwendung der Glycopeptid-Festphasensynthese miteinander kombiniert werden.



Glycosylierte Partialsequenz aus der Wiederholungseinheit des tumorassoziierten MUC1

Abb. 2.1: Die tumorassoziierten T_N -, Sialyl- T_N - und Thomsen-Friedenreich-(T)-Antigene sowie die MUC1-Zielstruktur zur Entwicklung synthetischer Tumorstoffe.

Von der Vakzinierung mit einer tumorassoziierten Antigen-Struktur wie der Wiederholungseinheit des Glycoproteins MUC1 erhofft man sich, eine Immunantwort gegen die Tumorzelle zu erzeugen. Dies wäre eine erstrebenswerte, schonende Alternative zu den etablierten Therapiemöglichkeiten einer Krebserkrankung. Da aber Glycopeptide mit einem Molekulargewicht von 2-5 kDa im Allgemeinen nicht ausreichend immunogen sind, müssen diese synthetisierten Glycopeptidstrukturen kovalent an ein Trägerprotein gebunden werden, um eine Immunantwort auszulösen. Deshalb soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die radikalische Thiol-Addition an ein Allylamid für eine chemoselektive Biokonjugation geeignet ist und folglich mit dieser Methode definierte MUC1-Glycopeptid-Trägerprotein-Konjugate aufgebaut werden können.

Zuvor ist es aber dafür notwendig, Modellaminosäuren zu synthetisieren, anhand derer die Thiol-Addition an Allylamide auf die etwaige Bildung von Nebenprodukten zu untersuchen und geeignete Reaktionsbedingungen zu entwickeln.

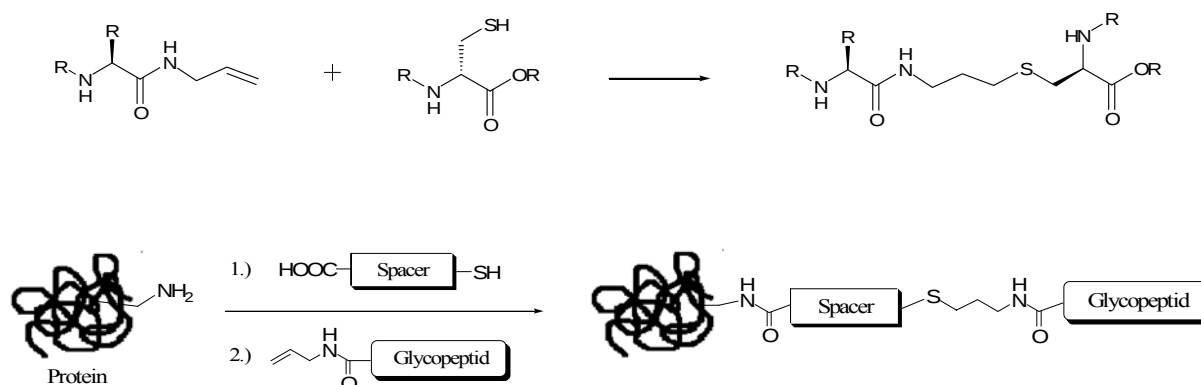


Abb. 2.2: Modellreaktion zur radikalischen Thiol-Addition und Syntheseweg zu Glycopeptid-Protein-Konjugaten.

Der niedrige Glycosylierungsgrad des veränderten Mucins MUC1 hat einen Einfluss auf die Struktur des Glycoproteins. So wird das MUC1-Glycoprotein in der tumorassoziierten Form in der immundominanten Region APDTRPAP als knaufartig beschrieben. Es soll versucht werden diese Struktur durch die Synthese von cyclischen (Glyco)Peptiden nachzuahmen und zu fixieren. Cyclische Peptide zeigen des weiteren eine im Vergleich zu linearen Peptiden erhöhte enzymatische Stabilität. Zur Synthese der Cycloglycopeptide soll die Ringschlussmetathese angewandt werden, was zuvor die Entwicklung der Synthese von für die Peptid-Festphasensynthese geeigneten, olefinischen Aminosäurebausteinen erfordert.

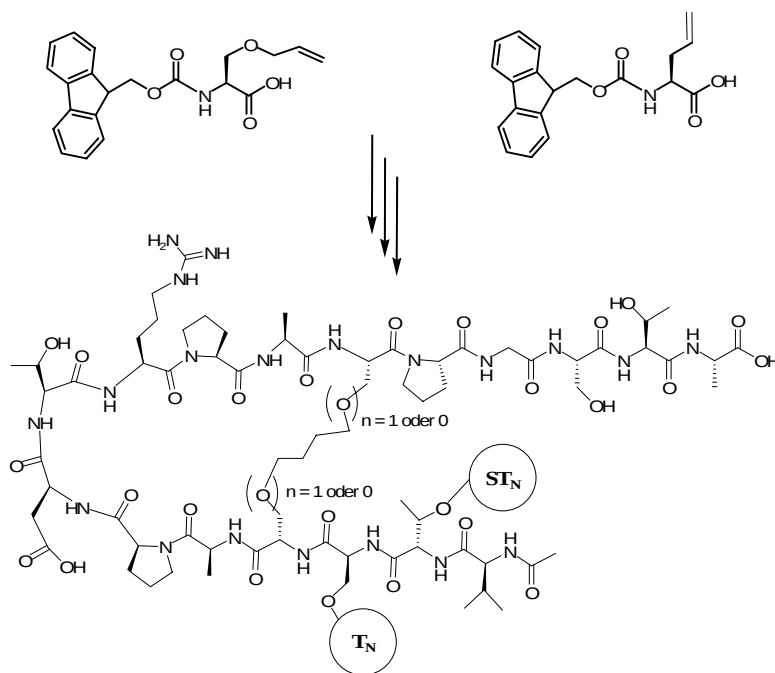


Abb. 2.3: Olefinische Fmoc-Aminosäure-Festphasenbausteine und cyclische (Glyco)Peptide mit einer Partialstruktur des tumorassoziierten Glycoproteins MUC1.

Die Bindung zwischen Saccharid und Peptidrückgrat wird im Falle des Mucin-Glycoproteins wie bei anderen O-Glycoproteinen auch durch eine O-glycosidische Bindung an Serin bzw. Threonin bewirkt. Ersetzt man diese Verknüpfung durch eine unnatürliche C-glycosidische Bindung, so ändert sich die biologische Aktivität des Glycoproteins vor allem durch einen verlangsamten Abbau durch entsprechende Glycosidasen. Diese Eigenschaft macht die C-Glycoside interessant für die Entwicklung von Pharmaka, zur Beeinflussung der Zell-Adhäsion oder der Zell-Zell-Erkennung oder als Vakzine. Es soll deshalb untersucht werden, ob ein effizienter Syntheseweg zur Herstellung einer C-Glycosylaminosäure, die das N-Acetylgalactosamin trägt und in einer Peptid-Festphasensynthese einsetzbar ist, möglich ist. Dieser Aminosäurebaustein soll auch in der Synthese eines Glycopeptids eingesetzt werden.

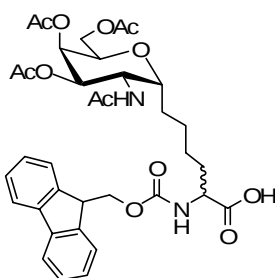


Abb. 2.4: Fmoc-geschützte C-Galactosylaminosäure.

3. Allgemeiner Teil

3.1 Die Synthese der tumorassoziierten Glycosylaminosäuren

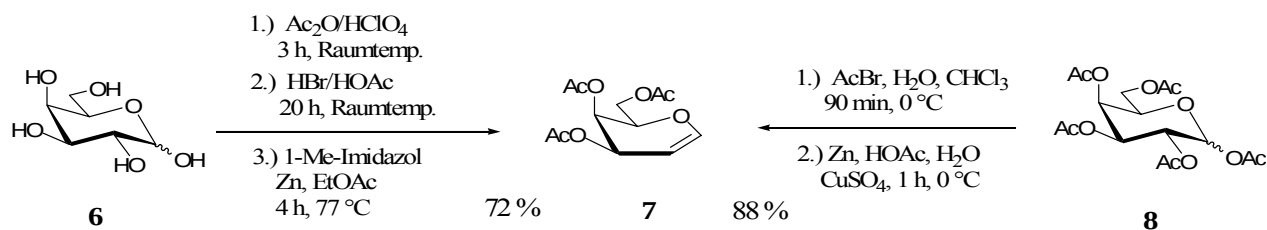
3.1.1 Die Synthese des *N*-Acetylgalactosamin-Threonin- und des *N*-Acetylgalactosamin-Serin-Bausteins (T_N -Antigen)

In Krebszellen ist eine charakteristische Veränderung der Kohlenhydratstruktur zu beobachten, die auf die veränderte Aktivität und Expression von Glycosyl- und Sialyltransferasen zurückzuführen ist.^[109, 110] Die stark verminderte Aktivität der Core 2 β -1,6-*N*-Acetylglycosaminyltransferase führt zu einer Akkumulation der Core 1-Struktur (s. Kapitel 1.3). Die Vorstufe der Core 1-Struktur, das T_N -Antigen, stellt deshalb ein zu synthetisierendes Zielmolekül sowie die Ausgangsverbindung für den biomimetischen Aufbau weiterer komplexer tumorassoziiierter Antigene dar.

Die Synthese des *N*-Acetylgalactosamin-Threonin- und des *N*-Acetylgalactosamin-Serin-Bausteins erfolgte gemäß einer von B. Liebe erarbeiteten Synthesestrategie.^[111, 112] Schlüsselschritt hierbei ist die Glycosylierung der *N*- und *C*-terminal geschützten Aminosäure-Derivate von Threonin bzw. Serin mit einem Galactosylbromid-Derivat.

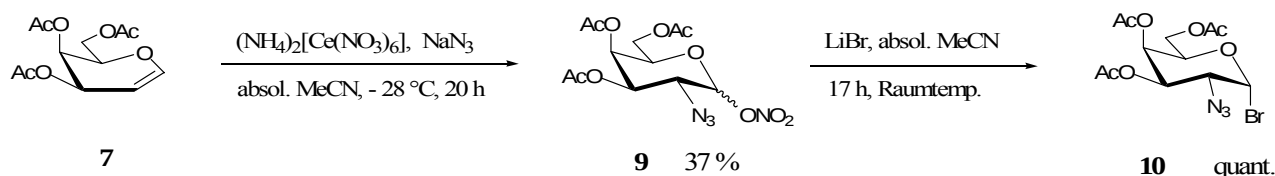
Zur Herstellung des Galactosylbromid-Derivates **10** wurde in einem ersten Schritt der Reaktionssequenz D-Galactose peracetyliert. Dies geschah durch die Umsetzung des Monosaccharids mit Acetanhydrid in Gegenwart katalytischer Mengen Perchlorsäure. Durch Zugabe von 33%iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig überführte man die vollständig acetylierte Galactose in das anomere Bromid. Die anschließende Eliminierung des Bromid-Ions und der Acetoxygruppe in 2-Position erfolgte mit Hilfe von aktiviertem Zinkpulver und *N*-Methylimidazol und lieferte das 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **7** in 72 % Ausbeute.

Ein alternatives Protokoll zur Synthese des Galactals **7** ist von S. Koto *et al.* beschrieben worden.^[113] Gemäß dieser Vorschrift wurde peracetylierte Galactose mit Acetylbromid und nachfolgend mit Wasser umgesetzt. Das dadurch entstandene Galactosylbromid-Derivat wurde nach dem Entfernen des Acetylbromids mit Zinkstaub, der durch die Zugabe von Kupfer(II)sulfat aktiviert wurde, in einem Essigsäure/Wasser-Gemisch zur Reaktion gebracht. Nach der Entfernung des Zinkstaubs durch Filtration und lediglich der Extraktion mit Toluol erhielt man das 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **7** in hoher Reinheit und hoher Ausbeute.



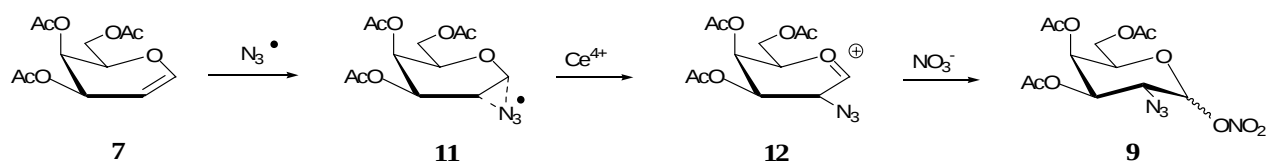
Schema 3.1: Synthese des 3,4,6-Tri-O-acetylalactals **7**.

In der natürlich vorkommenden T_N -Antigen-Struktur ist das *N*-Acetylgalactosamin über eine α -glycosidische Bindung mit der Aminosäure Serin bzw. Threonin verknüpft, deshalb sollte bei einer Glycosylierungsreaktion zur chemischen Synthese des T_N -Antigens überwiegend das α -Anomer entstehen. Darum ist es notwendig in der 2-Position der Galactose eine funktionelle Gruppe zu installieren, die keinen Nachbargruppeneffekt während der Glycosylierungsreaktion ausübt und später die Erzeugung einer Aminofunktion ermöglicht. Die Azidogruppe erfüllt diese beiden Voraussetzungen. Die Einführung der N_3 -Funktion in die 2-Position gelingt durch das von R. U. Lemieux *et al.* eingeführte Verfahren der Azidonitratisierung,^[114] bei welchem das 3,4,6-Tri-O-acetylalactal **7** mit Cer(IV)ammoniumnitrat und Natriumazid bei -28 °C in absolutem Acetonitril zur Reaktion gebracht wurde und das 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactosylnitrat **9** in 37%iger Ausbeute entstand.



Schema 3.2: Azidonitratisierung und Synthese des 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromids **10**.

In mechanistischen Überlegungen wird die Addition eines durch Ce^{4+} - und N_3^- -Ionen gebildeten Azidradikals an die Galactal-Doppelbindung diskutiert. Das entstehende Galactosylradikal **11** wird durch Ce^{4+} -Ionen weiter zum Oxycarboniumion **12** oxidiert, welches durch die Addition eines Nitrations zum 2-Azido-2-deoxy- α/β -D-galactosylnitrat **9** reagiert.

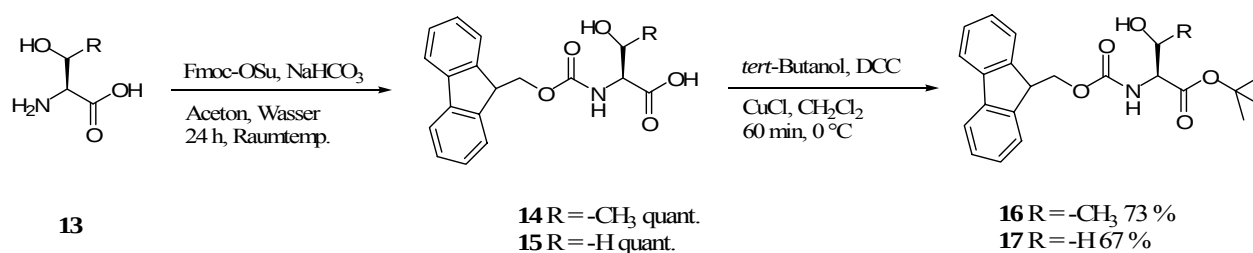


Schema 3.3: Möglicher Reaktionsmechanismus der Azidonitratisierung.

Man erhielt nach der Reinigung durch Flash-Chromatographie ein Anomerengemisch der Verbindung **9**, welches im nächsten Reaktionsschritt mit wasserfreiem Lithiumbromid in absolutem Acetonitril umgesetzt wurde. Bei dieser nucleophilen Substitution wurde ausschließlich das durch den anomeren Effekt favorisierte α -2-Azido-2-deoxygalactosylbromid **10** gebildet, welches ohne chromatographische Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wurde.

Als Aminosäure zur Synthese der T_N-Antigen-Derivate wurden die *N*- und *C*-terminal geschützten Threonin- bzw. Serin-Derivate Fmoc-Thr-OtBu **16** bzw. Fmoc-Ser-OtBu **17** verwendet, die sich in zwei Stufen aus L-Serin bzw. L-Threonin synthetisieren lassen.^[115, 116]

In einem ersten Schritt erfolgte dazu die Blockierung der Aminofunktion durch die Fmoc-Schutzgruppe.^[117] Die Umsetzung von L-Threonin bzw. L-Serin mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) lieferte quantitativ die Verbindungen Fmoc-Thr-OH **14** bzw. Fmoc-Ser-OH **15**.

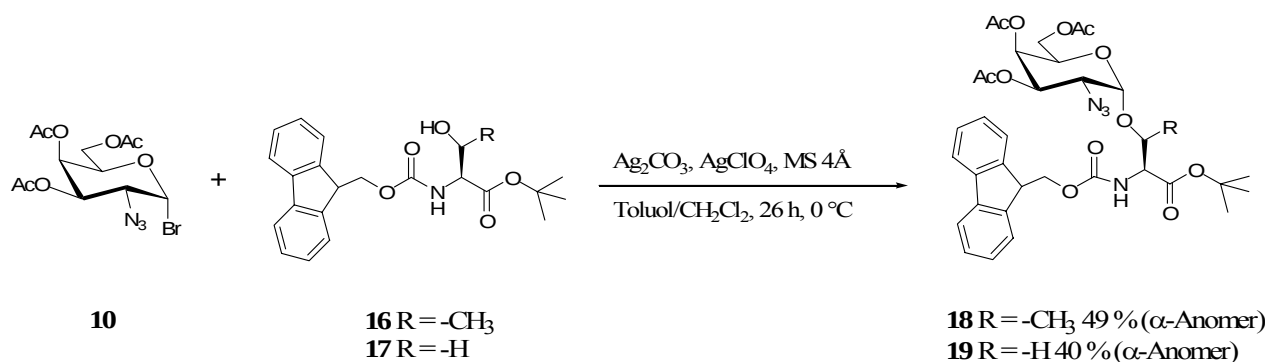


Schema 3.4: Herstellung der *C*- und *N*-terminal blockierten Aminosäure-Derivate Fmoc-Thr-OtBu **16** und Fmoc-Ser-OtBu **17**.

Die Veresterung zu den entsprechenden *tert*-Butylestern erfolgte durch die eher selten angewandte Reaktion mit *O-tert*-Butylisoharnstoff, welcher durch Kupfersalzkatalyse (CuCl) aus *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *tert*-Butanol gebildet wird.^[118-120] Man erhielt die orthogonal geschützten Aminosäure-Derivate **16** und **17** in 73 % bzw. 67 % Ausbeute.

Bei der Einführung der *tert*-Butylgruppe ist es notwendig niedrige Temperaturen und kurze Reaktionszeiten einzuhalten, da sonst als Nebenreaktion die Blockierung der β -Hydroxyfunktion der Aminosäure als *tert*-Butylether in hohem Maß eintritt.

Die Glycosylierung der Hydroxygruppe an Serin und Threonin mit dem Galactosylbromid **10** erfolgte durch eine Variation der Glycosylierungsmethode nach Koenigs-Knorr.^[121] Hierzu wurde der Glycosyldonor **10** mit Silbercarbonat und dem Zusatz von wasserfreiem Silberperchlorat aktiviert und mit dem Serin- bzw. Threonin-Glycosylakzeptor in einem Lösemittelgemisch aus Toluol und Dichlormethan zur Reaktion gebracht.^[122] Auf dieser Stufe kann eine Trennung der entstehenden Anomere erfolgen, und man erhielt die reinen α -Anomere in Ausbeuten von 49 % bzw. 40 %.



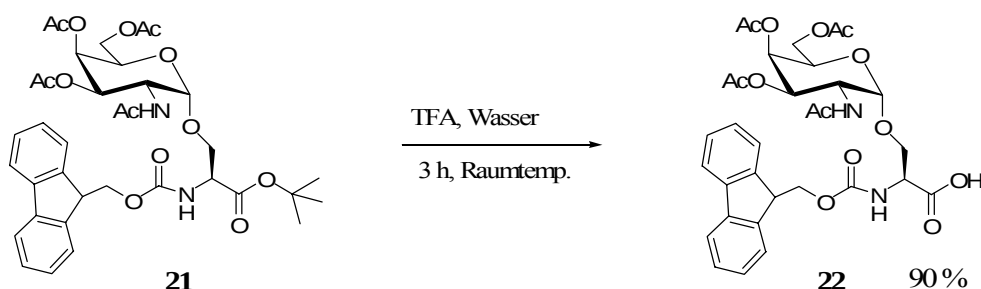
Schema 3.5: Glycosylierung der Glycosylakzeptoren Fmoc-Ser-OtBu **17** und Fmoc-Thr-OtBu **16** mit 2-Azidogalactosylbromid **10**.

Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte die Reduktion der Azidofunktion unter gleichzeitiger Acetylierung der neu gebildeten Aminofunktion. Hierzu wurde die Azid-Komponente **18** bzw. **19** mit durch Kupfer(II)sulfat aktiviertes Zinkpulver in einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) umgesetzt.^[123] Man erhielt die 2-Acetamidoglycosylamino acids **20** und **21** in 86%iger und 78%iger Ausbeute. Man kann die Ausbeute des komplett geschützten T_N-Bausteins **20** bzw. **21** um 15 % steigern, wenn man nach der Glycosylierung keine Anomerentrennung der Azidoglycosylamino acids **18** bzw. **19** vornimmt, sondern das Anomerengemisch in der Zink vermittelten Reduktion einsetzt. Auf der Stufe der Acetamidoglycosylamino acids ist nämlich eine Trennung der Anomere effektiver durchzuführen.



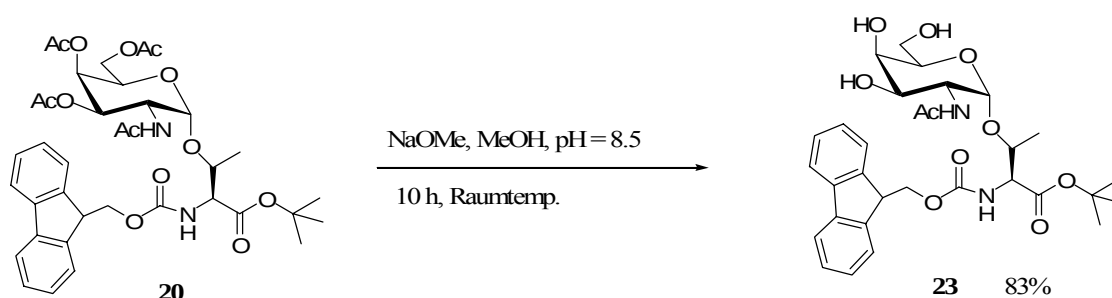
Schema 3.6: Reduktion und Acetylierung der 2-Azidofunktion.

Da das T_N-Serin-Derivat **21** als Baustein in der Festphasen-Glycopeptidsynthese eingesetzt werden sollte, wurde der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure unter Zusatz von 1 % Wasser abgespalten. Auf diese Weise konnte der T_N-Serin-Festphasenbaustein **22** nahezu quantitativ in Form eines farblosen, amorphen Feststoffes erhalten werden.



Schema 3.7: Synthese des T_N-Serin-Festphasenbausteins **22**.

Der T_N-Threonin-Baustein **20** sollte als Glycosylakzeptor in einer Sialylierungsreaktion zum Aufbau des ST_N-Antigens eingesetzt werden. Dazu wurden in einer Zemplén-Umesterungsreaktion^[124] die Acetylgruppen selektiv in Gegenwart der basenlabilen Fmoc-Gruppe abgespalten. Das Versetzen der methanolischen Reaktionslösung mit 1%iger methanolischer NaOMe-Lösung erfordert ein sorgfältiges Einstellen des pH-Wertes, der einen Wert von 8.5 nicht übersteigen sollte. Man erzielt eine Ausbeutesteigerung um bis zu 20 %, wenn man das Rohprodukt der Deacetylierung nach der Neutralisation mit 0.4 Äquivalenten Fmoc-OSu und *N,N'*-Diisopropylethylamin („Hünigs Base“, DIPEA) behandelt.



Schema 3.8: Zemplén-Umesterung am T_N-Threonin-Derivat **20**.

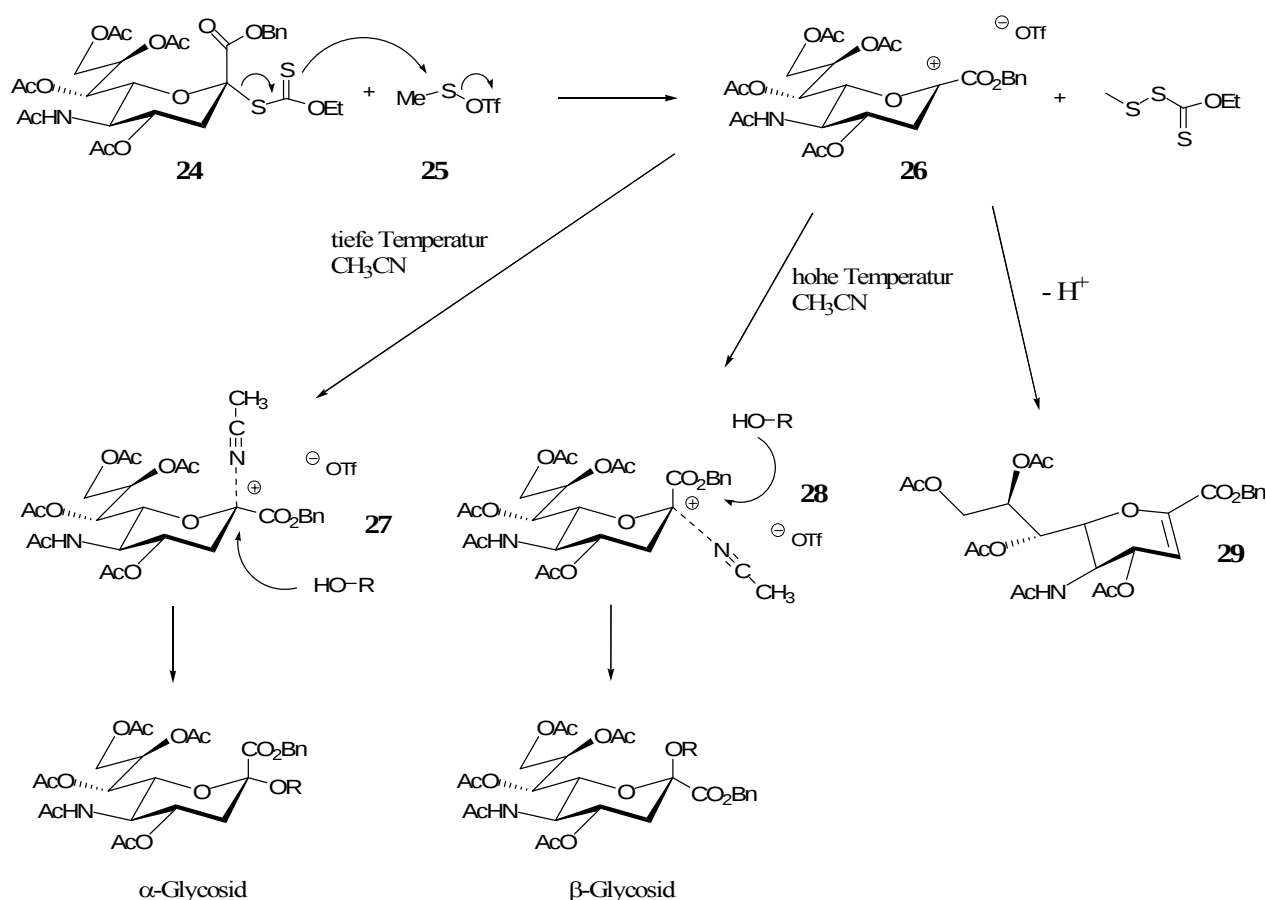
Generell ist anzumerken, dass die Ausbeuten bei den Umsetzungen der Threonin-Derivate im Vergleich zu den Serin-Derivaten höher sind und die Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren besser durchzuführen sind.

3.1.2 Die Synthese des (2-6)-Sialyl-*N*-acetylgalactosamin-Threonin-Bausteins (ST_N-Antigen)

Das (2-6)-Sialyl-*N*-acetylgalactosamin, sog. ST_N-Antigen, stellt im Hinblick auf die Entwicklung von Tumorstoffen eine besonders interessante tumorassoziierte Antigenstruktur dar. Die Sialylierung des in einem frühen Stadium der Glycoproteinbiosynthese vorliegenden T_N-Antigens (*N*-Acetylgalactosamin) katalysiert durch die α -2,6-Sialyltransferase führt zu dem tumorassoziierten Sialyl-T_N-Antigen, das vorwiegend auf Darm-, Magen-, Ovarial- und Mammakarzinoma zu finden ist.^[125-128] Mehr als 80% der Krebsarten in der Brust, der Prostata und den Eierstöcken exprimieren das ST_N-Antigen. Im Gegensatz dazu ist die Expression von ST_N-Antigen in normalem Gewebe stark reduziert und beschränkt sich auf nur wenige epitheliale Gewebe an sekretorischen Grenzlinien.^[129] Die Überexpression des ST_N-Antigens in verschiedenen Karzinoma korreliert mit einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose.^[130]

Analog der Biosynthese soll das (2-6)-Sialyl-*N*-acetylgalactosamin durch eine Kupplung des T_N-Antigens mit der Sialinsäure hergestellt werden. Durch eine regio- und stereoselektive Sialylierung an der primären 6-Hydroxyfunktion des T_N-Antigen-Bausteines **23** ist dieses ST_N-Disaccharid synthetisch zugänglich.^[107] Sialylierungen stellen aufgrund der strukturellen Besonderheiten der Neuraminsäure eine synthetische Herausforderung dar.

Das anomere Zentrum der Sialinsäure liegt als tertiäres Kohlenstoffatom vor, welches im Verlauf der Glycosylierungsreaktion ein Carbeniumion **26** ausbildet. Die Nachbarschaft von drei Substituenten macht daher das Reaktionszentrum für einen nucleophilen Angriff sterisch schwerer zugänglich. Durch die elektronischen Eigenschaften der Carbonsäureester-Funktion am anomeren Zentrum wird das Glycosylkation **26** destabilisiert, wodurch der Neuraminsäuredonor zu einer β -Eliminierung unter Ausbildung des Glycals **29** neigen. Aus diesem Grund setzt man die Neuraminsäuredonoren in einem Überschuss zum Glycosylakzeptor ein.



Schema 3.9: Reaktionsschema und stereochemische Kontrolle der Sialylierungsreaktion.

Ein weiteres Problem stellt die stereoselektive Bildung der glycosidischen Bindung dar. Das Fehlen eines nachbargruppenaktiven Substituenten am C3-Atom der Neuraminsäure verlangt nach Alternativen zur stereochemischen Kontrolle während der Sialylierung.

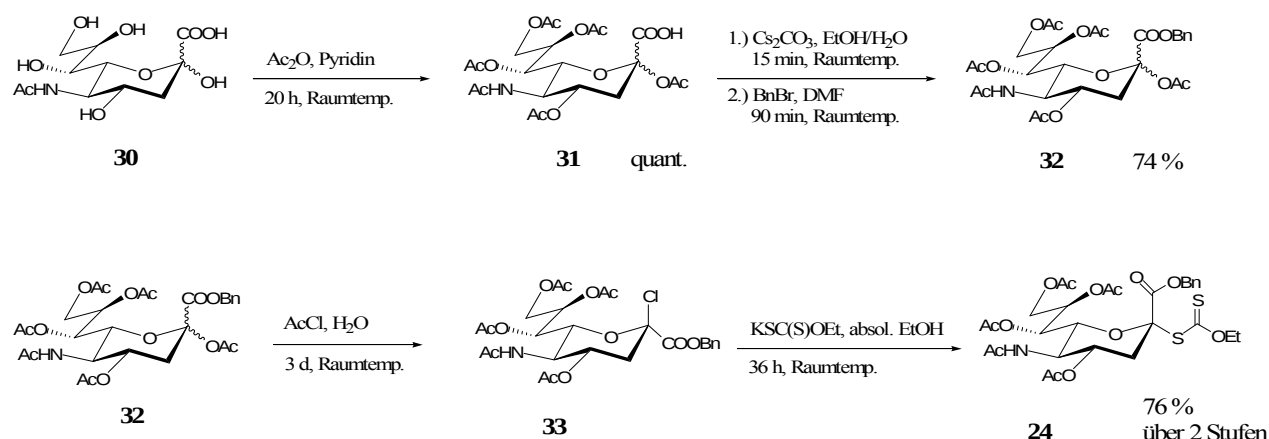
Die stereochemische Kontrolle von Sialylierungsreaktionen ist durch die geeignete Wahl des Lösemittels und der Temperatur möglich.^[131, 132] Bei der Verwendung von Acetonitril als Lösemittel wird die Nitrilgruppe an das intermediär gebildete Sialylkation koordiniert, wobei

sowohl ein axiales als auch ein äquatoriales Nitrilium-Konjugat gebildet werden, die beide miteinander im Gleichgewicht stehen (sog. Nitrileffekt).^[133-136] Bei tiefen Temperaturen entsteht in einer kinetisch kontrollierten Reaktion das axiale β -Nitrilium-Konjugat **27** und bei höheren Temperaturen das thermodynamisch stabilere, äquatoriale α -Nitrilium-Konjugat **28**. Der anschließende Angriff eines Nucleophils führt so je nach Reaktionsbedingungen zu sterisch einheitlichen Produkten oder zumindest zu einem deutlichen Überschuss eines Anomers.

Für die Sialylierung von Glycosylakzeptoren gibt es mehrere Neuraminsäuredonoren mit unterschiedlichen Austrittsgruppen.^[137] Häufig eingesetzt werden die als Phosphit-^[138, 139] oder als Xanthogenat-modifizierten Sialinsäure-Derivate. Ebenso finden 2-Halogeno-Derivate oder 2-Thio-Derivate unter Verwendung der entsprechenden Promotoren (z.B. ZnCl_2 oder Dimethyl(methylthio)sulfonium-trifluormethansulfonat (DMTST)) ihren Einsatz in Sialylierungsreaktionen.^[140]

In dieser Arbeit wurde das von A. Marra und P. Sinaÿ eingeführte Ethylxanthogenat (Ethoxydithiocarbonat) der *N*-Acetylneuraminsäure,^[141] als Donor für die Sialylierungsreaktion verwendet. Um einen für die Sialylierungsreaktion geeigneten Sialinsäurexanthogenat-Donor herzustellen, wurden zuerst die Hydroxylfunktionen der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure **30** mit einer Mischung aus Acetanhydrid und Pyridin (2:1) quantitativ peracetyliert.

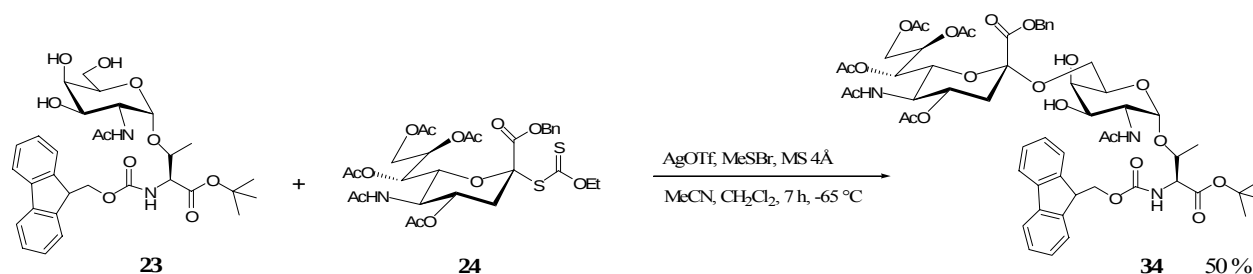
Als Schutzgruppe für die Säurefunktion in C1-Position der Sialinsäure dient der Benzylester, der im Gegensatz zum oft eingesetzten Methylester unter milden, neutralen Bedingungen hydrogenolytisch spaltbar ist.^[142, 143] Hierfür wurde das bei der Acetylierung entstehende Anomerengemisch **31** als Rohprodukt durch Umsetzung mit Cäsiumcarbonat in einem Ethanol/Wasser-Gemisch in das entsprechende Cäsiumcarboxylat überführt. Dieses reagierte in der nachfolgenden nucleophilen Substitution mit Benzylbromid im Lösemittel *N,N'*-Dimethylformamid in 74%iger Ausbeute zu dem vollständig blockierten Sialinsäure-Derivat **32**. Der Benzylester **32** wurde drei Tage mit Acetylchlorid, dem einige Tropfen konz. HCl-Lösung zugesetzt wurden, behandelt. Aufgrund des anomeren Effektes bildet sich das β -Sialinsäurechlorid **33**, das ohne weitere Reinigungsschritte mit Kaliummethylxanthogenat in absolutem Ethanol umgesetzt wurde. In einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion erhielt man das gewünschte α -Sialinsäurexanthogenat **24** in 76 % Ausbeute über zwei Stufen. Als Nebenprodukt entstand in geringer Menge das Sialinsäureglycal **29**, welches nur schwer säulenchromatographisch abgetrennt werden kann, jedoch in der folgenden Sialylierungsreaktion nicht stört.



Schema 3.10: Syntheseweg zur Herstellung des Sialinsäurexanthogenats **24**.

Für die Synthese des Sialyl- T_N -Antigens **34** wurde das Xanthogenat **24** mittels Methylsulfonyltriflat (MeSOTf) **25** aktiviert. Die Eliminierung der Xanthogenat-Gruppe erzeugt das zur Glycosylierung fähige Kation **26**. Dieses stark thiophile Reagenz MeSOTf lässt sich *in situ* aus Silbertriflat und Methylsulfonylbromid erzeugen. Methylsulfonylbromid ist durch die Umsetzung äquimolarer Mengen von Brom und Dimethyldisulfid in absolutem 1,2-Dichlorethan erhältlich.

Die Sialylierung erfolgte unter Verwendung eines 2.5-fachen Überschusses des Neuraminsäuredonors **24**.^[142] Bei einer Temperatur von $-65\text{ }^\circ\text{C}$ in einer Mischung aus absolutem Acetonitril und Dichlormethan (2:1) wurde der Reaktionsmischung aus Donor und Akzeptor zunächst Silbertriflat zugegeben und dann eine 1.6 M Methylsulfonylbromid-Lösung in absolutem 1,2-Dichlorethan unter Verwendung einer Spritzenpumpe zugetropft.



Schema 3.11: Sialylierung des Galactosamin-Threonin-Derivates **23**.

Aufgrund der größeren Reaktivität und der geringeren sterischen Hinderung der primären 6-Hydroxyfunktion des Galactosamin-Derivates **23** verläuft die Reaktion vollständig regioselektiv. Das gewünschte α -Glycosid **34** wurde in einer Ausbeute von 50 % isoliert, und das Sialinsäureglycal **28** konnte durch eine Chromatographie entfernt werden.

Die Bestimmung der anomeren Konfiguration an der C-2 Position der Neuraminsäure erfolgte mittels 2-dimensionaler NMR-Spektroskopie, da die übliche Bestimmung durch Messung der ^3J -Kopplungskonstante zwischen H-1 und H-2 bzw. der ^1J -Kopplungskonstante zwischen C-1 und H-1 wegen des Vorliegens eines quartären Kohlenstoffatoms am anomeren Zentrum der Neuraminsäure nicht durchführbar ist.

In der Literatur findet man empirische Regeln für die Zuordnung der anomeren Konfiguration in peracetylierten Neuraminsäureglycosiden, die auf dem Unterschied in den chemischen Verschiebungen δ und der Differenz der Kopplungskonstanten J beruhen.^[144-147]

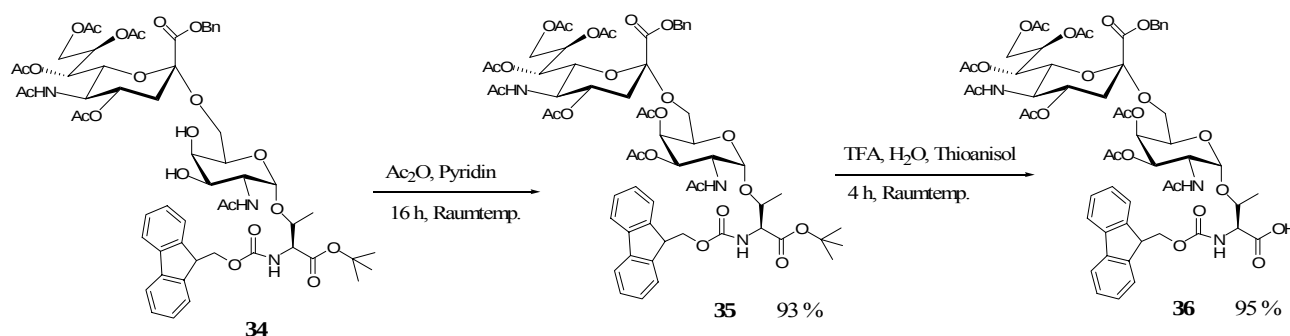
- 1) $\delta\text{H-3}_{\text{ax}} (\alpha\text{-Anomer}) > \delta\text{H-3}_{\text{ax}} (\beta\text{-Anomer})$
- 2) $\delta\text{H-4} (\alpha\text{-Anomer}) < \delta\text{H-4} (\beta\text{-Anomer})$
- 3) $\delta\text{H-9a} - \delta\text{H-9b} (\alpha\text{-Anomer}) < \delta\text{H-9a} - \delta\text{H-9b} (\beta\text{-Anomer})$
- 4) $^3\text{JH-7,H-8} (\alpha\text{-Anomer}) > ^3\text{JH-7,H-8} (\beta\text{-Anomer})$

Diese empirischen Regeln sind aber nicht auf alle Verbindungen übertragbar.

Mit Hilfe eines HMBC-Experimentes kann die anomere Konfiguration durch das Vorhandensein einer Kopplung der Protonen an C-3 der Neuraminsäure zum Kohlenstoffatom an C-1 eindeutig bestimmt werden. Aufgrund des Winkels von 180° zwischen dem axialen Proton an C-3 und dem Carboxylkohlenstoff C-1 im α -Anomer liegt gemäß der Karplusbeziehung eine starke Kopplung zwischen den beiden vor, so dass ein Kreuzpeak im HMBC-Spektrum vorhanden ist. Im Fall des β -Anomers besteht zwischen dem axialen H-3 und dem C-1-Kohlenstoffatom eine axial-äquatoriale Wechselwirkung, die nach der Karplusbeziehung nur eine schwache Kopplung hervorruft, die man im HMBC-Spektrum nicht erkennt. Das äquatoriale Proton an C-3 koppelt sowohl im α - als auch im β -Anomer sehr schwach mit C-3, sodass ein Kreuzpeak im HMBC-Spektrum nicht in Erscheinung tritt.

Um einen für die Peptid-Festphasensynthese geeigneten Glycosylaminosäurebaustein zu erhalten, wurden in einem nächsten Reaktionsschritt die freien Hydroxylgruppen des Bausteines **34** mit einer Acetanhydrid/Pyridin-Mischung acetyliert. Der entstandene, vollständig blockierte Aminosäurebaustein **35** neigt bei der Abspaltung der *tert*-Butylester-Schutzgruppe weniger zu Nebenreaktionen als der nicht acetylierte ST_N -Baustein **34**. Die C-terminale *tert*-Butylester-Gruppe wird in einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Anisol und

Wasser acidolytisch abgespalten. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung konnte der Sialyl-T_N-Festphasenbaustein in einer Ausbeute von 95 % erhalten werden.



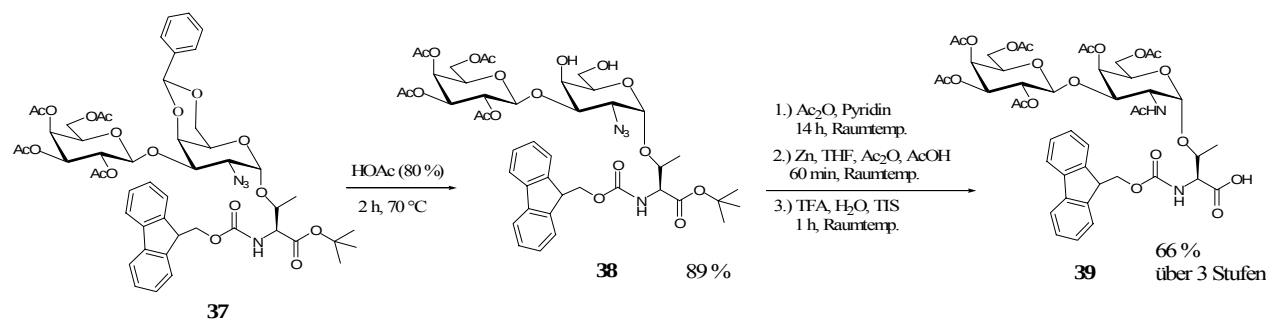
Schema 3.12: Acetylierung des Sialyl-T_N-Threonin-Bausteines **34** und Abspaltung der *tert*-Butylester-Schutzgruppe.

3.1.3 Die Synthese des (1-3)-Galactosyl-*N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Bausteins (T-Antigen)

Das als T-Antigen (Thomsen-Friedenreich-Antigen) bezeichnete Strukturelement wurde 1984 als erstes Krebsantigen beschrieben und liegt tumorspezifisch in Brustgeweben vor.^[148, 149] Durch das veränderte Enzymmuster in Krebszellen kommt es zu einer Anhäufung dieser Vorläufer-Struktur Core 1 (Galβ1-3GalNAc). Charakteristisch ist, dass dieses Disaccharid besonders in fortgeschrittenen Tumoren auftritt und die erhöhte Expression wurde in Speiseröhren-, Brust- und Lungenkarzinoma beschrieben.^[148, 150-152]

Die Verbindung **37** ist durch eine Glycosylierung nach R. R. Schmidt^[153] zugänglich, bei der der als 4,6-Benzylidenacetal-geschützte *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-azido-2-desoxy-*D*-galacto-pyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester als Glycosylakzeptor mit einem tetraacetylierten Galactosetrichloracetimidat-Glycosyldonor^[154] reagiert. In dem T-Antigen-Vorläufermolekül **37** wurde dann die Benzyliden-Schutzgruppe acidolytisch durch Einwirkung von 80%iger Essigsäure gespalten, was in 89%iger Ausbeute gelang. Die Hydroxylgruppen wurden durch Umsetzung mit Acetanhydrid und Pyridin (1:2) acetyliert und die Azidofunktion mit aktiviertem Zinkstaub und einem Gemisch aus Essigsäure und Acetanhydrid in THF reduziert und die sich bildende Aminofunktion auf diese Weise zugleich acetyliert. Die Umsetzungen verliefen nahezu quantitativ und beiden Reaktionen folgten zur Aufarbeitung lediglich nur Extraktionsschritte. Als letzter Schritt wurde der *tert*-Butylester mit

Trifluoressigsäure und Thioanisol als Abfangreagenz gespalten und man erhielt nach einer Reinigung durch Flash-Chromatographie den T-Antigen-Festphasenbaustein **39** in einer Ausbeute von 66 % über drei Stufen.



Schema 3.13: Synthese des T-Antigen-Festphasenbausteines **39**.

3.2 Die Konjugation von Glycopeptiden mit einem Trägerprotein

3.2.1 Immunologische Aspekte^[155-158]

Das Immunsystem kann durch zwei verschiedene, jedoch miteinander kommunizierende Komponenten auf Antigene (Immunogene) reagieren: Die zelluläre Immunantwort vermittelt durch T-Lymphocyten und die humorale Immunantwort durch sezernierte Antikörper, die von B-Lymphocyten produziert werden. Die B-Lymphocyten erkennen Antigene durch Zelloberflächen-Immunglobuline, die an diskrete Epitope auf dem Antigen-Molekül binden, wobei jede B-Zelle nur ein spezielles Immunglobulin auf der Oberfläche exprimiert, was nur ein bestimmtes Antigen-Epitop erkennen kann (monoklonal). Die Bindung der antigenen Determinante der B-Zelle führt zu einer Internalisierung der als nicht eigen erkannten Substanz durch Rezeptor-vermittelte Endocytose und zu einer sich daran anschließenden Prozessierung. Bei der Proteolyse des phagozytierten Antigens entstehen kurze Proteinfragmente, die an MHC-II-Moleküle gebunden werden und auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert werden. Zirkulierende, antigenspezifische T-Helferzellen binden an diese B-Zelle, wenn sie einen Rezeptor tragen, der spezifisch den Komplex aus dem abgebauten Protein (antigene Determinante der T-Zelle) und MHC-II erkennt. Diese Kooperation ist notwendig, denn nur durch die Bindung des Antigens an die B-Zelle alleine ist dieselbe nicht in der Lage, sich zu vermehren und Antikörper zu produzieren. Zum einen ist die Bindung der B-Zelle an die T-Zelle eine notwendige Voraussetzung zur Antikörperproduktion zum anderen ist die Bindung aber auch nötig, um die Produktion weiterer kostimulatorischer Signale auszulösen. Dazu gehören die Produktion und Sekretion von Cytokinen wie IL-6 (B-Zell-Differenzierung), IL-2 (Proliferationsinduktion) oder IL-4 (initiale Aktivierung der B-Zellproliferation). Ebenfalls spielen die Tumornekrosefaktoren α und β bei der B-Zell-Stimulation eine Rolle. Des weiteren sind andere Interaktionen von Liganden und Rezeptoren auf der B- bzw. T-Zelle, wie z.B. CD40 und CD40L, CD2 und LFA3 oder B7-Ligand und CD28 für die Aktivierung der B-Zelle von entscheidender Bedeutung. Da die angeführten Wechselwirkungen in einem engen räumlichen Kontext zwischen B- und T-Zelle erfolgen, spricht man auch von einer immunologischen Synapse.^[159, 160]

Das Zusammenspiel aller kostimulatorischen Signale während der Kooperation zwischen B- und T-Zelle bewirkt die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle, die dann große Mengen an spezifischen Antikörpern gegen das Antigen-Epitop sezerniert.

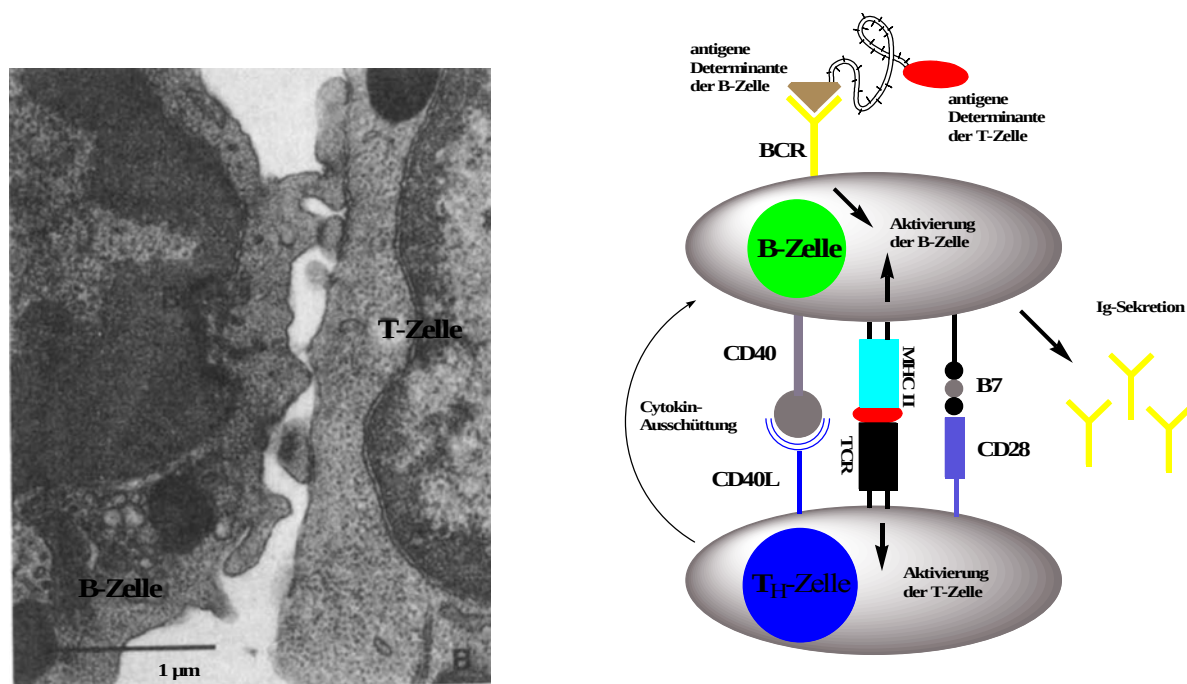


Abb. 3.1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer beginnenden T-B-Zell-Kooperation^[161] und schematische Darstellung der T-Zell abhängigen Aktivierung der B-Zelle.

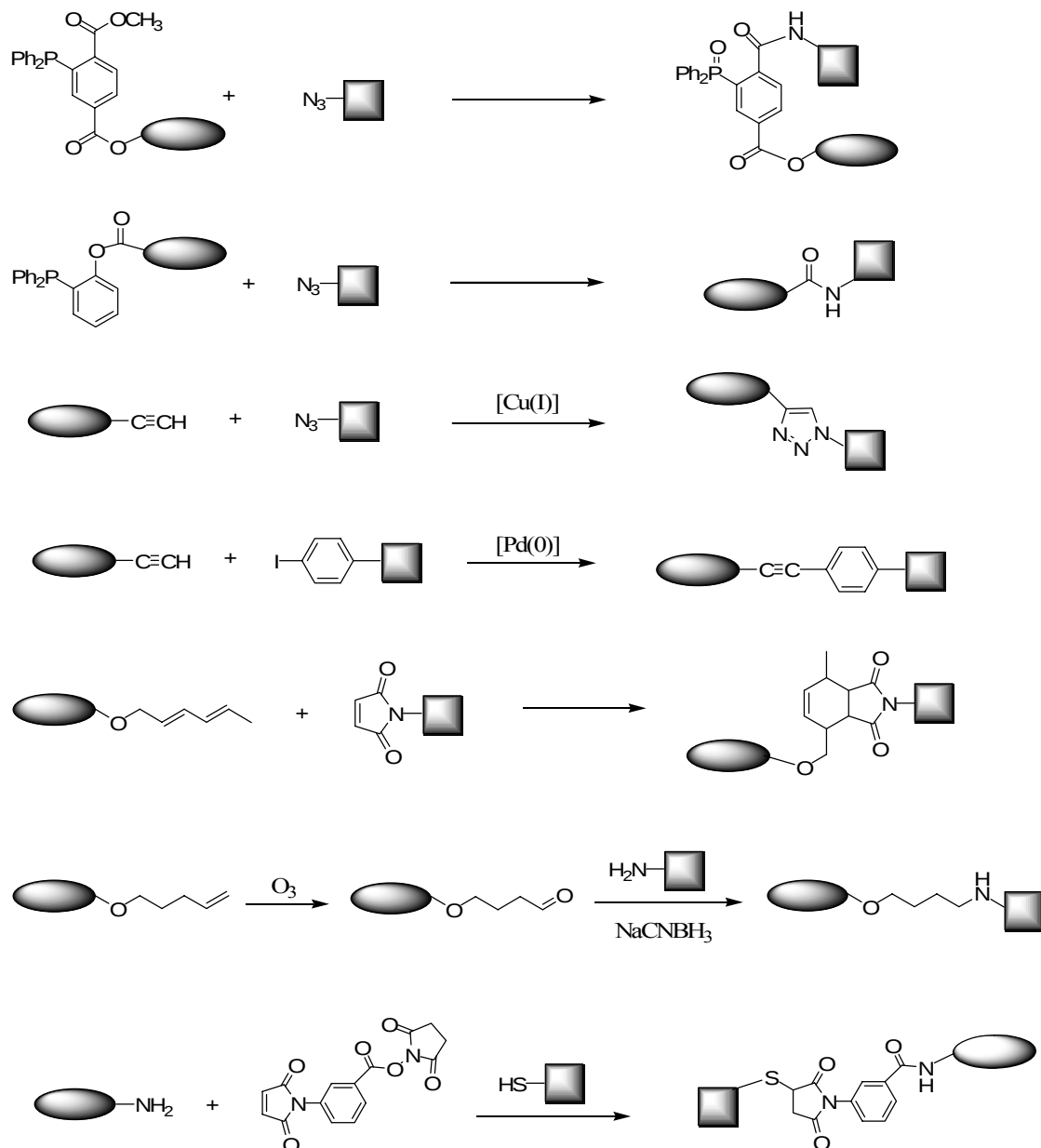
3.2.2 Konjugationsmethoden zur Erzeugung von Antigen-Protein-Konjugaten

Kleine Moleküle wie kurze Peptide, Pharmaka oder Saccharide mit einem Molekulargewicht von kleiner als 2-5 kDa binden zwar an Antikörper, aber sind im Allgemeinen nicht immunogen. Man bezeichnet sie deshalb auch als Haptene (vom Griechischen haptein = anheften), also als Halbantigene oder unvollständige Antigene. Um gegen sie eine Immunantwort zu erzeugen, ist es notwendig diese Haptene an geeignete Trägermoleküle (sog. Carrier) anzuheften.^[162-164] Als Carrier kommen z.B. Proteine wie Rinderserumalbumin (BSA), Ovalbumin oder Hämocyanin der Schlüssellock-Napfschnecke (KLH), ein Polymer^[165] oder ein synthetisches Protein (z.B. Poly-L-Lysin oder verzweigte Lysin-Gerüste, sog. MAP's (multiple antigenic peptide))^[166, 167] zum Einsatz.^[168]

Die Technik der Biokonjugation spielt in den Lebenswissenschaften eine bedeutende Rolle. Die Methoden zur Konjugation von kleineren Molekülen aber auch Oligosacchariden oder Polypeptiden an komplexe Biomakromoleküle finden in der Immobilisierung von Antikörpern oder Enzymen,^[169] in der Antikörper-Antikörper-Konjugation,^[170] in den Untersuchungen und der Inhibierung von Enzymen,^[171] in der Synthese von Neoglycoproteinen,^[172, 173] als Liganden in der Affinitätschromatographie^[174] sowie in der Bioanalytik und dort besonders im Kontext der Proteomanalyse (Proteomics)^[175-179] ihre Anwendung. Die Herstellung von Hapten-Proteinkonjugaten ist ebenfalls ein wichtiger Bereich in dem die Biokonjugation vornehmlich zum Einsatz gelangt. Es gibt eine Vielzahl verschiedenartiger Strategien zur Biokonjugation von Haptenen mit Proteinen.^[180] Hierbei stellen homo- oder heterobifunktionelle Reagenzien die kovalente Bindung zwischen Hapten und Protein her.

Zum Einsatz gelangen dabei die etablierten Vorgehensweisen zur Bildung von Amidn aus Carbonsäure am Hapten (z.B. Saccharid oder Glycopeptid) und freier Aminogruppe am Trägerprotein mittels Carbodiimiden (z.B. wasserlösliches *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (EDAC))^[181] oder den daraus herstellbaren *N*-Hydroxysuccinimidestern sowie die Erzeugung von Aziden aus Estern über die Hydrazide. Auch Glutaraldehyd, Isocyanate bzw. Thioisocyanate (z.B. 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure Dinatriumsalz (DIDS))^[182], Diimidoester (z.B. Dimethyl-3,3'-dithio-bis(propionimidat)dihydrochlorid (DTBP))^[183] werden zur Konjugation eingesetzt. Die homobifunktionellen Linker sind bezüglich der Kupplungsausbeute äußerst effektiv, jedoch ist die Selektivität der Kupplungsreaktion eher gering, wenn im Hapten mehrere identische funktionelle Gruppen vorhanden sind. Dieses Problem versucht man mit heterobifunktionellen Linker-Reagenzien zu umgehen. Als besonders häufig eingesetzte Reagenzien sind hier zu nennen die Amino-Sulfhydryl-reaktiven Kreuzkupplungsreagenzien *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP)^[184] oder *m*-Maleinimidobenzoesäure-*N*-hydroxysuccinimidester (MBS)^[185], die Amino-Photo-reaktiven Kreuzkupplungsreagenzien, wie z.B. 6-(4-Azido-2-nitrophenylamino)hexansäure-*N*-hydroxy-succinimidester,^[186] und die Carbonyl-Sulfhydryl-reaktiven Kreuzkupplungsreagenzien, wie z.B. 4-(4-*N*-Maleinimidophenyl)butansäure-hydrazid (MPBH).^[187]

Die am häufigsten verwendete, weitestgehend selektive Konjugationstechnik ist hierbei die Addition einer Thiol-Funktion an die von Keller und Rudinger^[188] eingeführte Maleinimid-Gruppierung, die einen sehr reaktiven Thiol-Akzeptor darstellt.



Schema 3.14: Chemoselektive Ligationsreaktionen zur Modifikation und Konjugation von Biopolymeren.

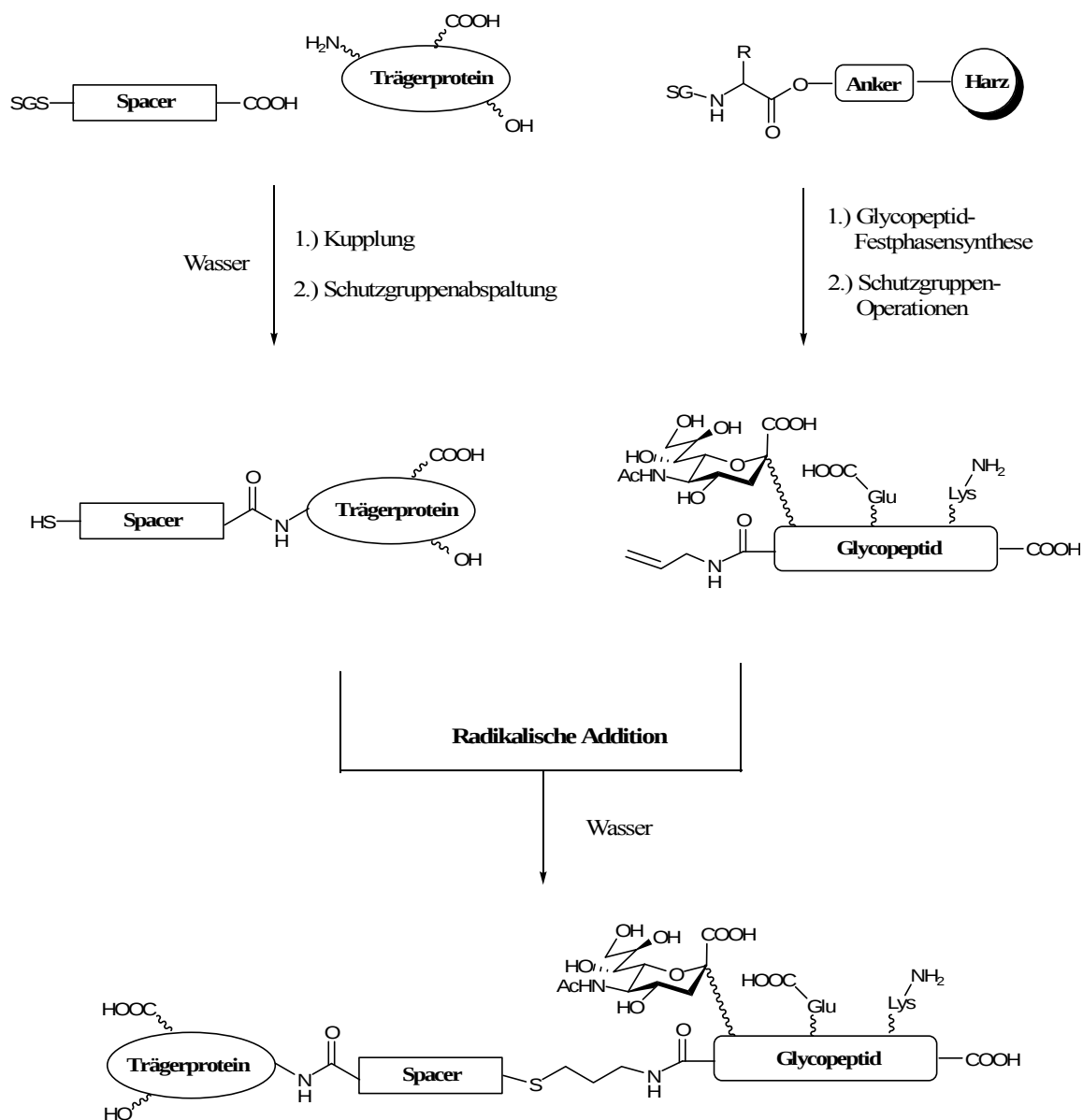
Eine andere Möglichkeit das Problem der geringen Selektivität der Kupplungsreagenzien zu lösen, wurde von L. F. Tietze *et al.* beschrieben. Hierbei wird stufenweise die unterschiedliche Aminolyse-Reaktivität des Quadratsäurediethylesters (3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion) zur Anbindung von pharmakologisch aktiven Molekülen an Biopolymere ausgenutzt.^[189]

Für die Konjugation von Oligosacchariden hat sich die reduktive Aminierung eines Aldehyds, der *in situ* durch Ozonolyse aus einem Allyl- oder Pentenylglycosid freigesetzt wird zur Biokonjugation bewährt.^[190]

Als chemoselektive Ligationsreaktionen, die nicht auf der Reaktion eines Elektrophils mit einem Nucleophil beruhen sind die [2+3]-dipolare Cycloaddition von Aziden mit Alkinen nach einem „Click-Chemistry“-Protokoll unter Kupfersalzkatalyse^[191-193] und die Sonogashira-Reaktion von Alkinen mit Iodarylen als Möglichkeiten für eine Biokonjugation zu nennen.^[194] Weitere Konjugationsstrategien beinhalten die Ligation über eine modifizierte Staudinger-Reaktion eines Phosphins (traceless und nontraceless Variante) mit einer Azid-Komponente^[195-197] sowie die Diels-Alder-Reaktion zwischen als 2,4-Hexadien-1-ol modifizierten Sacchariden mit einem durch Maleinimid funktionalisierten Protein.^[198]

An die Konjugationsstrategie bezüglich der Bildung von Glycopeptid(Hapten)-Protein-Konjugaten werden mehrere Anforderungen gestellt. Die Ligation sollte chemoselektiv sein, so dass das Hapten in einer strukturell einheitlichen Form präsentiert wird. Dies stellt eine Herausforderung da, denn Glycopeptide und Protein tragen viele, reaktive funktionelle Gruppen (-COOH, -NH₂, -OH) die in beiden Kupplungspartnern gleichermaßen adressierbar sind. Die Transformation sollte effizient durchführbar sein und der sich ausbildende bzw. eingesetzte Linker sollte unter physiologischen Bedingungen stabil sein. Darüber hinaus sollte die gebildete Linkerstruktur selber nicht immunogen sein und nur geringen Effekt auf die Konformation der Antigenstruktur ausüben. Im Falle eines auf der Maleinimidstruktur beruhenden Linkers wurde eine Hydrolyse ab pH-Werten von 7.5 beobachtet. Ebenfalls wurde eine starke Antikörperbildung gegen diese Linkerstruktur hervorgerufen, die sogar die Immunantwort gegen das Hapten vollständig bzw. stark unterdrückte.^[199] Diese Gefahr besteht auch bei der Verwendung von aromatischen Linkersystemen und solch artifiziellen Strukturen wie Tetrazol- oder Quadratsäure-Derivaten. Die chemische Ligation sollte außerdem in einem wässrigen Medium durchführbar sein, da die meisten Proteine nur in Wasser oder Pufferlösungen gut löslich sind bzw. nicht denaturiert werden. Der Linker muss, wenn er während der Festphasensynthese in das Glycopeptid eingebaut wird, die Peptidkupplungsbedingungen ebenso tolerieren wie die sich anschließenden Schutzgruppenoperationen.

Wie in dem Schema 3.15 skizziert ist, sollte in dieser Arbeit die Anbindung der tumorassoziierten Glycopeptide, die als Allylamine modifiziert werden, über die radikalische Addition an ein mit Thiolgruppen belegtes Trägerprotein erfolgen.



Schema 3.15: Reaktionsweg zur Herstellung von Glycopeptid-Protein-Konjugaten.

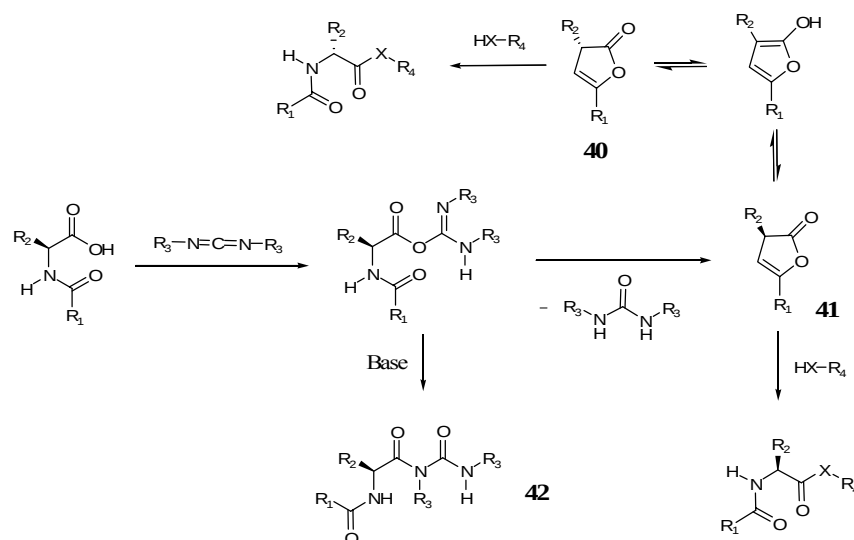
Im Jahre 1905 beschrieb T. Posner^[200] die „Anti-Markownikoff“-Addition von Thiolen an ungesättigte Verbindungen.^[201, 202] Diese Reaktion ist eine typische Kettenreaktion und wird durch den Zusatz von Radikalstartern^[203] (z.B. Diazoverbindungen) oder durch die Bestrahlung mit energiereicher Strahlung ausgelöst. Dabei entstehen zunächst Alkyl- oder Arylthio-Radikale, die sich dann in einem zumeist reversiblen Schritt an das ungesättigte System unter

Bildung eines C-Radikals anlagern. Dieses Radikal reagiert mit einem Thiol zum Endprodukt und zu einem neuen Thio-Radikal und pflanzt so die Kette fort. Die Reaktion ist in Wasser und bei einem neutralen pH-Wert, der die glycosidische Bindung nicht beeinträchtigt, durchführbar. Des weiteren dürfte der entstehende Thioether aus immunologischer Sicht ein unbedenkliches Strukturelement sein.

3.2.3 Die Synthese von Allylamidoaminosäuren und die Untersuchung der radikalischen Thiol-Addition

Um zu überprüfen, ob an den natürlich vorkommenden Aminosäuren Nebenreaktionen auftreten können, wurden diverse Allylamidoaminosäuren synthetisiert und diese in einer radikalischen Thiol-Addition mit Cystein-Derivaten umgesetzt.

Bei der Synthese der Modellverbindungen und dem dafür nötigen Aufbau der Allylamidbindung wurden vorzugsweise Aminosäure-Derivate verwendet, die als Aminoschutzgruppe eine Urethan-Funktion trugen. Diese Alkoxycarbonyl-Gruppen zeigen im Falle von C-terminal aktivierten Aminosäuren eine geringere Tendenz zur Bildung von 5-(4*H*)-Oxazolidinonen **40** als die *N*-Acyl-Schutzgruppen.



Schema 3.16: Nebenreaktionen bei der Aminosäure-Aktivierung durch Carbodiimide.

Diese intermolekulare Nebenreaktion der Oxazolidinon-Bildung führt wie in Schema 3.16 gezeigt zu einer Racemisierung der Aminosäure, wenn die Verbindung **41** im Anschluss hydrolysiert wird oder in einer Aminolyse die Amidbindung geknüpft wird.

Als Kupplungsreagenzien^[204] wurden, ebenfalls zur Reduzierung der Racemisierung und der geringeren Bildung von Nebenprodukten, bevorzugt Reagenzien des Uronium-Typs, z.B. *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium-tetrafluorborat (TBTU)^[205] unter Verwendung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[206] als Additiv eingesetzt. Der Mechanismus der Kupplungsreaktion dieser Verbindungen ist in Schema 3.31 näher erläutert. In Abb. 3.2 sind einige der gebräuchlichsten Kupplungsreagenzien zum Aufbau der Amidbindung gezeigt.

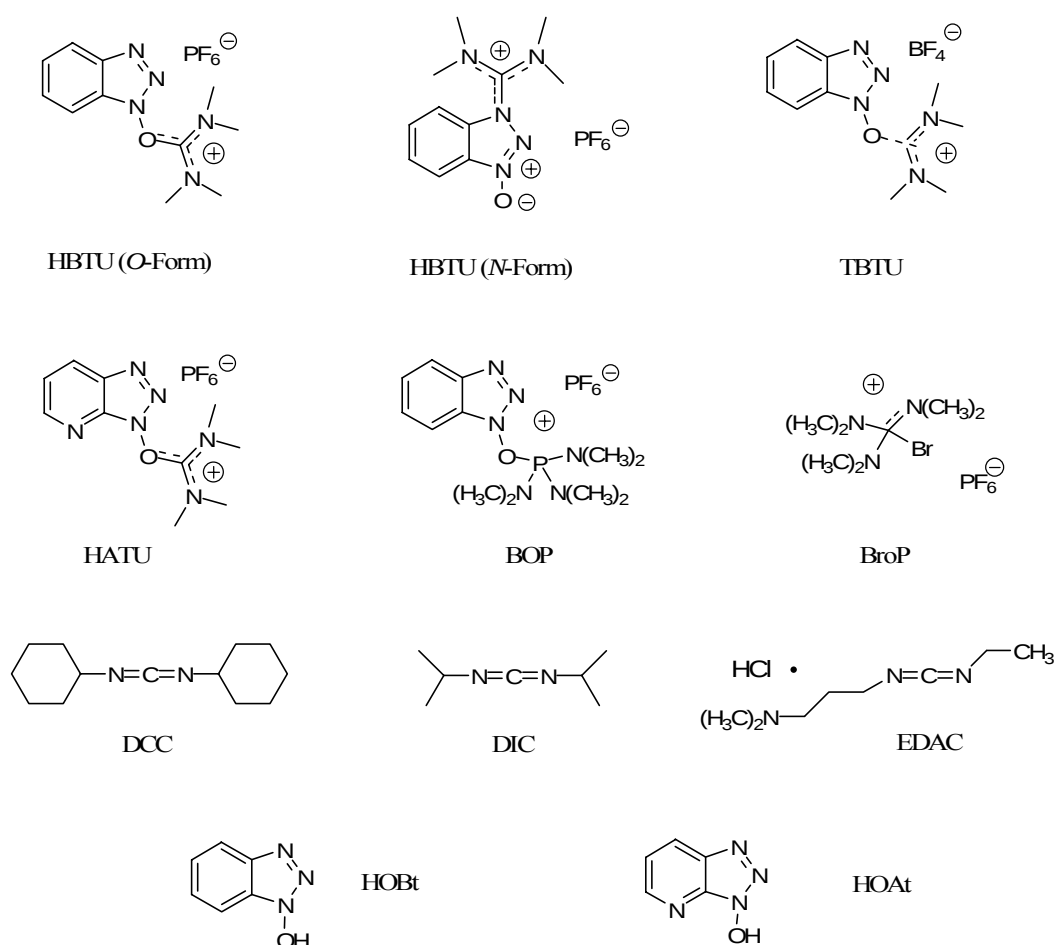
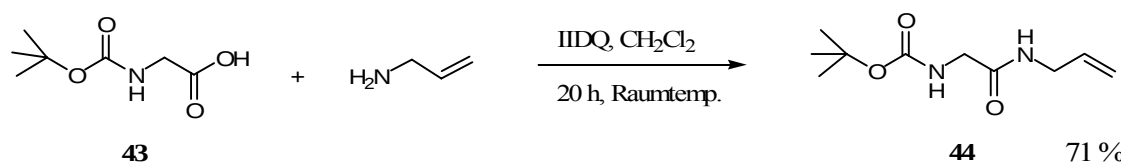


Abb. 3.2: Gebräuchliche Kupplungsreagenzien zum Aufbau der Amidbindung.

Verwendet man Carbodiimide (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder Diisopropylcarbodiimid (DIC)) und insbesondere ohne den Zusatz von Additiven, so können unerwünschte Nebenreaktionen wie die basenkatalytische Acyl-Wanderung vom Isoharnstoff-O-Atom zum Isoharnstoff-N-Atom auftreten (s. Schema 3.16).

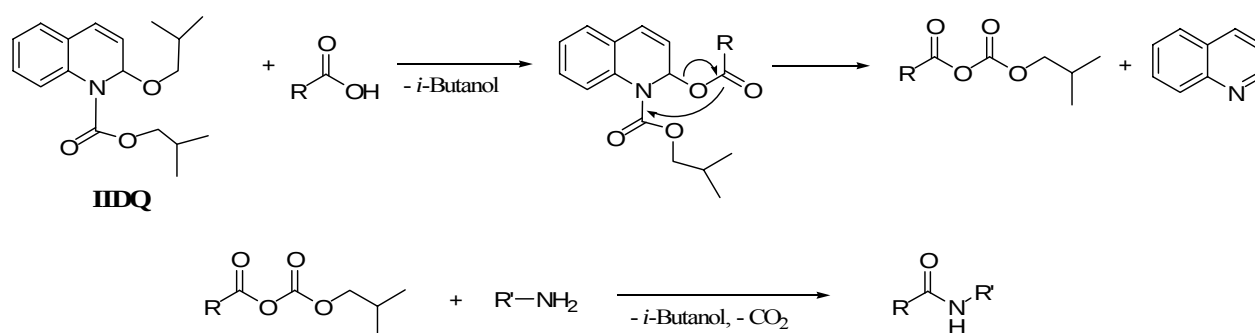
Der so entstehende *N*-Acyl-Harnstoff **42** kann nicht mehr in einer Aminolyse zur Reaktion gebracht werden. Ebenfalls tritt verstärkt eine Oxazolidinon-Bildung mit resultierender Racemisierung auf.

Zuerst wurde Glycin, die einfachste proteinogene Aminosäure, untersucht. Die α -CH₂-Gruppe der Aminosäure Glycin kann in Radikalreaktionen über ein Glycylradikal-Intermediat reagieren.^[207] So ist α -Bromoglycin mit NBS in einer Radikalreaktion herstellbar^[208] und die Photocyclisierung am α -C-Atom des Glycins in Keto-Dipeptiden ist möglich.^[209] Zur Untersuchung ob diese Position unter den für die Biokonjugation gewählten Bedingungen der radikalischen Thiol-Addition angegriffen wird, wurden das *N*-Boc-Glycin-Derivat **44** und das *N*-Acetylglycinallylamid **47** hergestellt. Dazu setzte man *N*-tert-Butyloxycarbonyl-(Boc)-geschütztes^[210] Glycin mit Allylamin unter Verwendung von 1-Isobutyloxycarbonyl-2-isobutyloxy-1,2-dihydrochinolin (IIDQ)^[211] als Kupplungsreagenz in Dichlormethan als Lösemittel um.



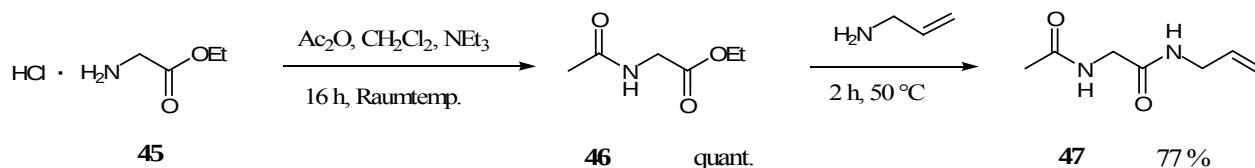
Schema 3.17: Synthese von *N*-Boc-Glycinallylamid **44**.

Der Mechanismus der IIDQ vermittelten Amidbindungsbildung ist in Schema 3.18 dargestellt. Nach dem Entfernen des Chinolins durch Extraktion mit Kaliumhydrogensulfat-Lösung erfolgte die Reinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie und man erhielt Verbindung **44** in 71%iger Ausbeute.



Schema 3.18: Kupplungsreaktion mit IIDQ.

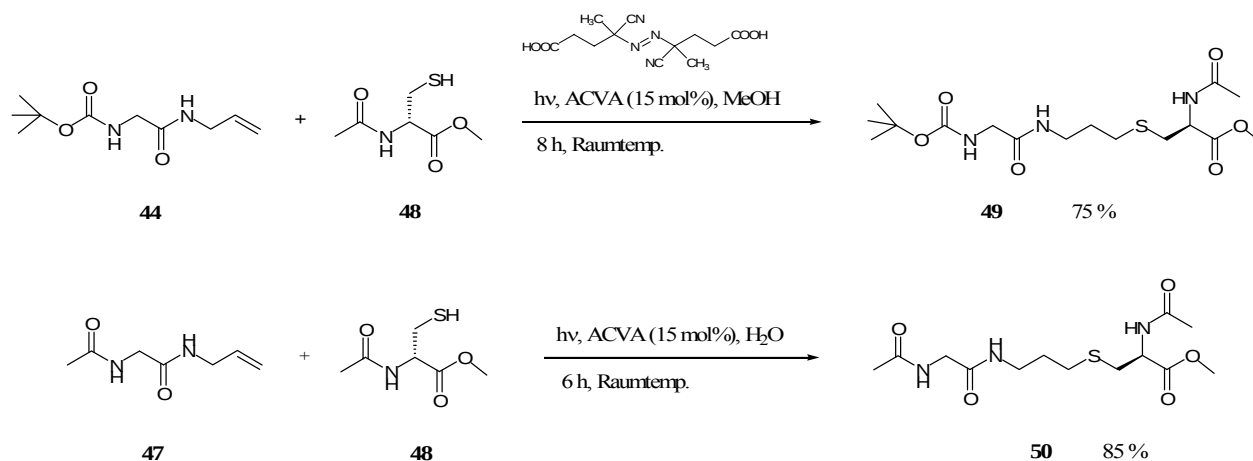
Zur Synthese des *N*-Acetylglycinallylamids **47** wurde die Aminofunktion des Glycinethylesterhydrochlorids **45** mit Acetanhydrid acetyliert und die Esterfunktion einer Aminolyse mit Allylamin unterzogen. Man erhielt Verbindung **47** in 77%iger Ausbeute. Eine Reaktion zwischen *N*-Acetylglycin und Allylamin konnte nicht erreicht werden, denn sowohl die Aktivestermethode, die Carbodiimid-Methode als auch die Kupplung mit IIDQ führten nicht zu dem gewünschten Produkt **47**.



Schema 3.19: Synthese des *N*-Acetylglycinallylamids **47**.

Beide Glycin-Derivate wurden dann der radikalischen Additionsreaktion mit *N*-Acetylcysteinmethylester unterworfen (s. Schema 3.20). Alle durch UV-Licht induzierten Radikalreaktionen wurden in einem Quarzreagenzglas unter Sauerstoffausschluss in entgastem Lösemittel durchgeführt. Unter dem Zusatz des wasserlöslichen Radikalstarters 4,4'-Azobis-(4-cyan-valeriansäure) (ACVA, V-501)^[203, 212] bestrahlte man die wässrige Reaktionslösung extern mit einer Quecksilberniederdrucklampe (Wellenlänge $\lambda = 254$ nm, Leistung: 77 W) zwischen vier und neun Stunden lang. Die entsprechenden Additionsprodukte **49** und **50** konnten in Ausbeuten von 75 % und 85 % nach einer Reinigung mittels Flash-Chromatographie erhalten werden.

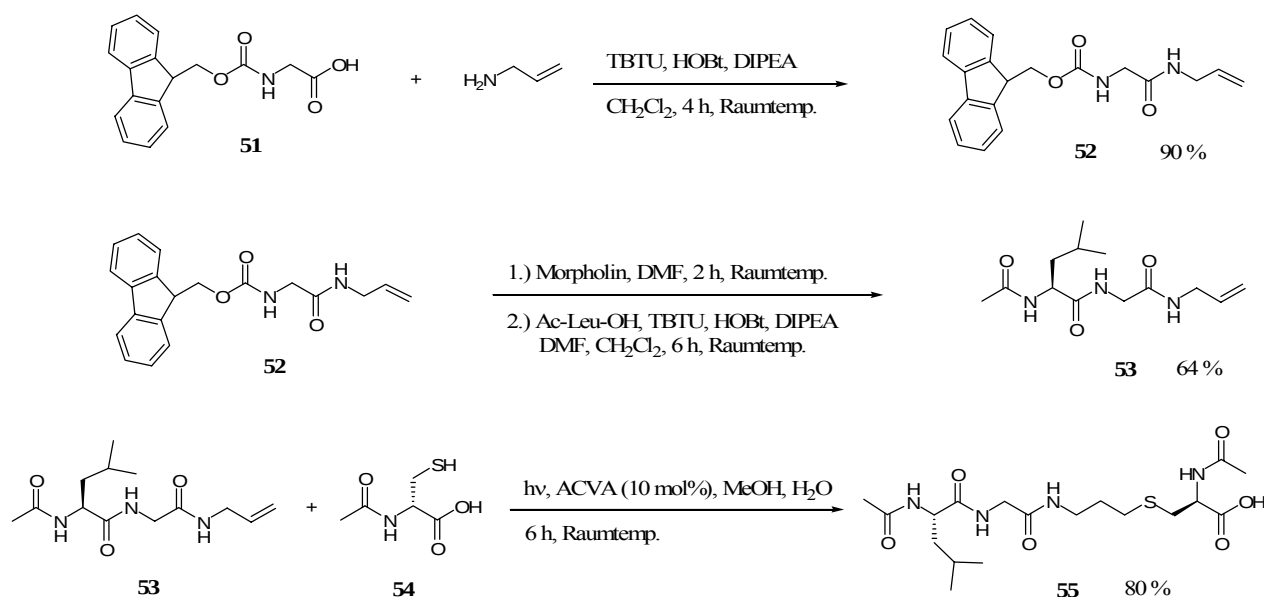
Die Untersuchung der Reaktionsmischung konnte die Bildung von α -substituierten Glycin-Derivaten ausschließen. Ebenfalls zeigten die Versuche, dass die Reaktion in Wasser als Lösemittel durchführbar ist.



Schema 3.20: Radikalische Thiol-Addition an die Allylamido-Glycin-Verbindungen **44** und **47**.

Generell ist zu bemerken, dass sich als Nebenprodukt der radikalischen Thiol-Addition das Cystin-Derivat der jeweils eingesetzten Cystein-Verbindung bildet (bis zu 15 %) und die nicht umgesetzten Edukte zurückisoliert werden können. Setzt man die Thiol-Komponente im zweifachen Überschuss ein so kann man die Reaktion zu einem vollständigen Umsatz der Allylamido-Verbindung führen. Im Falle der Biokonjugation an ein Protein ist diese Reaktionsführung nicht möglich, da das Protein als Thiol-Komponente dient und dort eine möglichst hohe Kupplungsausbeute erzielt werden soll. Um dieser Situation gerecht zu werden, wurden deshalb die Cystein-Komponenten in den Modelluntersuchungen in max. 1.2 bis 1.3 Äquivalenten eingesetzt. Der Zusatz eines Radikalstarters (5-20 mol%) erhöht die Ausbeute um ca. 10 % im Vergleich zur Reaktion bei der nur die Bestrahlung mit UV-Licht zum Reaktionsstart verwendet wird.

Um die Situation in einem Peptid besser nachzuahmen, d.h. das Vorhandensein einer Amidbindung an der α -Aminofunktion sollte gegeben sein, wurde das Leucylglycin-Dipeptid **53** synthetisiert. Dazu wurde die Allylamid-Funktion im *N*-Fmoc-geschützten Glycin durch die Kupplung von Allylamin mit Hilfe des Kupplungsreagenzes TBTU, dem Additiv HOBt und der Base *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) im Lösemittel DMF eingeführt.



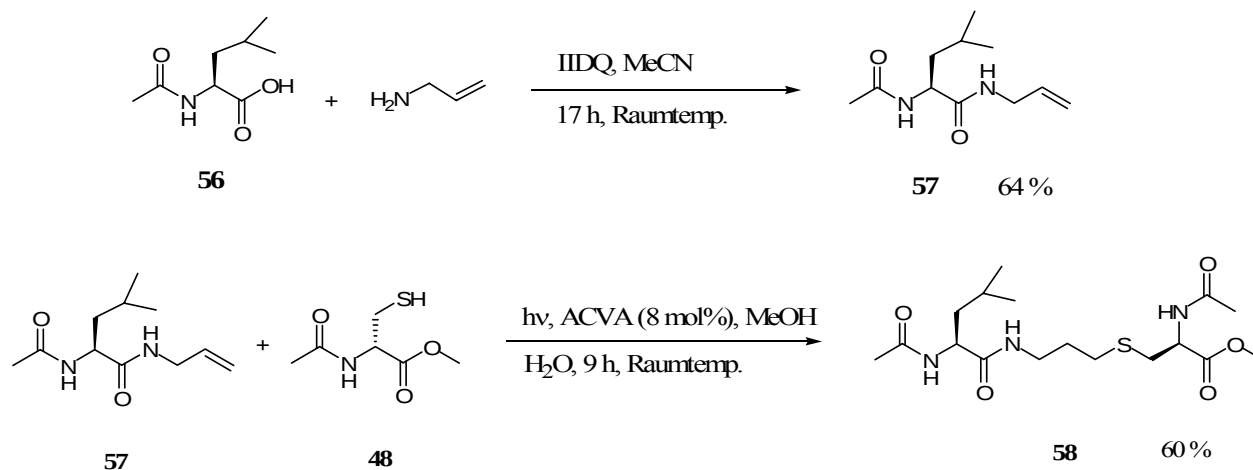
Schema 3.21: Bildung des Leucylglycin-Dipeptids **53** und Umsetzung zu dem Thioether **55**.

Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (s. Schema 3.35) durch das zweistündige Einwirken einer 20%igen Morpholin-Lösung in DMF wurde die Aminofunktion des Glycinallylamids mittels des Reagenzienpaares TBTU/HOBt mit *N*-Acetylleucin zur Reaktion gebracht (s. Schema 3.20). Nach einer chromatographischen Reinigung an Kieselgel wurde das Leucinglycylallylamid **53** in 64%iger Ausbeute erhalten. Das Dipeptid **53** konnte dann mit *N*-Acetylcystein in einer Radikalreaktion durch Bestrahlung mit UV-Licht umgesetzt werden. Auch hier trat keine Bildung von Substitutionsprodukten am α -C-Atom des Glycins auf.

Grundsätzlich kann sich bei Radikalreaktionen mit α -Aminosäuren am α -C-Atom ein C-Radikal ausbilden.^[207] Ob über diese Radikalzwischenstufe eine Racemisierung erfolgen kann, galt es als nächstes zu untersuchen. Dazu wurden als Modellsysteme das *N*-Acetylleucinallylamid **57** und das *N*-Acetylalanin-allylamid **61** synthetisiert. Durch die Verwendung von Cystein-Derivaten als Thiol-Komponenten erzeugt man bei der radikalischen Kupplung an die Allylamidoaminosäure ein Diastereomer. Sollte bei der Reaktion eine Racemisierung auftreten, so kann das Vorliegen von zwei Diastereomeren durch unterschiedliches chromatographisches und NMR-spektroskopisches Verhalten nachgewiesen werden.

Die Leucinverbindung **57** wurde durch Kupplung von *N*-Acetylleucin an Allylamin mittels IIDQ hergestellt. Bei der zunächst versuchten Synthese unter Verwendung von TBTU war der bei der Reaktion entstehende Tetramethylharnstoff nicht vom Produkt abtrennbar.

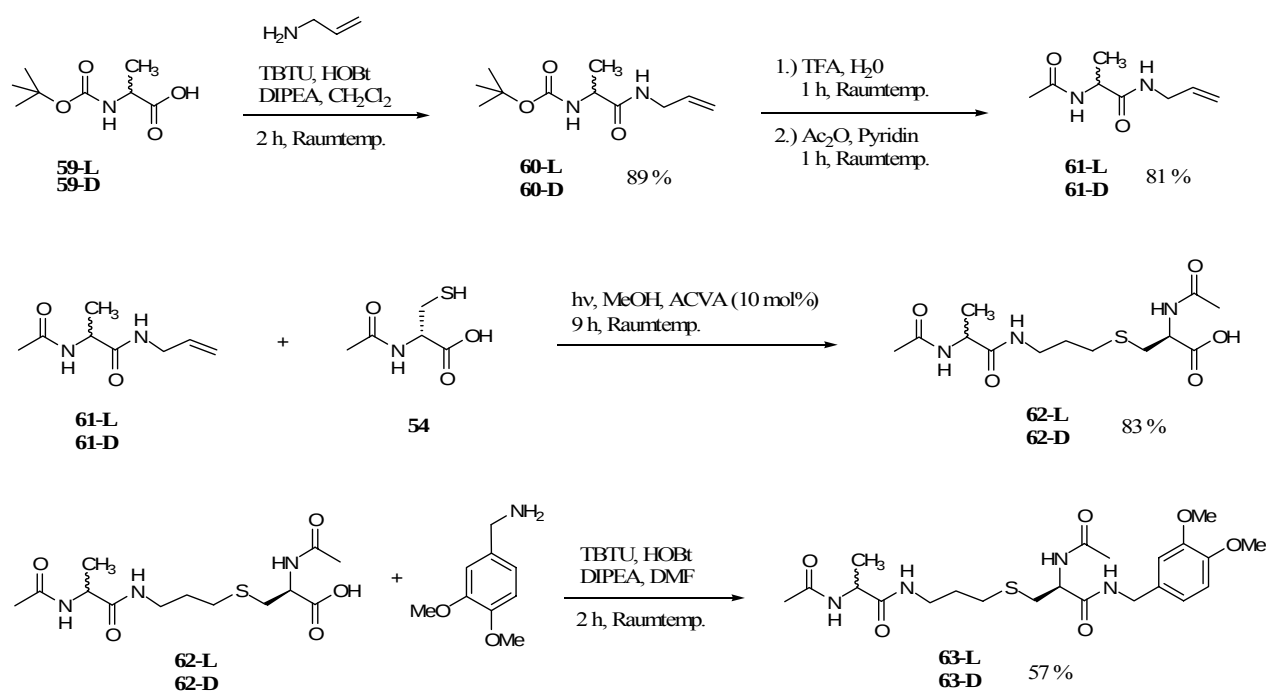
Das im darauf folgenden Schritt durch die radikalische Thiol-Addition erhaltene Thioether **58** zeigte in der RP-HPLC-Untersuchung und der NMR-Spektroskopie keinen Hinweis auf die Bildung von Diastereomeren.



Schema 3.22: Herstellung und Umsetzung des *N*-Acetylleucin-Derivates **57**.

In der Literatur wird zum einen die Möglichkeit einer α -H-Abstraktion^[213] durch Thiyl-Radikale beschrieben, zum anderen trat aber in radikalischen Thiol-Additionen an ungesättigten Aminosäuren keine Racemisierung der Aminosäure bedingt durch die Radikalreaktion auf.^[214]

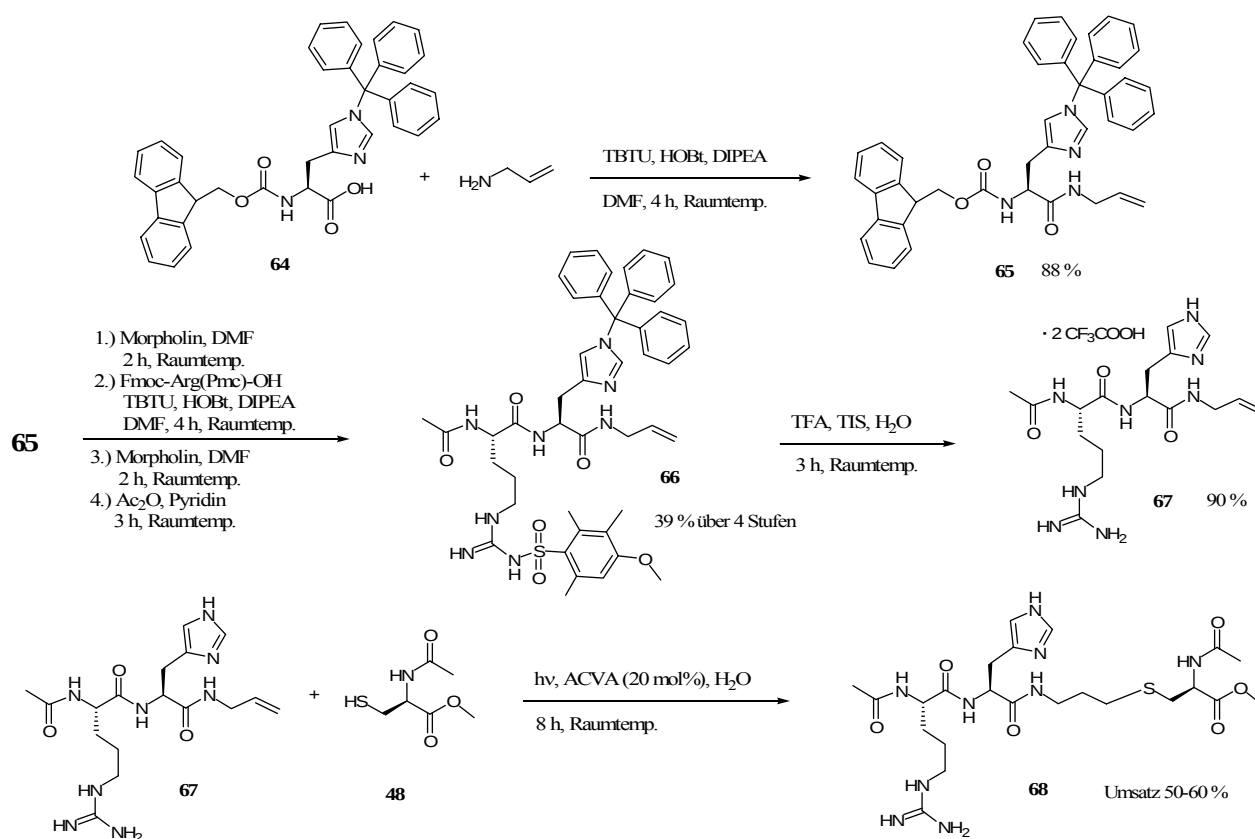
Zur weiteren und genaueren Untersuchung der Racemisierungsneigung wurde das *N*-Acetylalanin-Derivat **61** in beiden enantiomeren Formen synthetisiert. Dies geschah durch die Aktivierung der als Urethane geschützten Alanin-Derivate **59-L** und **59-D** mittels TBTU, HOBt und DIPEA im Lösemittel Dichlormethan und der Aminolyse des Aktivesters mit Allylamin. Das Boc-geschützte Alaninallylamid **61** wurde im Folgenden mit Trifluoressigsäure und Wasser als Abfangreagenz behandelt und die freiwerdende Aminofunktion mit Acetanhydrid acetyliert. Durch diesen Syntheseweg konnte racemisierungsfrei das gut wasserlösliche *N*-Acetylalanin-allylamid **61** erzeugt werden, deren α -C-Atom eine elektronische Situation wie in einem Peptid aufweist. Die Addition von *N*-Acetylcystein an die π -Doppelbindung erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht und unter Verwendung von ACVA als Initiator und lieferte das Dipeptid **62** in einer Ausbeute von 83 %.



Schema 3.23: Synthese der D- und L-Alanin-Modellverbindung **61** und nachfolgende Thiol-Addition zum Thioether **62**.

Die Untersuchung mittels der NMR-Spektroskopie zeigte beim Vermessen einer Mischung der beiden Diastereomere im ^1H -Spektrum keine Unterschiede im Vergleich zu dem Spektrum der einzelnen Diastereomere. Im ^{13}C -Spektrum hingegen trat für einige C-Atome eine Signalverdopplung auf. Eine chromatographische Trennung des Diastereomergemisches konnte jedoch weder durch NP-HPLC noch durch RP-HPLC erreicht werden. Deshalb wurde die Säure **62** mit Veratrylamin als Arylamid derivatisiert (s. Schema 3.23). Auf diese Weise konnte die mittels des UV-Detektors der HPLC-Anlage auch in sehr niedriger Konzentration nachweisbare Verbindung **63** erhalten werden, deren Diastereomerenmischung nun durch analytische NP-HPLC erfolgreich aufgetrennt werden konnte. Anhand der chromatographischen und spektroskopischen Untersuchungen kann die Bildung von Racematen unter den gewählten Reaktionsbedingungen während der Thiol-Additionsreaktion ausgeschlossen werden. Mit dem *N*-Acetylalanin-allylamid **61** konnte auch gezeigt werden, dass die Radikalreaktion in Pufferlösungen (NaOAc/HOAc ($\text{pH} = 5$) und NaH_2PO_4 ($\text{pH} = 7.5$)) grundsätzlich möglich ist, was für die Anwendung in der Proteinmodifikation von Bedeutung ist.

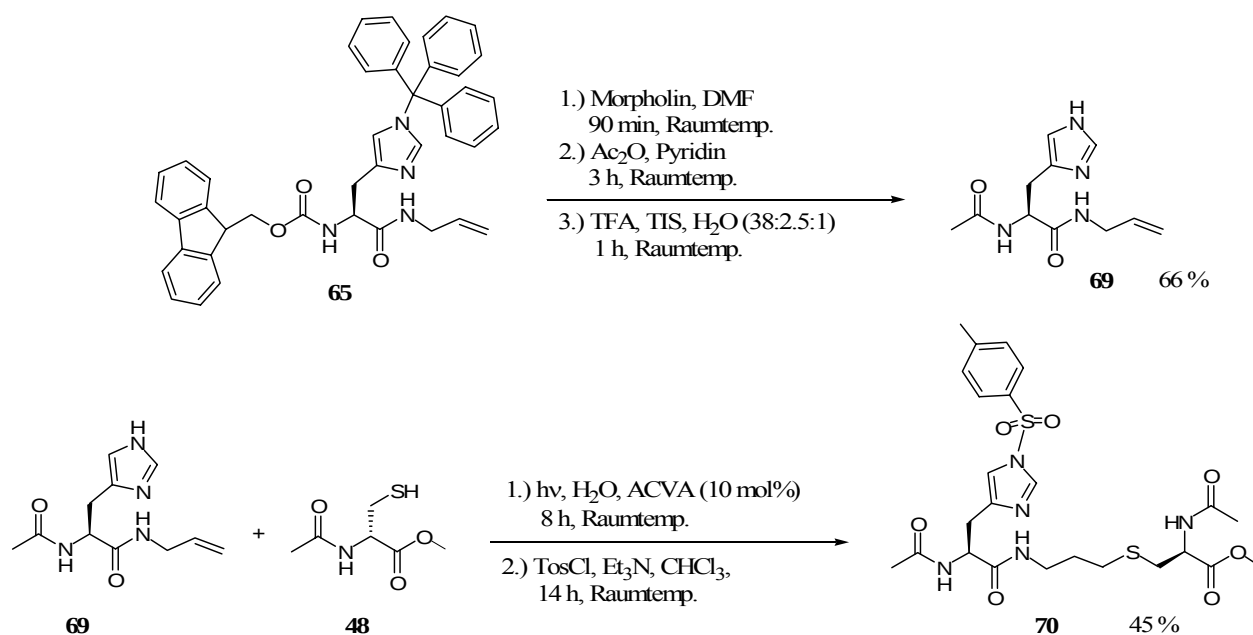
Da die Wiederholungseinheit der MUC1-Sequenz die Aminosäuren Histidin und Arginin enthält, wurde deren Einsetzbarkeit in der radikalischen Thiol-Addition untersucht. Das Arginylhistidin-allylamid **67** (s. Schema 3.23) konnte durch die Anbindung von Allylamin an die orthogonal Fmoc- und Trityl(Trt)-geschützte^[215, 216] Histidin mittels des Aktivesterverfahrens erhalten werden. Dann wurde die Fmoc-Gruppe basisch abgespalten durch das Behandeln mit 20%iger Morpholin-Lösung in DMF und anschließend ohne weitere Reinigungsschritte das Fmoc- und Mtr-geschützte Arginin-Derivat mittels TBTU, HOBt und DIPEA in DMF angekuppelt. Im Anschluss erfolgten eine weitere Fmoc-Abspaltung und die Acetylierung der Aminogruppe mit Acetanhydrid, der sich dann eine Reinigung durch Flash-Chromatographie anschloss.



Schema 3.24: Synthese und Umsetzung des Allyl-modifizierten Arginylhistidin-Dipeptids **67**.

Eine Mischung aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan (TIS) und Wasser bewirkte die acidolytische Abspaltung der Mtr- und der Tritylschutzgruppe. In Schema 3.24 ist der Syntheseweg zum Dipeptid aufgezeigt, welches in einer Ausbeute von 31 % über 6 Stufen erhalten wurde. Die sehr polare Verbindung ging einer analytischen RP-HPLC-Analyse zu folge eine Reaktion mit der Thiol-Komponente *N*-Acetylcysteinmethylester ein.

Der Umsatz betrug ca. 60 %. Die Bildung von Nebenprodukten außer der Disulfid-Bildung zeigte die HPLC-MS-Analyse nicht. Eine präparative Trennung konnte wegen des Fehlens einer präparativen Säule mit dem entsprechenden Säulenmaterial nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund erfolgte die Synthese der Allyl-modifizierten Histidin-Verbindung **69**. Im Fmoc- und Trityl-geschützten Histidin-allylamid **65** wurde die Fmoc-Gruppe gegen eine Acetylgruppe ausgetauscht und die Tritylschutzgruppe mit TFA unter Zusatz von TIS und Wasser entfernt.

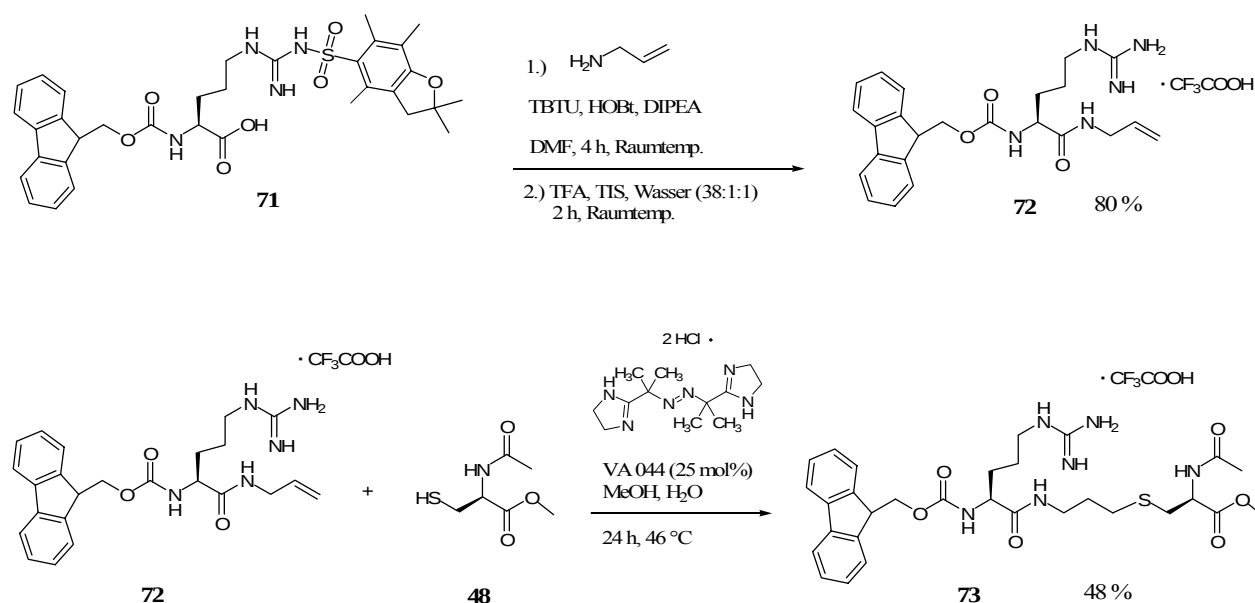


Schema 3.25: Synthese des Allylamidohistidins **69** und Thiol-Kupplung zum Histidin-Derivat **70**.

Die radikalische Kupplungsreaktion mit dem *N*-Acetylcysteinmethylester verlief mit einem hohen Umsatz (s. Schema 3.25). Aber auch dieses Produkt war zu polar, was eine chromatographische Trennung an Kieselgel und den vorhandenen RP-HPLC-Säulen nicht ermöglichte. Erst die Überführung der Verbindung mit Toluolsulfonsäurechlorid in das entsprechende Sulfonamid **70** erbrachte eine chromatographisch zu reinigende Verbindung in mittlerer Ausbeute.

Die Synthese der analogen Arginin-Modellsubstanz **72** erfolgte, was die Bildung der Amidbindung und die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppe anbetrifft, unter nahezu identischen Bedingungen wie bei der Herstellung des Histidin-Derivates **69**. Lediglich die Fmoc-Gruppe wurde nicht gegen eine Acetylgruppe ausgetauscht, da das Acetyl-geschützte Substrat kein sinnvolles chromatographisches Verhalten zeigte.

Die Umsetzung mit *N*-Acetylcysteinmethylester lieferte den Argininthioether **73** in einer Ausbeute von 48 % nach der Reinigung durch präparative RP-HPLC.



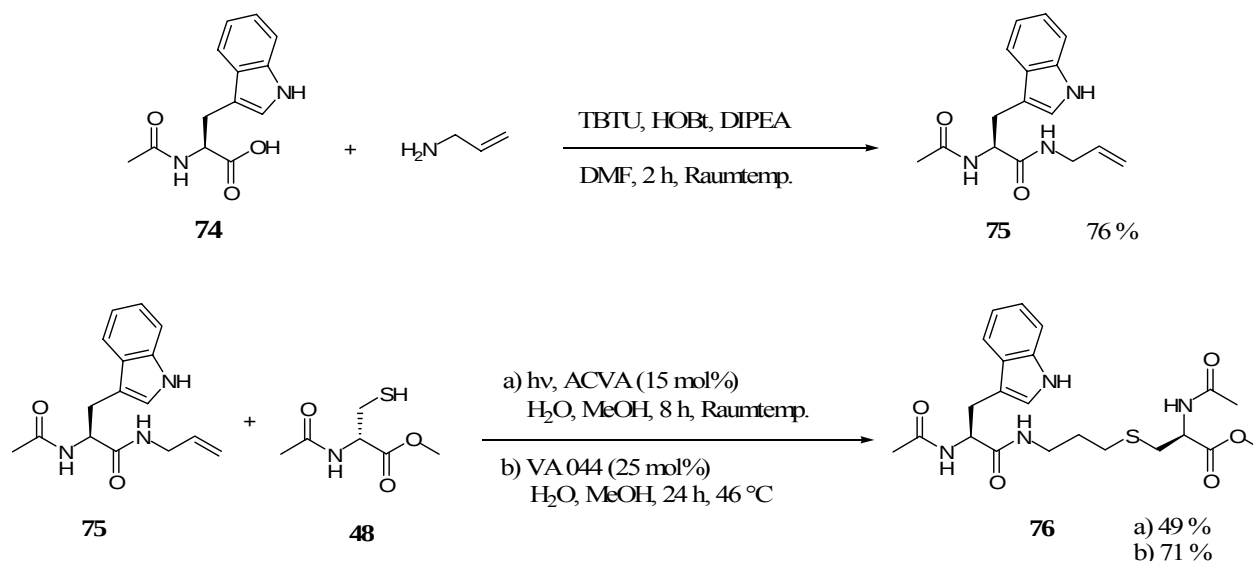
Schema 3.26: Herstellung des Argininallylamids **72** und Einsatz in der radikalischen Thiol-Addition.

Eine alternative Initiierung der Radikalreaktion zur Bestrahlung mit UV-Licht, was die SH-Bindung homolytisch spaltet sowie die Photolyse des Radikalstarters bewirkt, bietet die Thermolyse des Radikalstarters durch Wärmeeinwirkung. Dabei ist eine niedrige Zerfallstemperatur im Hinblick auf die Verwendung von sensiblen Verbindungen und Proteinen ebenso wichtig wie die Wasserlöslichkeit des Initiators. Der Radikalstarter 2,2'-Azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (VA-044) erfüllt beide Kriterien.^[217] Die Halbwertszeit des Zerfalls bei 44 °C in Wasser beträgt 10 Stunden. Mit diesem Radikalstarter wurde die Thiol-Addition am Arginin-Derivat **72** durchgeführt.

Die Bestrahlung mit UV-Licht könnte bei aromatischen Aminosäuren und sensiblen Aminosäuren wie Tryptophan zu Nebenreaktionen und uneinheitlichen Produkten führen. Deshalb wurde die Modellverbindung **75** durch Kupplung von *N*-Acetyltryptophan mit Allylamin mit TBTU und HOBT als Aktivierungsreagenzien synthetisiert, wobei die NH-Funktion des Indolringes während der Amidbindungsbildung nicht blockiert werden musste.

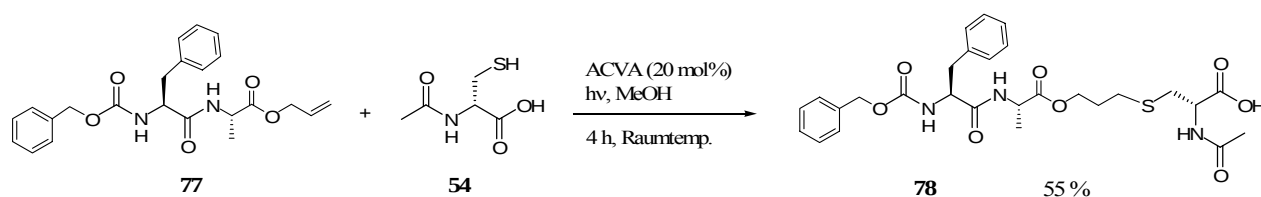
Die Bestrahlung einer Mischung von *N*-Acetyltryptophan-allylamid **76** und Cysteinmethylester **48** lieferte das Tryptophan-Additionsprodukt **76** in 49 % Ausbeute. Wobei sich im HPLC-Chromatogramm (UV-Detektor) die Bildung von ca. 10-15 % an Nebenprodukten zeigte.

Die Wiederholung der Reaktion mit VA-044 als Radikalstarter lieferte den gewünschten Tryptophan-Thioether in 71%iger Ausbeute.



Schema 3.27: Synthese des Tryptophan-Modellsystems **75** und Addition von *N*-Acetylcysteinmethylester.

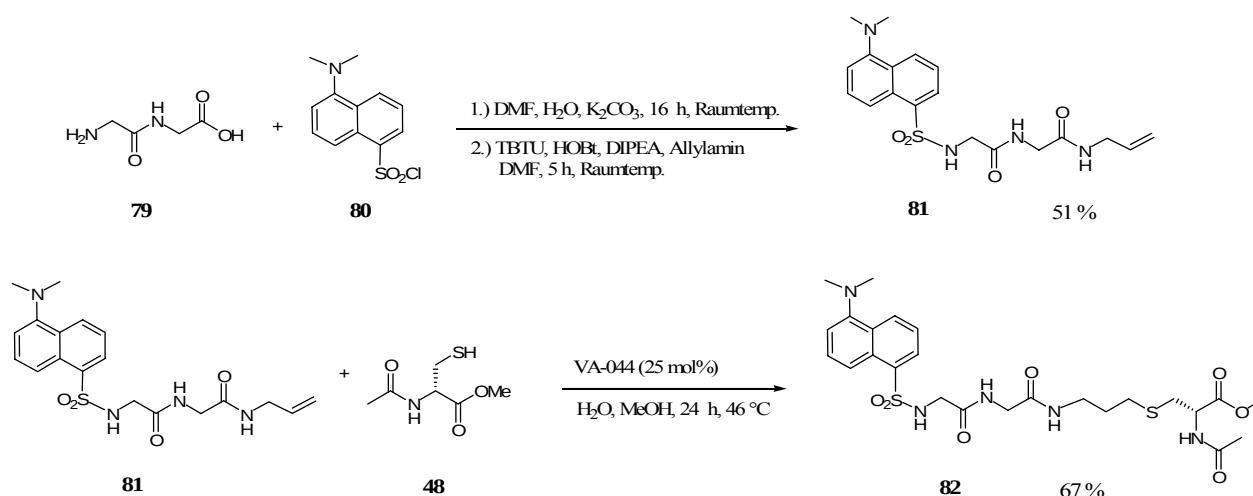
Die radikalische Thiol-Addition ist auch an die Allylesterfunktion möglich. Der Dipeptidallylester **77** konnte durch die Bestrahlung mit UV-Licht in Gegenwart von *N*-Acetylcystein und des Radikalstarters ACVA trotz des Vorhandenseins der nicht völlig photostabilen Cbz-Schutzgruppe^[218, 219] in das Tripeptid **78** mit einer Ausbeute von 55 % überführt werden.



Schema 3.28: Umsetzung des Dipeptidallylester **77** mit *N*-Acetylcystein.

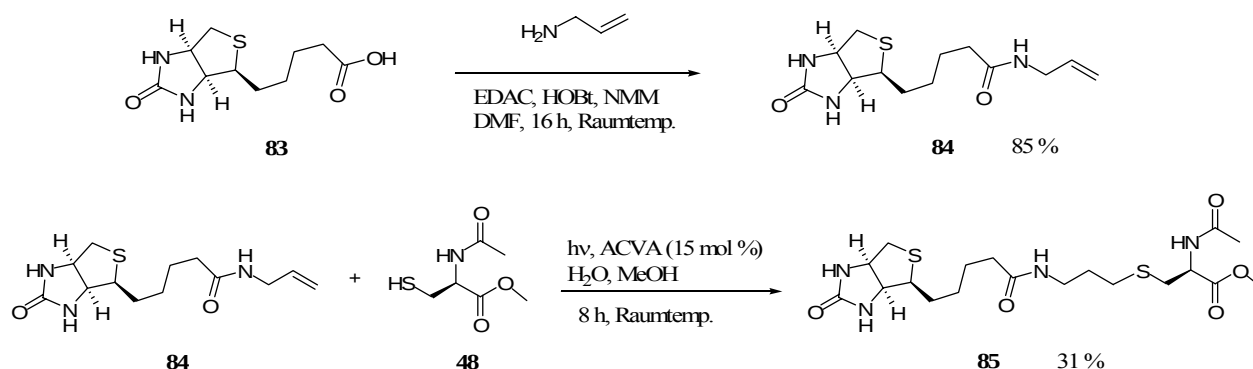
Interessant wäre es, diese Konjugationsmethode für die Markierung von Proteinen oder Peptiden mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit Biotin zu nutzen. In einer solchen Markierung wäre die Dansylverbindung **81** einsetzbar. Dieses Substrat erhält man durch die Reaktion von Glycylglycin mit Dansylchlorid unter Schotten-Baumann-Bedingungen^[220] und nachfolgender TBTU-vermittelten Kupplung des Allylamins.

Die Addition an den Cysteinmethylester **48** gelang sowohl durch Bestrahlung mit UV-Licht (Ausbeute ca. 30 %) als auch durch die Initiierung der Radikalreaktion mit dem wärmeempfindlichen Initiator VA-044.



Schema 3.29: Herstellung des Dansylglycylglycinallylamids **81** und Addition an *N*-Acetylcysteinmethylester.

Die Derivatisierung von Enzymen, Peptide oder Proteinen mit Biotin (Vitamin H) ermöglicht aufgrund der hochaffinen Bindung des Biotins an das Glycoprotein Avidin ein breites Spektrum biochemischer Nachweisverfahren z.B. Lokalisation von markierten Proteinen oder Immunoassays sowie Isolations- und Reinigungsoperationen.^[221, 222] Ein einfaches Biotinylierungsreagenz wäre Verbindung **84**, die durch die Umsetzung der Carboxylfunktion im Biotinmolekül mit Allylamin unter Verwendung von EDAC erhältlich ist. Die niedrige Ausbeute der Additionsreaktion an den *N*-Acetylcysteinmethylester ist auf Verluste während der Reinigung durch die Flash-Chromatographie zurückzuführen, da das Biotin-Derivat **85** zur Gelbildung^[223] neigte und in dem zur Chromatographie geeigneten Lösemittelgemisch nur schwer löslich war.



Schema 3.30: Herstellung des Allylamidobiotins **84** und radikalische Thiol-Addition.

3.3 Die Synthese von als Allylamide modifizierten Glycopeptiden

3.3.1 Die Peptidsynthese an fester Phase

Die Synthese von Peptiden und Glycopeptiden dient zur Bestätigung einer vorgeschlagenen Primärstruktur, dem Design von bioaktiven Peptiden, zur Identifikation der strukturellen Parameter ihrer biologischen Aktivität, sowie zur Herstellung pharmakologisch aktiver Peptide und Proteine.^[224, 225] Die Synthese der (Glyco)Peptide kann in Lösung oder an der festen Phase erfolgen. Nach der von R. B. Merrifield 1963 entwickelten Peptid-Festphasensynthese^[226-229] (Nobelpreis 1984) wird die erste Aminosäure über ihre Carboxylgruppe an ein unlösliches, filtrierbares Polymer gebunden, das mechanisch stabil und chemisch inert ist.^[230, 231] Polystyrol quervernetzt mit 1-2% Divinylbenzol bzw. TentaGel[®] (Polystyrol-Harz mit aufgepfropften Polyethylenglycoleinheiten (10-20)) kommen vornehmlich zum Einsatz.^[232] Die Quelleigenschaften des Harzes sind ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Synthese. Geeignete Lösemittel sind Dichlormethan, DMF, NMP und THF. Polare Lösemittel wie Methanol oder sogar Wasser können bei TentaGel[®] analogen Harzen zum Einsatz gelangen.^[233-236] Die Beladungsdichte des Harzes mit der Startaminosäure liegt im Allgemeinen in einem Bereich von 0.2 bis 0.5 mmol pro Gramm Harz. Ein Ankersystem stellt die Verbindung von Trägerpolymer zu der Startaminosäure her.^[237] Vom C-Terminus her wird dann die Peptidkette sukzessiv aufgebaut. Die N-terminale Schutzgruppe der Startaminosäure wird selektiv entfernt und die Bindung mit einer neuen Aminosäure unter Einsatz eines geeigneten Kupplungsreagenzes geknüpft. Dabei müssen der Anker und die Aminosäureseitenketten-Schutzgruppen gegenüber den Bedingungen der N-terminalen Deblockierung sowie der Aminosäurekupplung inert sein. Der Wahl der Kupplungsbedingungen (s. Kapitel 3.3.2) kommt eine große Bedeutung zu, denn eine nahezu quantitative und von Nebenreaktionen (z.B. Racemisierung, Umlagerungen) freie Umsetzung der Kupplungspartner ist die Voraussetzung für den Erhalt eines homogenen Endproduktes. Ebenso hat die Auswahl und Optimierung der Seitenkettenschutzgruppen einen großen Einfluss auf den Verlauf der Synthese. Für die Peptid-Festphasensynthese etablierten sich zwei Schutzgruppenstrategien. Bei der Boc-Strategie^[238, 239] wird als temporäre Schutzgruppe der Aminofunktion die *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-Gruppe eingesetzt und die Seitenketten der Aminosäure sind in der Regel mit hydrogenolytisch oder Fluorwasserstoffsäure spaltbaren Schutzgruppen versehen. In der Fmoc-Strategie^[240] wird die Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe als temporäre Aminoschutzgruppe verwendet, und zur Blockierung der Seitenketten kommen vornehmlich acidolytisch spaltbare Schutzgruppen zum Einsatz.

Die zwei Reaktionsschritte, *N*-terminale Deblockierung der am Harz gebundenen Aminosäure und Kupplung einer weiteren, temporär blockierten Aminosäure, werden solange wiederholt bis die gewünschte Aminosäuresequenz erreicht ist. Als letzter Schritt erfolgt die Abspaltung des Peptids vom Träger durch Spaltung der Bindung zwischen C-terminaler Aminosäure und Ankergruppierung. Dabei kommen säurelabile (z.B. Wang, SASRIN, Barlos),^[241-243] basenlabile,^[244] fluoridspaltbare (z.B. PTMSEL),^[245] allylische (z.B. HYCRON)^[246, 247] sowie photolabile^[248, 249] Ankersysteme zum Einsatz. Das Prinzip der Merrifield-Synthese ist in Abb. 3.3 verdeutlicht.

Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in einem hohen Reaktionsumsatz, der durch einen Überschuss der zu kuppelnden Komponenten und aller zur Kupplung notwendigen Reagenzien erreicht wird. Dieser Überschuss ist durch einfaches Filtrieren und Waschen vom polymergebundenen Peptid abzutrennen. Das Verfahren erhöht die Solvation und vermindert die Aggregation der Zwischenprodukte. Als weiteres entfallen die mühsamen Reinigungsoperationen sowie die Isolierung der Zwischenprodukte, die bei einer Synthese in Lösung nach den einzelnen Syntheseschritten nötig sind. Die einfache Durchführung der Reaktionen erlaubt eine Automatisierung.

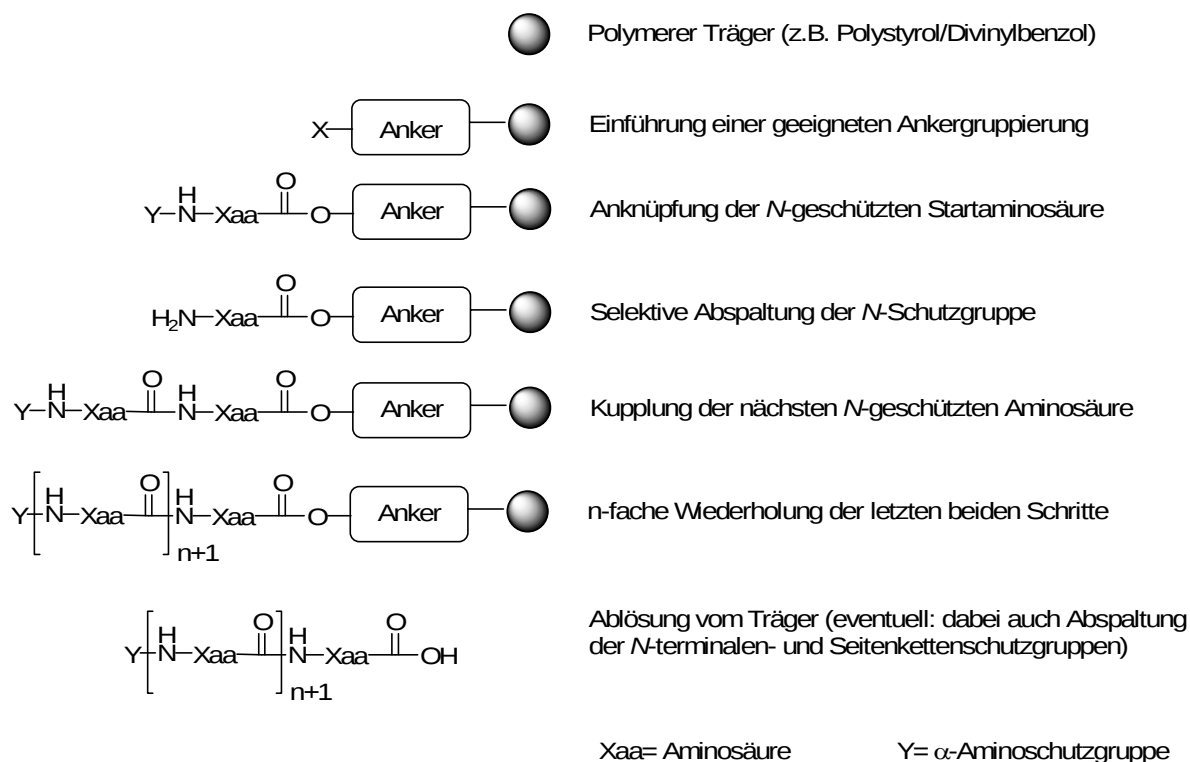


Abb. 3.3: Allgemeines Schema einer Peptid-Festphasensynthese nach Merrifield.

3.3.2 Kupplungsreagenzien in der Peptidsynthese^[204]

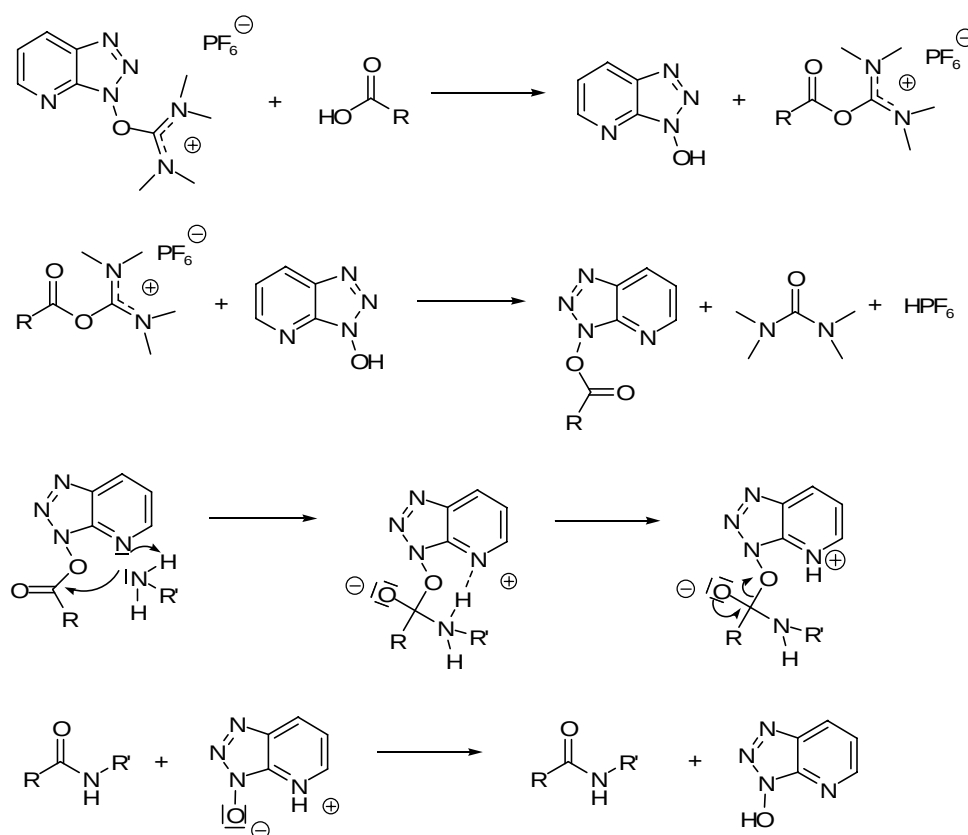
Die Aktivierung der Carbonsäure kann durch Überführen in Säureanhydride,^[225] Azide,^[225] Säurehalogenide^[250] (besonders Fluoride^[251]) oder durch Carbodiimide (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[252] oder *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC)) erfolgen. Bei der Wahl des Kupplungsreagenzes sind besonders die Neigung zur Racemisierung sowie die Stabilität und Aktivität der aktivierten Carbonsäure zu bedenken. Die wichtigsten Kupplungsreagenzien sind bereits in Abb. 3.2 dargestellt.

Zur Festphasensynthese der (Glyco)Peptide in dieser Arbeit wurde die effektivere Aktivestermethode angewandt. Die Carbonsäure wird *in situ* mittels eines Aktivierungsreagenzes (Oniumsalze)^[253], im Allgemeinen Phosphoniumsalze^[254, 255] oder die in dieser Arbeit verwendeten Uroniumsalze (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU),^[256] *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU)^[205] und 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)^[257]), auf sehr schonende Weise in einen Aktivester überführt. Ob die Kupplungsreagenzien als Uroniumsalze (*O*-Form) oder als Guanidinium-Salze (*N*-Form) vorliegen (s. Abb. 3.2), hängt von den Bedingungen während ihrer Herstellung ab. Die Uroniumsalz-Form, die sich in Lösung unter basischen Bedingungen in den Guanidinium-Typ umlagert, ist die reaktivere der beiden Reagenzien.^[258]

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen und zur Verminderung der Racemisierung werden diesen Kupplungsreagenzien die Additive 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[206] und 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)^[259] zugesetzt. Der sich bildende Aktivester zeigt zwar eine niedrigere Reaktivität im Vergleich zu den primär entstehenden *O*-Isoacylharnstoffen ist aber dennoch so reaktiv, dass eine sehr schnelle Amidbindungsbildung eintritt. Außerdem bleibt er über eine längere Zeit ohne die Bildung von Nebenprodukten in Lösung stabil, was bei sterisch anspruchsvollen Kupplungen ein Vorteil ist. Der HOAt-Aktivester ist dem HOBt-Aktivester bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit und der Unterdrückung der Racemisierung überlegen. Zum einen ist HOAt eine stärkere Säure ($pK_s \approx 3.28$) als HOBt ($pK_s \approx 4.60$), und es ist somit bei der Substitution durch die Aminofunktion eine bessere Abgangsgruppe. Dabei hat das Stickstoffatom im HOAt noch eine weitere Funktion.

Wie in Schema 3.31 gezeigt, koordiniert dieser während der Aminolyse über eine intermolekulare Wasserstoffbrücke das angreifende Amin und sorgt somit für eine Vororientierung, die der Racemisierung entgegenwirkt.

Das Reagenzienpaar HATU/HOAt wird bei anspruchsvollen Kupplungsreaktionen eingesetzt, wie z.B. von Saccharid-Festphasenbausteinen. Als Base wird *N,N'*-Diisopropylethylamin („Hünigs Base“, DIPEA) eingesetzt, das aufgrund der sterisch anspruchsvollen Isopropylreste kaum Racemisierung der zu kuppelnden Carbonsäure-Komponente auslöst. Die Base dient zur Deprotonierung der Amino- und Carboxylfunktion sowie der aciden OH-Gruppen des HOAt bzw. HOBt. Die Aminosäurekupplung findet in einem neutralen bis leicht sauren Reaktionsmilieu statt.

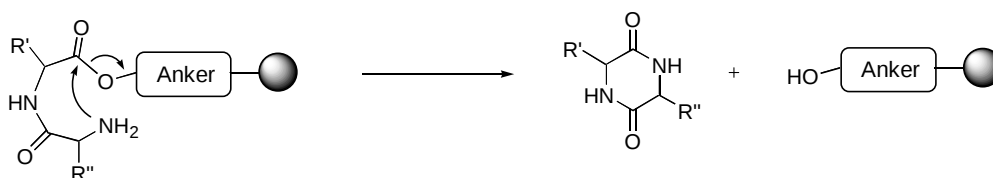


Schema 3.31: Reaktionsmechanismus der Aktivestermethode.

3.3.3 Die Synthesestrategie und das allgemeine Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptide

Als feste Phase wurde in dieser Arbeit ein säurelabiles HMPB-BHA-Harz verwendet, das aus Polystyrol als polymeren Träger besteht und mit Benzhydrylamid (BHA) modifiziert ist (s. Schema 3.36).^[260, 261] Es quillt in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und Dichlormethan gut, was für eine effiziente Reaktion wichtig ist. Dieses BHA-Polystyrol-Harz ist mit 4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutansäure (HMPB) funktionalisiert, die als Ankersystem dient. Das Ankersystem gehört zur Klasse der SASRIN(Super acid sensitive resin)-Harze,^[242] die durch Behandlung mit 1%iger Trifluoressigsäure das Peptid freisetzen. Der Abspaltvorgang kann hierbei innerhalb kürzester Zeit (wenige Minuten) erfolgen. Neutralisiert man die Abspaltung direkt im Anschluss an die Abspaltung, dann sollten die gängigen säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureseitenkettenfunktionen unangetastet bleiben. Das Ankersystem sollte deshalb die Synthese von geschützten Glycopeptiden ermöglichen, die in Synthesestrategien mit Fragmentkondensationen oder anderen Umsetzungen mit völlig blockierten Aminosäureseitenketten eingesetzt werden können.

Bei der Peptid-Festphasensynthese kann insbesondere auf der Stufe des am Anker gebundenen Dipeptids eine unerwünschte intramolekulare Aminolyse der Esterbindung unter Bildung eines Diketopiperazins auftreten, so dass das Peptid vom polymeren Träger abgelöst wird.^[262, 263]

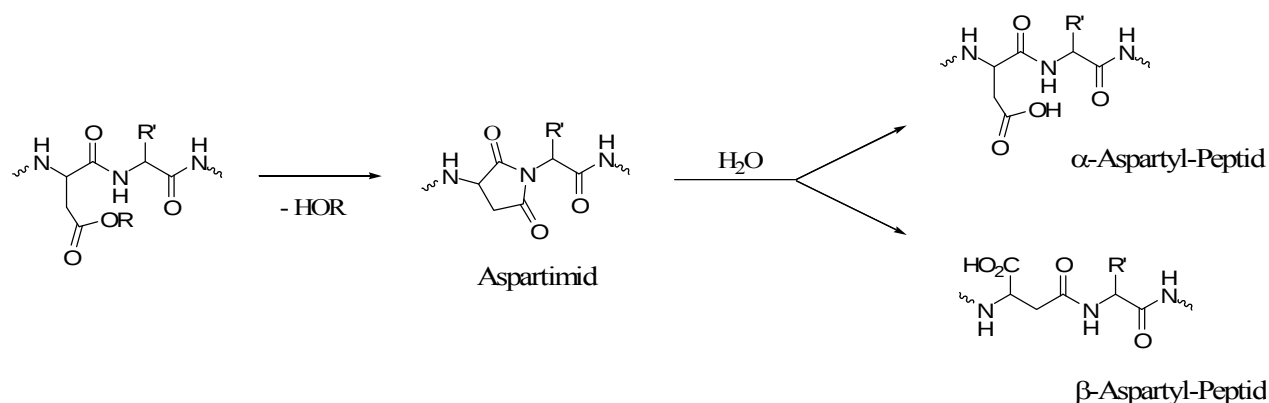


Schema 3.32: Diketopiperazinbildung.

Startamino­säuren wie Glycin oder Prolin begünstigen diese Nebenreaktion. Aber auch D-Aminosäuren und *N*-Alkyl-Aminosäuren im entsprechenden Dipeptid fördern die Diketopiperazinbildung. Als besonders gefährdet gelten die Strukturelemente Pro-Gly-Anker, Pro-Pro-Anker und Tyr-Pro-Anker. Mit zunehmend voluminöser Seitenkette der Aminosäuren nimmt die Diketopiperazinbildung jedoch ab. Ebenfalls können sterisch anspruchsvolle Ankersysteme diese Nebenreaktion unterdrücken.

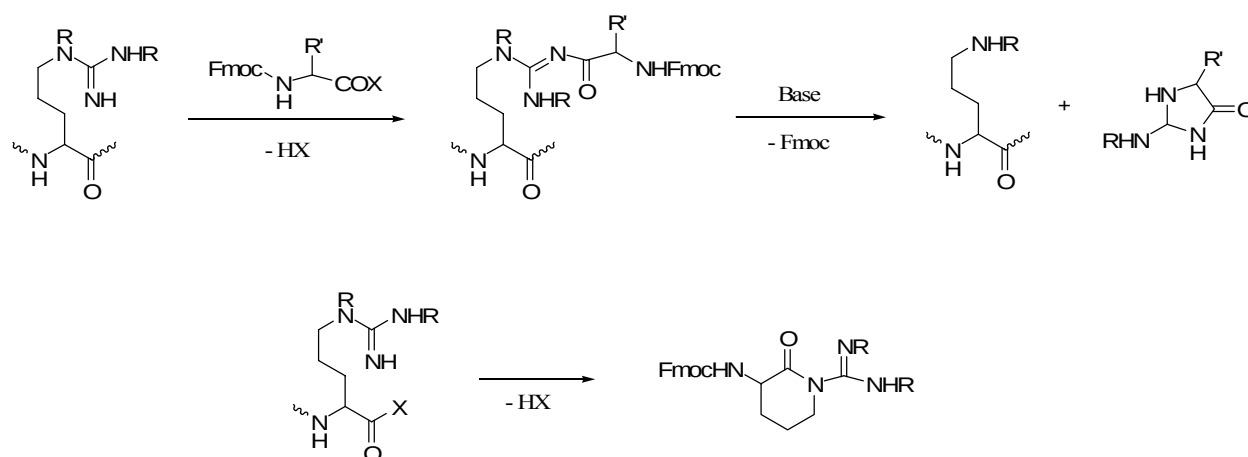
Um eine Diketopiperazinbildung zu vermeiden, wurde zur Synthese der prolinreichen MUC1 Sequenz Alanin als Startamino­säure am sterisch nicht anspruchsvollen HMPB-Anker ausgewählt. Mit dieser Startamino­säure trat kein Ausbeuteverlust während der Peptidsynthesen durch Diketopiperazinbildung auf.

In der immundominanten Region der Wiederholungseinheit der MUC1-Sequenz ist die Aminosäure Asparaginsäure enthalten. Die Cyclisierung der Asparaginsäure zum Succinimid mit nachfolgender Öffnung des Rings zum α - bzw. ungewünschten β -Aspartylpeptid ist eine weitere mögliche Nebenreaktion während der Peptidsynthese. Das Auftreten dieser Nebenreaktion ist sequenzabhängig.^[264] Durch den Schutz der β -Carboxylfunktion als sterisch gehinderten *tert*-Butylester kann diese Nebenreaktion während der Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie unterdrückt werden.^[265] Jedoch bleibt die Gefahr einer Aspartimidumlagerung bei einer der folgenden Schutzgruppenabspaltung (acidolytisch oder basisch) am Peptid oder am Saccharid bestehen.



Schema 3.33: Aspartimidumlagerung.

Des weiteren beinhaltet die MUC1-Sequenz Arginin. Die Guanidinogruppe des Arginins ist besonders nucleophil und kann im Kupplungsschritt leicht acyliert werden. Durch die Abspaltung eines 2-Iminoimidazolidins kann aus dem Acylierungsprodukt ein Ornithin-Derivat entstehen. Aktiviert man die Carboxylgruppe eines Argininbausteins als Aktivester, so kann eine intramolekulare Lactambildung eintreten. Die Guanidinofunktion wird hierbei auf die zu acylierende Aminogruppe übertragen, was zu einem Abbruch der wachsenden Peptidkette führt (s. Schema 3.34). Durch Verwendung einer Sulfonylschutzgruppe wie z.B. 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-(Pmc)-, der 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-(Pbf)- oder 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl-(Mtr)-Gruppe kann die Nucleophilie der Guanidinogruppe ausreichend herabgesetzt werden und die eben genannte Nebenreaktion zurückgedrängt werden.^[266-268]



Schema 3.34: δ -Lactambildung in carboxyaktivierten Arginin-Derivaten und Ornithin-Bildung in Arginin-Derivaten.

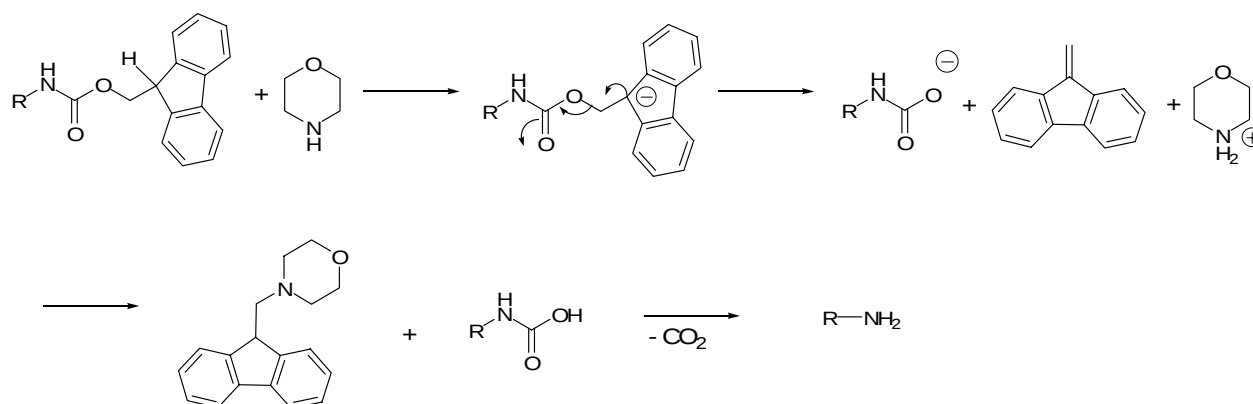
Die Abspaltung dieser Schutzgruppen erfolgt acidolytisch. Die Labilität der Pmc-Schutzgruppe ist mit der eines *tert*-Butylesters vergleichbar. Vergleicht man die Mtr- und die Pmc-Schutzgruppe so ist die Mtr-Schutzgruppe bedeutend säurestabiler.^[267] Die zur vollständigen Abspaltung der Schutzgruppe nötige Zeit ist von den verwendeten Abfangreagenzien abhängig.^[269] Das Risiko der Threonin- und Serin-Sulfonierung während der Abspaltung der Sulfonylschutzgruppen kann durch die Verwendung von passenden Abfangreagenzien minimiert werden.^[270]

Zur Glycopeptid-Festphasensynthese sollen die Fmoc-blockierten und bereits glycosylierten Aminosäuren-Festphasenbausteine in die Peptidsequenz eingebaut werden. Deshalb ist bei den Nachfolgenden Kupplungsreaktionen und Schutzgruppenmanipulationen zu bedenken, dass die O-glycosidische Bindung als acetalische Struktur säurelabil ist und in die Hydroxyaminosäure sowie ein Glycosylkation zerfallen kann oder aber eine Anomerisierung auftreten kann.^[271] Bei Baseneinwirkung besteht die Möglichkeit einer β -Eliminierung des Saccharids, was zur Ausbildung einer α -Aminoacrylsäurestruktur führt.^[272, 273]

Sämtliche Peptide und Glycopeptide in dieser Arbeit wurden nach der Fmoc-Strategie aufgebaut und für die automatisierte Synthese stand ein ABI-433-A Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems zur Verfügung. Während der Synthese wird für jede zu kuppelnde Aminosäure dergleiche Synthesesyklus durchlaufen.

Die Fmoc-Gruppe wurde mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in NMP in drei bis vier Zyklen von je drei Minuten abgespalten. Die Prüfung der Vollständigkeit der Fmoc-Abspaltung erfolgte durch Messung der UV-Absorption des entstehenden Dibenzofulven-Piperidin-

Adduktes. Es erfolgt eine Wiederholung der Abspaltung, solange nicht ein bestimmter Schwellenwert der UV-Absorption unterschritten wird.



Schema 3.35: Mechanismus der Abspaltung der Fmoc-Gruppe.

Die Fmoc-Aminosäuren mit den säurelabilen Schutzgruppen *tert*-Butylester,^[274] *tert*-Butylether,^[275] Mtr, Pmc und Boc wurden in vier- bzw. zehnfachem Überschuss bezüglich der Startaminosäure eingesetzt. Die Kupplung erfolgte bei Raumtemperatur mit den Kupplungsreagenzien HBTU, HOBt und DIPEA in einer Mischung aus DMF und NMP (1:1) in einem äquimolaren Verhältnis (DIPEA: 2 Äquivalente) zur eingesetzten Aminosäure-Menge. Die Kupplungszeiten lagen bei 20-30 Minuten pro Aminosäurekupplung. Die Kupplung der Glycosylaminosäuren wurde mit den reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt und mit einer längeren Kupplungszeit durchgeführt. Nach jeder Kupplungsreaktion wurden die überschüssigen Reagenzien durch Waschen mit NMP entfernt, und die nicht umgesetzten Aminofunktionen wurden mit einer Mischung aus Acetanhydrid, DIPEA und HOBt in NMP acetyliert, um die Bildung von Fehlsequenzen zu vermeiden und Deletionssequenzen besser abtrennen zu können. Nach abgeschlossener Synthese wurde das Harz intensiv im Synthesizer mit NMP und dann mit Dichlormethan gewaschen.

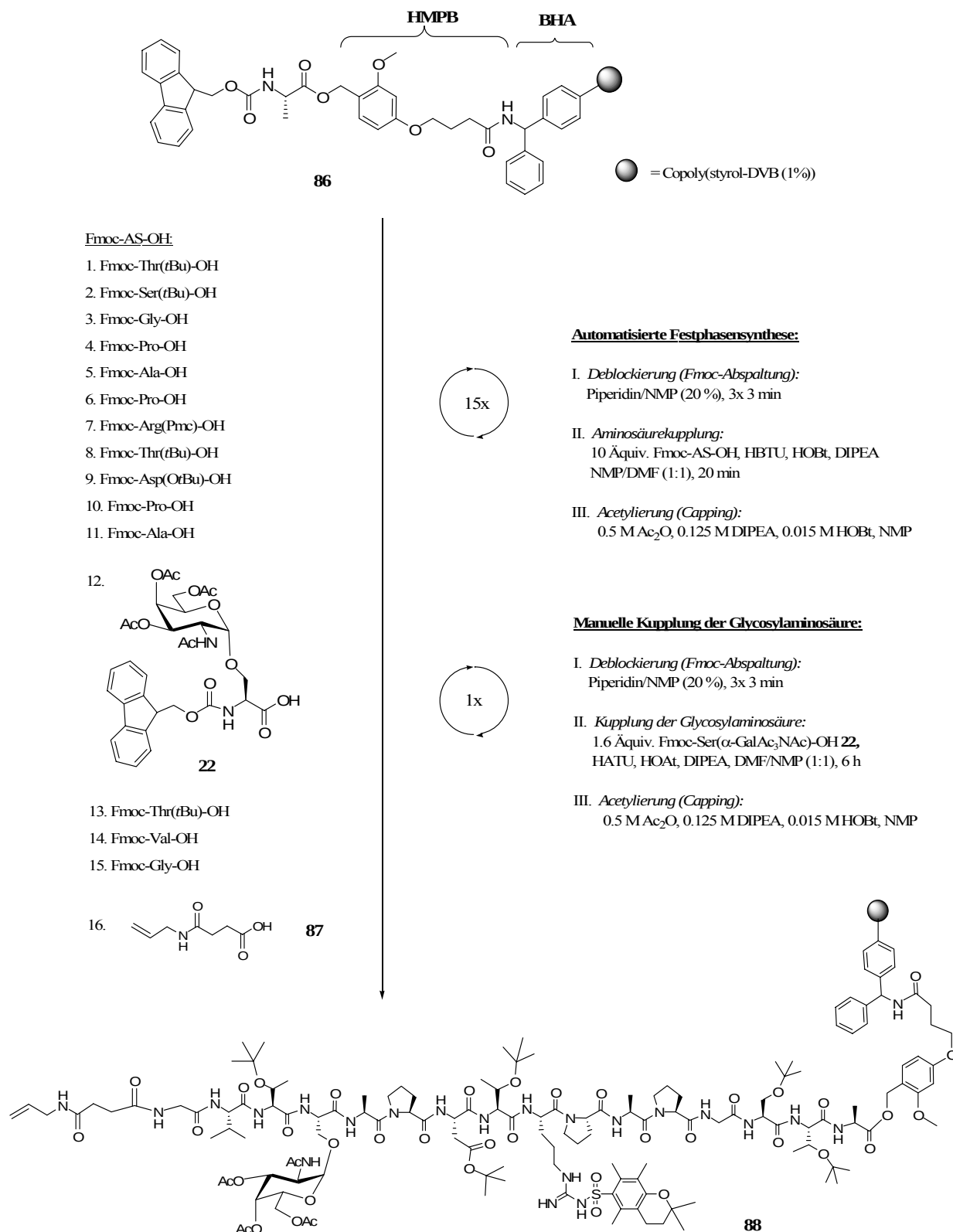
Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgte mit einer 1%igen Trifluoressigsäure-Lösung in Dichlormethan in einem Festphasenreaktor.^[276] Das Harz wurde vier Minuten mit der Abspalllösung behandelt, und der Abspaltvorgang wurde vier- bis fünfmal wiederholt. Durch die sofortige Neutralisation mittels einer äquimolaren Menge an 10%iger methanolischer Pyridin-Lösung beträgt die Verweildauer der Glycopeptide mit den säurelabilen Schutzgruppen in der verdünnten Trifluoressigsäure-Lösung gerade die für die Abspaltung vom Harz notwendige Zeit. Die Reinigung erfolgte nach dem Verdampfen der Lösemittel und der

Aufnahme in Dichlormethan durch intensives Waschen mit Wasser und 0.5%iger Essigsäure bzw. 0.1%iger Trifluoressigsäure und einer sich anschließenden Lyophilisation.

3.3.4 Die Synthese der als Allylamide modifizierten Glycopeptide mit einer Partialsequenz aus der Wiederholungseinheit des Glycoproteins MUC1

MUC1 aus biologischen Isolaten von Tumorgewebe ist stets mikroheterogen und enthält Strukturen, die auf Tumorzellen vorkommen und solche, die auch auf gesunden Zellen zu finden sind. Deshalb bieten nur gereinigte und strukturell definierte, d.h. synthetische Glycopeptid-Antigene, die Möglichkeit einer selektiveren Aktivierung des Immunsystems gegen Glycoproteinstrukturen, die auf Tumorzellen, nicht aber auf normalen Zellen vorkommen. Die Verwendung von definierten Vakzinen erlaubt außerdem die systematische Analyse der durch Vakzine induzierten Immunität in Bezug auf die klinische Reaktion. Auch sind synthetische Antigene im Prinzip in größerer Menge erhältlich. Ein weiterer Aspekt ist, dass durch die Synthese von Glycopeptiden im Gegensatz zur Verwendung von nur saccharidischen Strukturen als Vakzine der tatsächlichen Struktur des MUC1-Glycoproteins auf der Tumorepithelzelle besser Rechnung getragen wird.

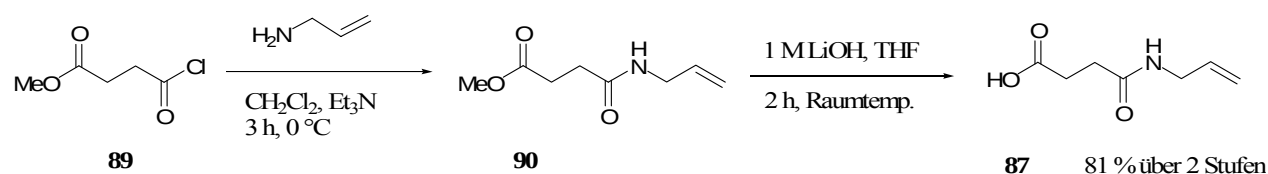
Die für diese Arbeit ausgewählte Zielsequenz beinhaltet die immundominante Region APDTRPAP und stellt eine Partialsequenz aus der Domäne der Wiederholungseinheit des Glycoproteins MUC1 dar. Die Glycopeptid-Festphasensynthese erfolgt nach dem in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Protokoll. Zur Synthese des mit T_N-Antigen glycosylierten MUC1-Glycopeptids **91** wird zunächst mit Fmoc-Alanin beladenes HMPB-BHA-Polystyrol-Harz **86** durch automatisierte Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren in ein mit dem Undecapeptid beladenes Polymer überführt. Die Ansatzgröße betrug 0.1 mmol an mit Fmoc-Alanin beladenem Harz. Nach der Entfernung der aminoterminalen Fmoc-Schutzgruppe, werden 1.6 Äquivalente des T_N-Serin-Bausteins in einer Lösung aus HATU, HOAt und DIPEA in NMP sechs Stunden lang manuell gekuppelt. Danach folgen der Cappingschritt und die automatisierte Peptidsynthese der restlichen drei Aminosäuren und des Spacer-Moleküls **87**, dessen Synthese im Folgenden erläutert wird.



Schema 3.36: Festphasensynthese des am Harz gebundenen T_N-Glycohexadecapeptids **88** ausgehend von Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86**.

Die Allylfunktion und nicht die Thiol-Funktion sollte in einem Spacer-Molekül in das Glycopeptid eingeführt werden, um bei den notwendigen Schutzgruppenmanipulationen und den Reinigungsoperationen mittels RP-HPLC eine Dimerisierung der Sulfhydrylgruppen und damit einen Ausbeuteverlust an dem komplexen Glycopeptid zu umgehen.

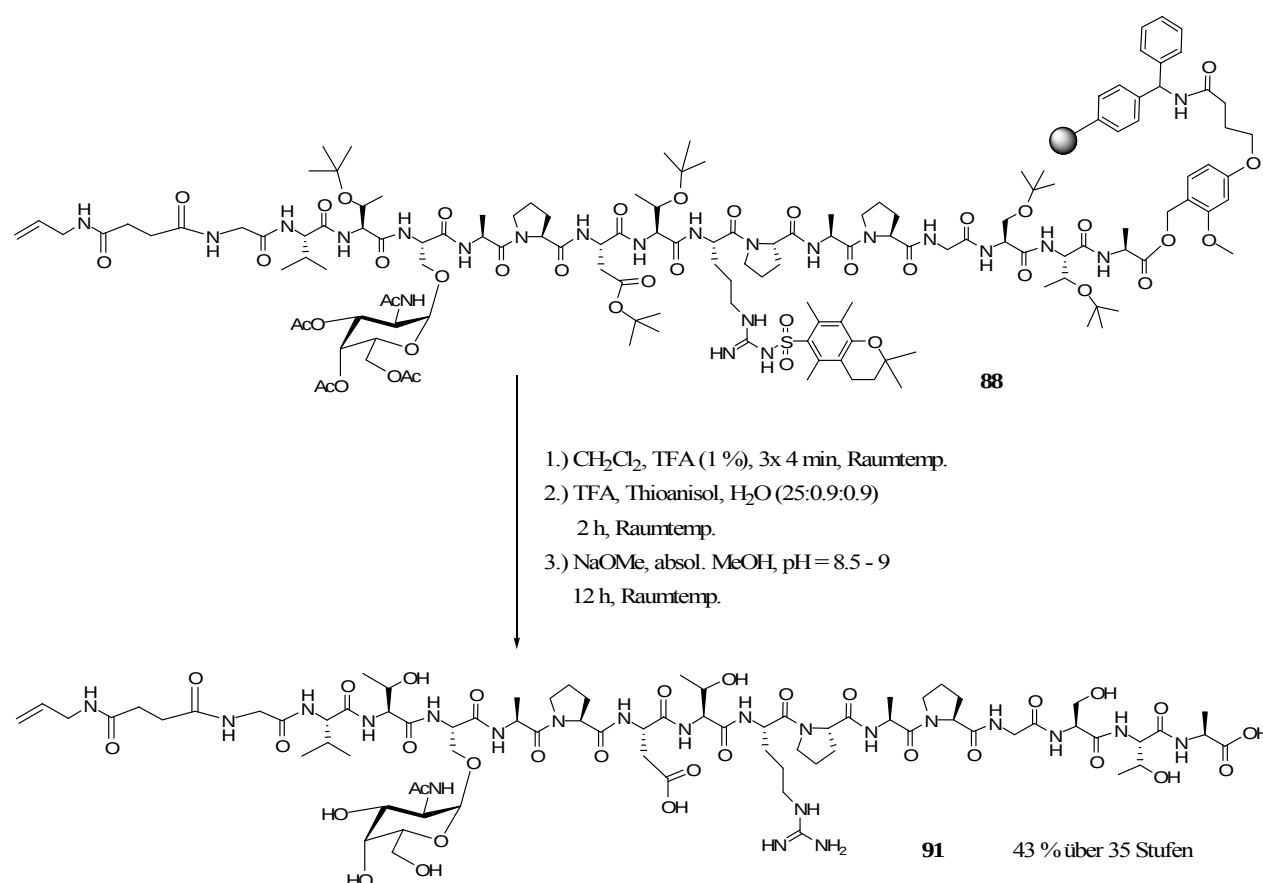
Die Einführung der olefinischen Bindung ist grundsätzlich durch die Kupplung von Allylamin in Lösung an die C-terminale Carboxylfunktion der Glycopeptide analog zur Synthese der Allylamido-Modellaminosäuren möglich. Dennoch bietet die Einführung der Allylamid-Funktion während der Peptid-Festphasensynthese die bereits in Kapitel 3.3.1 genannten Vorteile einer Synthese an der festen Phase. Um die Allylfunktion in der Peptid-Festphasensynthese einführen zu können, wurde die Mono-*N*-Allylamidobornsteinsäure **87** als Festphasensynthesebaustein synthetisiert. Dazu wurde Bornsteinsäuremonomethylesterchlorid **89** mit einem Äquivalent Allylamin in Gegenwart von Triethylamin in einer Aminolyse umgesetzt und der Allylamidobornsteinsäuremethylester **90** anschließend mit wässriger Lithiumhydroxid-Lösung in THF verseift. Nach der Reinigung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 81 % über zwei Stufen erhalten. Das Spacer-Molekül **87** kann unter den Kupplungsbedingungen der Aktivestermethode (TBTU, HOBT, DIPEA) in der Festphasen-Peptidsynthese problemlos in das Glycopeptid eingeführt werden.



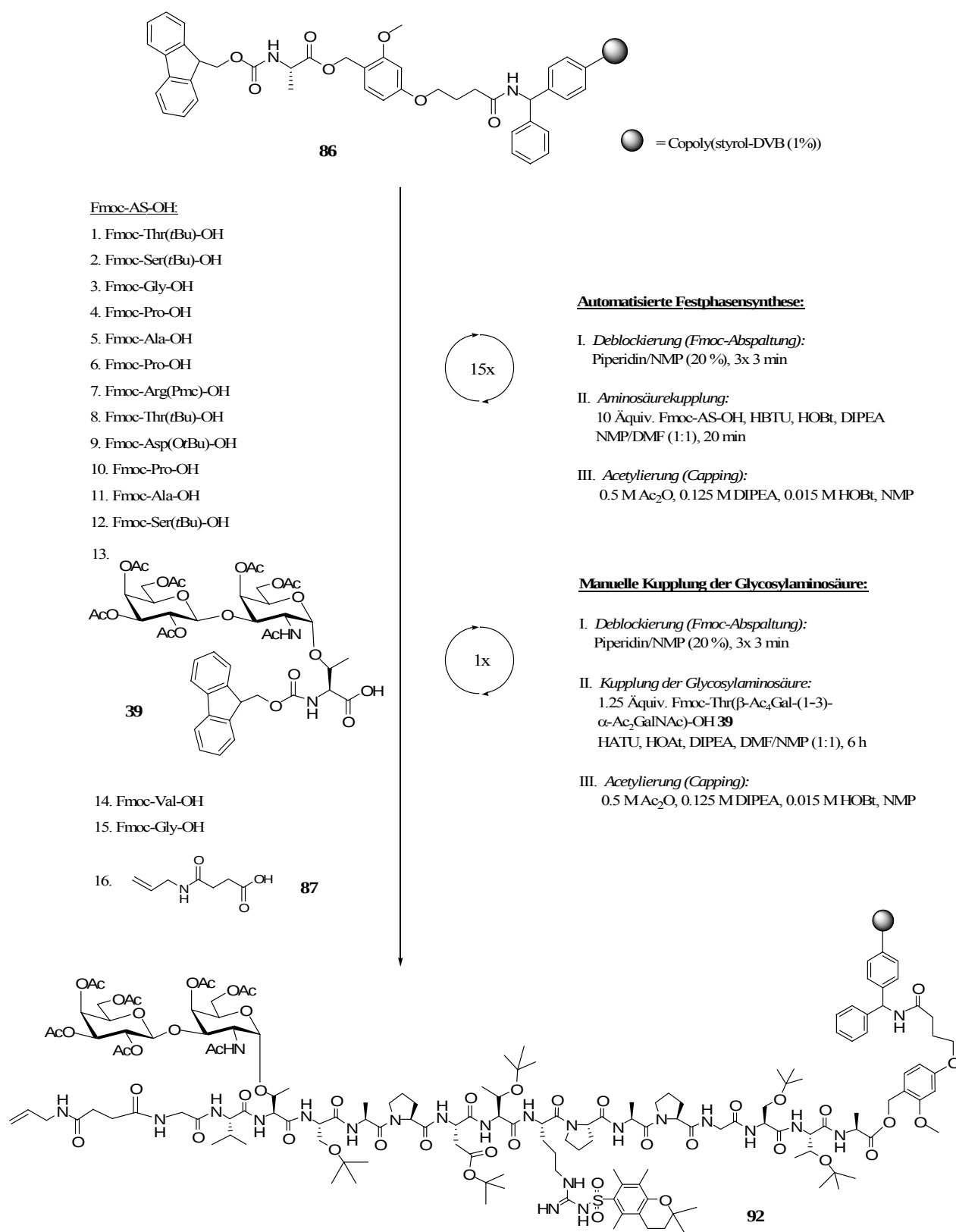
Schema 3.37: Herstellung der Mono-*N*-Allylamidobornsteinsäure **87**.

Die Abspaltung des geschützten Glycopeptids gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift (s. Kapitel 3.3.3) mit 1%iger Trifluoressigsäure in Dichlormethan vom polymeren Träger gelang selektiv unter Erhalt aller säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen. Das T_N-Glycohexadecapeptid konnte in hoher Ausbeute nach dem Entfernen des Pyridinium-Trifluoracetats durch Extraktion mit 0.5%iger Essigsäure bzw. 0.1%iger Trifluoressigsäure und Wasser erhalten werden.

Um das Glycopeptid in einer Biokonjugation einzusetzen, musste es noch deblockiert werden. Die vollständige Abspaltung aller säurelabilen Schutzgruppen erfolgte innerhalb von zwei Stunden mit Trifluoressigsäure und dem Zusatz von Thioanisol sowie Wasser als Kationenabfangreagenzien. Die Aufarbeitung erfolgte durch digerieren mit Pentan und Diethylether. Dadurch konnten das Thioanisol und das Abspaltungsprodukt der Pmc-Schutzgruppe zu einem sehr hohen Anteil entfernt werden. Die Abspaltung der Pmc-Schutzgruppe verlief also unter den gewählten Reaktionsbedingungen glatt. Die Deacetylierung der Galactosamineinheit erfolgte durch eine Zemplén-Umesterungsreaktion in absolutem Methanol bei einem pH-Wert von 8.5-9, der durch Zutropfen einer 1%igen Natriummethanolat-Lösung eingestellt wurde. Nach der Neutralisation mit verdünnter Trifluoressigsäure erfolgte die Reinigung des Rohproduktes durch präparative RP-HPLC. Auf diese Weise erhielt man das komplett deblockierte T_N-Hexadecaepetid **91** in einer Ausbeute von 43 % über 35 Stufen.



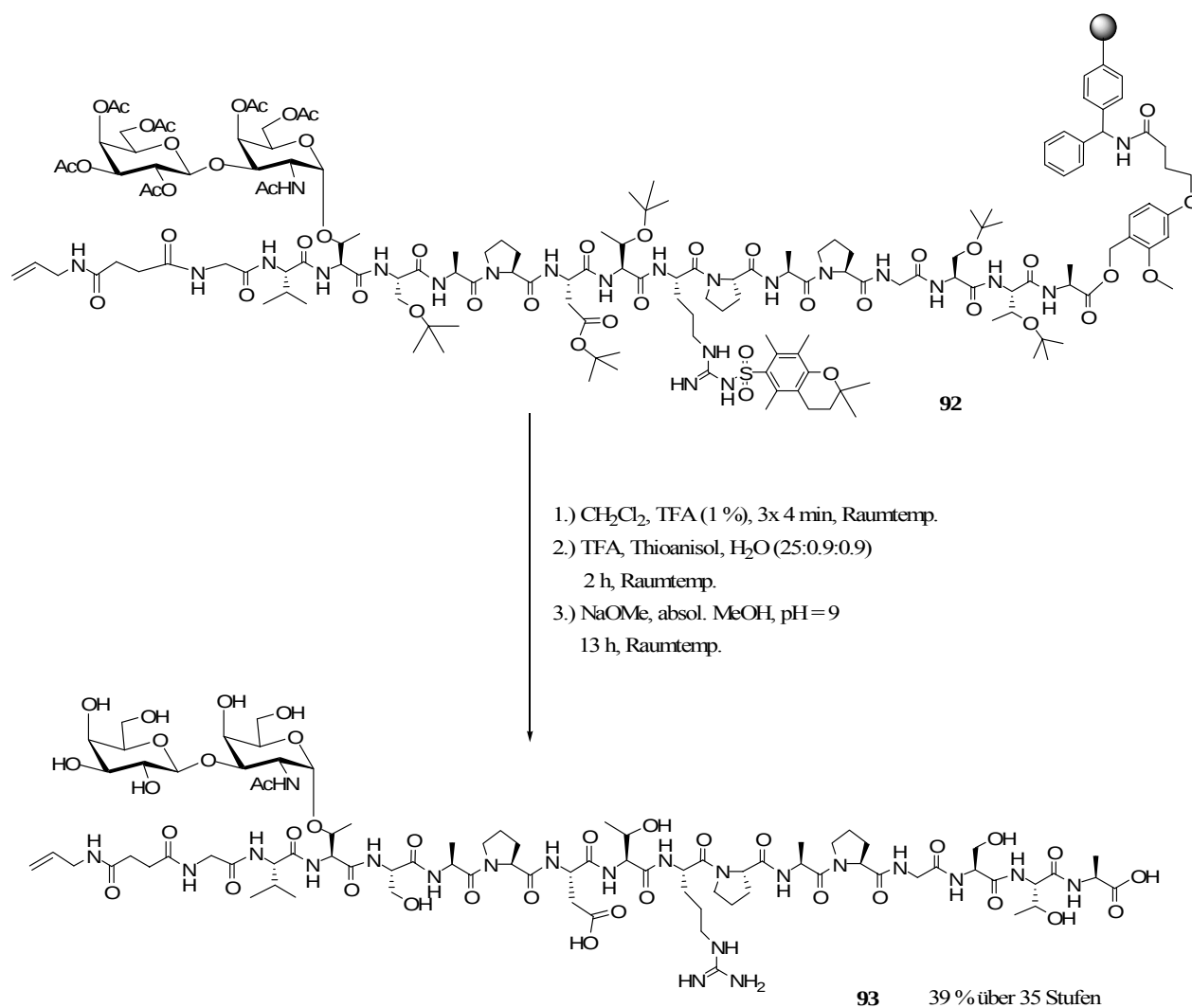
Schema 3.38: Acidolytische Abspaltung vom polymeren Träger und Deblockierung zum T_N-Glycohexadecaepetid **91**.



Schema 3.39: Festphasensynthese des polymergebundenen T-Antigen-Glycohexadecapeptids **92**.

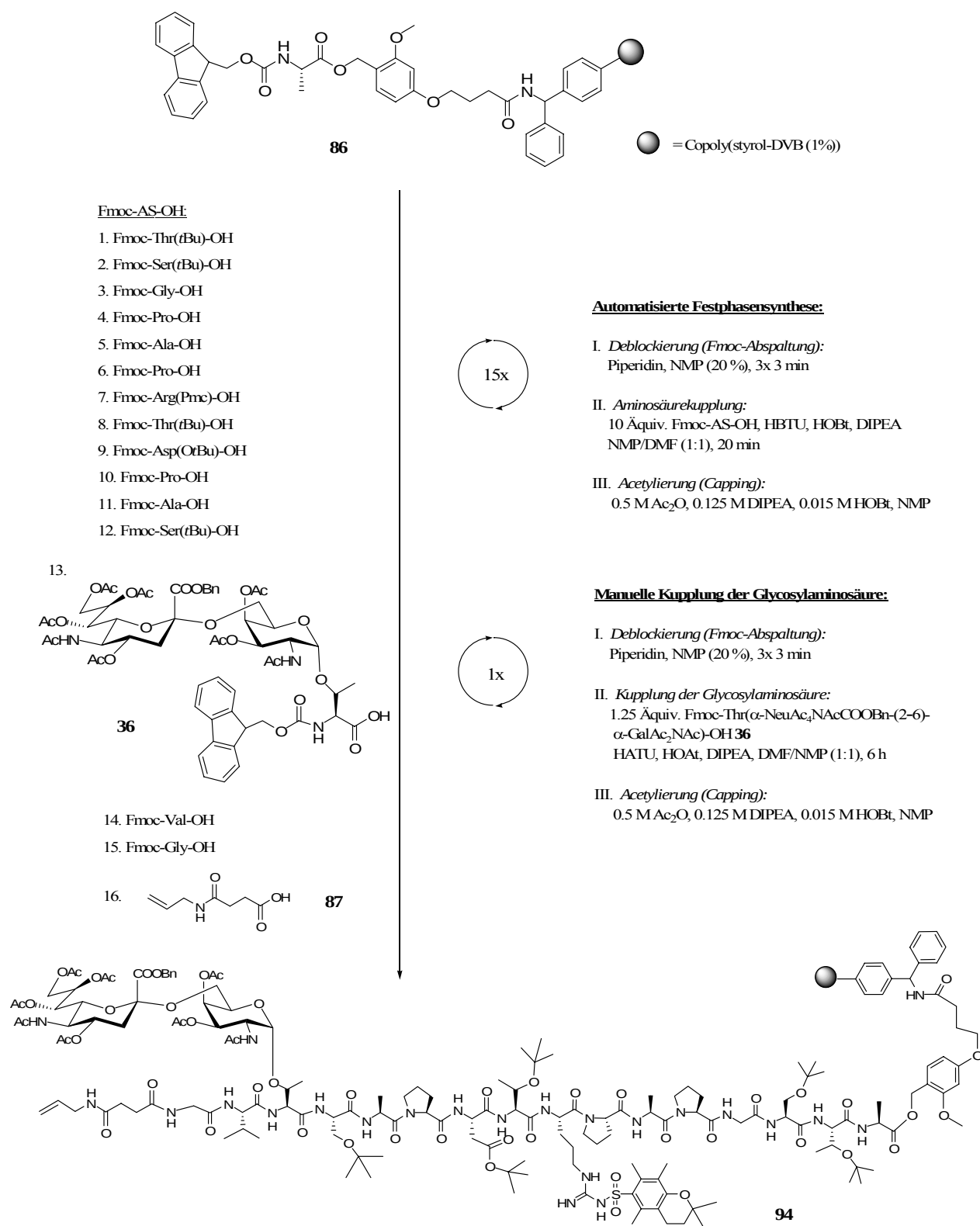
Die automatisierte Peptid-Festphasensynthese des T-Antigen enthaltenden Hexadecapeptids **93** erfolgte nach dem allgemeinen Protokoll der Peptid-Festphasensynthese in analoger Weise zur Synthese des T_N-Glycohexadecapeptid **91** in einem 0.1 mmol Ansatz. Dabei wurde der Threonin-T-Antigen-Baustein eine Position später als das T_N-Antigen in der Peptidsynthese eingesetzt. Antikörperbindungsstudien mit dem monoklonalen Antikörper C595, der gegen die Sequenz RPAP des Epitops der MUC1-Wiederholungseinheit zeigten, dass durch eine Glycosylierung an dieser Stelle der Bindungseffekt verstärkt wird.^[277] Die manuelle Kupplung von 1.25 Äquivalenten der T-Antigen-Glycosylaminosäure **29** erfolgte wieder unter Verwendung der Reagenzien HATU und HOAt. Bei der Synthese konnte im UV-Abspaltungsprotokoll nach der Kupplung des Saccharid-Bausteins kein Abfall der UV-Absorption beobachtet werden, was trotz des geringen Überschusses an Glycosylaminosäure auf eine vollständige Kupplung derselben hindeutete und sich in einer Ausbeute von 39 % über 35 Stufen widerspiegelte.

Nach der Abspaltung vom Harz erfolgte die acidolytische Spaltung der *tert*-Butyl- und der Pmc-Schutzgruppen durch Einwirkung von Trifluoressigsäure mit den Abfangreagenzien Thioanisol und Wasser sowie die Deacetylierung mit methanolischer Natriummethanolat-Lösung (pH = 9) am Saccharid. Nach der Reinigung mittels präparativer RP-HPLC konnte das zur Konjugation einsetzbare Glycopeptid als farbloses Lyophilisat erhalten werden. Die korrekte Struktur der Glycopeptide **91** und **93** konnte durch massenspektrometrische sowie zweidimensionale NMR-spektroskopische Untersuchungen belegt werden.



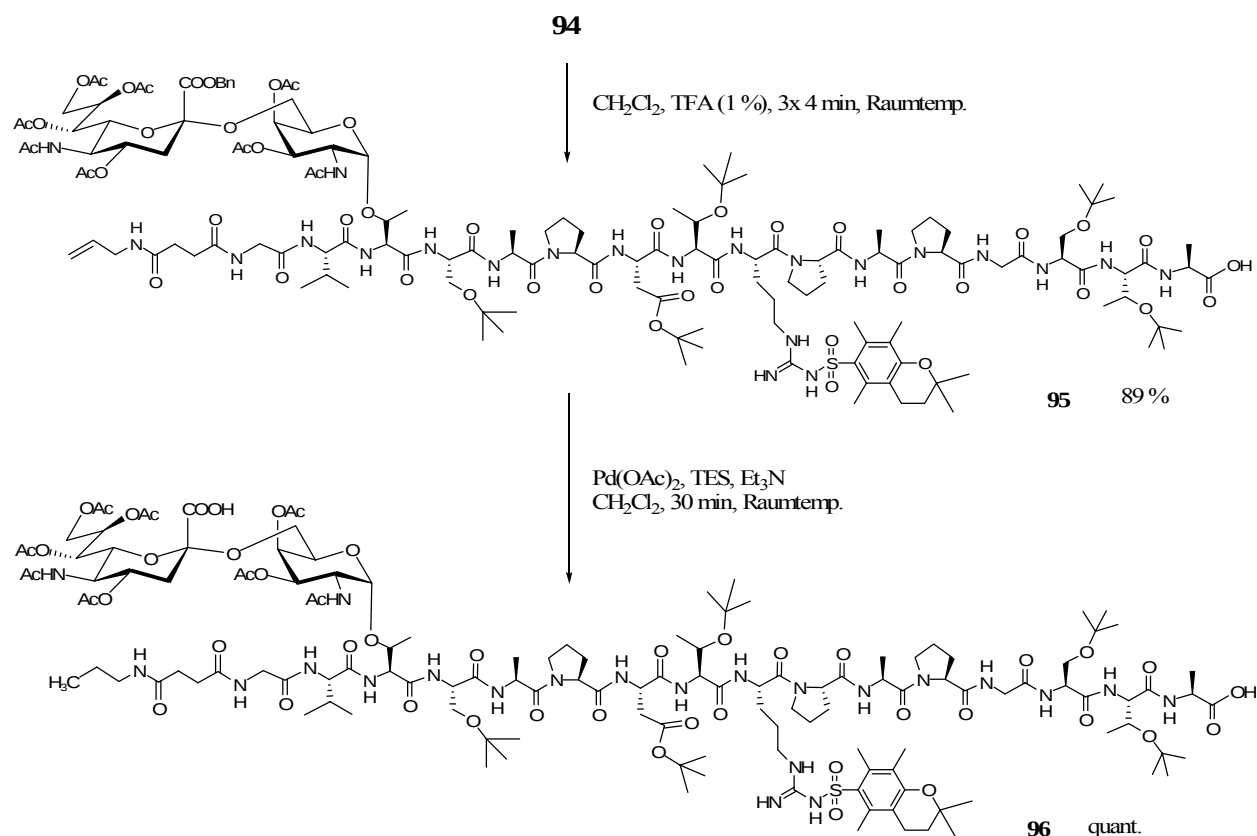
Schema 3.40: Abspaltung vom Harz und Deblockierung zum T-Antigen-Glycohexadecapeptid **93**.

Die Synthese des Glycohexadecapeptids **101** mit der ST_N -Antigen-Struktur erforderte eine Abwandlung bei der Einführung des olefinischen Spacer-Moleküls. Zunächst wurde das ST_N -Glycopeptid mit dem Allylspacer **87** in analoger Weise zu den bisher durchgeführten Synthesen durch eine automatisierte Peptid-Festphasensynthese aufgebaut, was in 89%iger Ausbeute auch gelang.



Schema 3.41: Festphasensynthese des Harz-gebundenen ST_N-Antigen-Glycohexadecapeptids **94**.

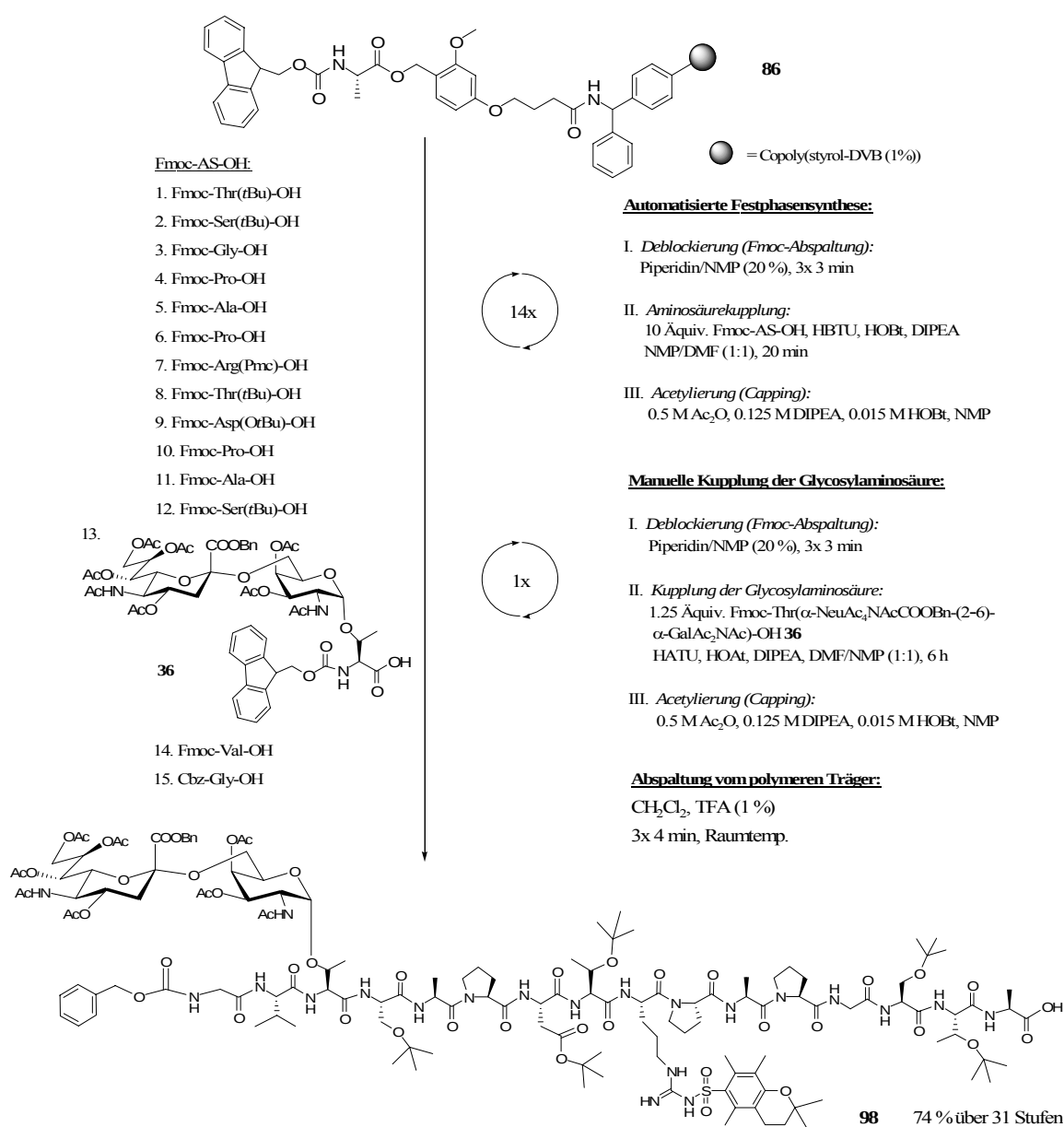
Die Deblockierung des Glycopeptids **94** erforderte dann die Abspaltung der Benzylester-Schutzgruppe, die wegen ihrer milderen Abspaltbedingungen im Vergleich zu der sonst eingesetzten Methylester-Schutzgruppe ausgewählt wurde. In der Literatur ist die Abspaltung von Benzylester- und Benzylether-Schutzgruppen in Gegenwart von leicht reduzierbaren Gruppen durch die Verwendung von Palladium(II)acetat und Triethylsilan in Dichlormethan beschrieben.^[278]



Schema 3.42: Abspaltung vom polymeren Träger und Versuch der selektiven Debenzylierung im ST_N-Glycohexadecapeptid **95**.

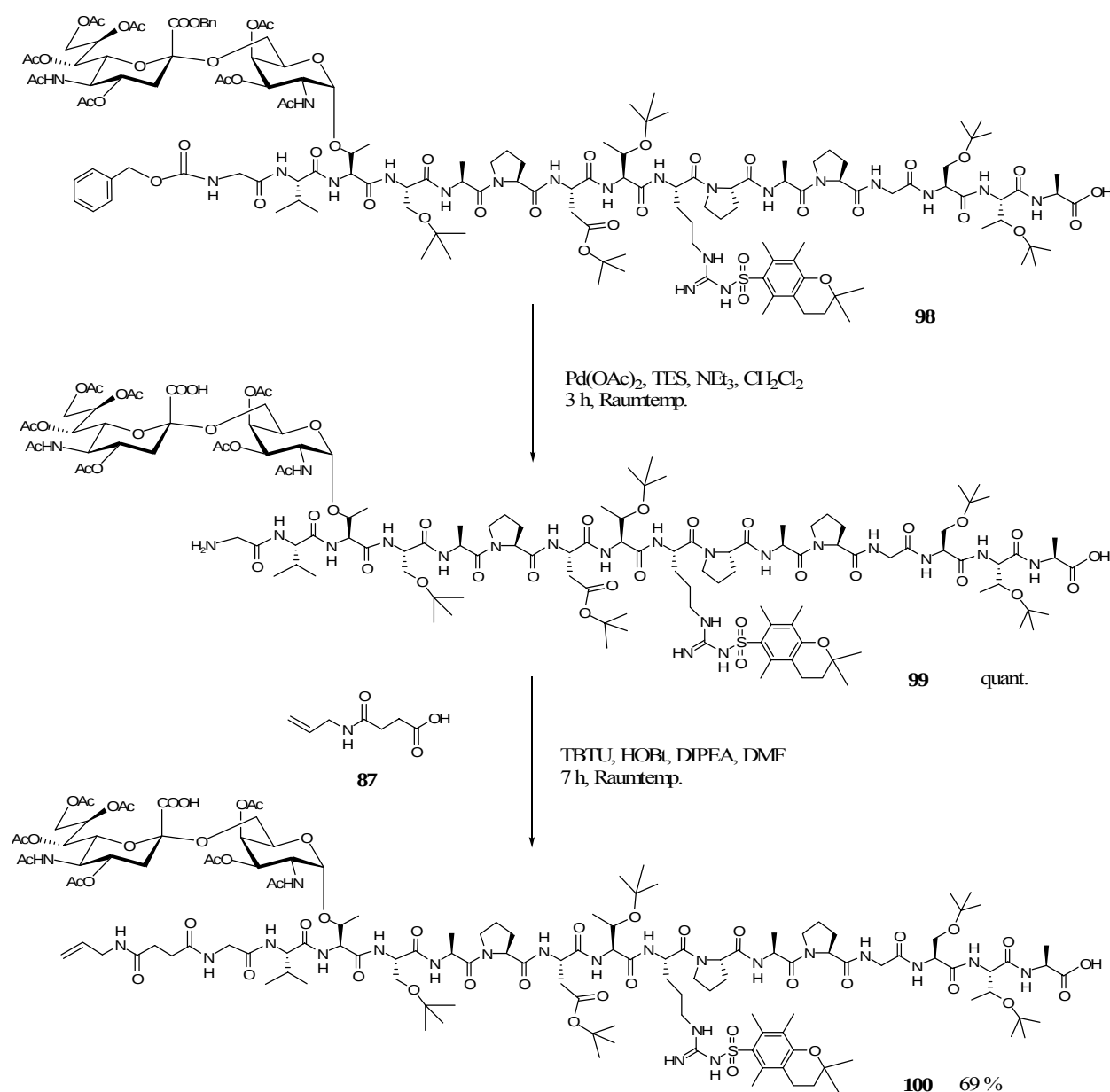
Diese Methode konnte nicht auf Verbindung **94** übertragen werden, denn die massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analyse zeigten nur das Vorliegen des Glycopeptids **95** an bei der der Benzylester vollständig abgespalten war, aber auch die Doppelbindung reduziert wurde.

Um dieses Problem zu lösen und zur Zielverbindung **101** zu gelangen, wurde daraufhin das Glycopeptid **98** hergestellt. Bei diesem ist der *N*-Terminus mit der von L. Zervas entwickelten Benzyloxycarbonyl-(Cbz)-Schutzgruppe^[279] blockiert. Die Glycopeptid-Festphasensynthese wurde an 0.1 mmol Fmoc-L-Alanin-HMPB-BHA-Harz **86** nach der allgemeinen Synthesevorschrift durchgeführt. Dabei kamen 1.25 Äquivalente des ST_N-Threonin-Bausteins und die Reagenzienkombination HATU/HOAt sowie als letzte Aminosäure in der iterativen Synthesesequenz Cbz-geschütztes Glycin zum Einsatz.



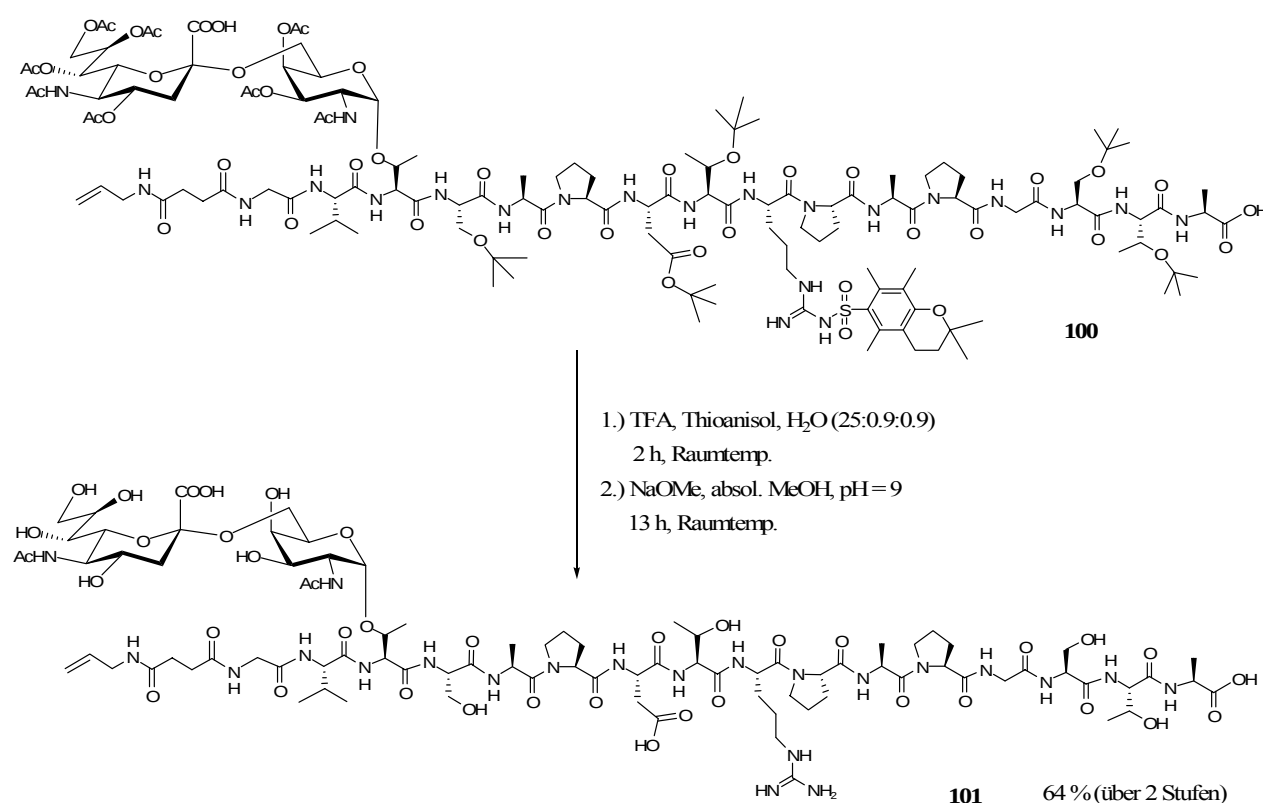
Schema 3.43: Synthese des *N*-terminal Cbz-geschützten ST_N-Glycohexadecapeptids **98**.

Nach der acidolytischen Abspaltung vom Harz konnte das vollständig blockierte Glycohexadecapeptid **98** als farbloses Lyophilisat in 74%iger Ausbeute (31 Stufen) erhalten werden. Die gut in Dichlormethan lösliche Verbindung wurde dann den milden Reaktionsbedingungen einer katalytischen Transferhydrierung unterworfen, die mit Triethylsilan als Wasserstoff-Donor durchgeführt wurde.



Schema 3.44: Hydrogenolytische Abspaltung der Benzylester- und der Cbz-Schutzgruppe im ST_N -Antigen-Glycohexadecapeptid und Kupplung des Allylamido-bernsteinsäure-Spacers **87**.

Dabei ist zu bemerken, dass die vollständige Abspaltung der Cbz- und der Benzylester-Schutzgruppe an diesem komplexen Molekül ohne die Bildung von Nebenprodukten und innerhalb von drei Stunden ablief. Die Aufarbeitung erfolgte durch Waschen der Reaktionslösung mit Ammoniumchlorid-Lösung sowie durch die Filtration über eine RP-Kieselgel-Kartusche, durch zweimalige Kodestillation mit Toluol und finaler Lyophilisation. Das *N*-terminale deblockierte Glycopeptid **99** wurde dann mit dem Bernsteinsäure-Spacer **87** in Lösung gekuppelt. Dazu wurde das Spacer-Molekül **87** mit TBTU/HOBt in DMF voraktiviert und dann im zweifachen Überschuss zum Glycopeptid gegeben. Nach der Reinigung durch präparative RP-HPLC wurde das Allylamido-Glycopeptid **100** erhalten.



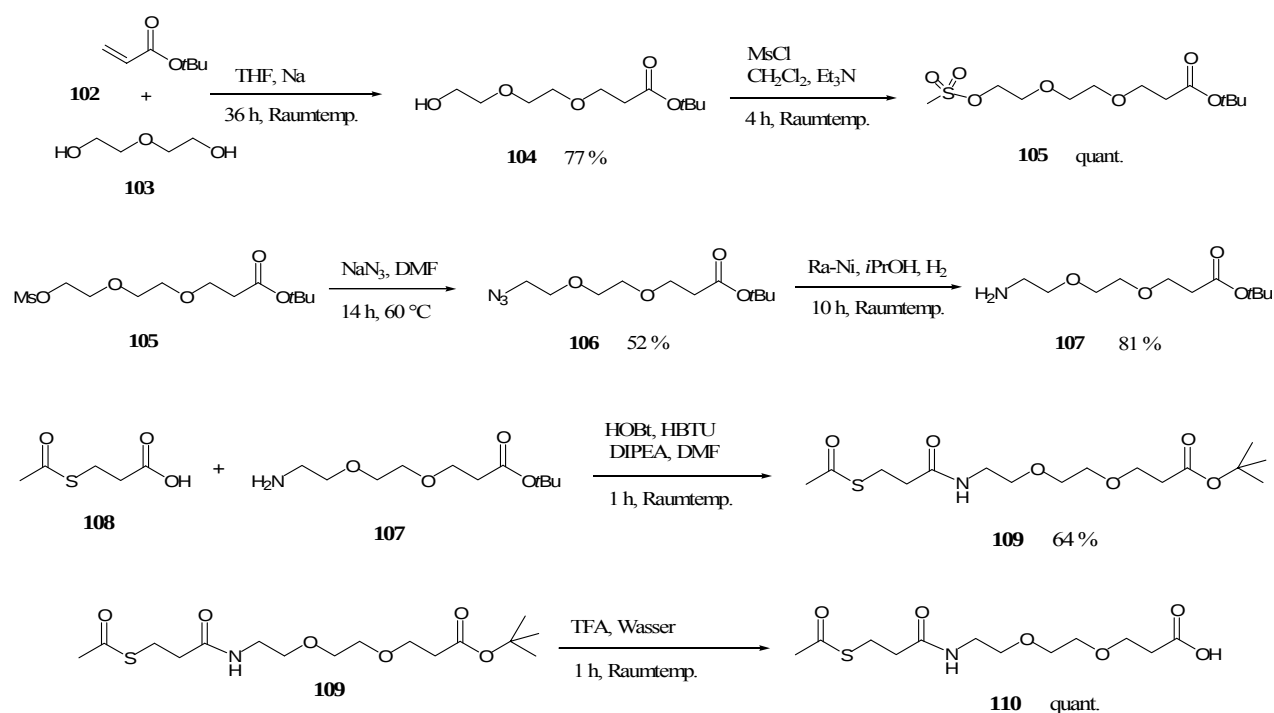
Schema 3.45: Abspaltung der säurelabilen und basenlabilen Schutzgruppen im ST_N-Antigen-Glycohexadecapeptids **100**.

Von diesem Allyl-modifizierten Glycopeptid **100** konnten dann anschließend die Acetylgruppen durch Umesterung (NaOMe, MeOH, pH = 9) und die säurelabilen Schutzgruppen acidolytisch (TFA, Thioanisol, Wasser) wie bei den vorhergehenden Glycopeptidsynthesen entfernt werden, sodass schließlich das ST_N-Glycohexadecapeptid in einer Ausbeute von 64 % erhalten werden konnte. Die Reinigung der Substanz erfolgte mit Hilfe der präparativen RP-HPLC.

3.4 Die Herstellung der Glycopeptid-Trägerprotein-Konjugate

Um mögliche sterische Hinderungen bei der Kupplung von Glycopeptiden an das Trägerprotein zu vermeiden und eine bessere Präsentation der Haptene auf dem Trägerprotein zu erzeugen, soll das Trägerprotein mit einem Thiol-Ethylenglycolspacer modifiziert werden. Außerdem ist die hydrophile Eigenschaft des Spacers im Hinblick auf die Kupplung von hydrophoben Haptenen interessant.

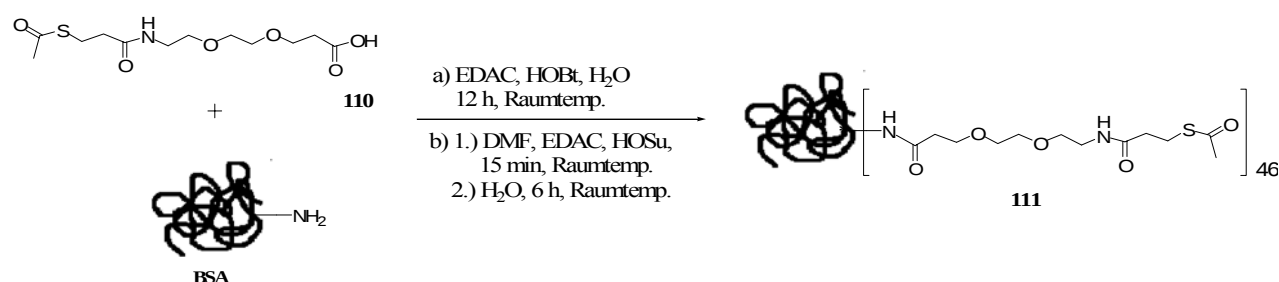
In einer Michael-Addition wird Diethylenglycol mit Acrylsäure-*tert*-butylester zur Reaktion gebracht. In dem nächsten Schritt wird aus der Hydroxygruppe mit Mesylchlorid und Triethylamin quantitativ das Methansulfonat **105** gebildet. Die Fluchtgruppe wird in einer nucleophilen Substitution mit Natriumazid in DMF durch die Azidogruppe ersetzt. Die darauf folgende Reduktion des Azido-Derivates **106** erfolgte mit Wasserstoff und Raney-Nickel in Isopropanol. Der Aminoethylenglycol-Baustein **107** stand dann für die Bildung eines Amids mit der Thiol-Carbonsäure **108** zur Verfügung. Thiole neigen in Gegenwart von Sauerstoff zur Bildung von Disulfiden. Um dies zu verhindern, wurde das Thiol mit einer Acetylgruppe. Die Idee dabei war es, die Schutzgruppe erst kurz vor der radikalischen Kupplung des Glycopeptids mit dem Protein abzuspalten. Dafür darf die Schutzgruppe zum einen die Wasserlöslichkeit der Verbindung nicht stark erniedrigen und zum anderen sollte sie in einem wässrigen Medium unter milden Bedingungen abspaltbar sein, die das Trägerprotein nicht angreifen. In der Affinitätschromatographie werden Proteine über ihre Carboxylgruppe als Thiolester an mit Thiolgruppen modifizierte Agarose gebunden und dann nach der Reinigung wieder mit 1 M NH_2OH -Lösung eluiert.^[280] Bereits von I. M. Klotz *et al.* ist diese milde Abspaltung mit 0.05 M Hydroxylamin-Lösung und der damit verbundene Einsatz im Gebiet der Protein-Modifikation beschrieben worden.^[281]



Schema 3.46: Synthese des S-Acetylthioethylglycol-Spacers **110**.

Thiolester sind gegenüber Nucleophilen reaktiver als die entsprechenden Ester. Die S-Acetyl-Schutzgruppe ist durch Amine wie z.B. 2-Methoxyethylamin abspaltbar.^[282] Trotz etwaiger Nebenreaktionen (Acetylierung der Aminofunktion oder Abspaltung der Schutzgruppe) konnte die Reaktion der S-Acetyl-3-mercaptopropionsäure **108** mit dem Aminoethylglycol **107** unter Voraktivierung mit TBTU/HOBt und einem Überschuss an zu kuppelnder Carbonsäure in 64%iger Ausbeute durchgeführt werden. Die Behandlung dieser Verbindung mit Trifluoressigsäure führte zu der in Modifizierungen von Proteinen einsetzbaren (12-(S-Acetyl-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonansäure **110**.

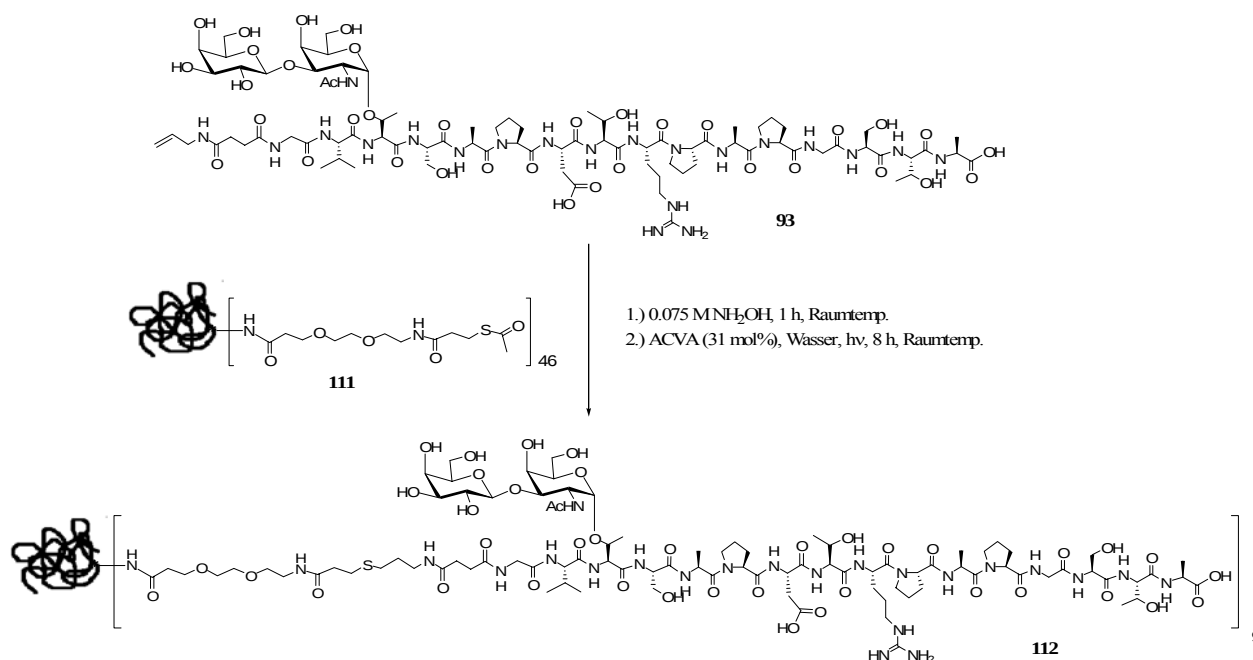
Als Trägerprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumine) ausgewählt. Dieses Protein besteht aus 582 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 66700 g/mol. In der Aminosäuresequenz befinden sich 59 Lysin-Moleküle. Mit der freien N-terminalen Aminofunktion liegen im BSA 60 freie Aminogruppen vor, wobei allerdings nur etwa 30 auf der Außenseite des Proteins liegend für eine Reaktion theoretisch zur Verfügung stehen. Die Anbindung des Glycolspacers **110** erfolgte bei Raumtemperatur im wässrigen Milieu bei einem schwach sauren pH-Wert. Als Kupplungsreagenz wurde das wasserlösliche N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (EDAC) mit 0.1 Äquivalenten an HOBt als Zusatz verwendet.^[283] Die Reinigung des modifizierten Proteins erfolgte durch Dialyse gegen Wasser.



Schema 3.47: Modifikation des Rinderserumalbumins (BSA) mit dem S-Acetylthioethylenglycol-Spacer **110**.

Zur Charakterisierung von Protein-Hapten-Konjugaten kann die matrixassistierte Laserdesorptions/ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie herangezogen werden.^[284] Mit Hilfe dieser Methode konnte ein durchschnittliches Molekulargewicht von 73639 g/mol des Spacer modifizierten Proteins **111** nachgewiesen werden, was somit eine Beladungsdichte von 24 Spacer-Molekülen pro BSA-Molekül bedeutet. Ändert man die Reaktionsführung, indem man durch die Umsetzung des Diethylenglycolspacers **110** mit EDAC und *N*-Hydroxysuccinimid im Lösemittel DMF den Aktivester vorbildet und diese Mischung dann zur wässrigen Protein-Lösung gibt, ist es möglich die Beladungsdichte auf 46 Spacer-Moleküle pro Protein-Molekül (Molekulargewicht: 80936 g/mol) zu steigern. Dabei bleibt die Wasserlöslichkeit des Proteins erhalten.

Zur Abspaltung der S-Acetylgruppen wurde das gefriergetrocknete, modifizierte BSA **111** in 0.075 M Hydroxylamin-Lösung gelöst und nach einstündigem, leichtem Rühren entfernt man die Hydroxylamin-Lösung durch die Dialyse gegen Wasser. Das nun mit freien Thiol-Gruppen belegte BSA-Protein wurde zusammen mit dem T-Antigen-Glycopeptid **93** in entgastem Wasser gelöst und unter Verwendung von 31 mol% ACVA sechs Stunden bestrahlt. Das Glycopeptid und der Radikalstarter wurden anschließend durch eine erschöpfende Dialyse gegen destilliertes Wasser entfernt.



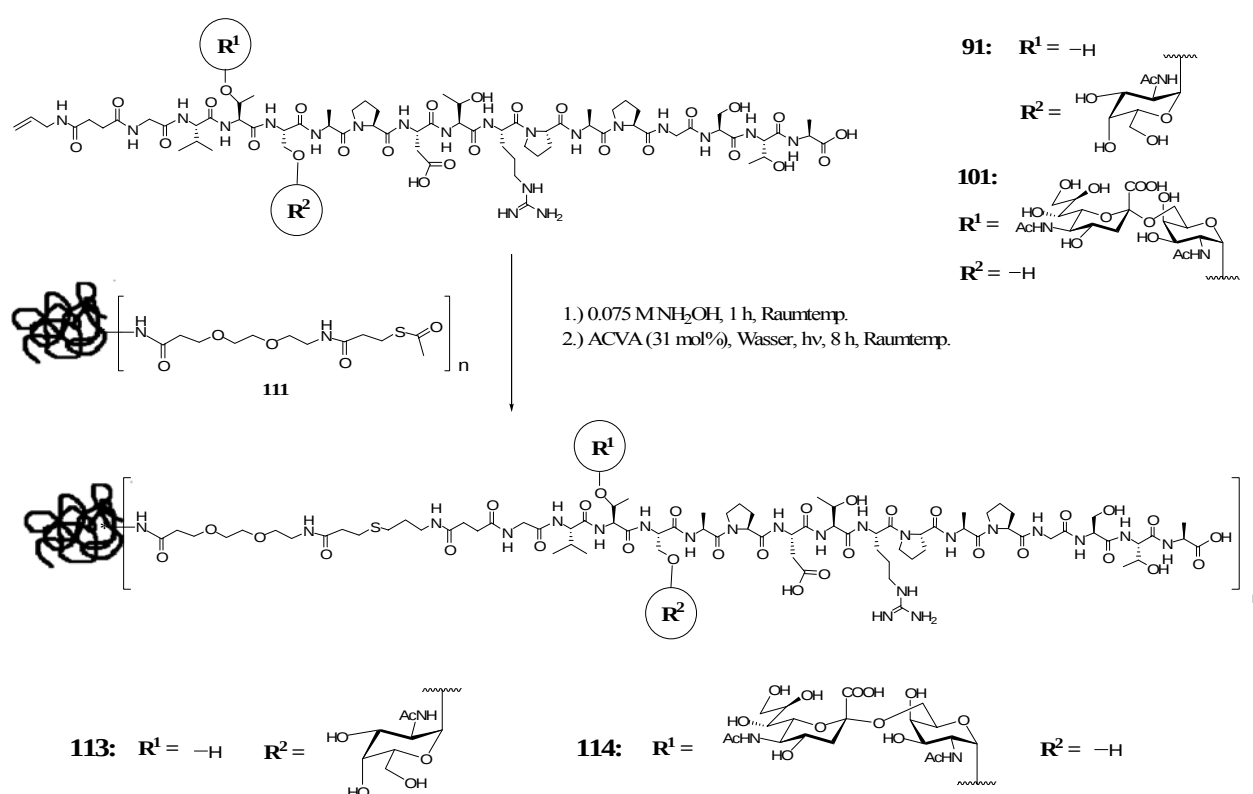
Schema 3.48: Synthese des T-Antigen-Glycopeptid-Protein-Konjugates **112** durch eine radikalische Thiol-Addition.

Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen konnte eine starke Intensitätsabnahme beim Vermessen des modifizierten BSA **111** im Vergleich zu reinem BSA festgestellt werden. Bei den Glycopeptid-Konjugaten **112**, **113** und **114** schreitet der Intensitätsverlust weiter fort, sodass keine aussagekräftigen und eindeutigen MALDI-Massenspektren erhalten wurden. Auch Optimierungsversuche bei der für die MALDI-Massenspektrometrie besonders entscheidenden Probenpräparation wie die Wahl der Matrix (z.B. Sinapinsäure, 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure, α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, Ferulasäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure), Variation der Lösemittel (Acetonitril, Wasser, Methanol, Ameisensäure) sowie deren Konzentrationsverhältnis, Kristallisierungstechniken (Dried-droplet, Overlayer, Sandwich) und Additiven (Trifluoressigsäure, Natriumformiat) zeigten keinen Einfluss auf die Aufnahme der Massenspektren.^[285]

Eine andere Möglichkeit zur Beladungsbestimmung ist, das Saccharid im Glycopeptid mit Phenol/Schwefelsäure-Reagenz kolorimetrisch nachzuweisen.^[286] Exemplarisch wurde diese Untersuchung am Neoglycoprotein **112** durchgeführt. Durch das Erstellen einer Kalibriergerade mit D-Galactose konnte eine Beladung von 9 Molekülen des Glycopeptids **93** pro Molekül BSA festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Abspaltung der Schutzgruppe und die Additionsreaktion in einer Ausbeute von 20 % über zwei Stufen ablaufen.

Bezüglich der Beladungsdichte bleibt anzumerken, dass in der Literatur bekannten Immunisierungsversuchen gezeigt wurde, dass eine optimale Peptiddichte in einem Bereich von 5 bis 20 Molekülen pro BSA-Carrierprotein-Molekül liegt.^[164]

Mit der radikalischen Thiol-Addition konnte also eine selektive Verknüpfung eines komplexen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptids mit einem Trägerprotein erreicht werden. Die Bindung des Glycopeptid-Antigens über nur eine Position sollte es ermöglichen, dass potentiell die gesamte Glycopeptidkette mit den B-Zell-Rezeptoren in Wechselwirkung treten kann. Auf dieselbe Weise wurden auch das synthetisierte T_N-Glycohexadecapeptid **91** und das ST_N-Glycohexadecapeptid **101** an das Trägerprotein BSA gekuppelt.



Schema 3.49: Synthese der MUC1-Glycopeptid-Protein-Konjugate **113** und **114** ausgehend von dem T_N-Glycohexadecapeptid **91** bzw. ST_N-Glycohexadecapeptid **101**.

3.5 Die Synthese von cyclischen (Glyco)Peptiden mit einer Partialstruktur aus der Wiederholungseinheit des tumorassozierten MUC1

3.5.1 Synthese von Allylether- und Allylglycin-Aminosäurebausteinen

Für die Entwicklung von synthetischen Tumorstoffen ist es notwendig, die Struktur des auf Krebszellen vorhandenen Antigens so genau wie möglich nachzubilden, um eine selektive Immunantwort zu erzeugen.

Die Sekundärstruktur der Wiederholungseinheit des Glycoproteins MUC1 ist beschreibbar als eine stabförmige Struktur mit knaufartigen Motiven, die man als Polyprolin- β -Turn-Helices bezeichnen kann.^[287] Die PDTRP-Sequenz bildet darin die Spitze eines „hervorstehenden Knaufes“, der exponiert ist und eine stabile Turnstruktur bildet. Diese immundominante Region erreicht ihre stabile Konformation im Fall von synthetischen Peptiden mit zwei oder mehr Wiederholungseinheiten.^[288] Bei mehreren Wiederholungseinheiten wird vermutlich die Stabilität erhöht und die Präsentation dieses Strukturelementes begünstigt.^[289, 290]

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen in Lösung an glycosylierten Partialstrukturen aus der Wiederholungseinheit des MUC1 deuten auf das Vorliegen eines Turns in der immunologisch relevanten Region PDTRPAP hin. Die Art des Turns (Typ I β -, Typ II β -, inverser γ -Turn, etc.) ist aber vermutlich aufgrund einer konformationellen Heterogenität der synthetisierten, kurzen MUC1-Fragmente nicht eindeutig zu bestimmen.^[291, 292]

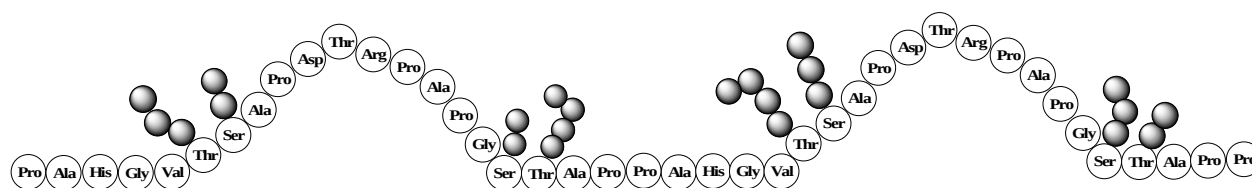


Abb. 3.4: Die knaufartige Struktur der Wiederholungseinheit des tumorassozierten MUC1.

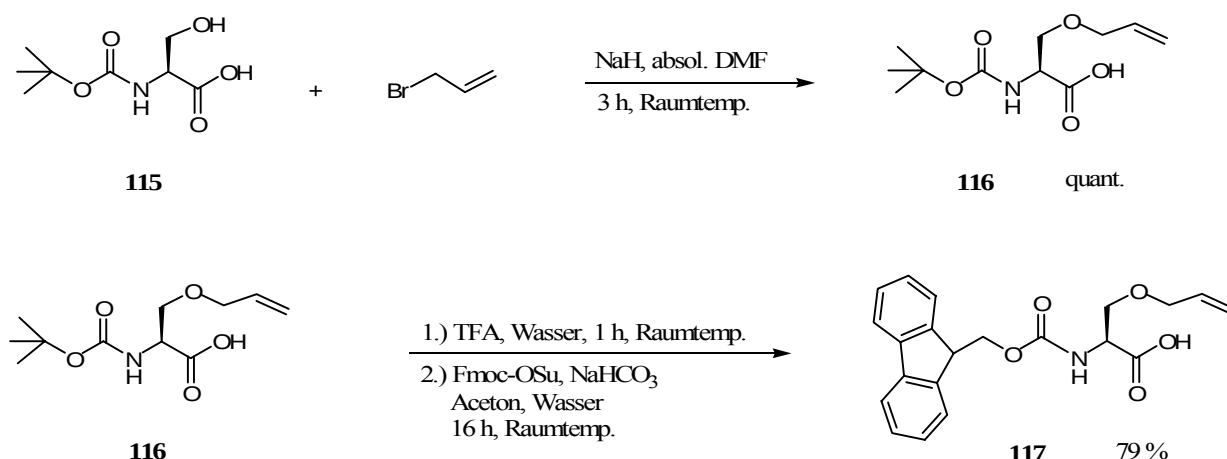
Daher schien es wünschenswert zu sein, die knaufartige Struktur der Wiederholungseinheit des MUC1-Proteins in einem kurzen Peptidsegment zu fixieren. In kurzen Peptiden geht sonst diese natürliche Form durch ein konformatives Gleichgewicht mit der gestreckten Form verloren.

Eine Möglichkeit, dieses Ziel zu erreichen, besteht darin, die Struktur in einem cyclischen Peptid festzuhalten. Ein weiterer Aspekt ist, dass die proteolytische Stabilität der cyclischen Peptide im Serum im Vergleich zu linearen Peptiden erhöht ist. Cyclische Epitop-Mimetika können als Immunogene Verwendung finden, um die Bildung von Antikörpern auszulösen, die mit dem Zielprotein kreuzreagieren. Ebenfalls können sie als Antigene zur Charakterisierung von Epitopen, die von Antikörpern erkannt werden, eingesetzt werden.^[293]

Cyclisierungen von Peptiden erreicht man in der Regel durch die Amidbindungsbildung am C- und N-Terminus (backbone to backbone cyclization), die Bildung einer Lactambrücke durch Verknüpfung zwischen Asparagin-/Glutaminsäure- und Lysinseitenketten oder die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke.^[294-297] Eine weitere Möglichkeit ist in der Cyclisierung durch eine Ringschlussmetathese (RCM) gegeben. Zur letzteren Vorgehensweise sind Arbeiten von R. H. Grubbs *et al.*^[298-300] und T. D. Clark *et al.*^[301] erschienen, die Sekundärstrukturen in Peptiden fixieren konnten. Als weitere Beispiele sind der „Rolling Loop Scan“,^[302, 303] die Synthese von Turn-Mimetika^[304] oder die Synthese von cyclischen Peptidantibiotika- oder Peptidhormon-Mimetika^[305] zu nennen.

Die Cyclisierung der (Glyco)Peptide sollte in dieser Arbeit durch eine Ringschlussmetathese (RCM) vollzogen werden. Die dafür nötige olefinische Bindung sollte in Form eines Fmoc-Serinallylethers und eines Fmoc-Allylglycin-Festphasenbausteins in das Peptid eingefügt werden.

Zur Herstellung des Serin-allylethers **116** erfolgte die Veretherung der Hydroxygruppe des *N*-Boc-geschützten Serins mit einem Äquivalent Allylbromid und zwei Äquivalenten an Natriumhydrid in DMF.^[306] Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden erhält man Verbindung **116** in quantitativer Ausbeute. Um das als Allylether modifizierte Boc-Serin **116** in einen in der Fmoc-Strategie einsetzbaren Aminosäurebaustein zu überführen, muss die *N*-terminale Boc-Schutzgruppe gegen die Fmoc-Schutzgruppe ausgetauscht werden. Die Abspaltung der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe erfolgte quantitativ mit wässriger Trifluoressigsäure (TFA/Wasser 95:5). Das entstehende Serintrifluoracetat konnte nach Lyophilisieren ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Reaktionsstufe eingesetzt werden.



Schema 3.50: Umsetzung von *N*-Boc-geschützten Serin **115** mit Allylbromid und Überführung des Serinallylethers **116** in den Fmoc-geschützten Peptid-Festphasenbaustein **117**.

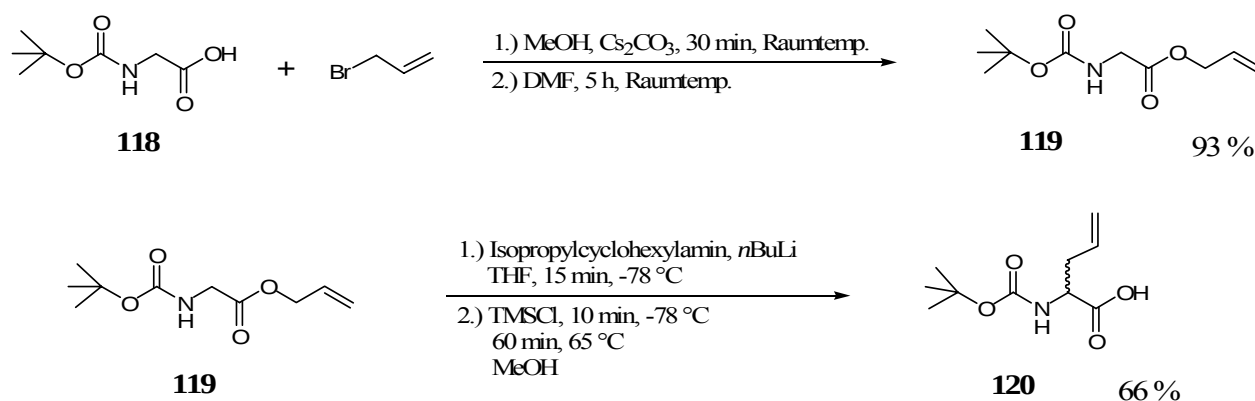
Im nachfolgenden Schritt wurde die freie Aminogruppe durch Umsetzung mit *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid (Fmoc-OSu) und Natriumhydrogencarbonat in einem Aceton/Wasser-Gemisch blockiert. Die Verwendung von Fmoc-OSu anstelle von Chlorameisensäure-(9-fluorenylmethyl)-ester (Fmoc-Cl) minimiert das Risiko der Aktivierung der Carboxylfunktion, womit die Amidbindungsbildung als Nebenreaktion unterbleibt. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhielt man den einsetzbaren Serin-allylether **117** in 79%iger Ausbeute.

Eine andere Möglichkeit zur Einführung der Doppelbindung ist in der unnatürlichen Aminosäure Allylglycin gegeben, die allerdings enantiomerenrein und mit dem richtigen Schutzgruppenmuster versehen sein muss.

Es gibt mehrere Methoden zur stereoselektiven Alkylierung von Glycin, z.B. über Bis-lactimether,^[307] Imidazolidinone,^[308] Oxazolidinone^[309] und Oxazinone.^[310] Es sollte in dieser Arbeit ein Weg entwickelt werden, der ein Allylglycin-Derivat für die Peptid-Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie auf möglichst einfache Weise ermöglicht. Schlüsselschritt sollte hierbei die Claisen-Umlagerung eines Alkylesterenolates sein.^[311-314]

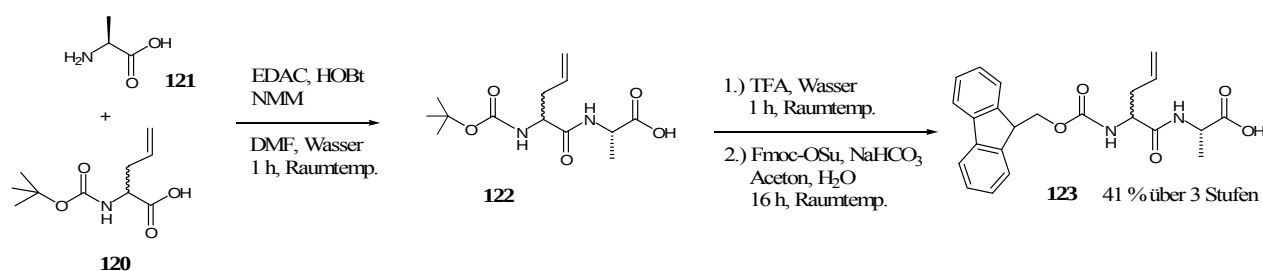
Ausgangsmaterial zur Synthese des Fmoc-geschützten Allylglycins **126** ist der Glycinallylester **119**. Zur Veresterung wurde das Cäsiumcarboxylat des *tert*-Butyloxycarbonylglycins mit Allylbromid in DMF umgesetzt. Die erhöhte Reaktivität des Cäsiumsalzes ist sowohl auf dessen Löslichkeit als auch auf die fehlende Ionenpaarbildung mit den Anionen zurückzuführen.

Der in 93%iger Ausbeute erhaltene Allylester **119** wurde dann einer Claisen-Ireland-Umlagerung^[315] unterzogen. Dabei ist die Wahl der *N*-terminalen Schutzgruppe des Glycinesters wichtig, denn diese muss unter den Bedingungen der Claisen-Umlagerung stabil sein und im Anschluss in hoher Ausbeute in eine Fmoc-Schutzgruppe überführbar sein. Der *N*-Boc-Allylester **119** wurde zunächst mit frisch hergestelltem erzeugten Lithiumisopropylcyclohexylamid in ein Esterenolat überführt, um dann mit Trimethylsilylchlorid in einen Silylenolester überführt zu werden.^[316] Dessen [3,3]-sigmatrope Umlagerung in das racemische Boc-Allylglycin **120** erbrachte eine Ausbeute von 66 %. Ebenso wie bei der Bildung des Allylesters **119** ließ sich das Produkt durch einfache Extraktionsschritte in hoher Reinheit isolieren.



Schema 3.51: Bildung des Glycinallylesters **119** und Claisen-Ireland-Umlagerung zum Allylglycin **120**.

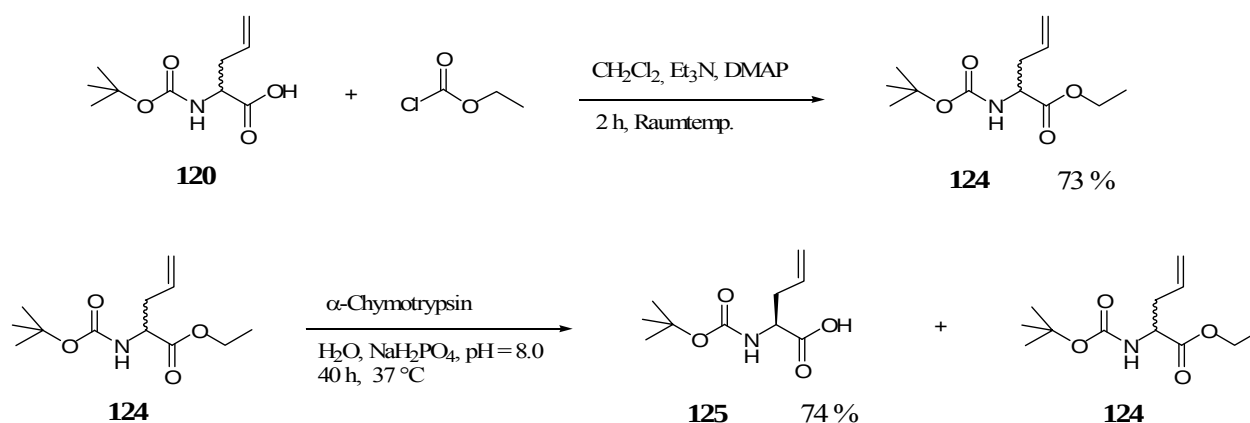
Es wurde zunächst versucht, das Enantiomerengemisch durch Bildung eines Dipeptids in Diastereomere zu überführen und diese dann chromatographisch zu trennen. Die Umsetzung des racemischen *N*-Boc-geschützten Allylglycins **120** mit L-Alanin gelang mit TBTU/HOBt als Kupplungsreagenzien in hoher Ausbeute.



Schema 3.52: Kupplung des Boc-L/D-Allylglycins **120** an L-Alanin und Überführung in das Fmoc-geschützte Dipeptid **123**.

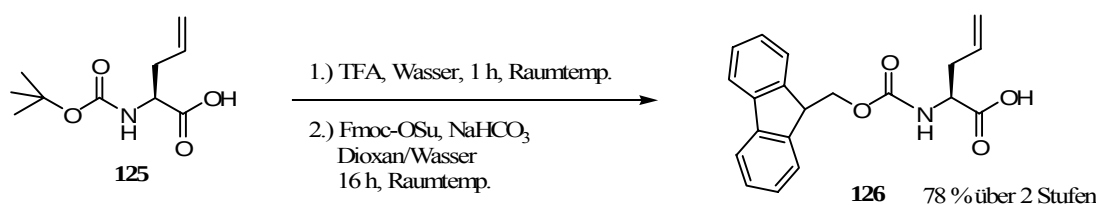
Allerdings konnte die erfolgreiche Trennung der *N*-Boc-geschützten Diastereomere **122** mittels der RP-HPLC im analytischen Maßstab nicht auf die präparative RP-HPLC übertragen werden. Ebenso ist der Fmoc-geschützte Baustein **123**, der durch Behandlung des Substrats **122** mit TFA und nachfolgender Reaktion mit Fmoc-OSu zugänglich ist, nicht durch präparative RP-HPLC auftrennbar. Jedoch kann es möglich sein, dass bei der Verwendung einer anderen Aminosäure als Alanin zur Bildung des Allylglycin-Dipeptids eine Trennung im präparativen Maßstab zu erzielen ist. Dies würde dann die Synthese von Diastereomeren reinen Fmoc-geschützten Allylglycin-Dipeptiden für die Peptid-Festphasensynthese in 5 Stufen ermöglichen. Die Trennung der Enantiomere der Allylglycin-Komponente **120** sollte auch über eine enzymatische Reaktion möglich sein. Um eine stereoselektive enzymatische Esterhydrolyse durchführen zu können, musste zunächst die mit der säurelabilen Boc-Schutzgruppe geschützte Aminosäure **120** unter milden Bedingungen in einen Ethylester überführt werden. Dies geschah durch die Reaktion des racemischen *N*-Boc-geschützten Allylglycins mit Chlorameisensäureethylester.^[317, 318] Die katalytische Zersetzung des sich intermediär bildenden gemischten Anhydrides mittels 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) führte auf milde Art und ohne die Bildung schwer abzutrennender Nebenprodukte bzw. Reagenzien zum *N*-Boc-geschützten Ethylester **124** in einer Ausbeute von 73 %.

Der Aminosäureethylester **124** wurde einer Protease-katalysierten enantioselektiven Hydrolyse unterzogen.^[319] Hierzu wurde der *N*-Boc-Allylglycin-ethylester in Phosphatpuffer (pH = 8, 0.1 M) aufgenommen und mit α -Chymotrypsin bei 37 °C 40 Stunden reagieren lassen. Durch einfache Extraktionsschritte konnte das Ester-Carbonsäure-Gemisch getrennt und das gewünschte Boc-(*S*)-Allylglycin-Derivat **125** in 74%iger Ausbeute erhalten werden.



Schema 3.53: Veresterung des (R,S)-Boc-Allylglycins **120** und enantioselektive Hydrolyse des Ethylesters **124**.

Von dem Boc-geschützten Allylglycin **125** wurde mit 95%iger wässriger Trifluoressigsäure die Boc-Gruppe entfernt und in das Produkt mit Fmoc-OSu in einer Dioxan/Wasser-Mischung und Natriumhydrogencarbonat als Base die Fmoc-Gruppe eingeführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung fiel der Allylglycin-Baustein **126** in einer Gesamtausbeute von 78 % an.



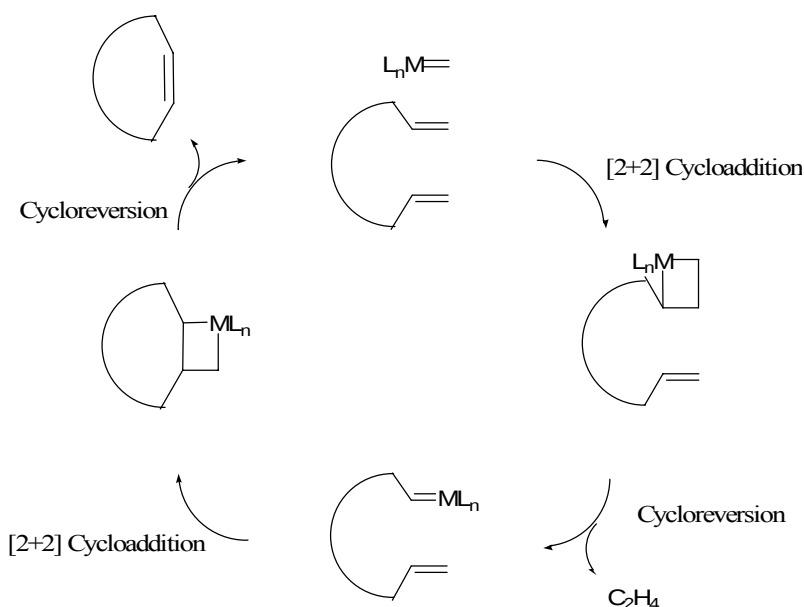
Schema 3.54: Fertigstellung des Fmoc-Allylglycin-Bausteins **126**.

Die Enantiomerenreinheit der Verbindung **126** wurde durch Überführen einer geringen Probenmenge an (S)-Fmoc-Allylglycin in das Dipeptid **123** und anschließende RP-HPLC-Analyse des entstehenden Diastereomers überprüft. Dabei wurde analog zur Synthese der Verbindung **123** vorgegangen (s. Schema 3.52).

Somit konnte ausgehend von Boc-geschütztem Glycin in 6 Stufen in einer Gesamtausbeute von 26 % der Peptid-Festphasenbaustein **126** synthetisiert werden.

3.5.2 Die Ringschlussmetathese

Bei der Olefinmetathese kommt es formal zu einem übergangsmetallkatalysierten Austausch von Alkylidenresten zwischen zwei Alkenen (griechisch „meta“ = Austausch; griechisch „thesis“ = Position). Die Metathesereaktion durchläuft dabei eine Serie von sich wiederholenden Reaktionsschritten, in denen Metallcarben-Zwischenstufen die Schlüsselspezies bilden. Zunächst erfolgt die Addition eines Metallcarbenkomplexes an eine C-C-Doppelbindung zu einem Metallacyclobutan-Intermediat. Eine sich anschließende Retro-[2+2]-Cycloaddition (Cycloreversion) lässt unter Abspaltung von Ethen eine neue Metallcarben-Spezies entstehen. Diese bildet in einer erneuten [2+2]-Cycloaddition mit einem weiteren Olefin ein neues Metallacyclobutan-Derivat, welches wiederum in einer Cycloreversion zerfällt und das gewünschte Metatheseprodukt freisetzt. Der regenerierte Metallcarbenkomplex tritt wieder in den Zyklus ein, um weiteres Olefin umzusetzen. Es bleibt anzumerken, dass jeder dieser Schritte reversibel ist. Ebenfalls sollte erwähnt werden, dass die in Metathesen eingesetzten Komplexe genau genommen eher Initiatoren als Katalysatoren sind, da sie im Allgemeinen nach der Reaktion nicht unverändert zurückgewonnen werden können.



Schema 3.55: Katalysezyklus der Olefinmetathese.

Schema 3.55 zeigt den allgemein akzeptierten Mechanismus der Olefinmetathese, der erstmals 1971 von Y. Chauvin und J. L. Hérisson vorgeschlagen wurde.^[320] Die Experimente der Gruppen C. P. Casey^[321], T. J. Katz^[322] und R. H. Grubbs^[323, 324] stützen diesen mechanistischen Vorschlag. Die Bildung eines Metallacyclobutans und der Austausch der Alkylidenreste in der Metathesereaktion wurden durch den Einsatz von ¹³C-markierten Olefinen bewiesen.^[325-327] Die Existenz eines Rutheniumcyclobutans bei der Verwendung des Grubbs-Katalysators der zweiten Generation konnte NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.^[328]

Die Entwicklung von stabilen, definierten Katalysatoren schuf völlig neue Möglichkeiten für die Anwendung der Olefinmetathese in der organischen Synthese. Abbildung 3.5 zeigt drei häufig verwendete und kommerziell erhältliche Metathesekatalysatoren. Ein entscheidender Schritt hin zur praktischen Anwendung der Olefinmetathese gelang 1976 mit der Entwicklung wohldefinierter Wolframcarben-Einkomponenteninitiatoren (z.B. $[\text{Ph}_2\text{C}=\text{W}(\text{CO})_5]$), die im Vergleich zu den allerersten Metathesereaktionen ohne den Zusatz von Coaktivatoren die Alkenmetathese auslösen können.^[329-335] Das Katalysatordesign wurde stark vorangetrieben, um leicht zugängliche Katalysatorsysteme zu erhalten, die eine hohe Aktivität mit ausgezeichneter Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen verbinden sollten. Hierbei konzentrierte man sich vorwiegend auf das Abstimmen der Katalysatorreaktivität durch die Modifikation der zusätzlichen Liganden am Metallzentrum, welches in einer Vielzahl der Katalysatorsysteme die Metalle Ruthenium bzw. Molybdän enthält. So erhöht der Austausch eines der Phosphanliganden im Grubbs-Komplex der 1. Generation **127**^[336, 337] gegen einen *N*-heterocyclischen Carbenliganden^[338-340] die katalytische Aktivität, die thermische Stabilität und die Toleranz des Komplexes gegenüber funktionellen Gruppen. Der Katalysator der 2. Generation **128**^[341] vermittelt Metathesen mit besonders hoher Aktivität, die in einigen Fällen sogar derjenigen des von R. R. Schrock entwickelten Katalysators **129**^[342] nahe kommt. Der Katalysator **128** ist aber gegenüber funktionellen Gruppen viel toleranter und thermisch stabiler als die Initiatorsysteme **127** und **129**. Trotz dieser Fortschritte geht die Suche nach noch effizienteren und selektiveren Metathesekatalysatoren unvermindert weiter.^[343]

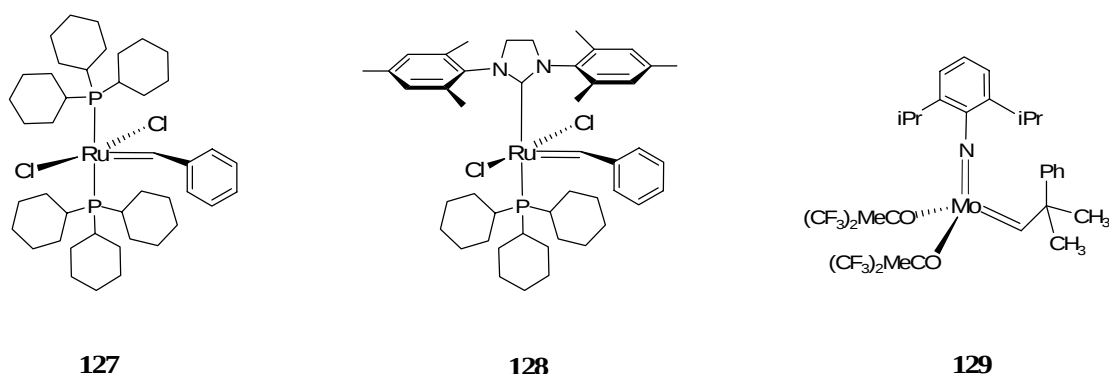
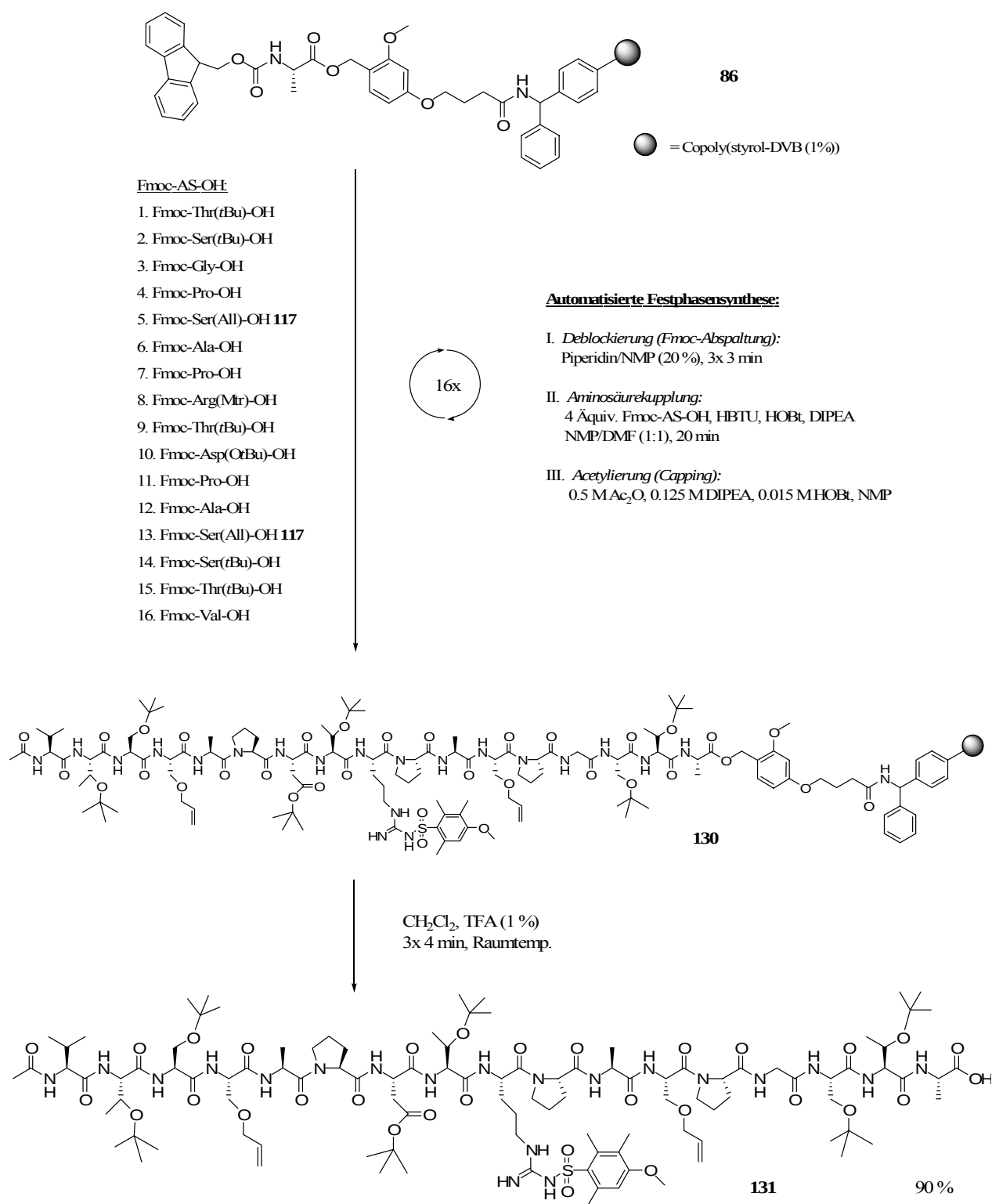


Abb. 3.5: Häufig verwendete Katalysatoren der Alkenmetathese.

Es gibt eine Reihe von interessanten Varianten und Erweiterungen der ursprünglichen Metathesereaktion wie die ROMP^[344], Enin,^[345] Alkin-^[346] sowie die Kreuzmetathese (CM)^[347]. Die meistgenutzte Metathesereaktion in der organischen Synthese ist die Ringschlussmetathese (RCM). Dabei werden intramolekular zwei Doppelbindungen verknüpft. Die Bildung von Ethen ist die Triebkraft dieser Reaktion. Die breite Akzeptanz dieser Reaktion in verschiedenen Bereichen der Chemie ist vor allem in der Anwendung der RCM bei der Synthese bedeutender Naturstoffe begründet.^[348] Als Beispiele für Makrozyklisierungen in der Totalsynthese seien aufgeführt die Synthese von Woodrosin I,^[349] Epothilon C^[350] und Manzamin A.^[351]

3.5.3 Synthese der cyclischen (Glyco)Peptide

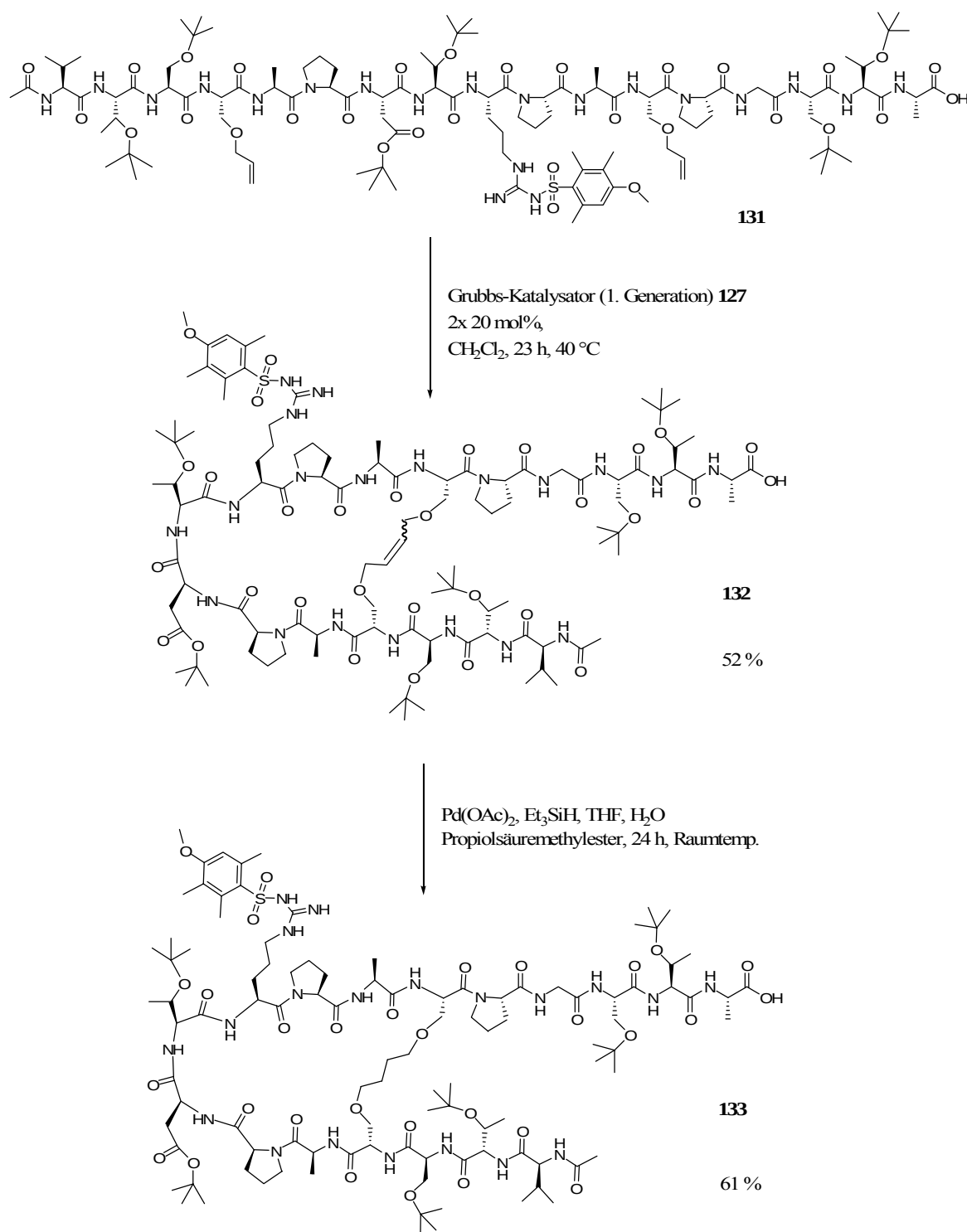
Zunächst sollte untersucht werden, ob ein cyclisches Peptid mit einer MUC1-Partialsequenz in dieser Größe und mit einer Vielzahl an funktionellen Gruppen durch einen Ringschluss aufzubauen ist. Das Allylserin-Derivat **117** sollte so in die Peptidsequenz eingebaut werden, dass ein nicht zu großer Zyklus entsteht, die immundominante Region sich aber im Zyklus befindet. Dazu wurde ausgehend von mit Fmoc-L-Alanin beladenem Harz **86** das Heptadecapeptid **131** nach dem allgemeinen Protokoll der Peptid-Festphasensynthese aufgebaut. Die Allylserin-Komponente **117** wurde wie die anderen Fmoc-Aminosäuren in einem Überschuss von vier Äquivalenten eingesetzt. In einer Ausbeute von 90 % konnte das bis auf den C-Terminus völlig geschützte Heptadecapeptid **131** durch acidolytische Spaltung des sehr säureempfindlichen SASRIN-Ankers vom Harz gelöst und isoliert werden.



Schema 3.56: Festphasensynthese des Harz-gebundenen Heptadecapeptids **130** und acidolytische Spaltung vom Harz.

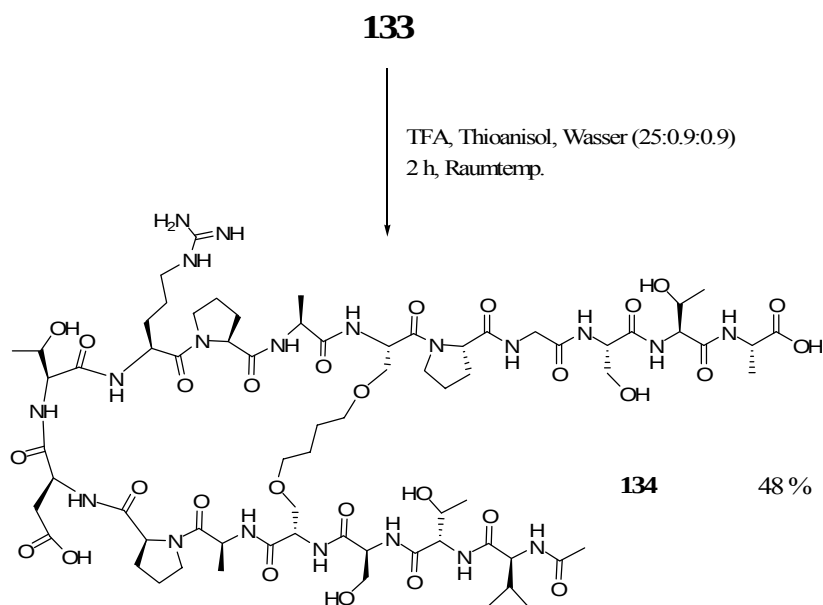
Das sehr gut in Dichlormethan lösliche, geschützte Heptadecapeptid **131** wurde in Dichlormethan mit 20 mol% des Grubbs-Katalysators der 1. Generation (Benzyliden-bis(tricyclohexylphosphin)dichlororuthenium) **127** erhitzt. Nach 11 Stunden wurde nochmals die gleiche Menge an Katalysator zugegeben und weitere 12 Stunden erwärmt. Die Konzentration der Reaktionslösung betrug 3 mmol/mL, um durch die gegebene Verdünnung den intramolekularen Ringschluss zu begünstigen. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Chromatographie mittels präparative RP-HPLC unter isokratischen Bedingungen. Es konnte in einer 52%igen Ausbeute das cyclische Peptid **132** isoliert werden. Die Verbindung wurde massenspektrometrisch und mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie untersucht. Charakteristisch ist die Veränderung der olefinischen Signale im Vergleich zu denen des Edukts. Der typische Signalsatz allylischer Gruppierungen geht in ein Signal einer symmetrisch 1,2-disubstituierten olefinischen Doppelbindung über. Im Massenspektrum kann der Verlust einer Ethylen-Masseneinheit verzeichnet werden. Die NMR-Spektren zeigen teilweise Signalverdopplung sowie eine Verbreiterung der Signale, was auf das Vorliegen eines *E/Z*-Isomeren-Gemisches sowie moleküldynamische Effekte der cyclischen Struktur zurückzuführen sein dürfte. Die Vermessung der NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen führte zu keiner entscheidenden Veränderung der Linienform, weshalb das *cis/trans*-Verhältnis im Molekül **132** nicht zu bestimmen war. Für die Ermittlung des *cis/trans*-Verhältnisses durch analytische RP-HPLC war das chromatographische Verhalten beider Isomere zu ähnlich.

Die Reduktion der Doppelbindung im Cyclopeptid **132** sollte aufgrund der Erfahrungen der Benzylester-Abspaltung im ST_N-Glycopeptid **95** mittels Palladium(II)acetat und Triethylsilan erfolgen. Bemerkenswerterweise wurde die Doppelbindung unter diesen Reaktionsbedingungen der katalytischen Transferhydrierung selbst bei einem drastischen Reagenzienüberschuss nicht reduziert. Eine Literatursuche ergab, dass Substrate mit disubstituierten Doppelbindungen mit Triethoxysilan und Pd(OAc)₂ in einem THF/Wasser-Gemisch erst nach Zusatz von Propiolsäuremethylester zum Alkan reduziert werden konnten.^[352] Der Einsatz von Triethoxysilan lässt aber Polymere entstehen, deren Abtrennung vom Peptid sicher erschwert wäre und mit Ausbeuteverlusten verbunden wäre. Deshalb wurde untersucht, ob bei der gegebenen Prozedur Triethoxysilan durch Triethylsilan ersetzt werden kann.



Schema 3.57: Ringschlussmetathese am Allylether tragenden Heptadecapeptid **131** unter Verwendung des Grubbs-Katalysators der 1. Generation **127** und Reduktion der Doppelbindung.

Die palladiumkatalysierte Reduktion mit Triethylsilan in einem THF/Wasser-Gemisch bei Zusatz von Propiolsäuremethylester führte schließlich zum gewünschten cyclisierten Heptadecapeptid **132**. Nach präparativer RP-HPLC konnte das reduzierte, geschützte Cycloheptadecapeptid **133** in einer Ausbeute von 61 % als farbloses Lyophilisat erhalten werden.



Schema 3.58: Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen am Cycloheptadecapeptid **133**.

Durch die Einwirkung von Trifluoressigsäure auf das cyclische Heptadecapeptid **133** in Gegenwart der Abfangreagenzien Thioanisol und Wasser konnten die säurelabilen Schutzgruppen Mtr, *t*Bu-Ether und *t*Bu-Ester abgespalten werden. Das vollständig deblockierte cyclische MUC1-Heptadecapeptid **134** wurde nach präparativer RP-HPLC in 48%iger Ausbeute isoliert.

Es ist also grundsätzlich möglich, ein cyclisches Peptid mit der an funktionellen Gruppen reichen Partialsequenz des MUC1 zu synthetisieren, wobei der Zyklus aus neun Aminosäuren besteht und 33 Atome beinhaltet. Aus diesem Grund wurde als nächstes unternommen, ein cyclisches Glycopeptid mit der T_N-Antigen-Struktur aufzubauen. Dazu wurde die gleiche Sequenz und den gleichen Positionen der *O*-Allylserine wie im Cyclopeptid **134** aufgebaut. An die Startaminosäure Fmoc-L-Alanin am HMPB-BHA-Harz **86** wurden die Fmoc-geschützten Aminosäurebausteine ebenso wie der Fmoc-geschützte Serinallylether **117** im Überschuss von vier Äquivalenten nach der Aktivestermethode gekuppelt. Das 2-Acetamido-galactopyranosylserin **22** wurde in geringem Überschuss eingesetzt.

Auch diese Glycopeptidsynthese verlief gemäß dem Abspaltprotokoll ohne Probleme und lieferte das gewünschte acyclische T_N-Glycoheptadecapeptid **136** in hoher Ausbeute (s. Schema 3.60). Die Reinheit der Verbindung ist bemerkenswert hoch, wie das HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes **136** in Abb. 3.6 belegt.

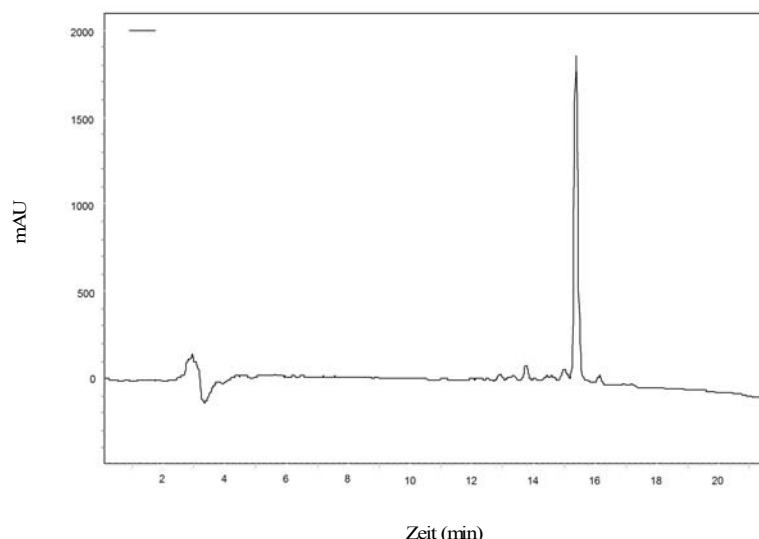


Abb. 3.6: HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes **136**.

Dieses in den Seitenketten völlig blockierte olefinische Glycopeptid sollte dann einer Ringschlussmetathese unterzogen werden. Die Verwendung des Grubbs-Katalysators der 1. Generation **127** führte aber kaum zur Cyclisierung des Moleküls **136**. Es gelang jedoch durch Einsatz des Grubbs-Katalysators der 2. Generation (Benzyliden[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinyliden]dichloro-(tricyclohexylphosphin)ruthenium) die Cyclisierung zu Verbindung **137** zu erreichen. Dabei wurde der Katalysator wieder in zwei Portionen (zweimal 20 mol%) zugegeben und die Reaktionsmischung insgesamt 24 Stunden auf 40 °C erwärmt (s. Schema 3.61). In Abb. 3.7 ist ein Ausschnitt des HSQC-NMR-Spektrums des cyclischen T_N-Glycoheptadecapeptids wiedergegeben, in dem die für das Molekül charakteristischen Signale markiert sind.

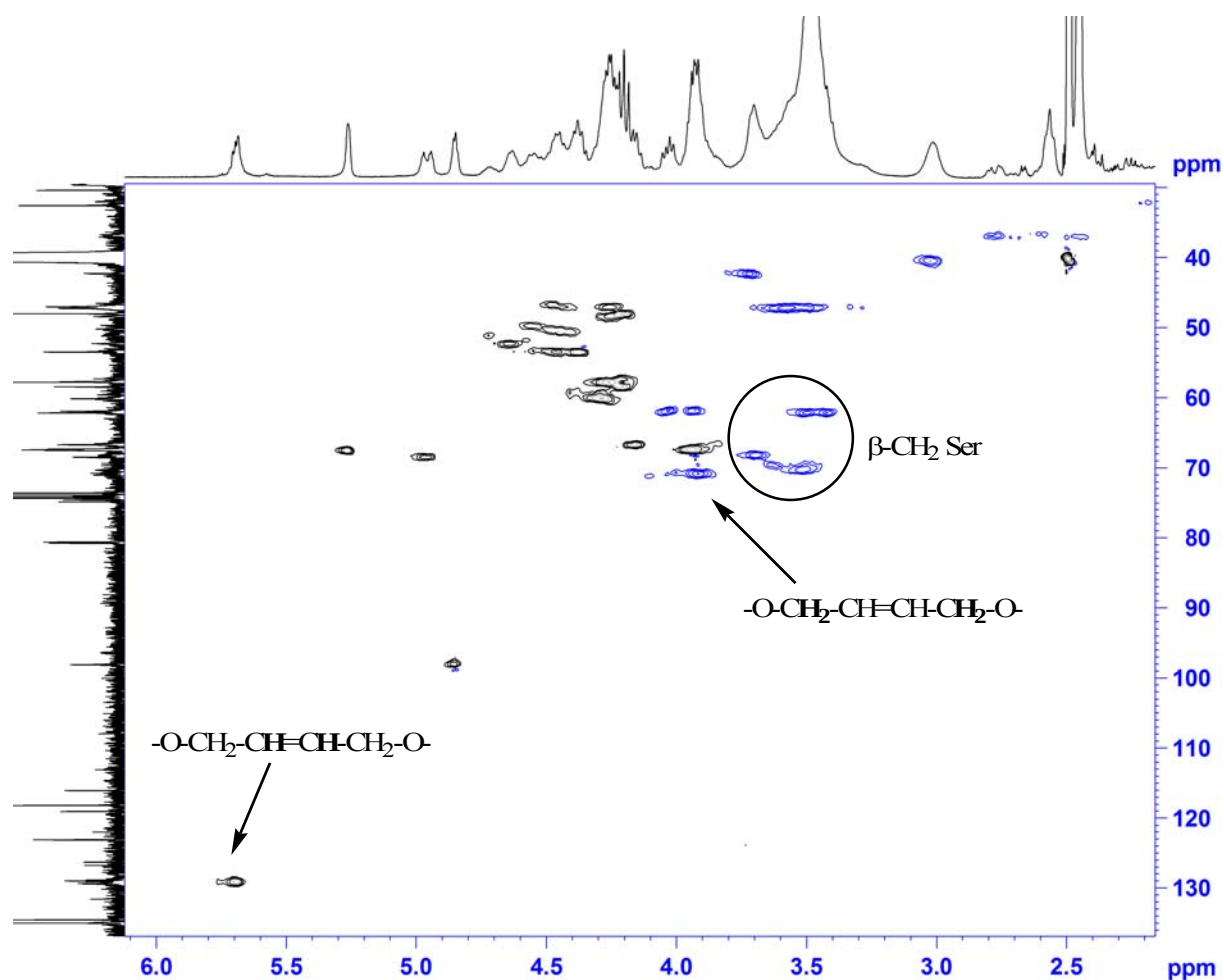
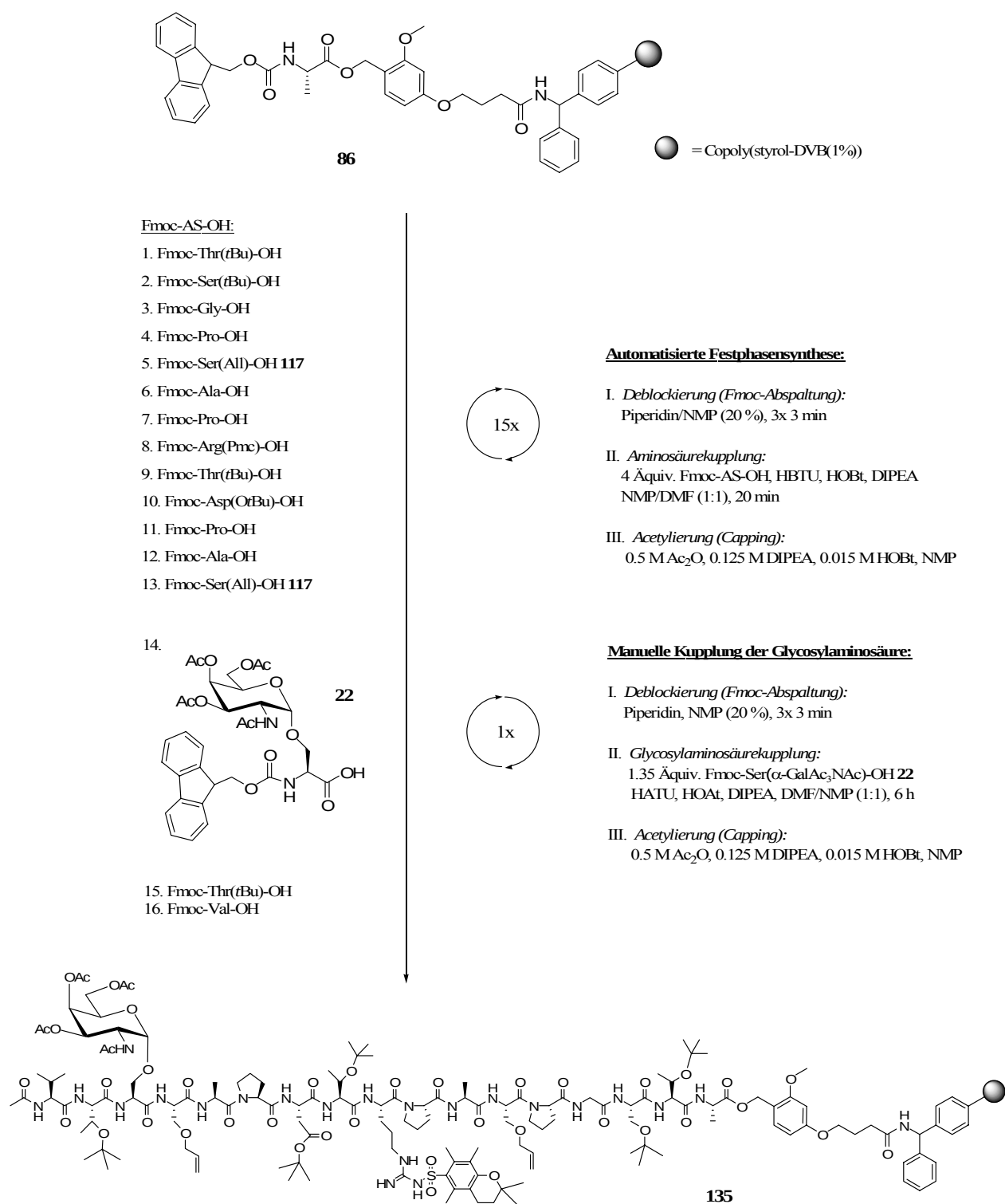
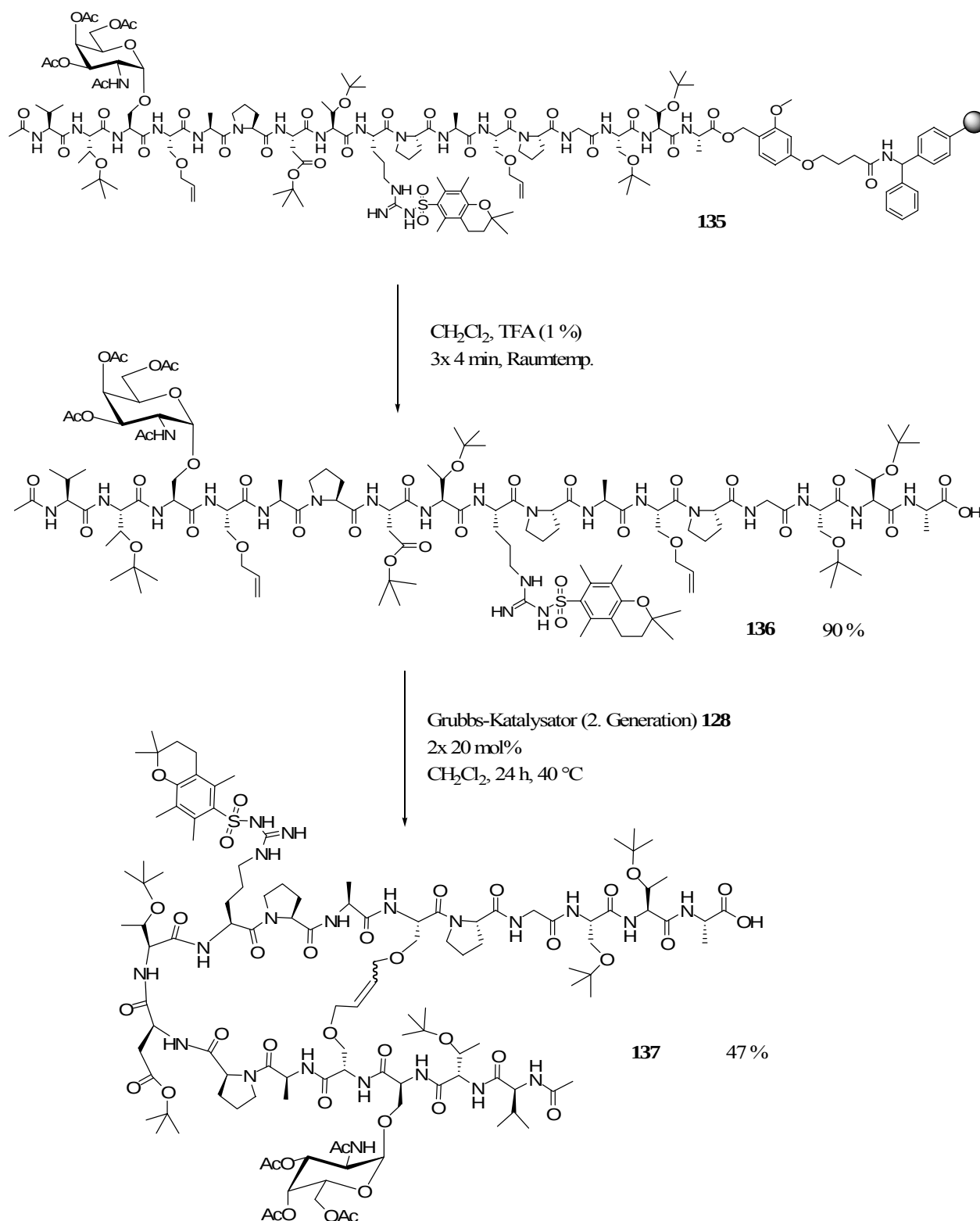


Abb. 3.7: Ausschnitt aus dem HSQC-NMR-Spektrum des cyclischen T_N -Glycoheptadecapeptids **137**.



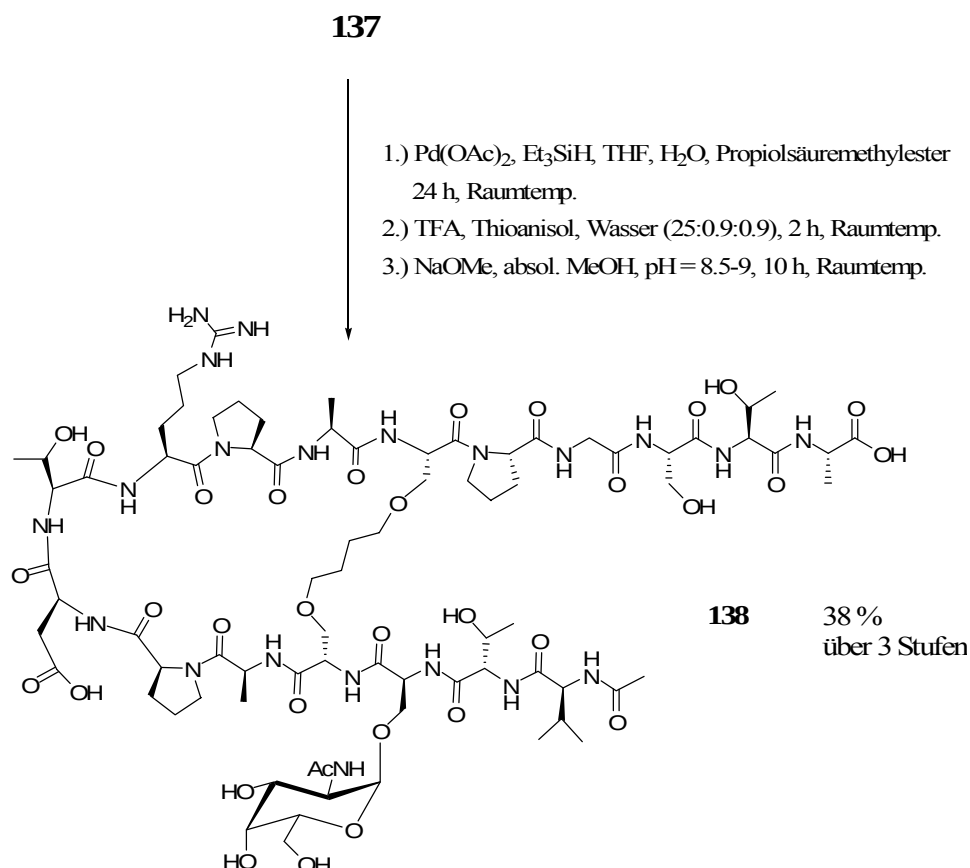
Schema 3.59: Festphasensynthese des Harz-gebundenen T_N-Heptadecapeptids **135** unter Verwendung von Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86**.



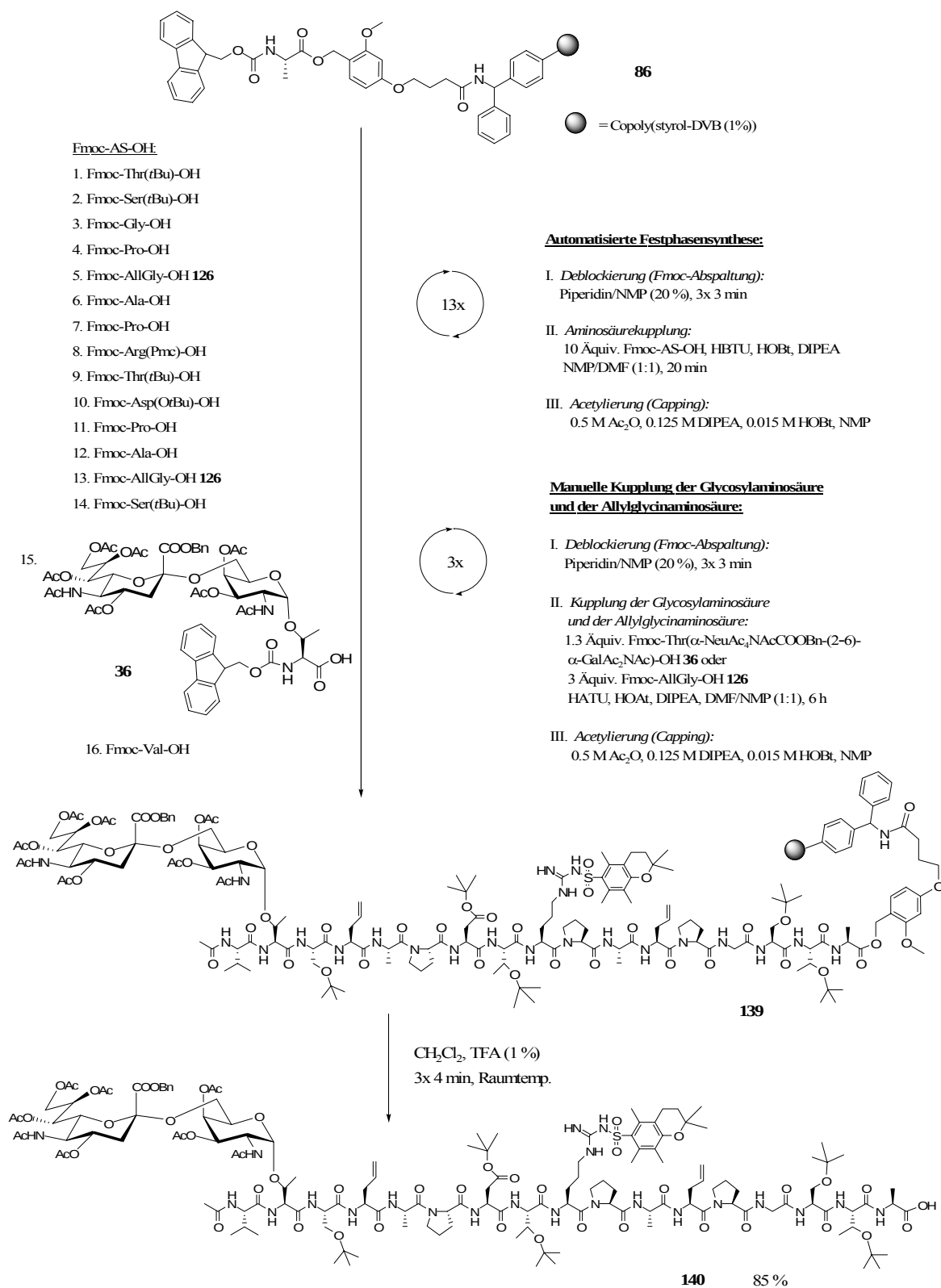
Schema 3.60: Abspaltung des vollständig geschützten T_N -Glycoheptadecapeptids **136** vom Harz und die Synthese des cyclischen T_N -Glycoheptadecapeptids **137** durch Ringschlussmetathese.

Die Ausbeute an Produkt betrug nach präparativer RP-HPLC 47 %. Die Verbindung wurde massenspektrometrisch und durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie sowie hochaufgelöste Massenspektrometrie charakterisiert. Das *E/Z*-Verhältnis war durch NMR-Spektroskopie aufgrund der Signalverbreiterung wiederum nicht zu bestimmen.

Die Doppelbindung konnte unter den am Cyclopeptid **132** erprobten Reaktionsbedingungen ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$, TES, H_2O , THF, Propiolsäuremethylester) reduziert werden. Um Ausbeuteverluste zu vermeiden, wurde das reduzierte geschützte Cycloglycopeptid ohne eine chromatographische Reinigung durch RP-HPLC weiter umgesetzt. So erfolgte die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen unter den bereits erprobten acidolytischen Bedingungen (TFA, Thioanisol, Wasser). Die kontrollierte Zemplén-Umesterung in methanolischer Natriummethanolat-Lösung lieferte schließlich das komplexe cyclische T_N -Glycoheptadecapeptid **138**, welches nach Reinigung durch präparative RP-HPLC in 38 % Ausbeute über drei Stufen erhalten werden konnte.



Schema 3.61: Reduktion der Doppelbindung, Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen und Zemplén-Umesterung am cyclischen T_N -Glycoheptadecapeptid **137**.

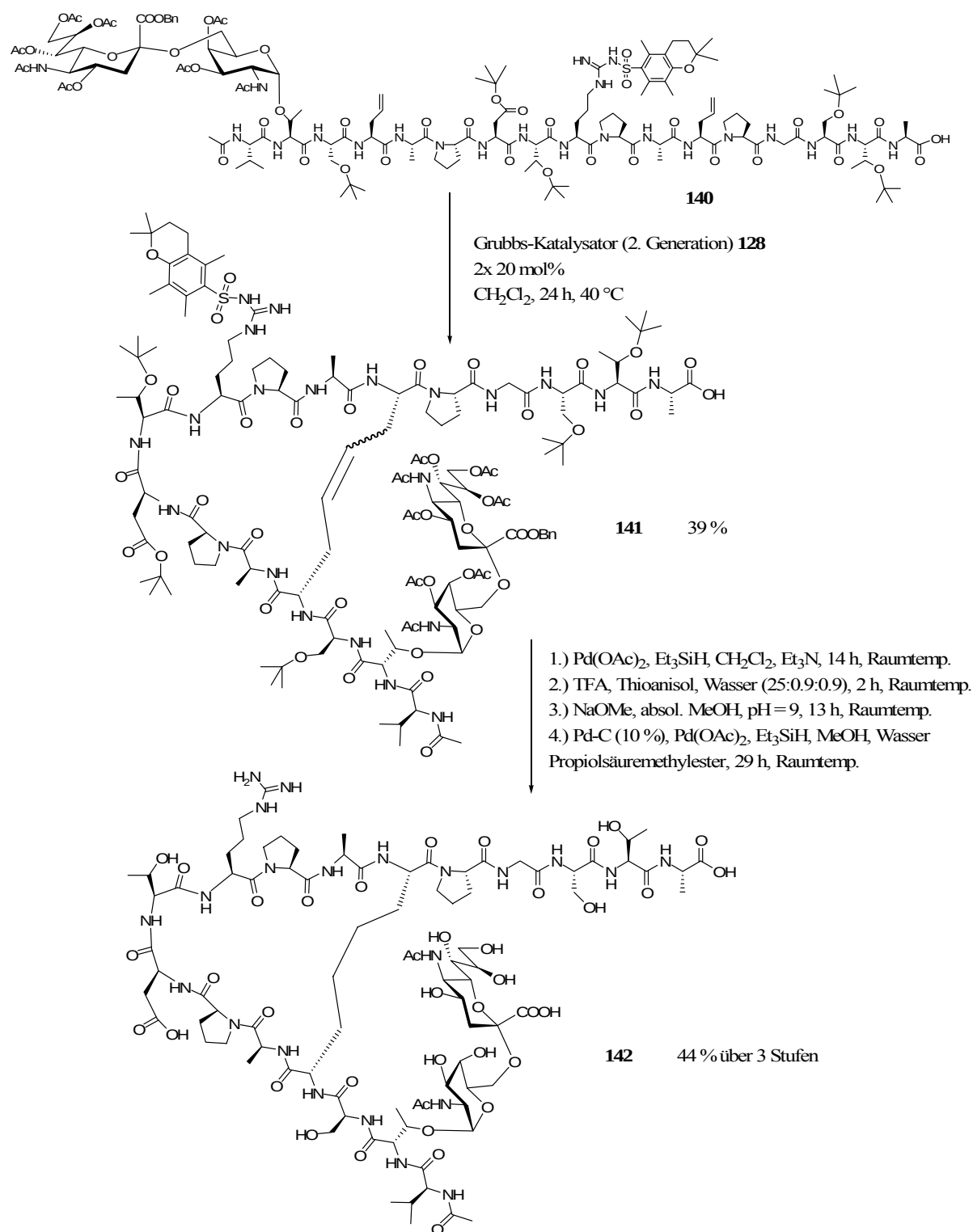


Schema 3.62: Festphasensynthese des Allylglycin enthaltenden ST_N-Glycoheptadecapeptids **140** an Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** und acidolytische Abspaltung vom polymeren Träger.

In einer weiterführenden Synthese sollte ein cyclisches Glycopeptid hergestellt werden, welches das ST_N-Antigen als Disaccharid-Komponente trägt. Außerdem sollte in dieser Verbindung die Allylserin-Struktur gegen eine Allylglycin-Struktur ausgetauscht werden. Die Position der olefinischen Aminosäure innerhalb der Peptidsequenz wurde dabei aber nicht verändert.

Die Glycopeptid-Festphasensynthese erfolgte an mit Fmoc-L-Alanin beladenem HMPB-BHA-Harz **86** gemäß dem allgemeinen Protokoll der Glycopeptid-Festphasensynthese. Die Kupplung der ST_N-Glycosylaminosäure **36** konnte nur mit 1.3 Äquivalenten an diesem kostbaren Baustein durchgeführt werden. Die Anbindung des Fmoc-Allylglycins **126** erfolgte mit einem Überschuss von 3 Äquivalenten. Für beide Kupplungsreaktionen wurde das aktivere Reagenzienpaar HATU/HOAt eingesetzt. Das die beiden Allylglycine enthaltende Glycopeptid konnte nach der acidolytischen Abspaltung vom polymeren Träger in einer Ausbeute von 85 % erhalten werden. Zur Cyclisierung wurde das Glycopeptid in Dichlormethan gelöst, innerhalb von 24 Stunden zweimal mit je 20 mol% des Grubbs Katalysators der 2. Generation versetzt und auf 40 °C erwärmt. Die Reinigung des Produktes gelang durch präparative RP-HPLC. Das ST_N-tragende Cycloglycoheptadecapeptid **141** wurde in einer Ausbeute von 39 % erhalten.

Aus dem cyclischen ST_N-Glycoheptadecapeptid **141** wurde zunächst die Benzylester-Schutzgruppe durch eine heterogenkatalytische Transferhydrierung mittels Palladium(II)acetat und Triethylsilan in Dichlormethan abgespalten. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen trat praktisch keine Reduktion der Doppelbindung im Molekül ein. Nur ein geringer Anteil an reduzierter Verbindung wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Die säurelabilen Schutzgruppen wurden mit TFA, Thioanisol und Wasser analog zur Abspaltung aus dem T_N-Cycloglycopeptid **137** entfernt. Zur Reinigung genügten lediglich das Entfernen aller flüchtigen Bestandteile, Digerieren mit Pentan bzw. Diethylether sowie eine Lyophilisierung. Die O-Acetylgruppen des ST_N-Saccharidteils wurden durch Umesterung mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in Methanol abgespalten. Die Hydrierung der Doppelbindung des vollständig deblockierten cyclischen Glycopeptids erfolgte unter Katalyse von Palladium auf Aktivkohle (10 %) sowie Palladium(II)acetat im Lösemittelgemisch Methanol/Wasser und dem Zusatz von Propiolsäuremethylester. Als Reduktionsmittel diente Triethylsilan. Die Reaktionszeit betrug zwei Tage. Nach der Reinigung durch präparative RP-HPLC wurde das vollständig deblockierte, cyclische ST_N-Glycoheptadecapeptid **142** in 44%iger Ausbeute über drei Stufen erhalten.



Schema 3.63: Ringschlussmetathese am Allylglycine enthaltenden ST_N -Glycoheptadecapeptid und die Vollendung der Synthese des cyclischen ST_N -Glycoheptadecapeptids **142**.

3.6 Synthese eines Konjugates aus einer Partialsequenz des MUC1 mit einem C-Glycosid-Analogon des T_N-Antigens und einem Tetanustoxin-Epitop

3.6.1 Stereoselektive Synthese des Allyl- α -C-glycosides des N-Acetylgalactosamins

Glycoproteine üben in biologischen Systemen als Enzyme, Hormone, Zelloberflächenmoleküle, Transport- und Rezeptorproteine wichtige Funktionen aus. Der Saccharidanteil beeinflusst die Konformation, die Faltung, die Löslichkeit oder die Ladung der Proteine. Er spielt insbesondere im biologischen Erkennungsprozess (Zell-Zell- und Zell-Molekülerkennung)^[353, 354] z.B. bei der selektiven Aufnahme von Serumkomponenten in die Zelle, bei Infektionen, bei der Krebsentstehung sowie bei Metastasierung und Immunreaktionen eine große Rolle.^[355-357] Glycoproteine übernehmen weiterhin wichtige Funktionen in der Regulierung des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Zelladhäsion. Im Zelloberflächenmolekül MUC1 ist wie bei allen Mucin-Glycoproteinen die Saccharid-Komponente O-glycosidisch an Serin bzw. Threonin gebunden. Die N-Acetylgalactosamin(T_N)-Struktur, die die Grundstruktur der komplexen MUC1-Glycoprotein-Saccharide darstellt, ist wie bereits erläutert wurde von großer biologischer Bedeutung.

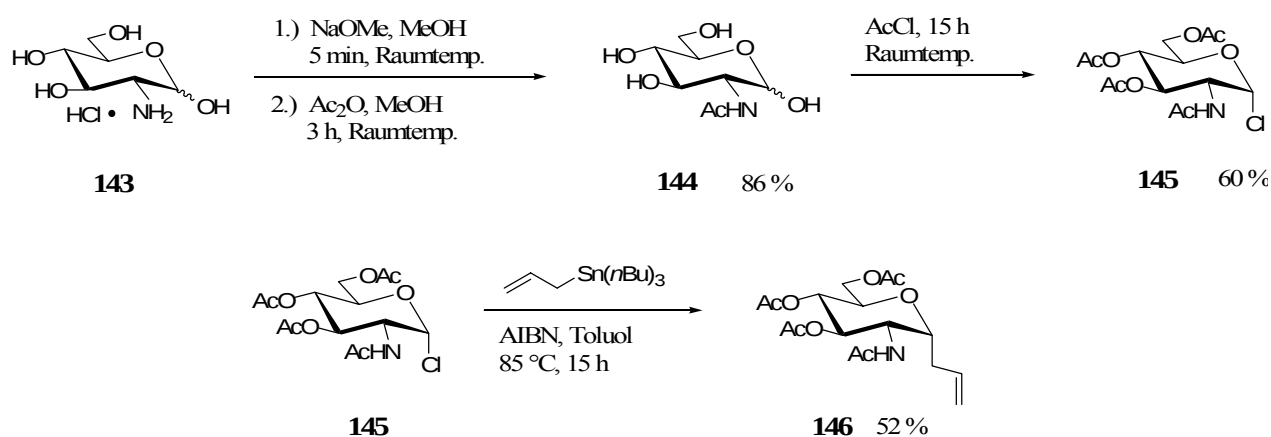
Die O-glycosidische Bindung ist nicht besonders stabil gegen basische und saure Reaktionsbedingungen. Dies setzt wohlüberlegte Synthesestrategien beim Aufbau von saccharidischen Strukturen und Glycopeptiden voraus. Im Hinblick auf pharmakologische Anwendungen der O-Glycoside ist die *in vivo*-Stabilität und damit die biologische Halbwertszeit ein besonders wichtiger Aspekt. Um dem enzymatischen Abbau durch Glycosidasen entgegenzuwirken, versucht man das O-Atom der O-glycosidischen Bindung gegen ein S-Atom oder eine Methylengruppe auszutauschen.^[358-360] C-Glycoside können deshalb auch als Enzyminhibitoren wirken.^[361, 362] Das Interesse am Aufbau C-glycosidischer Moleküle ist hoch, und eine Vielzahl von Methoden ist etabliert, die eine C-C-Bindungsbildung am anomeren C-Atom des Saccharids ermöglichen.^[363, 364]

Bei einigen Verfahren zur Herstellung von C-glycosidisch verknüpften Saccharid-Derivaten ist Übertragung jedoch auf Aminozucker, die in der C-2 Position eine Aminofunktion tragen, schwierig. C-verknüpfte Aminoglycoside sind über Oxim-Intermediate^[365] zugänglich. Die Synthese von C-Galactosamin-Derivaten gehen meist von Galactal-Intermediaten aus, die dann über Azido-Chlorierungen^[366] oder Azido-Selenierungen^[367] mit acetylenischen,^[368]

olefinischen^[369] oder anderen Derivaten^[370-373] umgesetzt werden. C-glycosidisch verknüpfte N-Acylglycosamin-Derivate sind auch durch eine Keck-Allylierung zugänglich.^[374] Es sind aber bisher nur wenige Syntheserouten zu C-glycosidischen 2-Glycosamin-Aminosäuren beschrieben worden.^[368, 375, 376]

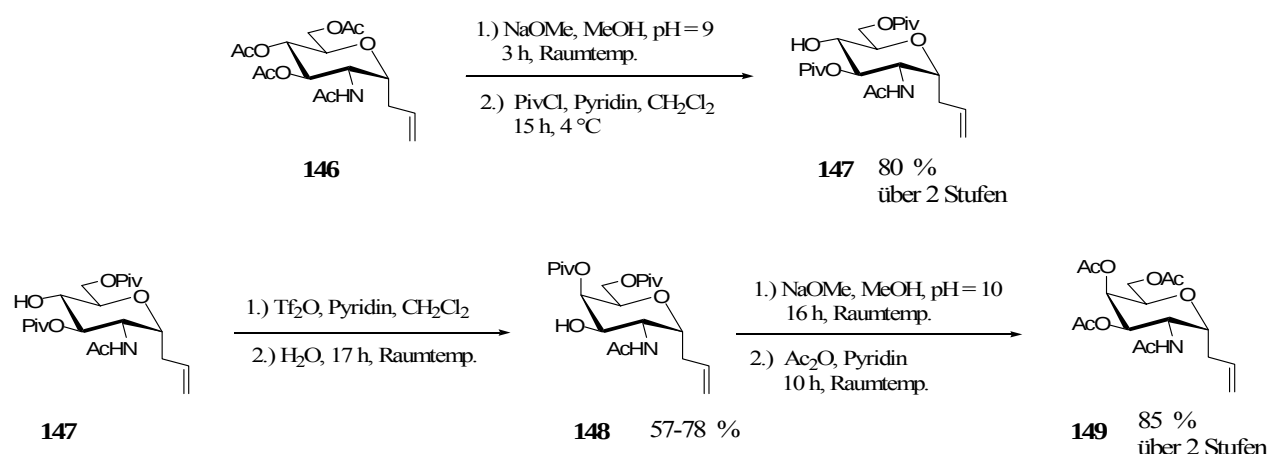
N-Acetylgalactosamin ist eine teure Verbindung ebenso wie die Galactal-Edukte für die oben genannten Verfahren zur Herstellung von C-Glycosylgalactosamin-Derivaten. Deshalb ist es sinnvoll, einen effizienten Syntheseweg für die Herstellung einer Galactosamin tragenden Aminosäure entwickeln. Glucosamin stellt ein alternatives Ausgangsmaterial für die Synthese einer solchen Aminosäure dar. Zunächst sollte an diesem die C-glycosidische Bindung gebildet werden, wonach der Baustein einer Isomerisierung an C4 unter Bildung des C-glycosidischen Galactosamins unterzogen werden sollte.

Ausgehend von D-Glucosaminhydrochlorid ließ sich das 3-(2'-Acetamido-3',4',6-tri-O-acetyl-2'-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-1-propen **146** in einer literaturbekannten dreistufigen Synthese gewinnen.^[377-381] Dazu wurde das D-Glucosaminhydrochlorid mit einer stöchiometrischen Menge Natriummethanolat in Methanol deprotoniert und die methanolische Lösung des Glucosamins wurde direkt mit Acetanhydrid versetzt. Man erhält das N-Acetyl-D-glucosamin **144**. Anschließend wurden die Hydroxygruppen mit Acetylchlorid acetyliert. Der bei der Reaktion entstehende Chlorwasserstoff reagiert mit der anomeren Funktion zum Glucosylchlorid **145**. Die Einführung der Allylfunktion in das 2-Acetamido-glucosylchlorid **145** durch radikalische Allylierung^[380, 382] mit Allyltributylstannan in Gegenwart von AIBN in absolutem und entgastem Toluol bei 85 °C. Auf diese Weise wurde stereoselektiv das α -Anomer in 52 % nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten. Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte einen Anteil von ca. 9 % β -Anomer, das chromatographisch nicht abgetrennt werden konnte.



Schema 3.64: Synthese des 3-(2'-Acetamido-3',4',6-tri-O-acetyl-2'-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-1-propens **146**.

Da aber das C-Glycosid des Galactosamins hergestellt werden sollte, musste die Konfiguration an C4 invertiert werden. Diese Epimerisierung erfolgte nach L. Cipolla *et al.*, wobei eine Acylgruppen-Wanderung im basischen Medium ausgenutzt wird.^[383, 384] Das 2'-Acetamido-glucopyranosyl-1-propen **146** wurde zunächst unter Zemplén-Bedingungen deacetyliert und das entstehende Triol mit Pivalinsäurechlorid selektiv in 3- und 6-Position geschützt. Das 3,6-O-pivaloylierte Glucosamin-Derivat **147** reagierte mit Trifluoressigsäureanhydrid in Pyridin und Dichlormethan (2:1) bei 0 °C zum entsprechenden 4-O-Triflat. Nach vollständiger Umsetzung, für die eventuell Reagenz nachgegeben werden musste (dünnschichtchromatographische Kontrolle), erfolgte die Epimerisierung durch Zugabe von Wasser. Nach 17 Stunden konnte das 2'-Acetamido-galactopyranosyl-1-propen **148** in einer Ausbeute von 78 % nach einer chromatographischen Reinigung erhalten werden. Laut dem NMR-Spektrum enthielt das Epimerisierungsprodukt nur die 4,6-dipivaloylierte Verbindung **148**. Folglich musste die Epimerisierung durch Wanderung des Pivalinsäure-Restes erfolgt sein.



Schema 3.65: Epimerisierung der C-glycosidischen 2-Acetamido-glucose **146** in die C-glycosidische 2-Acetamido-Galactose **148**.

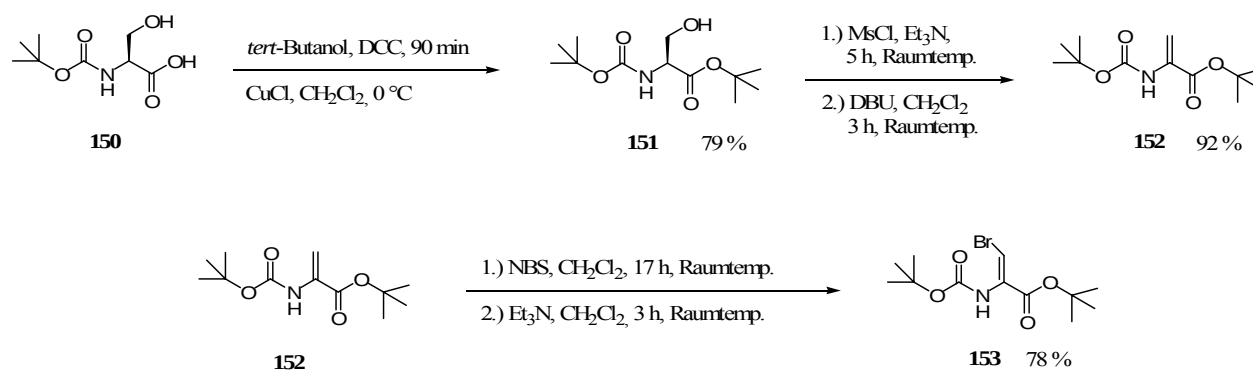
Die Pivaloylgruppen der Verbindung **148** wurden durch Zemplén-Umesterung bei pH-Wert 10 abgespalten und das resultierende deblockierte C-glycosidische Monosaccharid wurde mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert. Sowohl im ¹H- als auch im ¹³C-NMR-Spektrum sind einige Signale der Acetyl- sowie Pivaloyl-geschützten Verbindungen **148** bzw. **149** verbreitert. Dies deutet darauf hin, dass das C-Glycosid in unterschiedlichen Konformationen vorliegt und die eindeutige sesselförmige ⁴C₁-Konformation, die im Falle eines O-Glycosids gegeben ist, nicht allein vorherrschend ist.

Durch ein homonukleares Entkopplungsexperiment konnte NMR-spektroskopisch sichergestellt werden, dass die Protonen an Position C1 und C2, ebenso wie die Protonen an C3 und C4 eine *cis*-1,2 bzw. *cis*-3,4 Konformation einnehmen. Die Protonen an Position C3 und C2 befinden sich aber in *trans*-2,3 Konformation. Die vicinalen Kopplungskonstanten für diese Protonenpaare im Ring betragen ³J(H1, H2) = 5 Hz, ³J(H2, H3) = 10 Hz und ³J(H4, H3) = 3.3 Hz. Dies bestätigt die α-anomere Konfiguration an C1 und das Vorliegen eines Galactose-Derivates.

Durch die Kombination der Synthese des 2'-Acetamido-glucopyranosyl-1-propens **146** mit der erfolgreichen Epimerisierungsreaktion am Glucose-Derivat **147** gelangt man auf kurzem und ergiebigem Weg zum pivaloylierten 3-(2'-Acetamido-3',4',6-tri-O-acetyl-2'-desoxy-α-D-glucopyranosyl)-1-propen **148**. Diese Synthesestrategie wurde im Laufe dieser Arbeiten kürzlich von R. N. Ben *et al.* veröffentlicht.^[385]

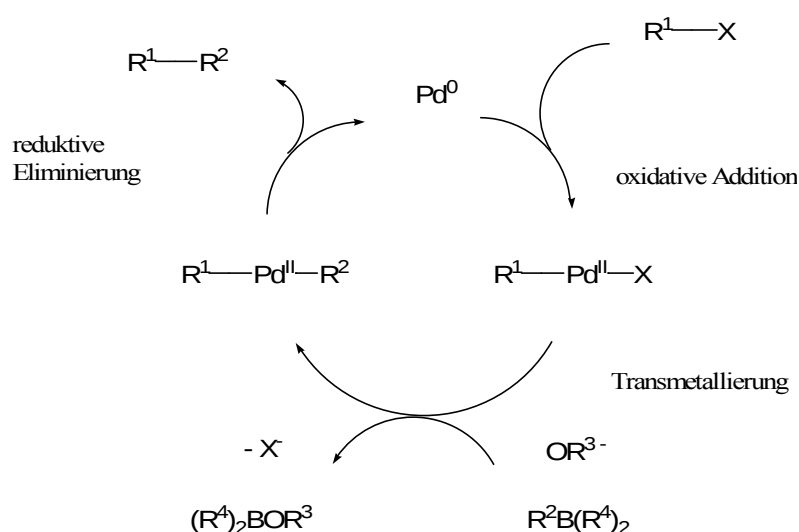
3.6.2 Die Synthese eines C-glycosidischen N-Acetylgalactosylaminosäure-Festphasenbausteins.

Die Anbindung der Propenylgalactosamineinheit **149** sollte durch eine *B*-Alkyl-Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mit einem Halogenvinyl-Aminosäurebaustein **153** erfolgen. Die Synthese von Brom-didehydroalanin **153** erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von D. Danion *et al.*,^[386] wobei darin das Schutzgruppenmuster verändert wurde, um später einen Zugang zu einem in der Peptid-Festphasensynthese einsetzbaren C-Glycosylaminosäurebaustein zu ermöglichen. Boc-Serin **150** wurde mittels *tert*-Butanol, Dicyclohexylcarbodiimid und katalytischen Mengen Kupfer(I)chlorid in den entsprechenden *tert*-Butylester überführt, was analog zur Herstellung des Fmoc-Aminosäurebausteins **16** geschah.^[120] Um das Didehydroalanin-Derivat **152** herzustellen, wurde **151** mit Methansulfonsäurechlorid und Triethylamin in das Mesylat überführt. Dann erfolgte β -Eliminierung unter Verwendung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als Base. Man erhielt das Eliminierungsprodukt **152** nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 92 % über 2 Stufen. Das Acrylsäure-Derivat **152** wurde mit *N*-Bromsuccinimid in Dichlormethan in den gewünschten β -Brom-enaminoester **153** umgewandelt. Die Konfigurationsbestimmung erfolgte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Gemäß der Literatur kann man eine Unterscheidung der *E*-/*Z*-Isomere über die vicinale $^3J_{C,H}$ -Kopplungskonstante des Carbonyl-Kohlenstoffs und des vinylischen Protons vornehmen, denn es wurde gefunden, dass in ähnlichen Verbindungen wie **153** das *Z*-Isomer eine Kopplungskonstante $^3J_{C,H} = 5$ Hz und das *E*-Isomer eine Kopplungskonstante $^3J_{C,H} = 11$ Hz aufweist.^[387, 388] In den NMR-Spektren der Verbindung **153** zeigt sich keine Signalverdopplung und die Kopplungskonstante beträgt $^3J_{C,H} = 4$ Hz, was auf das Vorliegen des reinen *Z*-Isomers **153** hindeutet.



Schema 3.66: Synthese der β -Brom-vinyl-Aminosäure **153**.

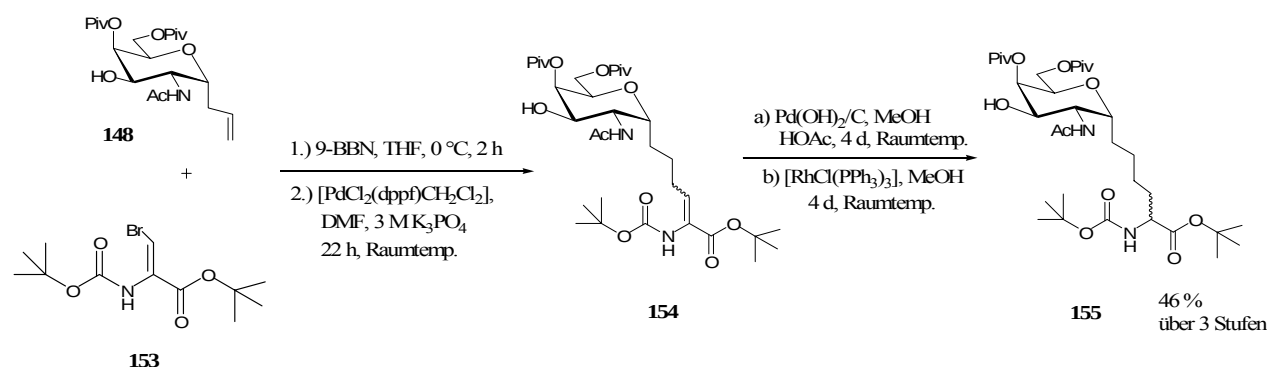
Die *B*-Alkyl-Suzuki-Miyaura-Reaktion unterscheidet sich von anderen Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungen dadurch, dass ein Alkylboran (anstelle eines Vinyl- oder Arylborans) mit einem Aryl- oder Vinylhalogenid, -triflat oder -enolphosphat umgesetzt wird.^[389] Die Reaktion wurde 1986 von A. Suzuki und N. Miyaura vorgestellt und erfolgt in Gegenwart einer Base und eines Pd(0)-Katalysators unter Einbeziehung eines sp^3 -Kohlenstoffatoms in den Kupplungsprozess.^[390] Man geht beim Katalysezyklus von einer Abfolge von oxidativer Addition, Transmetallierung und reduktiver Eliminierung aus.^[391]



Schema 3.67: Allgemeiner Katalysezyklus der Suzuki-Miyaura-Reaktion.

Organometallverbindungen, die an einem sp^3 -C-Atom metalliert sind und über Wasserstoffatome in der β -Position verfügen, neigen in Kupplungsreaktionen auf der Stufe des Alkyl-Palladium-Komplexes zur β -Hydrid-Eliminierung.^[390] Man versucht, diese β -Hydrid-Eliminierung durch Bevorzugung der reduktiven Eliminierung mittels einer geeigneten Wahl des Katalysatorsystems zu unterdrücken. Der Bis(diphenylphosphanyl)ferrocen(dppf)-Ligand hat sich in vielen *B*-Alkyl-Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungen als erfolgreich erwiesen. Man nimmt an, dass dieser zweizählige Ligand die Bevorzugung der reduktiven Eliminierung durch Erzwingen einer *cis*-Geometrie zwischen den Vinyl- und Alkylgruppen im quadratisch-planaren Pd(II)-Komplex unterstützt. Ebenfalls beeinflusst der Bisswinkel die Geschwindigkeit der reduktiven Eliminierung. Ein großer Chelatbindungswinkel zwingt die beiden zu kuppelnden Alkylgruppen am Pd(II)-Zentrum näher zueinander und unterstützt damit die reduktive Eliminierung gegenüber der Hybrid-Eliminierung.^[392]

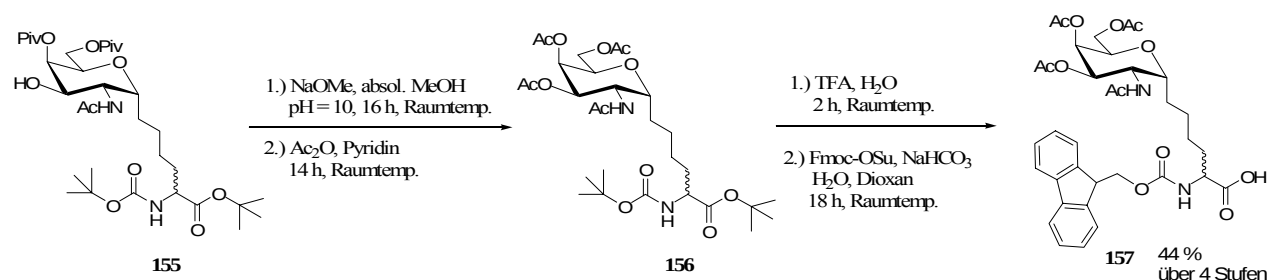
Zur Nutzung dieser Kreuzkupplung wurde das 2'-Acetamido-galactopyranosyl-1-propen **148** in einer Hydroborierungsreaktion mit 9-BBN in absolutem THF zur Reaktion gebracht. Zu dieser Reaktionslösung wurden dann bei Raumtemperatur DMF, 3 M K_3PO_4 -Lösung, das Vinylbromid **153** und der Palladium-Katalysator $[PdCl_2(dppf)CH_2Cl_2]$ gegeben.^[393] Die Kupplung konnte auch in Gegenwart der sterisch anspruchsvollen *tert*-Butylester und Boc-Schutzgruppe erfolgreich durchgeführt werden. Trotz Reinigung mittels Flash-Chromatographie enthielt man das Kreuzkupplungsprodukt allerdings verunreinigt mit ca. 15 % Boran-haltigen Komponenten. Die Reduktion des Kupplungsproduktes konnte dennoch entweder durch heterogen-katalysierte Reduktion mittels $Pd(OH)_2$ auf Aktivkohle (10 %) in Ethylacetat und dem Zusatz von Essigsäure oder durch die homogen-katalytische Hydrierung mit dem Wilkinson Katalysator $[RhCl(PPh_3)_3]$ in Methanol erreicht werden. Die Reduktion erforderte vier Tage, war aber ohne Wasserstoff-Überdruck erreichbar.



Schema 3.68: *B*-Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung des Aminosäure-Vinylbromids **153** mit dem 2'-Acetamido-galactopyranosyl-1-propens **148** und Reduktion der ungesättigten Aminosäure **154**.

Durch Säulenchromatographie gelang die Trennung der beiden Diastereomere sowie des reduzierten Produktes **155** und der nicht umgesetzten olefinischen Verbindung **154** nicht. Jedoch konnte die Verbindung **155** von der nicht reduzierten Verbindung **154** mit Hilfe der präparativen RP-HPLC getrennt werden. Dabei wurden zwei Isomere der reduzierten Verbindung **155** erhalten. Einer HMBC-spektroskopischen NMR-Untersuchung zufolge handelt es sich um das gewünschte an Position C4 und C6 pivaloylierte reduzierte Kupplungsprodukte sowie das an Position C3 und C6 pivaloylierte Kupplungsprodukt, das offensichtlich während der Suzuki-Miyaura-Kupplung im basischen Milieu durch Acylgruppen-Wanderung entstanden ist.

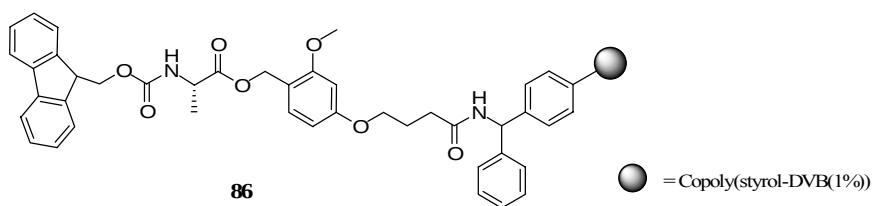
Die Abspaltung der Pivaloylgruppen gelang durch eine Zemplén-Reaktion (Natriummethanolat, Methanol) bei pH = 10. Zunächst wurde nahezu selektiv eine der Pivaloylgruppen innerhalb von drei Stunden gespalten. Die Entfernung der zweiten Pivaloylgruppe bedurfte hingegen einer Reaktionszeit von 16 Stunden. An die Freisetzung schloss sich die Acetylierung der Hydroxygruppen mit Acetanhydrid und Pyridin (2:1) an. Um den Baustein in einer Peptid-Festphasensynthese einzusetzen zu können, wurden die Boc- und die *tert*-Butylester-Schutzgruppe im Aminosäure-Derivat **156** mittels Trifluoressigsäure und einem Zusatz von Wasser quantitativ abgespalten. Die Aminofunktion wurde danach mit Fmoc-OSu und Natriumhydrogencarbonat in einem Dioxan/Wasser-Gemisch blockiert. Diese Deblockierungs-/Blockierungssequenz verlief glatt und lieferte die gewünschte C-Galactosylaminosäure **157** in einer Ausbeute von 44 % über vier Stufen. Die Verbindung wurde als Racemat hergestellt, nicht zuletzt auch um Referenzsubstanzen für spätere enantioselektive Reduktionen zur Verfügung zu haben und die Bedingungen für eine optimale Trennung der Enantiomerenüberschüsse ausarbeiten zu können. Es konnte allerdings mit den zur Verfügung stehenden chromatographischen Mitteln selbst im analytischen Maßstab keine Trennung der Verbindungen **155**, **156** und **157** sowie der Zwischenprodukte erreicht werden. Im Falle der Endverbindung **157** konnte durch analytische RP-HPLC lediglich eine Teiltrennung der Diastereomere erzielt werden.



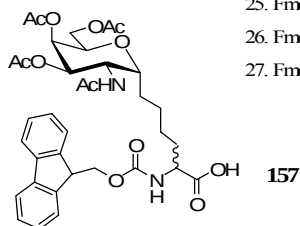
Schema 3.69: Synthese des C-glycosidischen T_N-Analogons **157**.

3.6.3 Die Synthese des MUC1-Tetanustoxin-Konjugates

Die C-Glycosylaminosäure **157** wurde in eine Partialsequenz der MUC1-Wiederholungseinheit eingebaut. Mit der Synthese des Glycopeptid-Konjugates **160** sollte ein weiteres Konzept zur Induktion einer Immunantwort und der Herstellung einer Tumorstoffimpfung verwirklicht werden. In früheren Studien war gezeigt worden, dass durch die Konjugation eines kaum immunogenen B-Zell-Epitops an T_H-Zell-Epitope deren Immunogenität gesteigert werden konnte.^[394, 395] Solche Konjugate bezeichnet man als Heterotope. Mit einem Konstrukt aus einem MUC1-Peptid epitop bestehend aus fünf Wiederholungseinheiten und einem T_H-Zell-Epitop des humanen Tetanustoxins konnte eine schwache *in vitro* Immunantwort induziert werden.^[100] Starke Immunantworten konnten mit einem Konjugat aus dem MUC1-Epitop (SAPDTRPA) und einem universellen Malaria-T_H-Zell-Epitop erreicht werden.^[396] Das Konstrukt aus einem MUC1-Sialylglycopeptid und einem Ovalbumin T-Zell-Epitop löste die Bildung von hochspezifischen Antikörpern aus.^[108] Vor diesem Hintergrund wurde das Konjugat **160** aufgebaut, welches eine Partialsequenz (⁵⁹¹TKIYSYFPSVI⁶⁰¹) des Tetanustoxins enthält. Dieser Teil entstammt einer Teilsequenz, die als universelles T-Zell-Epitop identifiziert wurde, da sie in der Lage ist, mit vielen unterschiedlichen HLA-Allelen zu interagieren.^[397] Zunächst erfolgte die Peptid-Festphasensynthese des MUC1-Glycopeptids an Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** nach dem in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Protokoll unter Verwendung der Kupplungsreagenzien HBTU, HOBt sowie DIPEA und den Lösemitteln DMF und NMP. Zur manuellen Kupplung der C-Glycoaminosäure **157** fanden HATU und HOAt Anwendung. Die Anbindung der nachfolgenden Aminosäuren zum Aufbau der Tetanustoxin-Partialsequenz sowie des Fmoc-geschützten Diethylenglycolspacers **159** erfolgte wieder unter den Standardkupplungsbedingungen der allgemeinen Arbeitsvorschrift. Der Diethylenglycolspacer **159** wurde in das Glycopeptid eingebaut, um einer gegenseitigen konformationellen Beeinflussung zwischen T_H-Zell-Epitop und MUC1-B-Zellepitop entgegenzuwirken.

Fmoc-AS-OH:

- | | |
|----------------------|--|
| 1. Fmoc-Thr(tBu)-OH | 13. Fmoc-Thr(tBu)-OH |
| 2. Fmoc-Ser(tBu)-OH | 14. Fmoc-Val-OH |
| 3. Fmoc-Gly-OH | 15. Fmoc-Gly-OH |
| 4. Fmoc-Pro-OH | 16. Fmoc-NH(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ CH ₂ COOH |
| 5. Fmoc-Ala-OH | 17. Fmoc-Ile-OH |
| 6. Fmoc-Pro-OH | 18. Fmoc-Val-OH |
| 7. Fmoc-Arg(Pmc)-OH | 19. Fmoc-Ser(tBu)-OH |
| 8. Fmoc-Thr(tBu)-OH | 20. Fmoc-Pro-OH |
| 9. Fmoc-Asp(OtBu)-OH | 21. Fmoc-Phe-OH |
| 10. Fmoc-Pro-OH | 22. Fmoc-Tyr(tBu)-OH |
| 11. Fmoc-Ala-OH | 23. Fmoc-Ser(tBu)-OH |
| 12. | 24. Fmoc-Tyr(tBu)-OH |
| | 25. Fmoc-Ile-OH |
| | 26. Fmoc-Lys(Boc)-OH |
| | 27. Fmoc-Thr(tBu)-OH |

Automatisierte Festphasensynthese:

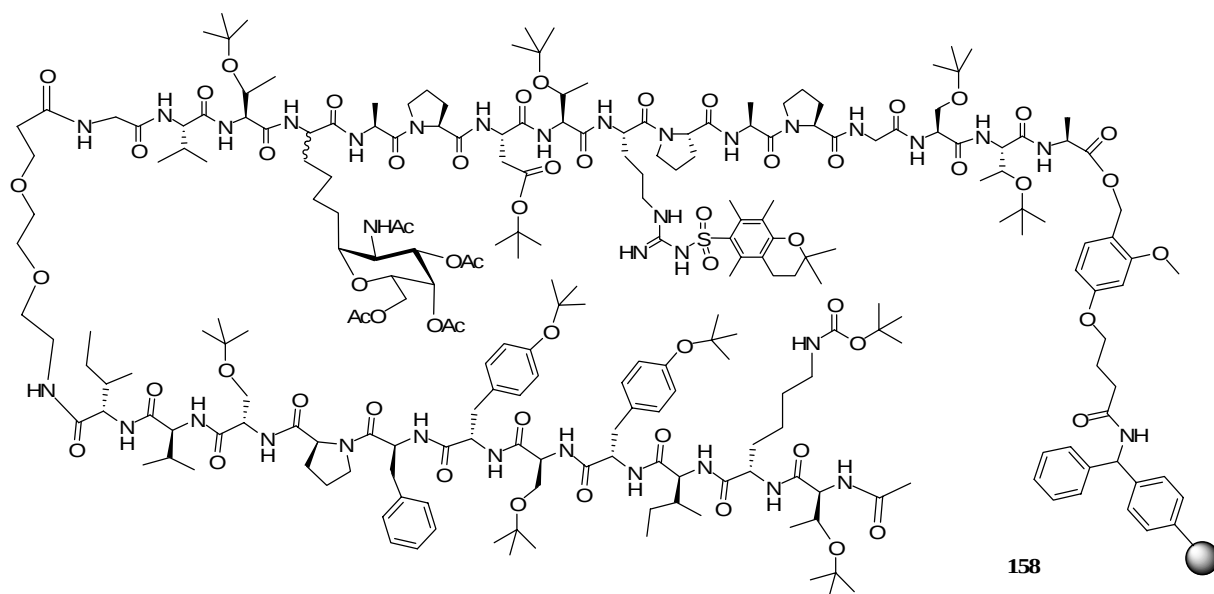
- I. *Deblockierung (Fmoc-Abspaltung):*
Piperidin/NMP (20 %), 3x 3 min
- II. *Aminosäurekupplung:*
10 Äquiv. Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBT, DIPEA
NMP/DMF (1:1), 20 min
- III. *Acetylierung (Capping):*
0.5 M Ac₂O, 0.125 M DIPEA, 0.015 M HOBT, NMP

26x

Manuelle Kupplung der Glycosylaminosäure:

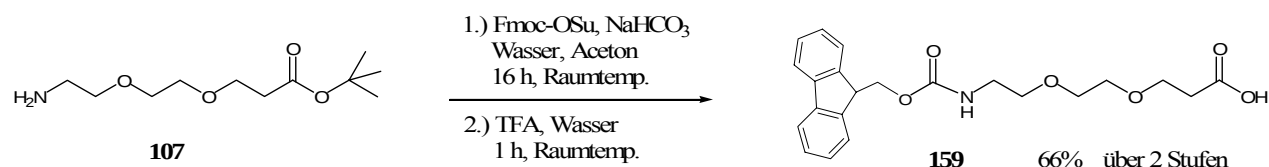
- I. *Deblockierung (Fmoc-Abspaltung):*
Piperidin, NMP (20%), 3x 3 min
- II. *Glycosylaminosäurekupplung:*
1.3 Äquiv. Verbindung **157**
HATU, HOAt, DIPEA, DMF/NMP (1:1), 6 h
- III. *Acetylierung (Capping):*
0.5 M Ac₂O, 0.125 M DIPEA, 0.015 M HOBT, NMP

1x



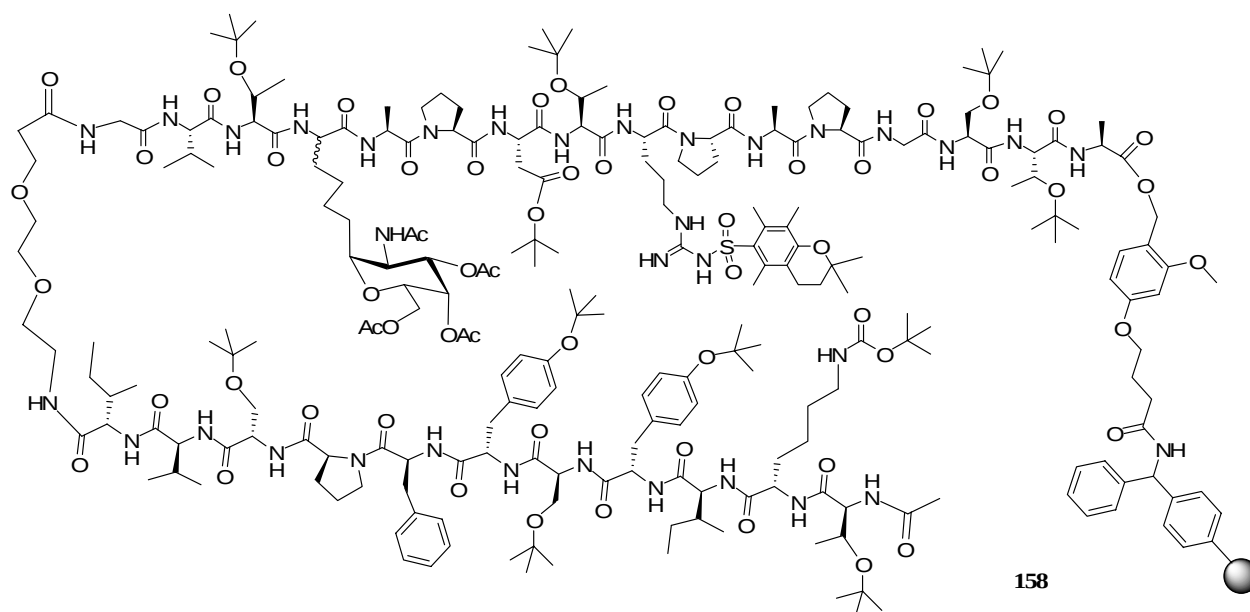
Schema 3.70: C-Glycopeptid-Festphasensynthese eines Konjugates aus der Partialsequenz der Wiederholungseinheit des MUC1 verknüpft mit dem C-Glycosid-Analogon des T_N-Antigens **157** und einem Tetanustoxin-Epitop.

Die Synthese des Spacers ist in Schema 3.71 gezeigt. Sie begann mit der Blockierung der Aminofunktion des Aminodiethylenglycolcarbonsäure-*tert*-butylester **107**, dessen Herstellung bereits in Kapitel 3.4 erläutert wurde, mit Fmoc-OSu und Natriumhydrogencarbonat in einem Aceton/Wasser-Gemisch. Dieser Umsetzung schloss sich die säurekatalysierte Spaltung des *tert*-Butylesters an. Den für die Peptid-Festphasensynthese einsetzbaren Diethylenglycolspacer **159** erhielt man in 66%iger Ausbeute.

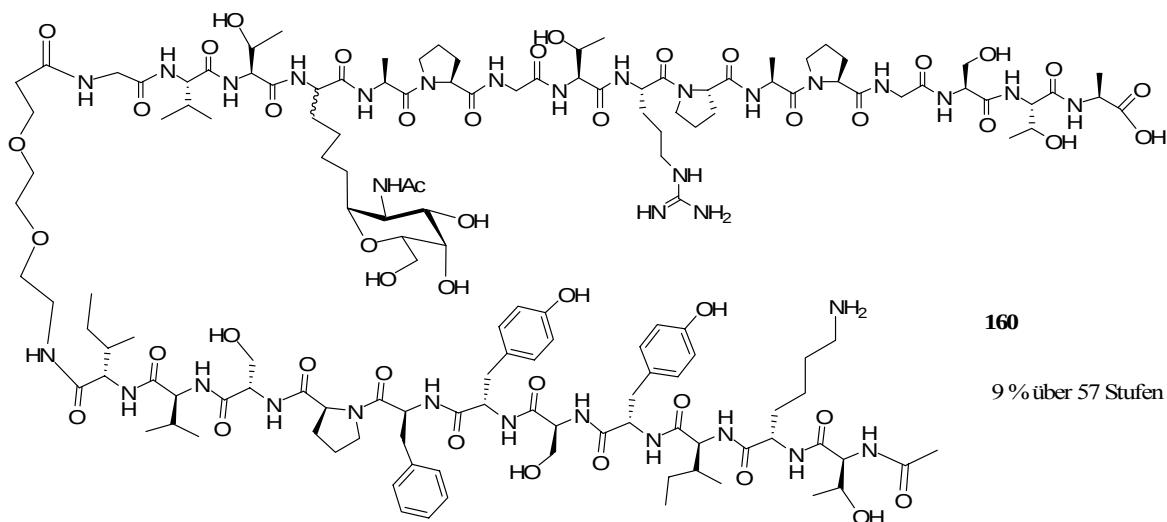


Schema 3.71: Synthese der Fmoc-geschützten Diethylenglycolcarbonsäure **159**.

Das Glycopeptidkonjugat wurde vom polymeren Träger mit 1%iger Trifluoressigsäure in Dichlormethan abgelöst, direkt gefolgt von der acidolytischen Abspaltung (TFA, Thioanisol, Wasser) der *tert*-Butylether-, Boc-, *tert*-Butylester- sowie der Pmc-Schutzgruppen. Abschließend wurden durch Zemplén-Umesterung (pH = 8.5-9) die Acetylschutzgruppen entfernt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurde das vollständig deblockierte Konjugat **160** in einer Ausbeute von 9 % über 57 Stufen (bezogen auf die Beladung mit Startaminosäure) erhalten (s. Schema 3.71).



- 1.) CH_2Cl_2 , TFA (1 %), 3x 4 min, Raumtemp.
 2.) TFA, Thioanisol, H_2O (25:0.9:0.9)
 2 h, Raumtemp.
 3.) NaOMe, absol. MeOH, pH = 8.5-9
 12 h, Raumtemp.



Schema 3.72: Abspaltung des Glycopeptid-Konjugates vom polymeren Träger und vollständige Deblockierung zum MUC1-Tetanustoxin-Konjugates **160**.

4. Zusammenfassung

Die Entwicklung von Tumorstoffen ist erstrebenswert, wenn man die Nachteile der alternativen, Therapiemöglichkeiten einer Krebserkrankung bedenkt. Auf epithelialen Tumorzellen sind charakteristische Veränderungen der Zelloberflächenglycoproteine festgestellt worden. Darum sind Glycopeptidfragmente dieser veränderten Zelloberflächenmoleküle als tumorassoziierte Antigene zur Unterscheidung von normalen und malignen Zellen von großem Interesse. Das membranständige Glycoprotein MUC1 ist auf epithelialen Tumorzellen stark überexprimiert. Es zeigt ein charakteristisch verändertes Glycosylierungsmuster, wobei die Saccharidketten stark verkürzt und mit Sialinsäureresten versehen sind. Diese tumorassoziierten Saccharid-Epitope sowie wegen der kurzen Saccharide nun zugängliche Epitope des Proteinrückgrates können vom Immunsystem erkannt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb synthetische Glycopeptide hergestellt, in denen die tumorassoziierten Saccharidantigene mit Partialsequenzen aus der Wiederholungseinheit des Glycoproteins MUC1 kombiniert wurden.

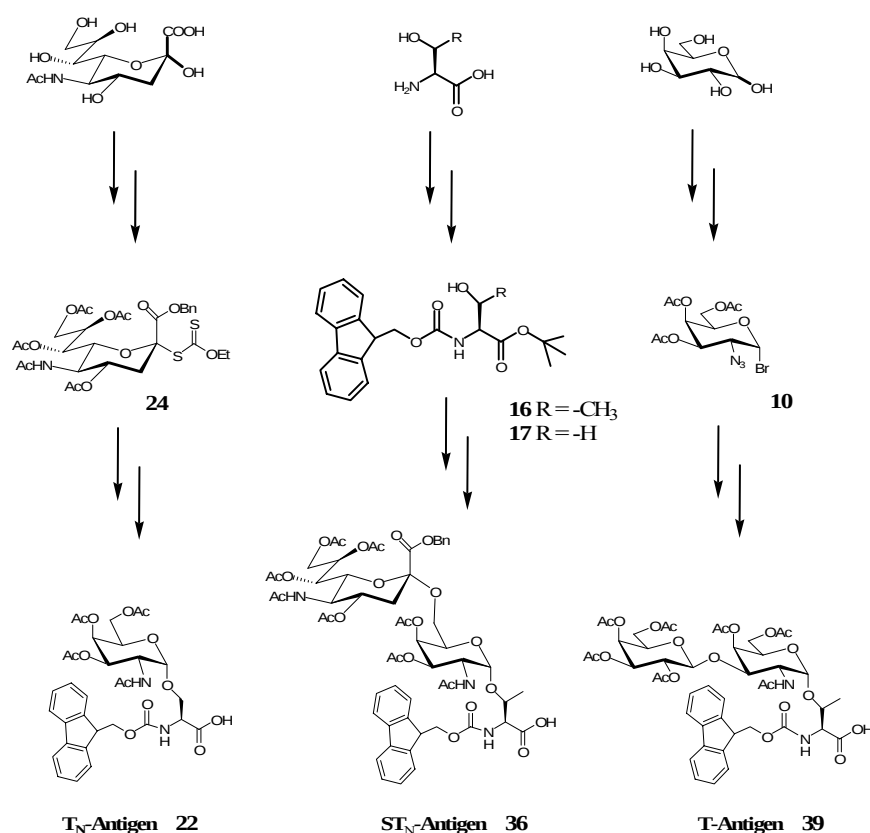


Abb. 4.1: Synthese Fmoc-geschützter tumorassoziiierter Glycosylaminosäure-Bausteine 22, 36 und 49 für die Festphasensynthese.

Dafür erfolgte zuerst die Synthese der glycosylierten Fmoc-geschützten Aminosäuren des T_N-**22**, des ST_N- **36** und des T-Antigens **39**. Während deren Synthese wurden die O-glycosidischen Bindungen zu den orthogonal geschützten Hydroxyaminosäuren **16** bzw. **17** nach Koenigs-Knorr mit dem Azidogalactosylbromid **10** und zum anderen durch Sialylierung mit dem Sialinsäureexanthogenat **24** als Glycosyldonor gebildet. Durch Peptid-Festphasensynthese an einem mit Alanin beladenem HMPB-BHA-Harz **86** wurden die MUC1-Glycohexadecapeptide **91**, **93** und **101** nach der Fmoc-Strategie aufgebaut.

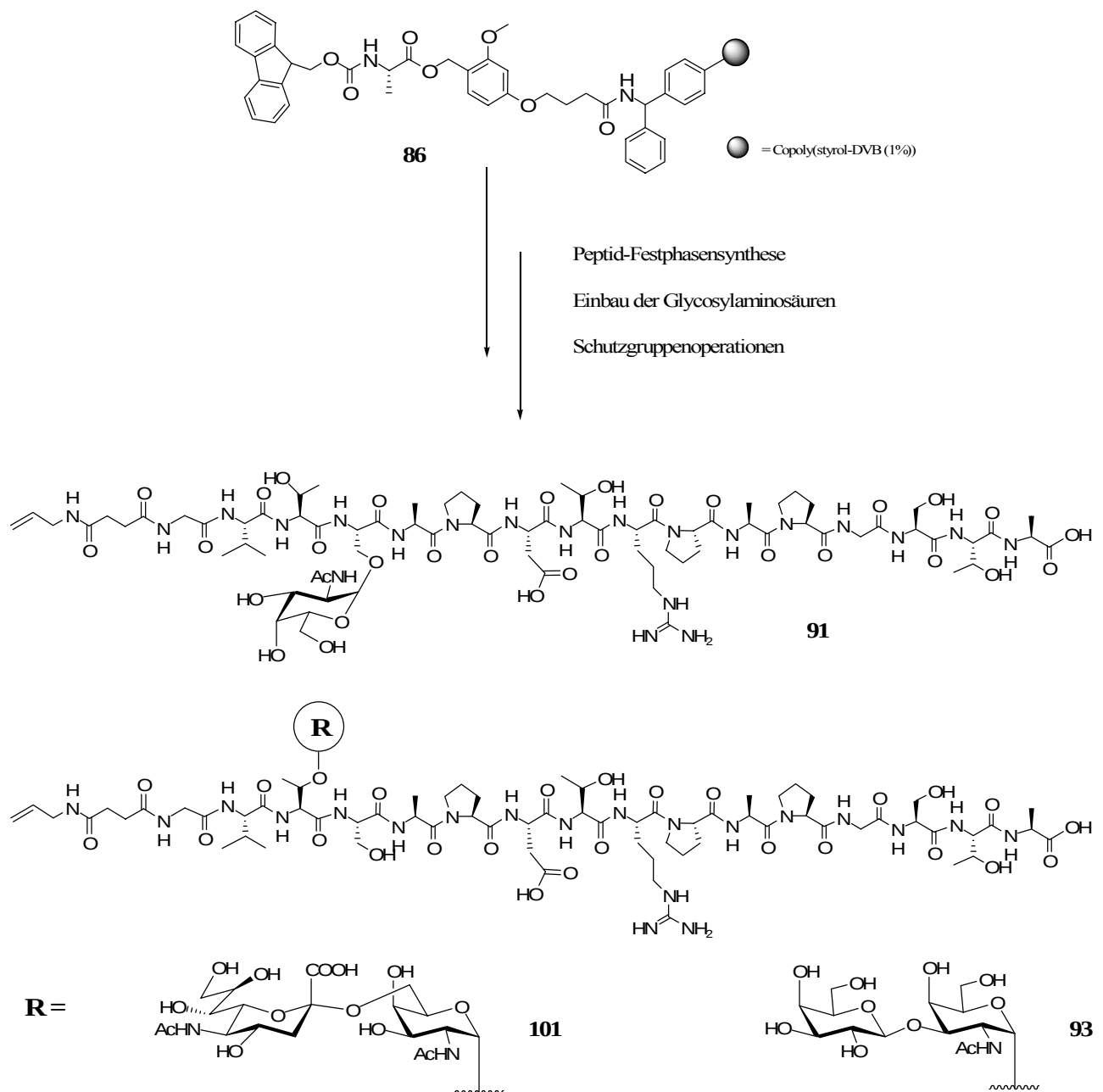


Abb. 4.2: Glycopeptid-Festphasensynthese der mit Allylamid funktionalisierten MUC1-Glycohexadecapeptide **91**, **93** und **101**.

Diese synthetischen Glycopeptidantigene mussten nun an immunogene Träger, wie z.B. Trägerproteine, gebunden werden, denn im Allgemeinen sind (Glyco)Peptide mit einem Molekulargewicht unter 2-5 kDa nicht immunogen. Um die Anbindung eines vollständig deblockierten, strukturell definierten Glycopeptids an ein Protein zu einem definierten Neoglycoprotein zu erreichen, wurde als neuer Weg die radikalische Addition eines auf dem Trägerprotein fixierten Thiols an ein Allylamid des Glycopeptidantigens untersucht. In Modellstudien an Allylamiden von verschiedenen Aminosäure- und Peptid-Derivaten wurde diese radikalische Thiol-Addition überprüft.

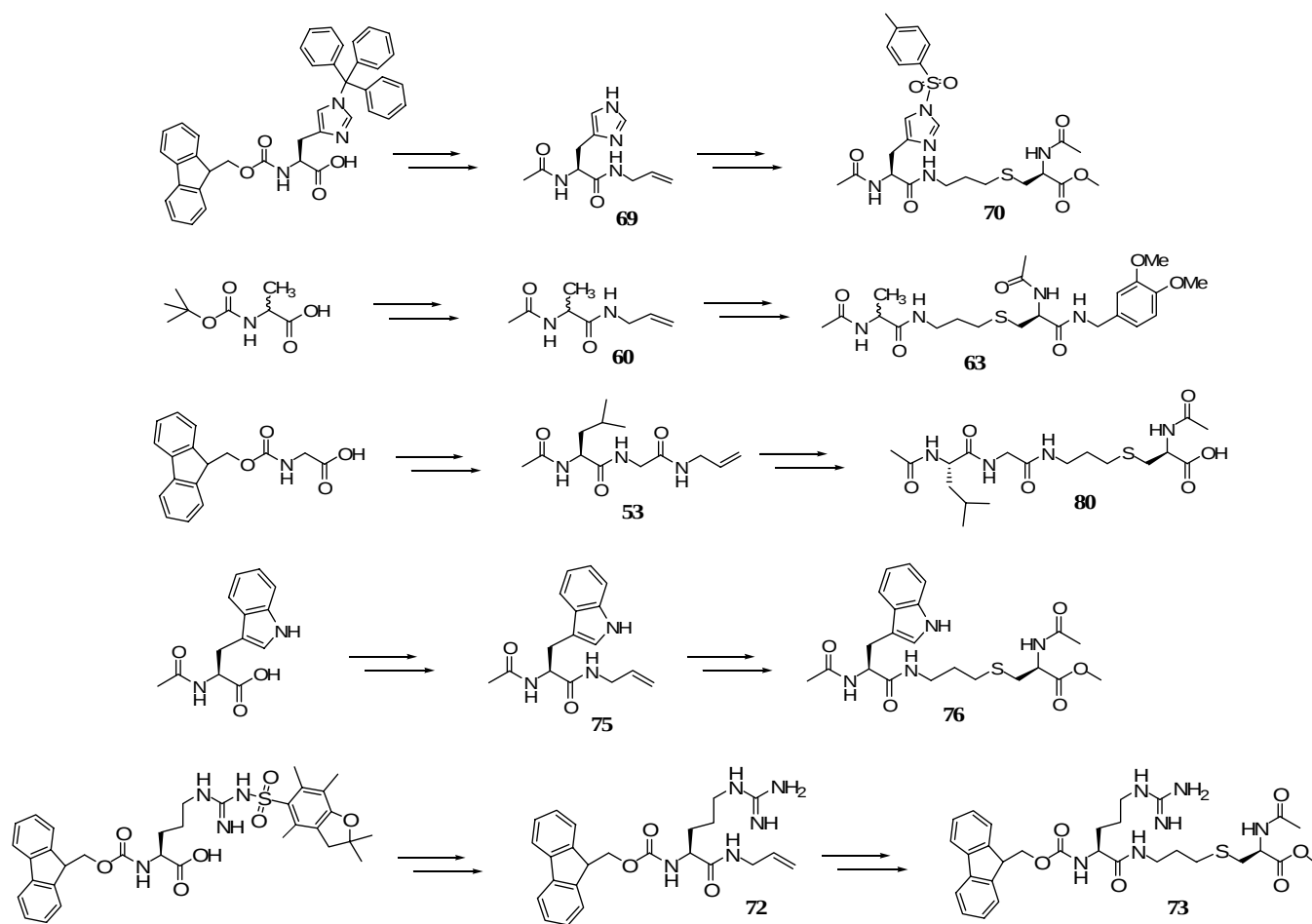


Abb. 4.3: Auswahl an synthetisierten Modellaminosäuren und Thioethern zur Untersuchung der radikalischen Thiol-Addition an Allylamide.

An diese Modellpeptid-allylamide wurden Cystein-Derivate unter Bestrahlung mit UV-Licht oder Thermolyse eines bei moderater Temperatur aktivierbaren Radikalstarters addiert. Die Bildung der Thioether erfolgte in zufrieden stellenden bis hohen Ausbeuten. Nebenreaktionen traten selbst an sensiblen Aminosäuren nicht ein.

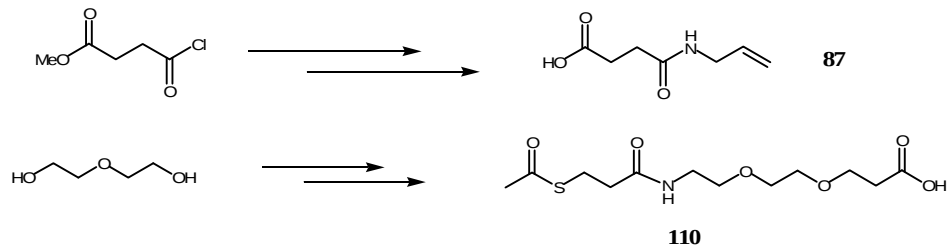


Abb. 4.4: Spacer-Moleküle **87** und **110** für die Thiol-Olefin-Addition.

Zur Übertragung dieser Konjugierung auf Proteine wurde Rinderserumalbumin (BSA) mit dem S-Acetyl-geschützten Thiodiethylenglycolcarbonsäure-Spacer **110** modifiziert, der selbst mehrstufig aus Diethylenglycol gewonnen worden war. Die synthetischen Glycopeptide wurden zum Abschluss der Festphasensynthese mit dem Allylamidobornsteinsäure-Spacer **87** versehen.

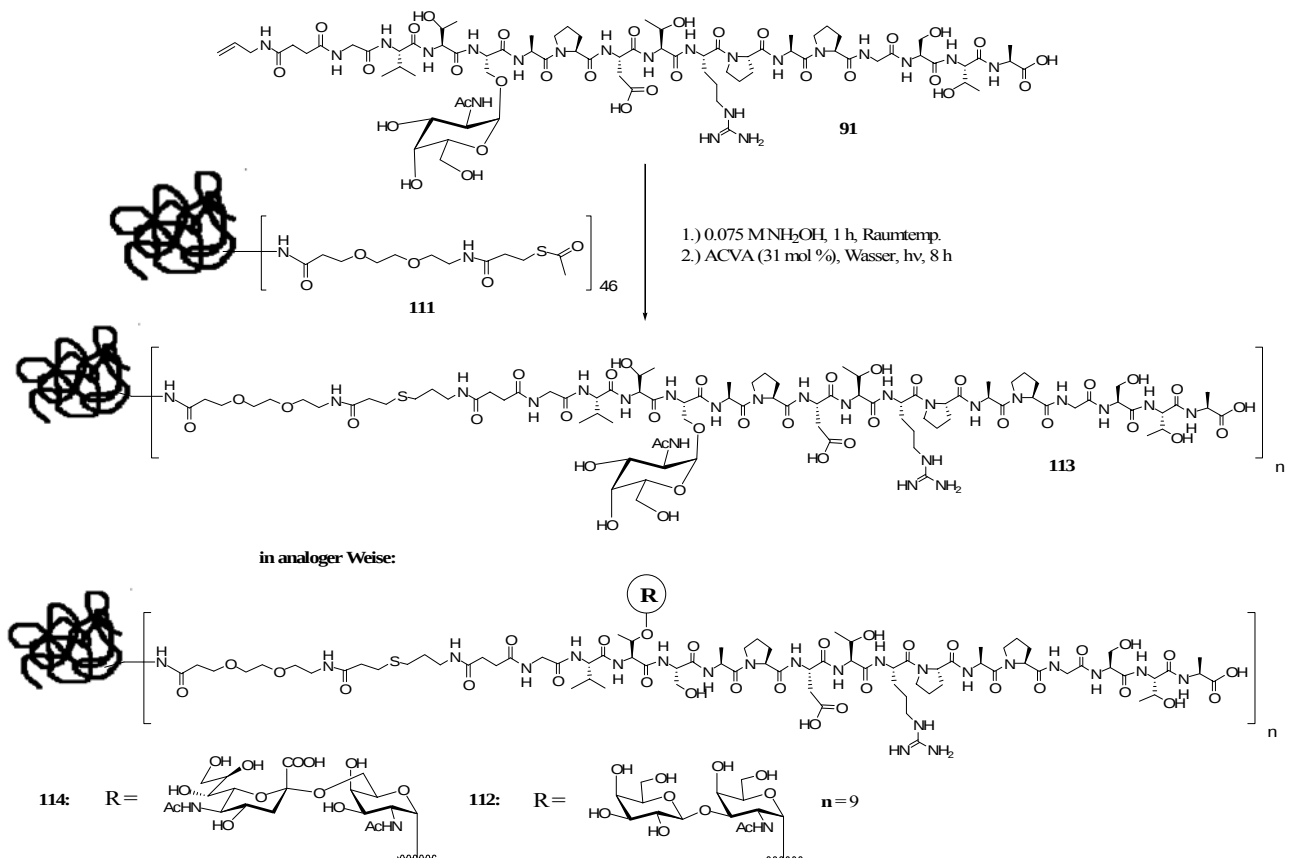


Abb. 4.5: Konjugate von mit Allylamid-Gruppen modifizierten Glycopeptiden aus der Wiederholungseinheit des tumorassoziierten MUC1-Glycoproteins mit Thiol-funktionalisiertem BSA.

Nach der Abspaltung der *S*-Acetyl-Schutzgruppe von den aufgepfropften Thiolgruppen am BSA-Molekül konnten die Glycopeptid-Haptene photolytisch bzw. radikalisch zu den Protein-Konjugaten **112**, **113** und **114** verknüpft werden.

Die tumorassoziierte Form des MUC1-Glycoproteins bildet in der Wiederholungseinheit eine Turn-Struktur aus, die als knaufartig beschrieben wird. Dieses Strukturelement sollte nun in synthetischen Ausschnitten aus der Domäne der MUC1-Wiederholungseinheit durch Cyclisierung fixiert werden. Die cyclischen (Glyco)Peptide, die die immundominante PDTRP-Sequenz einschließen, wurden unter Einsatz der Ringschlussmetathese gewonnen. Dazu bedurfte es zunächst der Synthese von mit Allylgruppen ausgestatteten und für die Peptid-Festphasensynthese geeigneten Aminosäurebausteinen. So konnte der Fmoc-geschützte Serin-allylether **117** ausgehend von *N*-Boc-Serin erhalten werden.

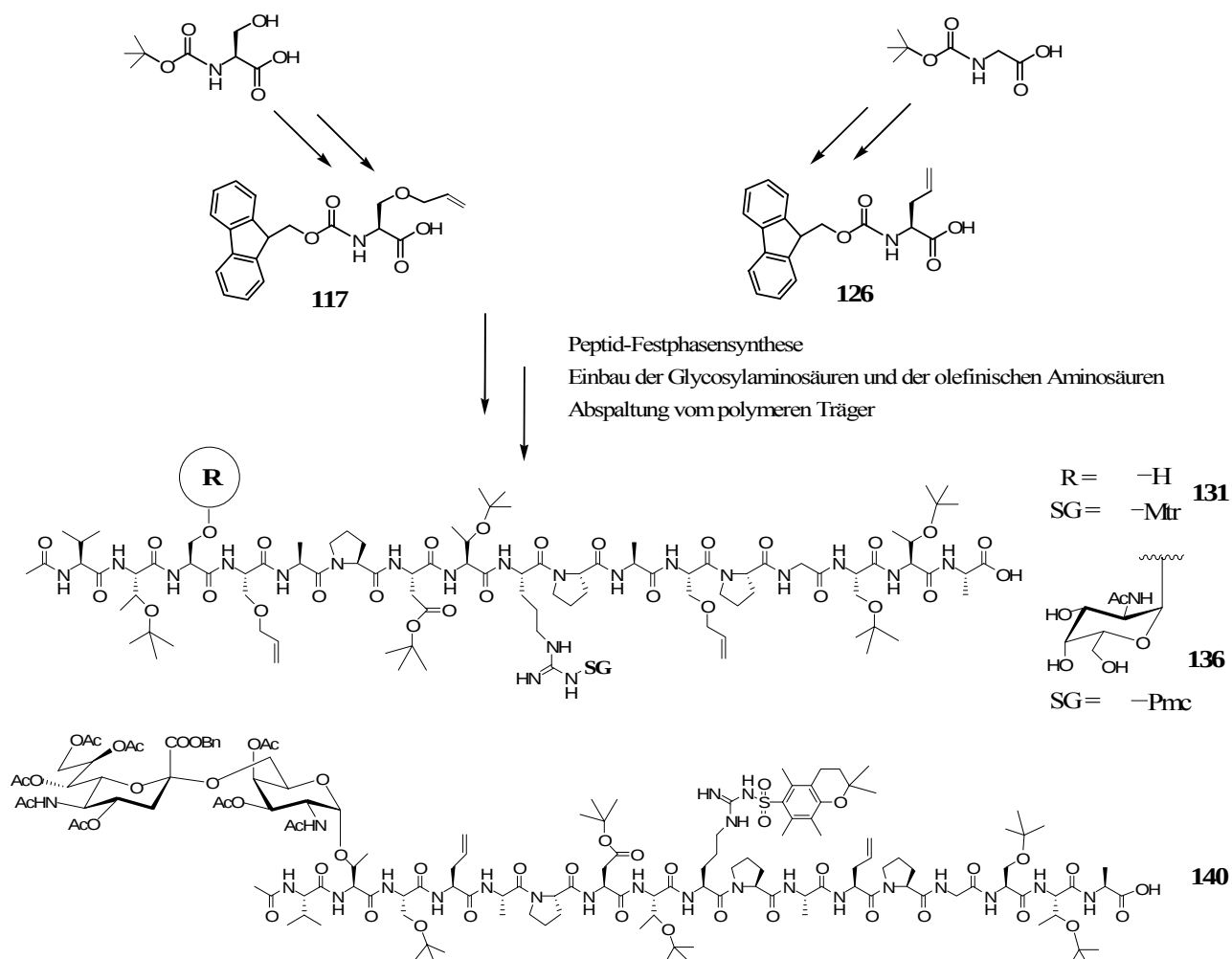


Abb. 4.6: Synthese von mit Allyl-Seitengruppen ausgestatteten MUC1-Glychoeptadeca-peptide **131**, **136** und **140**.

Zur Herstellung des Fmoc-geschützten Allylglycins **126** wurde *N*-Boc-Glycin-allylester über eine Claisen-Umlagerung und eine enantioselektive enzymatische Esterhydrolyse in den L-Allylglycin-Baustein **126** überführt. Mit diesen Soll-Verknüpfungselementen wurden an der Festphase die linearen (Glyco)Peptide aufgebaut. Zur Cyclisierung wurden die Glycoheptadecapeptide **131**, **136** und **140** unter Verwendung des Grubbs-Katalysators der 1. bzw. 2. Generation der Metathese-Reaktion unterworfen. Die im Cyclus entstandene Doppelbindung konnte durch katalytische Transferhydrierung reduziert werden. Die schlussendliche Abspaltung aller Schutzgruppen lieferte die cyclischen MUC1-Glycoheptadecapeptide **134**, **138** und **142**.

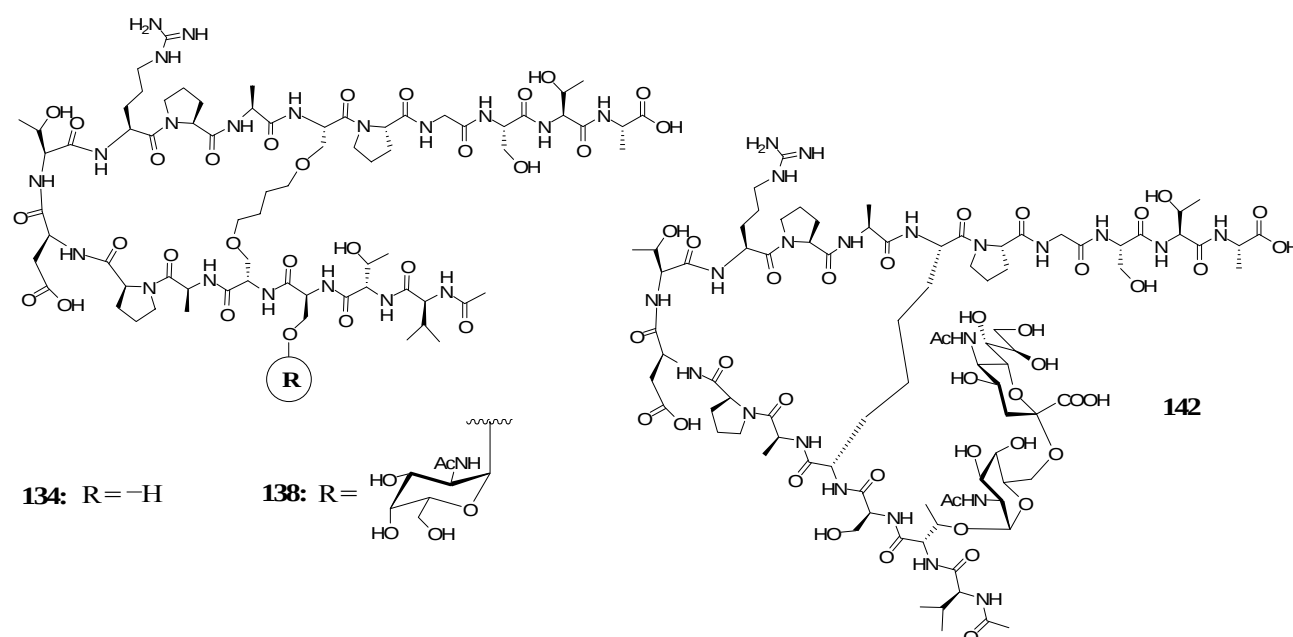


Abb. 4.7: Die über Ringschlussmetathese erhaltenen cyclischen MUC1-Glycoheptadecapeptide **134**, **138** und **142**.

N-Acetyl- α -D-galactosamin bildet die fundamentale Verknüpfungsstruktur in biologisch relevanten Mucin-Glycoproteinen. Für eine pharmakologische Anwendung von Ausschnitten dieser Glycoproteine z.B. als Tumorstoffe ist die ausreichende Stabilität von deren O-glycosidischer Bindung gegen enzymatischen Abbau von besonderer Bedeutung. Daher sollte der Austausch des am C1 des Saccharids gebundenen Sauerstoffatoms gegen eine Methylengruppe in O-Glycopeptiden angestrebt werden, um diese zentrale Verknüpfung zu stabilisieren. Zur Gewinnung eines C-glycosidischen T_N-Glycopeptid wurde die C-glycosidisch verknüpfte *N*-Acetylgalactosamin-Aminosäure **157** hergestellt, die als Fmoc-Aminosäure-Derivat für die Festphasensynthese geeignet wäre.

Deren Synthese gelang ausgehend von D-Glucosamin, das über eine radikalische Allylierungsreaktion in das 1-Propenyl-*N*-acetylglucosamin-Derivat **146** überführt wurde. Die Umwandlung der Glucose-Form in das Galactosamin-C-Glycosid **148** erfolgte durch eine Konfigurationsumkehr an C4 über eine Acyl-Umlagerung. Die Verknüpfung des C-Allyl-Monosaccharids mit der Aminosäure geschah durch *B*-Alkyl-Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung an die Brom-vinyl-Aminosäure **153**. Dieses Dehydroalanin-Derivat **153** war in einer vierstufigen Synthese aus *N*-Boc-Serin erzeugt worden. Nachfolgend wurde durch Hydrierung der Doppelbindung und Schutzgruppenoperationen die Synthese des C-glycosidischen Glycoaminoäure **157** vollendet. Dieses Fmoc-geschützte T_N-Antigen-Analogon wurde in die Festphasensynthese eingesetzt und so in die MUC1-Partialsequenz eingebaut. An dieses Glycopeptid wurde in Fortführung der Festphasensynthese ein universelles T_H-Zell-Epitop aus dem Tetanustoxin über einen Diethylenglycolspacer angebunden. Nach der Schutzgruppenabspaltung konnte das C-glycosidische MUC1-Tetanustoxin-Konjugat **160** erhalten werden.

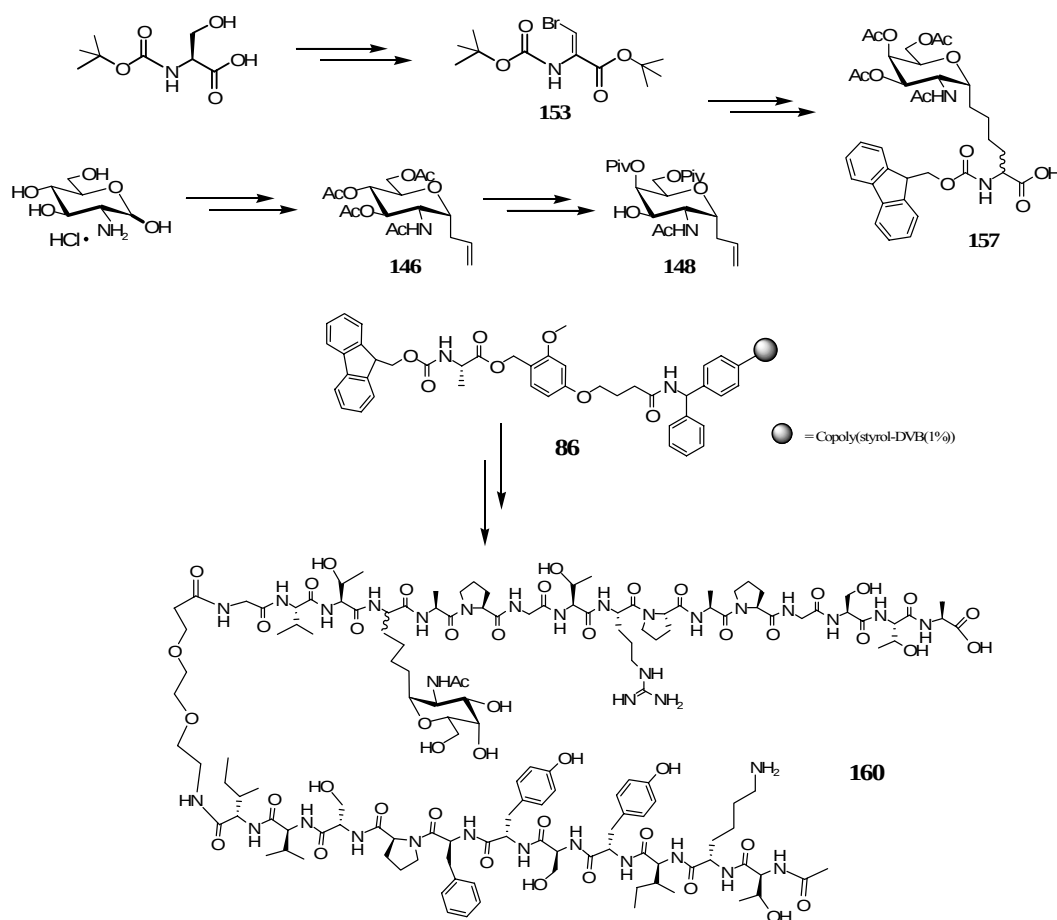


Abb. 4.8: C-glycosidischer Aminosäure-Festphasenbaustein **157** und das MUC1/Tetanustoxin-Glycopeptid-Konjugat **160**.

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Dünnschichtchromatographie:

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf Aluminium-Fertigplatten der Fa. Merck angefertigt, die mit Kieselgel 60 F₂₄₅ beschichtet sind. Die Detektion der Verbindungen erfolgte mit Hilfe einer der folgenden Methoden:

- UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$.
- Iod-Kristalle in einer DC-Entwicklungskammer.
- Lösung von 320 mg Tolidin, 2 g KI, und 60 mL Eisessig in 940 mL Wasser (nach vorheriger Chlorierung in einer DC-Entwicklungskammer mittels wässriger NaOCl-Lösung (13 %) und halbkonz. HCl-Lösung).
- Ninhydrin-Sprühareagenz (1.5 g Ninhydrin in einer Mischung aus 15 mL Eisessig, 500 mL Methanol; Entwicklung durch Wärmeeinwirkung).
- Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat, 2.5 g Molybdätophosphorsäure in einer Mischung aus 94 mL dest. Wasser und 6 mL konz. Schwefelsäure; Entwicklung durch Wärmeeinwirkung).
- Zuckerreagenz (Eine Mischung aus gleichen Teilen Zuckerreagenz I (Mischung aus 50 mL Ethanol und 2.7 mL konz. Schwefelsäure) und Zuckerreagenz II (Mischung aus 0.1 mL *p*-Methoxyphenol und 50 mL Ethanol; Entwicklung durch Wärmeeinwirkung)).

Säulenchromatographie:

Säulenchromatographische Reinigungen wurden nach dem Verfahren der Flash-Chromatographie^[398] an Kieselgel der Fa. MP Biomedicals (Partikelgröße 32-63 μm) durchgeführt. Die Säulendimensionen (Höhe x Durchmesser) sowie die verwendeten Laufmittelgemische (angegeben in Volumenverhältnissen (z.B. Cyclohexan/Ethylacetat 1:1)) sind bei den einzelnen Verbindungen aufgeführt.

Elementaranalysen:

Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor des Institutes für Organische Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt.

Drehwerte:

Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 241 bei den Wellenlängen $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 578$ nm in einer 10 cm langen Polarimeterzelle gemessen und auf die Natrium-D-Linie ($\lambda = 589$ nm) extrapoliert. Die Konzentration in g pro 100 mL und das verwendete Lösemittel sind bei den Drehwerten angegeben.

Schmelzpunkte:

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Umlaufapparatur nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi bestimmt und sind unkorrigiert.

NMR-Spektroskopie:

Die Messungen von 300 MHz- ^1H - und 75.5 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Bruker AC-300-Spektrometer vorgenommen. Die 400 MHz- ^1H - und 100.6 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Bruker AM-400-Spektrometer und einem Bruker AV-400-Spektrometer aufgenommen. Die Messungen der 600 MHz- ^1H - und 150.9 MHz- ^{13}C -NMR-Spektren erfolgten an einem Bruker DRX-600-Spektrometer. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu den Signalen der Lösemittel CDCl_3 (^1H , $\delta = 7.26$; ^{13}C , $\delta = 77.16$), DMSO-d_6 (^1H , $\delta = 2.50$; ^{13}C , $\delta = 39.52$), MeOH-d_4 (^1H , $\delta = 3.31$; ^{13}C , $\delta = 49.00$), D_2O (^1H , $\delta = 4.79$), Benzol-d_6 (^1H , $\delta = 7.16$; ^{13}C , $\delta = 128.06$) und Aceton-d_6 (^1H , $\delta = 2.05$; ^{13}C , $\delta = 29.84$) angegeben.

Massenspektrometrie:

Die Feld-Desorptions-Massenspektren wurden bei 20 kV Beschleunigungsspannung mit einem MAT-95-Spektrometer der Fa. Finnigan gemessen.

MALDI-TOF Massenspektren wurden mit einem Axima-CFR Gerät der Fa. Kratos, Eppstein aufgenommen. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxy-benzoesäure (dhb) verwendet. Die angegebenen Messwerte geben den Schwerpunkt der Einhüllenden aller Isotopenpeaks an.

ESI-Massenspektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

Gerät 1: Navigator 1-Instrument (Fa. ThermoQuestElectron) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser 70:30 bei einer Flussrate von 0.75 mL/min, einer Cone Voltage von 25 V bzw. 70 V und einem Stickstoffstrom von ca. 300 L/h aufgenommen.

Zur Probeninjektion wurde ein Basic-Marathon Autosampler (Fa. Spark) mit einer 20 µL-Probenschleife (Probenkonzentration 0.1 g/L) und ein HPLC-Pumpensystem (Fa. Knauer) mit einem nachgeschalteten Flussteiler (Splitverhältnis etwa 10:1) verwendet.

Gerät 2: Micromass-Q-TOF-Ultima 3-Massenspektrometer der Fa. Waters. An diesem Gerät wurden die HR-MS-Messungen durchgeführt.

Eine Lösung von Natriumformiat diente als interne Referenz bzw. beim Einsatz eines „LockSpray-Interface“ dienten Natriumformiat oder NaI/CsI in Wasser/Isopropanol Gemischen als externe Referenz. Je nach Substanz wurde ein Gemisch von Acetonitril und Wasser oder Methanol und Wasser zur Probeninjektion verwendet.

RP-HPLC-Chromatogramme:

Analytische RP-HPLC wurde mit einer Knauer Wellchrom MaxiStar K1000-Pumpe mit 10 mL Edelstahlpumpenkopf und Niederdruckgradientenausbausatz, Knauer 4-Kanal-Degasser, einer analytischen Mischkammer und einem Knauer Diodenarraydetektor DAD K-2800 durchgeführt. Es wurde eine Flussrate von 1 mL/min verwendet. Als mobile Phase wurden Wasser/MeCN-Gemische (A: Wasser; B: Acetonitril bzw. C: 0.1 % TFA in Wasser; D: 0.1 % TFA in Acetonitril) verwendet und als Trennsäulen kamen zum Einsatz:

- Säule A: Eurospher C18 / 7µm, 250 x 4.00 mm (Fa. Knauer).
- Säule B: Luna[®] C18(2) / 5µm, 100Å, 250 x 4.60 mm (Fa. Phenomenex)
- Säule C: Jupiter[™] C18 / 5µm, 300Å, 250 x 4.60 mm (Fa. Phenomenex).
- Säule D: Aqua[™] C18 / 5µm, 200Å, 250 x 4.60 mm (Fa. Phenomenex).

Präparative RP-HPLC wurde mit zwei Knauer Wellchrom MiniStar K500-Pumpen (jeweils mit 50 mL Edelstahlpumpenkopf) in Hochdruckgradientenschaltung, einer präparativen Mischkammer und einem Knauer „Variable Wavelength Monitor“ als UV-Detektor durchgeführt. Im Allgemeinen wurde 25 mL/min als Flussrate eingestellt (Änderungen sind bei den jeweiligen Verbindungen aufgeführt). Die zur Detektion verwendete Wellenlänge ist ebenfalls bei den jeweiligen Verbindungen vermerkt.

Als mobile Phase wurden Wasser/MeCN-Gemische (A: Wasser; B: Acetonitril bzw. C: 0.1 % TFA in Wasser; D: 0.1 % TFA in Acetonitril) verwendet. Als Trennsäulen wurden eingesetzt:

- Säule E: Eurospher100 C18 / 7 μ m, 250 x 40 mm (Fa. Knauer).
- Säule F: Luna[®] C18(2) / 10 μ m, 250 x 50.0 mm (Fa. Phenomenex)

Semipräparative RP-HPLC wurde mit den Pumpen der präparativen RP-HPLC durchgeführt, wobei aber niedrigere Flussraten eingestellt wurden (i. a. 15 mL/min). Die Detektion erfolgte mit dem Detektor der präparativen RP-HPLC. Die verwendete Wellenlänge ist bei den jeweiligen Verbindungen aufgeführt. Als Eluenten wurden Wasser/MeCN-Gemische verwendet.

- Säule G: Jupiter C18 / 5 μ m, 300Å, 250 x 20 mm (Fa. Phenomenex).
- Säule H: Luna[®] C18(2) / 10 μ m, 250 x 21.20 mm (Fa. Phenomenex)

Die verwendeten Gradienten sind bei den Verbindungen angegeben. Bei allen RP-HPLC-Analysen wurden die Lösemittel vor Gebrauch 20 Minuten im Ultraschallbad entgast. Das Wasser wurde einem Simplicity-185-Wasseraufbereitungssystem der Fa. Millipore entnommen. Acetonitril wurde in HPLC-Qualität bei der Fa. FischerScientific erworben.

Lösemittel:

Absolute Lösemittel (Acetonitril, 1,2-Dichlorethan, Dichlormethan, Methanol, Ethanol, THF, Toluol) wurden nach den üblichen Verfahren getrocknet,^[399] destilliert und frisch eingesetzt. Absolutes DMF wurde in Septenflaschen über Molekularsieb von der Fa. Fluka bezogen. DMF p.a. (aminfrei, zur Peptidsynthese) wurde von der Fa. Roth bezogen. Die für chromatographische Trennungen verwendeten Lösemittel Ethylacetat, Cyclohexan, Methanol, Ethanol und Dichlormethan wurden vor Gebrauch destilliert.

Lösemittel wurden durch 15-minütiges Einstellen in ein Ultraschallbad unter Argon-Atmosphäre und durch drei folgende pump-freeze-Zyklen entgast. Bei großen Lösemittelmengen wurde mehrere Stunden ein Stickstoff- bzw. Argongasstrom durch die Lösemittel geleitet.

5.2 Versuche zu Kapitel 3.1.1

3,4,6-Tri-O-acetylgalactal^[113, 400-402] (7)

Methode a):

Zu einer Suspension von 0.50 g (2.78 mmol) D-Galactose in 300 mL Acetanhydrid und 1.1 mL Perchlorsäure (60 %ig) gibt man portionsweise unter gelegentlicher Kühlung 34.0 g (191 mmol) D-Galactose. Man rührt die Reaktionslösung 3 h bei Raumtemp. und tropft dann innerhalb von 40 min 155 mL Bromwasserstoffsäure in Eisessig (33%ig) bei Raumtemp. zu. Nach 20-stündigem Rühren bei Raumtemp. wird mit 300 mL Chloroform verdünnt. Man gießt die Reaktionslösung auf 200 g Eis und trennt die wässrige Phase ab. Zur organischen Phase werden 200 mL Eiswasser gegeben und man neutralisiert mit Natriumhydrogencarbonat. Die organische Phase wird fünfmal mit je 100 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 100 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wird das Lösemittel i. Vak. abgedampft. Das Rohprodukt (79.0 g) wird direkt für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

130.0 g (1.99 mol) Zink-Staub werden in 2 N HCl aufgeschlämmt, mit dest. Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet. Diesen aktivierten Zink-Staub suspendiert man in 700 mL Ethylacetat und 15.4 mL (195 mmol) 1-Methylimidazol und erhitzt zum Sieden. Man tropft zu der Suspension innerhalb von 2.5 h 79.0 g (192 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-galactosylbromid gelöst in 230 mL Ethylacetat. Die Reaktionsmischung wird weitere 90 min zum Sieden erhitzt. Man verdünnt mit 300 mL Ethylacetat, filtriert über „Hyflo-Supercel[®]“ und wäscht das Filtrat einmal mit 150 mL 2 N HCl und zweimal mit je 200 mL NaHCO₃-Lsg. Man trocknet über MgSO₄ und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (4:1) gereinigt.

Ausbeute: 37.8 g (72 %); R_f (Ac₅Gal) = 0.71 (CH₂Cl₂/EtOAc 5:1), R_f (Ac₄GalBr) = 0.72 (CH₂Cl₂/EtOAc 5:1).

Methode b):

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von Ac₅Gal **8** (23.4 g, 61 mmol), 71 mL Chloroform und 23.5 mL (39.0 g, 317 mmol) Acetylbromid gibt man bei 0 °C tropfenweise unter gutem Rühren 3.9 mL (218 mol) Wasser. Man lässt auf Raumtemp. erwärmen und rührt 90 min. Dann entfernt man die Lösemittel i. Vak. und koevaporiert viermal mit je 150 mL Toluol.

Das zurückgebliebene Öl wird in 188 mL Eisessig aufgenommen und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung gibt man bei 0 °C 188 mL Wasser, 23 g (352 mmol) Zink-Staub sowie 2.27 g (9.21 mmol) Kupfersulfat-Pentahydrat und rührt bei dieser Temperatur 1 h. Man filtriert über „Hyflo-Supercel[®]“ ab und extrahiert viermal mit je 250 mL Toluol. Die vereinigten Toluol-Phasen werden dreimal mit je 200 mL Wasser und zweimal mit je 350 mL ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, mit NaSO₄ getrocknet und das Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Die Substanz fällt in genügender Reinheit für den nachfolgenden Reaktionsschritt an.

Ausbeute: 14.7 g (88 %); hellgelbes Öl; R_f = 0.37 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1).

C₁₂H₁₆O₇ MW: 272.25 EM: 272.0896.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 6.40 (dd, 1H, H-1, J = 1.84 Hz, J = 6.25 Hz); 5.49 (m, 1H, H-3); 5.36 (m, 1H, H-4); 4.66 (m, 1H, H-2); 4.25 (m, 1H, H-5); 4.16 (m, 2H, H-6); 2.06 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.02 (s, 3H, CH₃ OAc); 1.96 (s, 3H, CH₃ OAc).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ(ppm): 170.46, 170.17, 170.04 (3C, 3x C=O OAc); 145.35 (1C, C-1); 98.79 (1C, C-2); 72.75 (1C, C-5); 63.84 (1C, C-3); 63.69 (1C, C-4); 61.86 (1C, C-6); 20.72, 20.66, 20.57 (3C, 3x CH₃ OAc).

3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy-α/β-D-galactosylnitrat^[114, 400] (9)

Eine Suspension von 156.6 g (290 mmol) trockenem Cerammoniumnitrat in 300 mL absol. Acetonitril wird auf -28 °C abgekühlt und mit 9.3 g (140 mmol) trockenem Natriumazid versetzt. Man tropft dann eine Lösung von 15.1 g (92 mmol) 3,4,6-Tri-O-acetylgalactal **7** in 200 mL absol. Acetonitril hinzu und rührt 20 h bei -28 °C unter Argon. Anschließend versetzt man die intensiv gelb gefärbte Suspension mit 500 mL kaltem Diethylether und 400 mL Eiswasser. Man schüttelt und trennt die Phasen. Die organische Phase wird zweimal mit je 400 mL Eiswasser, einmal mit 400 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingeeengt.

Das Rohprodukt wird chromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (48:10) gereinigt.

Ausbeute: 7.7 g (37 %); farbloses Öl; R_f = 0.39 (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1).

$C_{12}H_{16}N_4O_{10}$ MW: 376.28 EM: 376.0866.

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromid^[114, 400] (10)

In 90 mL absol. Acetonitril werden 9.16 g (24.4 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactosylnitrat **9** gelöst und zu einer intensiv gerührten Suspension von 10.6 g (122 mmol) trockenem Lithiumbromid in 90 mL absol. Acetonitril gegeben. Man lässt 17 h unter Argon bei Raumtemp. rühren und verdünnt dann mit 500 mL Dichlormethan. Die organische Phase wird zweimal mit je 100 mL Wasser gewaschen, mit $MgSO_4$ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Man erhält ein gelbes Öl, das sofort in der nächsten Synthesestufe eingesetzt wird.

Ausbeute: 9.6 g (quant.); gelbliches Öl; R_f = 0.39 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1).

$C_{12}H_{16}N_3O_7Br$ MW: 394.18 EM: 393.0172.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin^[116, 403] (14)**

(Fmoc-Thr-OH)

In 800 mL Aceton/Wasser (1:1) werden 20.0 g (168 mmol) L-Threonin und 14.1 g (168 mmol) Natriumhydrogencarbonat gelöst. Unter Rühren gibt man 56.6 g (168 mmol) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) portionsweise zu. Man rührt die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemp. und stellt dann mit konz. HCl auf pH = 2 ein. Das Aceton wird i. Vak. entfernt und das Produkt mit insgesamt 700 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird dreimal mit je 200 mL 1 N HCl und zweimal mit je 200 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Man trocknet über $MgSO_4$ und entfernt das Lösemittel i. Vakuum.

Ausbeute: 57.0 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.42 (CH_2Cl_2 /MeOH/HOAc/H₂O 90:10:1:1).

$C_{19}H_{19}NO_5$ MW: 341.36 EM: 341.1263.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 7.69 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 6.99 Hz); 7.57 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 7.04 Hz); 7.42-7.21 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 6.11 (sb, 1H, NH Urethan); 4.54-4.30 (m, 3H, α-CH Thr, CH₂-Fmoc, β-CH Thr); 4.14 (m, 1H, H9-Fmoc); 2.13 (d, 3H, γ-CH₃ Thr, J = 6.27 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ(ppm): 174.54 (1C, -COOH), 157.26 (1C, C=O Urethan); 143.80, 143.53 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.25 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 128.21 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.73 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.20, 125.11 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.97 (2C, C4-, C5-Fmoc); 59.11 (1C, α-CH Thr); 67.98, 67.46 (2C, CH₂-Fmoc, β-CH Thr); 47.60 (1C, C9-Fmoc); 19.37 (1C, γ-CH₃ Thr).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin^[116, 403] (15)**

(Fmoc-Ser-OH)

Die Reaktion wurde gemäß der Vorschrift zur Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin **14** durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: L-Serin: 20.0 g (190 mmol); Natriumhydrogencarbonat: 16.0 g (190 mmol); *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu): 64.2 g (190 mmol).

Ausbeute: 62.0 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.59 (EtOAc/HOAc (10:1)).

C₁₈H₁₇NO₅ MW: 327.33 EM: 327.1107.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ(ppm): 7.88 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.73 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.44-7.30 (m, 5H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, NH Urethan); 4.29-4.22 (m, 3H, α-CH Ser, CH₂-Fmoc); 4.04 (m, 1H, H9-Fmoc); 3.66 (d, 2H, β-CH₂ Ser, J = 4.77 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB): δ(ppm): 172.30 (1C, -COOH); 156.20 (1C, C=O Urethan); 143.95 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 140.85 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.76 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.20 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.41 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.21 (2C, C4-, C5-Fmoc); 65.84 (1C, CH₂-Fmoc); 61.49 (1C, β-CH₂ Ser); 56.81 (1C, α-CH Ser); 46.76 (1C, C9-Fmoc).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester^[120, 404] (16)**

(Fmoc-Thr-OtBu)

Unter einer Argonatmosphäre und Lichtausschluss werden 23.5 g (318 mmol) *tert*-Butanol, 50.3 g (244 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und eine katalytische Menge CuCl (750 mg, 6.57 mmol) 5 Tage bei Raumtemp. gerührt. Man verdünnt das grün-schwarze Reaktionsgemisch mit 150 mL absol. Dichlormethan und tropft 25.0 g (73 mmol) Fmoc-Thr-OH **14**, die in 100 mL absol. Dichlormethan gelöst sind, unter Eiskühlung hinzu. Man lässt die Reaktionslösung innerhalb von 1 h auf Raumtemp. kommen und rührt dabei unter Lichtausschluss sowie unter Argon. Die Reaktionsmischung kühlt man wieder auf 0 °C ab. Der ausgefallene *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wird mittels „Hyflo-Supercel®“ abfiltriert und der Filterkuchen fünfmal mit je 100 mL kaltem Dichlormethan gewaschen. Das dunkelgrüne Filtrat wird dreimal mit je 200 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und dreimal mit je 100 mL ges. NaCl-Lsg. intensiv gewaschen. Man extrahiert die wässrigen Phasen einmal mit 150 mL Dichlormethan und trocknet die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄. Das Lösemittel wird i. Vak. verdampft und der bräunliche, viskose Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 10.0 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (4:1) → (2:1) gereinigt.

Ausbeute: 21.1 g (73 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = -10.8^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $[\alpha]_D^{28}(\text{Lit.})^{[120]} = -9.5^\circ$ ($c = 1.05$, CHCl₃); $R_f = 0.32$ (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1).

C₂₃H₂₇NO₅ MW: 397.46 EM: 397.1889.

ESI-MS (m/z) = 420.1 ($[M+Na]^+$), Ber.: 420.4; 364.0 ($[M+Na-C_4H_8]^+$), Ber.: 364.2.

Ber.: C 69.50 H 6.85 N 3.52

Gef.: C 69.58 H 6.72 N 3.55

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J = 7.53$ Hz); 5.55 (d, 1H, NH Urethan, $J = 8.46$ Hz); 4.39 (d, 2H, CH₂-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 4.29-4.20 (m, 3H, H9-Fmoc, β -CH Thr, α -CH Thr); 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.22 (d, 3H, γ -CH₃ Thr, $J = 5.88$ Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ (ppm): 170.23 (1C, C=O *t*Bu-Ester); 156.01 (1C, C=O Urethan); 143.75 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.30 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.70 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.07 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.11 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.97 (2C, C4-, C5-Fmoc); 82.63 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 68.28 (1C, β -CH Thr); 67.18 (1C, CH₂-Fmoc); 59.57

(1C, α -CH Thr); 47.17 (1C, C9-Fmoc); 28.01 (3C, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 19.91 (1C, γ -CH₃ Thr).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin-*tert*-butylester**^[120, 404] (17)
(Fmoc-Ser-O*t*Bu)

Die Reaktion wurde gemäß der Vorschrift zur Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin-*tert*-butylester **16** durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: Fmoc-Ser-OH **15**: 25.0 g (76 mmol); *tert*-Butanol: 24.5 g (331 mmol); *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC): 52.5 g (254 mmol); Kupfer(I)chlorid: 735 mg (7.43 mmol).

Ausbeute: 19.7 g (67 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = +5.4^\circ$ (*c* = 1.00, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20}$ (Lit.)^[405] = $+6.7^\circ$ (*c* = 1.00, CHCl₃); *R*_f = 0.37 (Cyclohexan/Aceton 2:1).

C₂₂H₂₅NO₅ MW: 383.44 EM: 383.1733.

ESI-MS (*m/z*) = 422.3 ([M+K]⁺), Ber.: 422.4; 406.4 ([M+Na]⁺), Ber.: 406.4; 350.3 ([M+Na-C₄H₈]⁺), Ber.: 350.3.

Ber.:	C 68.91	H 6.57	N 3.65
-------	---------	--------	--------

Gef.:	C 68.86	H 6.47	N 3.69
-------	---------	--------	--------

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, *J* = 7.35 Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, *J* = 7.04 Hz); 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, *J* = 7.31 Hz); 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, *J* = 7.55 Hz); 5.73 (d, 1H, NH Urethan, *J* = 5.88 Hz); 4.39 (d, 2H, CH₂-Fmoc, *J* = 6.99 Hz); 4.31 (m, 1H, α -CH Ser); 4.20 (t, 1H, H9-Fmoc, *J* = 6.97 Hz); 3.91 (s, 2H, β -CH₂ Ser); 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃ *t*Bu-Ester).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ (ppm): 169.56 (1C, C=O *t*Bu-Ester); 156.35 (1C, C=O Urethan); 143.84, 143.74 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.31, 141.28 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.71 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.08 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.09 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.98 (2C, C4-, C5-Fmoc); 82.81 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 67.16 (1C, CH₂-Fmoc); 63.61 (1C, β -CH₂ Ser); 56.65 (1C, α -CH Ser); 47.14 (1C, C9-Fmoc); 28.00 (3C, 3x CH₃ *t*Bu-Ester).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester^[122] (**18**)**

(Fmoc-Thr(α -GalAc₃N₃)-OtBu)

In einer Mischung aus 84 mL absol. Toluol und 72 mL absol. Dichlormethan werden 10.15 g (25.55 mmol) Fmoc-Thr-OtBu **16** mit 30 g gepulvertem Molekularsieb 4Å 30 min bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Man kühlt die Suspension auf 0 °C ab und gibt 9.50 g (34.45 mmol) Silbercarbonat und 1.05 g (5.07 mmol) Silberperchlorat (Entfernen des Kristallwassers durch dreimalige Kodestillation mit je 35 mL absol. Toluol) hinzu. Nach 30 min Rühren unter Argon und unter Lichtausschluss werden unter Eiskühlung 11.08 g (28.10 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -*D*-galactosylbromid **10** gelöst in 100 mL absol. Toluol und 100 mL absol. Dichlormethan innerhalb von 30 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 26 h unter Argon und unter Lichtausschluss bei Raumtemp. gerührt. Man verdünnt mit 400 mL Dichlormethan, filtriert über „Hyflo-Supercel®“ ab und wäscht das Filtrat zweimal mit je 200 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und zweimal mit je 200 mL ges. NaCl-Lsg. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel i. Vak. abdestilliert. Das Rohprodukt wird an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 10.0 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (4:1) → (2:1) mittels Flash-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: α -Anomer 8.88 g (49 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{28} = +77.8^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.: $+79.8^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃)^[122]; $R_f = 0.23$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1); $R_f = 0.67$ (Toluol/Ethylacetat 4:2).

C₃₅H₄₂N₄O₁₂ MW: 710.73 EM: 710.2799.

ESI-MS (m/z) = 749.3 ([M+K]⁺), Ber.: 749.7; 733.4 ([M+Na]⁺), Ber.: 733.7; 693.3 ([M+K-C₄H₈]⁺), Ber.: 693.6; 677.2 ([M+Na-C₄H₈]⁺), Ber.: 677.6.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm): 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.71$ Hz); 7.61 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J = 6.99$ Hz); 7.39-7.24 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc); 7.40-7.27 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc); 5.63 (d, 1H, NH Urethan, $J = 9.18$ Hz); 5.45 (d, 1H, H4-Gal, $J = 2.19$ Hz); 5.32 (dd, 1H, H3-Gal, $J = 11.20$ Hz, $J = 3.40$ Hz); 5.09 (d, 1H, H1-Gal, $J = 3.30$ Hz); 4.44-4.26 (m, 6H, H5-, H6a-, H6b-Gal, H9-Fmoc, α -CH Thr, β -CH Thr); 4.08 (m, 2H, CH₂-Fmoc); 3.61 (dd, 1H, H2-Gal, $J = 11.02$ Hz, $J = 3.69$ Hz); 2.16 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.06 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.03 (s, 3H, CH₃ OAc); 1.49 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.33 (d, 3H, γ -CH₃ Thr, $J = 6.66$ Hz).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB, DEPT): $\delta(\text{ppm})$: 170.31, 169.95, 169.81, 169.17 (4C, 3x C=O OAc, 1x C=O *t*Bu-Ester); 156.80 (1C, C=O Urethan); 143.86 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.25 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.67 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.08 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.26 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.94, 119.91 (2C, C4-, C5-Fmoc); 99.23 (1C, C1-Gal); 82.87 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 76.39 (1C, β -CH Thr (im Lösemittelsignal)); 68.01, 67.49, 67.04 (4C, C3-, C4-, C5-Gal, CH₂-Fmoc); 61.89 (1C, C6-Gal); 59.23 (1C, α -CH Thr); 57.67 (1C, C2-Gal); 47.11 (1C, C9-Fmoc); 27.97 (3C, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 20.64 (3C, 3x CH₃ OAc); 18.94 (1C, γ -CH₃ Thr).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galacto-pyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (19)**
(Fmoc-Ser(α -GalAc₃N₃)-OtBu)

Die Glycosylierungsreaktion wurde analog der Vorschrift zur Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester **18** durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: Fmoc-Ser-OtBu **17**: 10.35 g (27.00 mmol); Silbercarbonat: 8.18 g (29.67 mmol); Silberperchlorat: 0.91 g (4.36 mmol); 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactosylbromid **10**: 9.63 g (24.43 mmol).

Ausbeute: α -Anomer 6.84 g (40 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +121.5^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{20}(\text{Lit.})^{[405]} = +124.0^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3); $R_f = 0.24$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1), $R_f = 0.69$ (Toluol/Ethylacetat 4:2).

$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{12}$ MW: 696.70 EM: 696.2643.

ESI-MS (m/z) = 735.5 ($[\text{M}+\text{K}]^+$), Ber.: 735.7; 719.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 719.7; 663.4 ($[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$), Ber.: 663.6.

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$: 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.71$ Hz); 7.61 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J = 6.96$ Hz); 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 5.85 (d, 1H, NH Urethan, $J = 8.10$ Hz); 5.42 (d, 1H, H4-Gal, $J = 2.58$ Hz); 5.28 (dd, 1H, H3-Gal, $J = 3.3$ Hz, $J = 11.40$ Hz); 4.93 (d, 1H, H1-Gal, $J = 3.66$ Hz); 4.43-3.93 (m, 9H, CH₂-Fmoc, H9-Fmoc, β -CH₂ Ser, α -CH Ser, H5-, H6-Gal); 3.64 (dd, 1H, H2-Gal, $J = 3.69$, $J = 11.35$ Hz); 2.13 (s, 3H, CH₃ Ac); 2.04 (s, 3H, CH₃ Ac); 1.96 (s, 3H, CH₃ Ac); 1.49 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, DEPT): δ(ppm): 170.37, 169.92, 169.68, 168.46 (4C, 3x C=O OAc, 1x C=O tBu-Ester); 155.84 (1C, C=O Urethan); 143.84, 143.80 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.27 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.70 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.07 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.14 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.95 (2C, C4-, C5-Fmoc); 99.21 (1C, C1-Gal); 83.10 (1C, C_{quart.}-tBu-Ester); 70.00 (1C, β-CH₂ Ser); 68.01, 67.49, 67.24, 67.18 (4C, CH₂-Fmoc, C3-, C4-, C5-Gal); 61.68 (1C, C6-Gal); 57.50, 54.92 (2C, α-CH Ser, C2-Gal); 47.08 (1C, C9-Fmoc); 27.94 (3C, 3x CH₃ tBu-Ester); 20.60 (3C, 3x CH₃ Ac).

***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^[123] (20)**

(Fmoc-Thr(α-GalAc₃NAc)-OtBu)

Zu einer Lösung von 3.00 g (4.22 mmol) Fmoc-Thr(α-GalAc₃N₃)-OtBu **18** in 175 mL einer Mischung aus THF, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) werden 5.00 g (76.49 mmol) Zink-Staub gegeben, der durch Aufschlännen in 80 mL einer verd. CuSO₄-Lsg. (2.48 g (9.96 mmol) Kupfersulfat-Pentahydrat in 80 mL Wasser) aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet wird. Man rührt 60 min bei Raumtemp. Anschließend wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von 300 mL THF verdünnt und über „Hyflo-Supercel[®]“ filtriert. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand viermal mit je 80 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird in 350 mL Dichlormethan gelöst und dreimal mit je 80 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 100 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Man reinigt das Rohprodukt an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch Ethylacetat/Cyclohexan (3:2).

Ausbeute: 2.64 g (86 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +65.1^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃), $[\alpha]_D^{22}(\text{Lit.})^{[122]} = +63.4^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃); R_f = 0.32 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2); R_f = 0.32 (Toluol/Ethylacetat 1:2).

C₃₇H₄₆N₂O₁₃ MW: 726.77 EM: 726.3000.

ESI-MS (m/z) = 693.3 ([M+Na-C₄H₈]⁺), Ber.: 693.7; 749.6 ([M+Na]⁺), Ber.: 749.7.

Ber.:	C 61.15	H 6.38	N 3.85
-------	---------	--------	--------

Gef.:	C 61.07	H 6.34	N 3.90
-------	---------	--------	--------

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$: 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.62 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J = 6.99$ Hz); 7.39-7.31 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 5.92 (d, 1H, NH GalNHAc, $J = 9.93$ Hz); 5.44 (d, 1H, NH Urethan, $J = 9.18$ Hz); 5.37 (s, 1H, H4-Gal); 5.09 (dd, 1H, H3-Gal, $J = 2.94$ Hz, $J = 11.40$ Hz); 4.87 (d, 1H, H1-Gal, $J = 3.30$ Hz); 4.62 (m, 1H, H2-Gal); 4.45 (m, 2H, CH_2 -Fmoc); 4.43-4.05 (m, 6H, H9-Fmoc, H6a-, H6b-, H5-Gal, β -CH Thr, α -CH Thr); 2.15 (s, 3H, CH_3 NHAc); 2.02 (s, 3H, CH_3 OAc); 1.99 (s, 6H, 2x CH_3 OAc); 1.44 (s, 9H, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 1.31 (d, 3H, γ - CH_3 Thr, $J = 6.24$ Hz).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB, DEPT): $\delta(\text{ppm})$: 170.85 (1C, C=O Amid); 170.32, 170.28, 170.26, 169.95 (4C, 3x C=O OAc, 1x C=O *t*Bu-Ester); 156.40 (1C, C=O Urethan); 143.71 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.31 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.76 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.10 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.11, 125.05 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.03, 120.00 (2C, C4-, C5-Fmoc); 99.95 (1C, C1-Gal); 83.26 (1C, $\text{C}_{\text{quart.}}$ -*t*Bu-Ester); 77.06 (1C, β -CH Thr (im Lösemittelsignal)); 68.75, 67.37 (4C, CH_2 -Fmoc, C3-, C4-, C5-Gal); 62.11 (1C, C6-Gal); 58.89 (1C, α -CH Thr); 47.29, 47.17 (2C, C9-Fmoc, C2-Gal); 28.10 (3C, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 23.28 (1C, CH_3 NHAc); 20.76, 20.66 (3C, 3x CH_3 OAc); 18.50 (1C, γ - CH_3 Thr).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester (21)**

(Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OtBu)

Die Reaktion wurde analog der Vorschrift zur Synthese von *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 **20** durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: Fmoc-Ser(α -GalAc₃N₃)-OtBu **19**: 4.00 g (5.74 mmol); Zink-Staub: 4.10 g (62.72 mmol); 170 mL THF/HOAc/Ac₂O (3:1:2).

Ausbeute: 3.15 g (78 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +61.2^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $[\alpha]_{\text{D}}^{20}(\text{Lit.})^{[405]} = +59.5^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3); $R_f = 0.37$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3); $R_f = 0.27$ (Toluol/Ethylacetat 4:2).

$\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{13}$ MW: 712.74 EM: 712.2843.

FD-MS (m/z) = 713.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 713.7.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.28 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J = 7.35 Hz); 5.71 (d, 1H, NH GalNHAc, J = 7.74 Hz); 5.65 (d, 1H, NH Urethan, J = 9.18 Hz); 5.35 (d, 1H, H4-Gal, J = 2.94 Hz); 5.10 (dd, 1H, H3-Gal, J = 2.94 Hz, J = 11.40 Hz); 4.82 (d, 1H, H1-Gal, J = 3.66 Hz); 4.56 (m, 1H, H2-Gal); 4.41 (m, 3H, α-CH Ser, CH₂-Fmoc); 4.23 (m, 9H, H9-Fmoc); 4.13-4.00 (m, 5H, β-CH₂ Ser, H5-, H6a-, H6b-Gal); 2.14 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.97 (s, 6H, 2x CH₃ OAc); 1.84 (s, 3H, CH₃ OAc); 1.47 (s, 9H, 3x CH₃ tBu-Ester).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, DEPT): δ(ppm): 170.13, 169.96, 168.88, 168.51 (4C, 3x C=O OAc, 1x C=O tBu-Ester); 155.76 (1C, C=O Urethan); 143.74 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.28 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.77, 127.73 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.10 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.12, 125.10 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.01, 119.95 (2C, C4-, C5-Fmoc); 98.84 (1C, C1-Gal); 83.09 (1C, C_{quart.}-tBu-Ester); 69.41 (1C, β-CH₂ Ser); 68.24, 67.31 (3C, C3-, C4-, C5-Gal); 67.24 (1C, CH₂-Fmoc); 61.89 (1C, C6-Gal); 54.82 (1C, α-CH Ser); 47.56 (1C, C2-Gal); 47.08 (1C, C9-Fmoc); 27.94 (3C, 3x CH₃ tBu-Ester); 23.31 (1C, 1x CH₃ NHAc); 20.75, 20.64, 20.61 (3C, 3x CH₃ OAc).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-serin (22)**

(Fmoc-Ser(α-GalAc₃NAc)-OH)

Es werden 2.50 g (3.51 mmol) Fmoc-Ser(α-GalAc₃NAc)-OtBu **21** in einer Mischung aus 95 mL Trifluoressigsäure und 5 mL Wasser gelöst. Man rührt 3 h unter Argon bei Raumtemp. Die flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt und der Rückstand wird zweimal mit je 150 mL Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:0.5:0.5).

Ausbeute: 2.07 g (90 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +88.9^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃), $[\alpha]_D^{22}$ (Lit.^{[406]) = +90.7° (c = 1.00, CHCl₃); R_f = 0.17 (CH₂Cl₂/EtOH/HOAc 50:2:0.5).}

C₃₂H₃₆N₂O₁₃ MW: 656.63 EM: 656.2217.

ESI-MS (m/z) = 657.5 ([M+H]⁺), Ber.: 657.2; 679.4 ([M+Na]⁺), Ber.: 679.2; 695.3 ([M+K]⁺), Ber.: 695.2.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 7.57 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.49 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 6.24 Hz); 7.37 (d, 1H, NH GalNHAc, J = 7.38 Hz); 7.34-7.20 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 6.14 (s_b, 1H, NH Urethan); 5.42 (s_b, 1H, H4-Gal); 5.14 (d, 1H, H3-Gal, J = 9.57 Hz); 4.93 (d, 1H, H1-Gal, J = 3.33 Hz); 4.52-4.29 (m, 4H, CH₂-Fmoc, α-CH Ser, H2-Gal); 4.21-3.89 (m, 6H, β-CH₂ Ser, H6a-, H6b-, H-5-Gal, H9-Fmoc); 2.13 (s, 3H, CH₃ Ac); 2.04 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.96 (s, 9H, 3x CH₃ Ac).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, DEPT): δ(ppm): 173.15, 171.56, 171.06, 170.68, 170.28 (5C, 3x C=O OAc, 1x C=O NHAc, 1x -COOH); 155.99 (1C, C=O Urethan); 143.66 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.27 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.80 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.10, 126.37 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.02 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.04, 119.80 (2C, C4-, C5-Fmoc); 98.76 (1C, C1-Gal); 69.65 (1C, β-CH₂ Ser); 68.09, 67.12 (3C, C3-, C4-, C5-Gal); 67.19 (1C, CH₂-Fmoc); 61.93 (1C, C6-Gal); 54.63 (1C, α-CH Ser); 47.99 (1C, C2-Gal); 47.08 (1C, C9-Fmoc); 22.37 (1C, CH₃ NHAc); 20.67, 20.63 (3C, 3x CH₃ OAc).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-α-*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester^[143] (23)**
(Fmoc-Thr(α-GalNAc)-OtBu)

Man löst 2.20 g (3.03 mmol) Fmoc-Thr(α-GalAc₃NAc)-OtBu **20** in 150 mL absol. Methanol. Die Lösung wird unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%-igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von pH = 8.5 erreicht ist (Auftropfen der Reaktionslösung auf ein mit dest. Wasser angefeuchtetes pH-Papier (Merck pH-Skala 7-14)). Es wird 10 h gerührt, wobei der pH-Wert anfänglich in Abständen von 20 min kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wird. In gleichen Abständen erfolgt die DC-Kontrolle. Man neutralisiert mit wenigen Tropfen Eisessig, entfernt das Lösemittel i. Vak. und kodestilliert zweimal mit je 60 mL Toluol. Man löst die Verbindung in 60 mL Acetonitril und gibt 256 mg (0.76 mmol) Fmoc-OSu und 98 mg (36 mmol) DIPEA und rührt 6 h bei Raumtemp. Nach dem Entfernen des Lösemittels i. Vak. reinigt man die Verbindung säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOH (50:4).

Ausbeute: 1.82 g (83 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +43.3^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃), $[\alpha]_D^{22}(\text{Lit.})^{[122]} = +40.2^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃); R_f = 0.12 (CH₂Cl₂/EtOH 50:4).

$C_{31}H_{40}N_2O_{10}$ MW: 600.66 EM: 600.2683.

ESI-MS (m/z) = 567.5 ($[M+Na-C_4H_8]^+$), Ber.: 567.2; 623.5 ($[M+Na]^+$), Ber.: 623.3; 1223.9 ($[2M+Na]^+$), Ber.: 1223.5.

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm): 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J = 6.96$ Hz); 7.37 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.26 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 6.84 (d, 1H, NH GalNHAc, $J = 7.74$ Hz); 5.77 (s_b, 1H, NH Urethan); 4.85 (d, 1H, H1-Gal, $J = 2.94$ Hz); 4.40 (m, 2H, CH_2 -Fmoc); 4.31-4.22 (m, 3H, H2-Gal, β -CH Thr, H9-Fmoc); 4.12 (m, 1H, α -CH Thr); 4.04 (s_b, 1H, H4-Gal); 3.95-3.70 (m, 4H, H3-, H5-, H6a-, H6b-Gal); 2.09 (s, 3H, CH_3 NHAc); 1.42 (s, 9H, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 1.27 (d, 3H, γ - CH_3 Thr, $J = 5.88$ Hz).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($CDCl_3$; BB, DEPT): δ (ppm): 173.66, 170.91 (2C, 1x C=O NHAc, 1x C=O *t*Bu-Ester); 156.50 (1C, C=O Urethan); 143.74, 143.68 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.30 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.76 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.07 (2C, C2-, C7-Fmoc); 124.99 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.98 (2C, C4-, C5-Fmoc); 99.60 (1C, C1-Gal); 82.25 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 76.43 (1C, β -CH Thr (im Lösemittelsignal)); 70.74, 70.08, 69.51 (3C, C3-, C4-, C5-Gal); 67.21 (1C, CH_2 -Fmoc); 62.49 (1C, C6-Gal); 59.00 (1C, α -CH Thr); 50.76 (1C, C2-Gal); 47.17 (1C, C9-Fmoc); 28.06 (3C, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 22.96 (1C, CH_3 NHAc); 18.89 (1C, γ - CH_3 Thr).

5.3 Versuche zu Kapitel 3.1.2

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α,β -D-galactonon-2-ulopyranosonat^[407] (31)

(α,β -NeuAc₅NAcCOOH)

Man suspendiert 15.0 g (48.5 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure **30** in 225 mL Pyridin und versetzt unter Eiskühlung mit 113 mL Acetanhydrid. Die Suspension wird 20 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Man entfernt die Acetanhydrid-Pyridin-Mischung i. Hochvak., kodestilliert zweimal mit 200 mL Toluol und nimmt den verbleibenden Rückstand in 600 mL Dichlormethan auf. Man wäscht die organische Phase einmal mit 200 mL 1 M KHSO₄-Lsg., trocknet über MgSO₄ und entfernt das Lösemittel i. Vakuum.

Ausbeute: 25.0 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.38 (CH₂Cl₂/EtOAc 5:1).

C₂₁H₂₉NO₁₄ MW: 519.45 EM: 519.1588.

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α,β -D-galactonon-2-ulopyranosonat^[407] (32)

(α,β -Ac₅NeuNAcCOOBn)

Man löst 25.00 g (48.5 mmol) α,β -Ac₅NeuNAcCOOH **31** in 200 mL Ethanol und versetzt die Lösung unter starkem Rühren portionsweise mit einer Lösung von 7.66 g (23.5 mmol) Cäsiumcarbonat gelöst in 10 mL Wasser. Nach Abklingen der Gasentwicklung rührt man die Reaktionsmischung 15 min bei Raumtemp. und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Dann kodestilliert man dreimal mit je 200 mL Toluol. Das verbleibende Öl nimmt man in 150 mL DMF auf und tropft 14.9 g (87.3 mmol) Benzylbromid langsam bei Raumtemp. zu. Man rührt 90 min bei Raumtemp. und entfernt dann das Lösemittel i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 200 mL Toluol. Man nimmt den Rückstand in 600 mL Ethylacetat auf und wäscht die organische Phase zweimal mit je 200 mL dest. Wasser und einmal mit 150 mL ges. NaCl-Lsg. Man trocknet über MgSO₄ und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird chromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOAc (50:0.2) → (50:1.5) gereinigt.

Ausbeute: 22.0 g (74 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.14$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 50:1).

$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{NO}_{14}$ MW: 609.58 EM: 609.2058.

O-Ethyl-S-(benzyl-[5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]dithiocarbonat^[140, 142] (24)
(α -Ac₅NeuNAcCOOBn-Xan)

α , β -NeuAc₅NAcCOOBn **32** (11.0 g, 18 mmol) wird in 50 mL auf 0 °C gekühltem Acetylchlorid gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 10 Tropfen konz. HCl-Lsg. und rührt die Reaktionsmischung 3 d bei Raumtemp. unter Argon. Man entfernt das Acetylchlorid i. Vak. und koevaporiert dreimal mit je 100 mL Toluol. Das zurückbleibende Öl wird ohne weitere Charakterisierung direkt in 290 mL absol. Ethanol gelöst und mit 4.9 g (30.6 mmol) Kaliumxanthogenat versetzt. Man rührt 36 h unter Lichtausschluss und unter einer Argonatmosphäre bei Raumtemp. Die Reaktionsmischung wird mit 600 mL Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 100 mL ges. NaHCO_3 -Lsg. gewaschen. Man trocknet über MgSO_4 und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:1) $\rightarrow$ (50:4) gereinigt.

Ausbeute: 9.23 g (76 % über 2 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.41$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50:4).

$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_{13}\text{S}_2$ MW: 671.73 EM: 671.1706.

ESI-MS (m/z) = 572.5 ($[\text{M}-\text{CS}_2\text{OEt}+\text{Na}]^+$), Ber.: 572.2; 694.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 694.2.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl_3): δ (ppm): 7.39-7.26 (m, 5H, 5x CH_{arom} . Bn-Ester); 5.39-5.22 (3H, H7-, H8-Sial, NH Amid); 5.20 (s, 2H, CH_2 -Bn-Ester); 4.81 (dd, 1H, H4-Sial, $J = 11.40$ Hz, $J = 4.77$ Hz); 4.54 (dd, 1H, H6-Sial, $J = 10.65$ Hz, $J = 1.84$ Hz); 4.35 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4.29 (m, 1H, $-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B9}$ -Sial); 4.19 (m, 1H, $-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B9}$ -Sial); 4.05 (1H, H5-Sial); 2.64 (dd, 1H, H3_{aq}-Sial, $J = 12.76$ Hz, $J = 4.80$ Hz); 2.13-1.81 (m, 16H, 4x CH_3 OAc, CH_3 NHAc, H3_{ax}-Sial); 1.26 (t, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $J = 6.97$ Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl_3 ; BB, DEPT): δ (ppm): 207.02 (1C, C=S); 170.70, 170.48, 170.16, 170.08, 170.02 (5C, 4x C=O OAc, C=O NHAc); 167.82 (1C, C1-Sial); 134.86 (1C, C_{ipso}-Bn-Ester); 128.75, 128.58, 127.97 (5C, 5x CH_{arom} . Bn-Ester); 86.51 (1C, C2-Sial); 75.23, 70.51, 68.76, 67.82 (4C, C4-, C6-, C7-, C8-Sial); 70.61, 67.95 (2C, CH_2 -Bn, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$);

62.02 (1C, C9-Sial); 49.16 (1C, C5-Sial); 37.09 (1C, C3-Sial); 23.13 (1C, CH₃ NHAc); 21.03, 20.76, 20.73, 20.66 (4C, 4x CH₃ OAc); 13.00 (1C, -CH₂CH₃).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester**^[122, 142] (34)
(Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalNAc)-OtBu)

Herstellung der Methylsulphenylbromid-Lösung (1.6 M in 1,2-Dichlorethan):

Man löst 709 μ L (753 mg, 7.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 mL absol. 1,2-Dichlorethan. Die Lösung versetzt man unter Lichtausschluss und unter einer Argonatmosphäre mit 410 μ L (1.276 g, 7.99 mmol) Brom. Die Lösung wird 16 h unter Lichtausschluss und unter Argon bei Raumtemp. gerührt.

Sialylierungsreaktion:

Eine Lösung von 724 mg (1.205 mmol) Fmoc-Thr(α -GalNAc)-OtBu **23** und 2.06 g (3.07 mmol) α -Ac₄NeuNAcCOOBnXan **24** in einem Gemisch aus 36 mL absol. Acetonitril und 18 mL absol. Dichlormethan wird zusammen mit 4 g aktiviertem Molekularsieb (4 Å) unter Argon 45 min gerührt. Anschließend werden 786 mg (3.07 mmol) trockenes Silbertriflat zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf -65 °C abgekühlt. Über einen Zeitraum von 45 min werden mittels einer Spritzenpumpe 1.93 mL (3.07 mmol) einer auf 0 °C gekühlten 1.6 M Lösung von Methylsulphenylbromid in absol. 1,2-Dichlorethan zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 7 h bei -65 °C gerührt und anschließend mit 429 μ L (311 mg, 2.4 mmol) *N,N'*-Diisopropylethylamin neutralisiert. Man rührt weitere 15 min bei dieser Temperatur und lässt dann langsam auf 10 °C kommen. Es wird mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und man filtriert über „Hyflo-Supercel®“. Abschließend entfernt man das Lösemittel i. Vak. und das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch EtOAc/EtOH (20:1) gereinigt.

Ausbeute: 693 mg (50 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +10.27^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃), $[\alpha]_D^{22}(\text{Lit.})^{[142]} = +6.27^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃); $R_f = 0.21$ (EtOAc/EtOH 20:1).

C₅₇H₇₁N₃O₂₂ MW: 1150.18 EM: 1149.4529.

ESI-MS (m/z) = 1116.4 ($[M+Na-C_4H_8]^+$), Ber.: 1116.2; 1172.6 ($[M+Na]^+$), Ber.: 1172.2.

400 MHz- ^1H -NMR ($\text{MeOH}-d_4$; ^1H - ^1H -COSY): $\delta(\text{ppm})$: 7.86-7.82 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc); 7.75-7.63 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.50-7.30 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Bn-Ester); 4.47-5.34 (m, 2H, H7-, H8-Sial); 5.30 (m, 2H, CH_2 -Bn-Ester); 4.91 (m, 1H, H4-Sial (im Wassersignal)); 4.79 (d, 1H, H1-Gal, $J = 3.88$ Hz); 4.63 (dd, 1H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$ -Fmoc, $J = 6.28$ Hz, $J = 10.96$ Hz); 4.53 (dd, 1H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$ -Fmoc, $J = 6.28$ Hz, $J = 10.96$ Hz); 4.38-4.20 (m, 5H, β -CH Thr, H2-Gal, H6-, H9a-Sial, H9-Fmoc); 4.18-4.10 (m, 2H, H9b-Sial, α -CH Thr); 4.02 (m, 1H, H5-Sial); 3.94 (dd, 1H, H6a-Gal, $J = 7.04$ Hz, $J = 10.20$ Hz); 3.80 (m, 1H, H5-Gal); 3.66 (sb, 1H, H4-Gal); 3.58 (dd, 1H, H3-Gal, $J = 2.72$ Hz, $J = 10.96$ Hz); 3.51 (dd, 1H, H6b-Gal, $J = 4.68$ Hz, $J = 10.16$ Hz); 2.73 (dd, 1H, $\text{H3}_{\text{aq.}}$ -Sial, $J = 4.68$ Hz, $J = 12.50$ Hz); 2.18, 2.12, 2.04, 2.03, 2.01 (s, 15H, 4x CH_3 OAc, 1x CH_3 NHAc); 1.88 (m, 4H, $\text{H3}_{\text{ax.}}$ -Sial, 1x CH_3 NHAc); 1.48 (s, 9H, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 1.20 (d, 3H, γ - CH_3 Thr, $J = 6.24$ Hz).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR ($\text{MeOH}-d_4$; BB, HMQC, HMBC): $\delta(\text{ppm})$: 173.73, 173.53, 172.41, 171.95, 171.74, 171.50, 171.09, 168.86 (8C, 4x C=O OAc, 2x C=O NHAc, 1x C=O Bn-Ester, 1x C=O *t*Bu-Ester); 159.17 (1C, C=O Urethan); 145.40, 145.15 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 142.71 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 136.69 (1C, $\text{C}_{\text{quart.}}$ -Bn-Ester); 132.41, 129.81, 129.72, 128.85, 128.23 (9C, C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Bn-Ester); 126.15, 126.06 (2C, C1-, C8-Fmoc); 121.03 (2C, C4-, C5-Fmoc); 100.76 (1C, C1-Gal); 100.08 (1C, C2-Sial); 83.45 (1C, $\text{C}_{\text{quart.}}$ -*t*Bu-Ester); 76.68 (1C, β -CH Thr); 73.48 (1C, C6-Sial); 71.31 (1C, C3-Gal); 70.74, 70.36 (2C, C7-Sial, C5-Gal); 70.16 (1C, C4-Sial); 69.93 (1C, C4-Gal); 68.87, 68.76, 67.60 (3C, CH_2 -Fmoc, CH_2 -Bn-Ester, C8-Sial); 65.50 (1C, C6-Gal); 63.44 (1C, C9-Sial); 60.86 (1C, α -CH Thr); 50.85 (1C, C2-Gal); 50.11 (1C, C5-Sial); 48.50 (1C, C9-Fmoc (im Lösemittelsignal)); 38.75 (1C, C3-Sial); 28.41 (3C, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 23.25, 22.71 (2C, 2x CH_3 NHAc); 21.30, 20.89, 20.72, 19.81 (4C, 4x CH_3 OAc); 18.73 (1C, γ - CH_3 Thr).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (35)**
(Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OtBu)

In 40 mL Pyridin werden 800 mg (0.696 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalNAc)-OtBu **34** gelöst und bei 0 °C mit 20 mL Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wird 16 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt.

Man entfernt die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert zweimal mit je 70 mL Toluol. Der gelbe Rückstand wird an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch Dichlormethan/Ethanol (50:0.8) → (50:2) gereinigt.

Ausbeute: 803 mg (93 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +26.3^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{22}(\text{Lit.})^{[142]} = +28.8^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3); $R_f = 0.23$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 50:2).

$\text{C}_{61}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_{24}$ MW: 1234.25 EM: 1233.4741

ESI-MS (m/z) = 1234.48 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 1234.47; 1265.45 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 1265.47.

400 MHz- ^1H -NMR ($\text{MeOH}-d_4$): $\delta(\text{ppm})$: 7.86-7.83 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc); 7.75-7.71 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.48-7.31 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Bn-Ester); 5.48 (d, 1H, H1-Gal, $J = 4.32$ Hz); 5.43-5.36 (m, 3H, H7-, H8-Sial, $-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$ -Bn-Ester); 5.24-5.21 (m, 2H, H4-Gal, $-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$ -Bn-Ester); 4.98 (dd, 1H, H3-Gal, $J = 3.12$ Hz, $J = 11.32$ Hz); 4.87 (m, 1H, H4-Sial); 4.70 (dd, 1H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$ -Fmoc, $J = 6.04$ Hz, $J = 10.76$ Hz); 4.52 (dd, 1H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$ -Fmoc, $J = 5.86$ Hz, $J = 10.94$ Hz); 4.41 (dd, 1H, H2-Gal, $J = 3.90$ Hz, $J = 11.34$ Hz); 4.34-4.23 (m, 4H, H6-, H9a-Sial, H9-Fmoc, β -CH Thr); 4.16-3.95 (m, 4H, H9b-Sial, α -CH Thr, H5-Sial, H5-Gal); 3.85 (dd, 1H, H6a-Gal, $J = 7.42$ Hz, $J = 10.18$ Hz); 3.15 (dd, 1H, H6b-Gal, $J = 4.30$ Hz, $J = 10.15$ Hz); 2.69 (dd, 1H, H3_{aq}-Sial, $J = 4.50$ Hz, $J = 12.70$ Hz); 2.15, 2.13, 2.04, 2.03, 1.99, 1.96 (s, 21H, 6x CH_3 OAc, 1x CH_3 NHAc); 1.89-1.85 (m, 4H, H3_{ax}-Sial, 1x CH_3 NHAc); 1.47 (s, 9H, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 1.20 (d, 3H, γ - CH_3 Thr, $J = 6.64$ Hz).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR ($\text{MeOH}-d_4$; BB): $\delta(\text{ppm})$: 173.53, 173.36, 172.30, 172.18, 171.92, 171.74, 171.59, 171.42, 170.98, 168.68 (10C, 6x C=O OAc, 2x C=O NHAc, 1x C=O Bn-Ester, 1x C=O *t*Bu-Ester); 159.11 (1C, C=O Urethan); 145.41, 145.14 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 142.77 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 136.62 (1C, C_{quart}-Bn-Ester); 130.00, 129.88, 128.87, 128.27, 128.23 (9C, C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Bn-Ester); 126.15, 125.97 (2C, C1-, C8-Fmoc); 121.09, 121.01 (2C, C4-, C5-Fmoc); 100.57 (1C, C1-Gal); 99.91 (1C, C2-Sial); 83.57 (1C, C_{quart}-*t*Bu-Ester); 77.32 (1C, β -CH Thr); 73.42 (1C, C6-Sial); 70.65 (1C, C3-Gal); 69.98, 69.36, 69.25, 69.08 (4C, C7-Sial, C5-Gal, C4-Sial, C4-Gal); 68.96, 68.61, 67.46 (3C, CH_2 -Fmoc, CH_2 -Bn-Ester, C8-Sial); 65.14 (1C, C6-Gal); 63.59 (1C, C9-Sial); 60.76 (1C, α -CH Thr); 50.35 (1C, C2-Gal); 50.17 (1C, C5-Sial); 47.80 (1C, C9-Fmoc (im Lösemittelsignal)); 38.83 (1C, C3-Sial); 28.38 (3C, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 23.02, 22.69 (2C, 2x CH_3 NHAc); 21.25, 20.95, 20.70 (6C, 6x CH_3 OAc); 19.70 (1C, γ - CH_3 Thr).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin (36)**

(Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH)

In einer Mischung aus 10 mL TFA, 10 mL Dichlormethan und 0.5 mL Anisol werden 400 mg (0.324 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OtBu **35** 4 h bei Raumtemp. gerührt. Man entfernt die Trifluoressigsäure i. Vak. und koevaporiert zweimal mit je 40 mL Toluol. Man reinigt den verbleibenden Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOH/HOAc (50:1:0.5) $\rightarrow$ (50:4:0.5).

Ausbeute: 364 mg (95 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +33.5^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH), $[\alpha]_D^{22}(\text{Lit.})^{[142]} = +29.1^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH); $R_f = 0.10$ (CH₂Cl₂/EtOH/HOAc 50:3:0.5), $R_t = 27.15$ min (Säule A, Gradient: 40 % D nach 70 % D in 45 min).

C₅₇H₆₇N₃O₂₄ MW: 1178.15 EM: 1177.4115.

ESI-MS (m/z) = 1200.6 ($[M+Na]^+$), Ber.: 1200.4.

300 MHz-¹H-NMR (MeOH-*d*₄): δ (ppm): 7.86-7.83 (m, 2H, H₄-, H₅-Fmoc); 7.75-7.71 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc); 7.46-7.32 (m, 9H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, 5x CH_{arom.}-Bn-Ester); 5.46-5.34 (m, 3H, H₇-, H₈-Sial, -CH_AH_B-Bn-Ester); 5.26-5.17 (m, 2H, H₄-Gal, -CH_AH_B-Bn-Ester); 4.99 (dd, 1H, H₃-Gal, $J = 3.12$ Hz, $J = 11.63$ Hz); 4.88 (m, 2H, H₄-Sial, H₁-Gal); 4.70 (dd, 1H, CH_AH_B-Fmoc, $J = 6.06$ Hz, $J = 10.86$ Hz); 4.52 (dd, 1H, CH_AH_B-Fmoc, $J = 5.88$ Hz, $J = 10.65$ Hz); 4.45-4.19 (m, 6H, H₆-, H_{9a}-Sial, H₉-Fmoc, H₂-Gal, β -CH Thr, α -CH Thr); 4.11 (m, 1H, H_{9b}-Sial); 4.05-3.97 (m, 2H, H₅-Sial, H₅-Gal); 3.85 (m, 1H, H_{6a}-Gal); 3.16 (dd, 1H, H_{6b}-Gal, $J = 4.23$ Hz, $J = 10.11$ Hz); 2.68 (dd, 1H, H_{3ax}-Sial, $J = 4.23$ Hz, $J = 12.64$ Hz); 2.14, 2.13, 2.03, 1.99, 1.96 (s, 21H, 6x CH₃ OAc, 1x CH₃ NHAc); 1.90-1.83 (m, 4H, H_{3ax}-Sial, 1x CH₃ NHAc); 1.22 (d, 3H, γ -CH₃ Thr, $J = 6.24$ Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, DEPT): δ (ppm): 172.93, 170.80, 170.62, 170.37, 170.32, 170.14, 169.68, 167.27 (10C, 6x C=O OAc, 2x C=O NHAc, 1x C=O Bn-Ester, 1x -COOH); 156.63 (1C, C=O Urethan); 143.80, 143.60 (2C, C_{8a}-, C_{9a}-Fmoc); 141.28 (2C, C_{4a}-, C_{4b}-Fmoc); 134.69 (1C, C_{quart.}-Bn-Ester); 129.02, 128.96, 128.82, 128.61, 128.21, 127.76, 127.14 (9C, C₃-, C₆-, C₂-, C₇-Fmoc, 5x CH_{arom.}-Bn-Ester); 125.27, 125.12 (2C, C₁-, C₈-Fmoc); 120.01, 119.97 (2C, C₄-, C₅-Fmoc); 99.60 (1C, C₁-Gal); 98.60 (1C, C₂-Sial); 77.21 (1C, β -CH Thr); 72.57, 68.97, 68.87, 68.37, 68.21, 68.09, 67.89, 67.49, 67.15 (9C, C₃-, C₄-, C₅-Gal,

C4-, C6-, C7-, C8-Sial, CH₂-Fmoc (67.15), CH₂-Bn-Ester (67.89)); 63.82 (1C, C6-Gal); 62.35 (1C, C9-Sial); 58.62 (1C, α -CH Thr); 49.20 (1C, C5-Sial); 47.24, 46.99 (2C, C9-Fmoc, C2-Gal); 37.64 (1C, C3-Sial); 23.14, 22.92 (2C, 2x CH₃ NHAc); 21.44, 21.00, 20.79, 20.74, 20.70, 20.64 (6C, 6x CH₃ OAc); 18.22 (1C, γ -CH₃ Thr).

5.4 Versuche zu Kapitel 3.1.3

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-azido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (38)

(Fmoc-Thr(β -Ac₄Gal-(1-3)- α -GalN₃)-OtBu)

In 25 mL 80%iger Essigsäure löst man 768 mg (0.766 mmol) Fmoc-Thr(β -Ac₄Gal-(1-3)- α -4,6-Bzn-GalN₃)-OtBu^[154] **37** und erwärmt die Reaktionsmischung 90 min auf 75 °C. Anschließend entfernt man die Essigsäure i. Hochvak. und kodestilliert zweimal mit 60 mL Toluol. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:0.5) → (50:1) gereinigt.

Ausbeute: 622 mg (89 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{26} = +52.08^\circ$ (c = 1.00, MeOH); $R_f = 0.09$ (CH₂Cl₂/MeOH 50:1).

C₄₃H₅₄N₄O₁₈ MW: 914.91 EM: 914.3433.

ESI-MS (m/z) = 881.4 ([M+Na-*t*Bu]⁺), Ber.: 881.3; 937.6 ([M+Na]⁺), Ber.: 937.3.

HR-MS (m/z) = 937.3347 ([M+Na]⁺), Ber.: 937.3331.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 7.77 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.60 Hz); 7.63 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 7.24 Hz); 7.41 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J = 7.20 Hz); 7.32 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J = 7.44 Hz); 5.70 (d, 1H, NH Urethan, J = 9.56 Hz); 5.42 (dd, 1H, H4-Gal, J = 3.40 Hz, J = 0.90 Hz); 5.31 (dd, 1H, H2-Gal, J = 10.36 Hz, J = 7.90 Hz); 4.88 (d, 1H, H1-GalNAc, J = 3.72 Hz); 5.04 (dd, 1H, H3-Gal, J = 10.52 Hz, J = 3.50 Hz); 4.76 (d, 1H, H1-Gal, J = 7.80 Hz); 4.50-4.44 (m, 2H, CH_AH_B-Fmoc, β -CH Thr); 4.35-4.09 (m, 6H, CH_AH_B-Fmoc (4.33), H9-Fmoc (4.26), H4-GalNAc (4.22), α -CH Thr (4.30), H6a-GalNAc (4.19), H6b-GalNAc (4.12)); 4.04 (dd, 1H, H3-GalNAc, J = 10.66 Hz, J = 3.00 Hz); 3.99-3.92 (m, 3H, H5-GalNAc, H5-, H6a-Gal); 3.83 (m, 1H, H6b-Gal); 3.58 (dd, 1H, H2-GalNAc,

$J = 10.56$ Hz, $J = 3.72$ Hz); 2.18, 2.11, 2.06, 2.01 (s, 12H, 4x CH₃ OAc); 1.51 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.34 (d, 3H, γ -CH₃ Thr, $J = 6.24$ Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, HSQC): δ (ppm): 170.44, 170.11, 170.07, 169.58, 169.21 (5C, 4x C=O OAc, C=O *t*Bu-Ester); 156.78 (1C, C=O Urethan); 143.92, 143.75 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.30 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.76 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.09, 127.03 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.24, 124.20 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.03, 120.00 (2C, C4-, C5-Fmoc); 101.91 (1C, C1-Gal); 99.22 (1C, C1-GalN₃); 82.98 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 77.82 (1C, C3-GalN₃); 75.85 (1C, β -CH Thr); 71.37 (1C, C5-GalN₃); 70.66 (1C, C3-Gal); 69.62 (1C, C5-Gal); 69.24 (1C, C4-GalN₃); 68.34 (1C, C2-Gal); 67.31 (1C, CH₂-Fmoc); 66.96 (1C, C4-Gal); 62.69 (1C, C6-Gal); 61.59 (1C, C6-GalN₃); 59.03 (1C, α -CH Thr); 58.55 (1C, C2-GalN₃); 47.17 (1C, C9-Fmoc); 28.01 (3C, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 20.67, 20.65, 20.61, 20.55 (4C, 4x CH₃ OAc); 19.06 (1C, γ -CH₃ Thr).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (39)**
(Fmoc-Thr(β -Ac₄Gal-(1-3)- α -GalAc₂NAc)-OH)

Es werden 602 mg (0.658 mmol) Fmoc-Thr(β -Ac₄Gal-(1-3)- α -GalN₃)-OtBu **38** mit 70 mL einer Acetanhydrid/Pyridin-Mischung (1:2) versetzt und 14 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Danach entfernt man die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 70 mL Toluol. Den Rückstand nimmt man in 80 mL Dichlormethan auf und wäscht zweimal mit je 15 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und zweimal mit je 15 mL 1 M KHSO₄-Lsg. Man trocknet über MgSO₄ und entfernt das Dichlormethan i. Vakuum. Zu dem Rückstand gibt man 40 mL einer THF/Acetanhydrid/Essigsäure-Mischung (3:2:1) und 1.25 g (19.12 mmol) Zinkstaub, der durch Aufschlämmen in 20 mL einer verd. CuSO₄-Lsg. (2.48 g, 9.96 mmol CuSO₄·5H₂O in 80 mL Wasser) aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet wird. Man rührt 60 min bei Raumtemp. Anschließend wird die Reaktionsmischung durch Zugabe von 100 mL THF verdünnt und über „Hyflo-Supercel[®]“ filtriert. Das Lösemittel wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand viermal mit je 80 mL Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird in 100 mL Dichlormethan gelöst und dreimal mit je 45 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 45 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wird das Lösemittel i. Vak. entfernt. Den verbleibenden

Feststoff löst man in 40 mL einer Mischung aus TFA, Wasser und TIS (38:1.5:0.5) und rührt bei Raumtemp. 1 h unter Argon. Anschließend entfernt man das TFA-Gemisch i. Vak. und kodestilliert zweimal mit je 50 mL Toluol. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 20.0 cm, Durchmesser = 2.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:0.5:0.5) → (50:1:0.5) gereinigt.

Ausbeute: 416 mg (66 % über 3 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +59.78^\circ$ (c = 1.00, CH₂Cl₂), $[\alpha]_D^{23}(\text{Lit.}^{[408]}) = +63.08^\circ$ (c = 1.00, CH₂Cl₂); $R_f(\text{Acetylierung}) = 0.57$ (Cyclohexan/Ethylacetat 2:3), $R_f(\text{NHAc}) = 0.17$ (Cyclohexan/Ethylacetat 2:3), $R_f = 0.28$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 50:2:0.5).

C₄₅H₅₄N₂O₂₁ MW: 958.91 EM: 958.3219.

ESI-MS (m/z) = 959.5 ([M+H]⁺), Ber.: 959.3; 981.6 ([M+Na]⁺), Ber.: 981.3.

Ber.: C 56.36 H 5.68 N 2.92

Gef.: C 56.18 H 5.70 N 2.88

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 7.78 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.44 Hz); 7.63 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 7.04 Hz); 7.42 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J = 7.00 Hz); 7.32 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J = 7.04 Hz); 6.07 (d, 1H, NH Amid, J = 9.00 Hz); 5.55 (d, 1H, NH Urethan, J = 7.80 Hz); 5.38 (d, 1H, H4-Gal oder H4-GalNAc, J = 2.64 Hz); 5.36 (d, 1H, H4-Gal oder H4-GalNAc, J = 2.49 Hz); 5.08 (m, 1H, H2-Gal); 5.01 (d, 1H, H1-GalNAc, J = 3.32 Hz); 5.04 (dd, 1H, H3-Gal, J = 10.36, Hz, J = 3.20 Hz); 4.58 (d, 1H, H1-Gal, J = 7.60 Hz); 4.53-4.51 (m, 2H, CH₂-Fmoc); 4.45-4.39 (m, 3H, H3-, H2-GalNAc, α-CH Thr); 4.23 (m, 1H, H9-Fmoc); 4.19-4.08 (m, 3H, H6a-GalNAc, β-CH Thr, H6a-Gal); 4.04-3.98 (m, 2H, H6b-Gal, H6b-GalNAc); 3.89-3.80 (m, 2H, H5-GalNAc, H5-Gal); 2.36 (s, 3H, CH₃ NHAc); 2.16, 2.13, 2.07, 2.03, 2.01, 2.00 (s, 18H, 6x CH₃ OAc); 1.30 (d, 3H, γ-CH₃ Thr, J = 6.04 Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, HSQC): δ(ppm): 173.19 (1C, -COOH); 170.61, 170.50, 170.33, 170.10, 169.99, 169.69 (7C, 6x C=O OAc, C=O NHAc); 156.63 (1C, C=O Urethan); 143.78, 143.61 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.35 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.84 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.20, 127.12 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.30, 124.94 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.21, 120.08 (2C, C4-, C5-Fmoc); 100.38 (1C, C1-Gal); 99.63 (1C, C1-GalNAc); 77.23 (1C, C3-GalNAc (im Lösemittelsignal)); 72.63, 70.87 (2C, C5-GalNAc, C5-Gal); 70.67 (1C, C3-Gal); 68.86, 68.63, 67.78 (3C, β-CH Thr, C4-GalNAc oder C4-Gal, C2-Gal); 66.95 (1C, CH₂-Fmoc); 66.76 (1C, C4-Gal oder C4-GalNAc); 62.86, 61.10 (2C, C6-Gal, C6-GalNAc); 58.48 (1C, α-CH Thr); 49.12 (1C, C2-GalNAc); 47.25 (1C, C9-Fmoc); 22.79 (1C, CH₃ NHAc); 20.71, 20.67, 20.62, 20.57, 20.52, 20.11 (6C, 6x CH₃ OAc); 18.29 (1C, γ-CH₃ Thr).

5.5 Versuche zu Kapitel 3.2.3

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition:

Methode a)

Man löst in dem entsprechenden, entgasten Lösemittel die Thiol-Komponente und die Allylfunktion tragende Komponente sowie den Radikalstarter 4,4'-Azobis-(4-cyanvaleriansäure) (ACVA, V-501) in einem Quarz-Reagenzglas (NS 14.5 Schliff, Durchmesser: 2 cm bzw. 1.4 cm, Länge: 19 cm bzw. 8 cm). Unter Argon bestrahlt man extern die Reaktionslösung mittels einer Quecksilberniederdrucklampe (Wellenlänge: $\lambda = 254$ nm, Leistung: 77 W). Nach beendeter Reaktion entfernt man das Lösemittel i. Vak. bzw. lyophilisiert die Reaktionslösung.

Methode b)

Man löst in dem entsprechenden, entgasten Lösemittel die Thiol-Komponente und die Allylfunktion tragende Komponente sowie den Radikalstarter 2,2'-Azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (VA-044) (Fa. Wako Chemicals GmbH) und erwärmt die Reaktionsmischung 24 h auf 46 °C unter Argon. Nach beendeter Reaktion entfernt man das Lösemittel i. Vak. bzw. lyophilisiert die Reaktionslösung.

N-tert-Butyloxycarbonylglycin-allylamid (44)

(Boc-Gly-NHAlI)

1.00 g (5.71 mmol) Boc-Gly-OH **43** und 427 μ L (326 mg, 5.71 mmol) Allylamin werden in 70 mL absol. Dichlormethan gelöst. Dann werden 1.73 g (5.71 mmol) IIDQ gelöst in 4 mL absol. Dichlormethan zugegeben. Man rührt die Reaktionsmischung 20 h unter Argon. Man verdünnt mit 50 mL Dichlormethan und wäscht je einmal mit 40 mL 1 M KHSO₄-Lsg., 50 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und 40 mL ges. NaCl-Lsg. Die wässrigen Phasen werden mit je 40 mL Dichlormethan reextrahiert. Man entfernt das Lösemittel i. Vak. und reinigt den Rückstand chromatographisch an Kiesegel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/ Ethylacetat (1:1).

Ausbeute: 868 mg (71 %); farbloses, viskoses Öl; $R_f = 0.13$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1).

C₁₀H₁₈N₂O₃ MW: 214.26 EM: 214.1317.

ESI-MS (m/z) = 137.1 ($[M-Boc+Na]^+$), Ber.: 137.1; 159.1 ($[M-Boc+2Na]^+$), Ber.: 159.1; 237.2 ($[M+Na]^+$), Ber.: 237.2; 253.1 ($[M+K]^+$), Ber.: 253.1; 278.3 ($[M+Na+MeCN]^+$), Ber.: 278.4; (429.3 ($[2M+H]^+$), Ber.: 429.3; 451.4 ($[2M+Na]^+$), Ber.: 451.3.

HR-MS (m/z) = 237.1209 ($[M+Na]^+$), Ber.: 237.1215.

Ber.: C 56.06 H 8.47 N 13.07

Gef.: C 56.20 H 8.59 N 13.11

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm): 6.50 (s_b , 1H, NH Amid); 5.77 (m, 1H, $-CH_2-CH=CH_2$); 5.37 (s_b , 1H, NH Urethan); 5.11 (m, 2H, $-CH_2-CH=CH_2$); 3.87 (m, 2H, $-CH_2-CH=CH_2$); 3.77 (d, 2H, α - CH_2 Gly, $J = 5.49$ Hz); 1.40 (s, 9H, 3x CH_3 Boc).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($CDCl_3$; BB): δ (ppm): 169.39 (1C, C=O Amid); 156.11 (1C, C=O Urethan); 133.81 (1C, $-CH_2-CH=CH_2$); 116.34 (1C, $-CH_2-CH=CH_2$); 80.27 (1C, $C_{quart.}$ -Boc); 44.38 (1C, α - CH_2 Gly); 41.69 (1C, $-CH_2-CH=CH_2$); 28.27 (3C, 3x CH_3 Boc).

N-Acetylglycin-allylamid (47)

(Ac-Gly-NHAlI)

11.30 g (109.6 mmol) Glycinethylester-hydrochlorid **45** werden in 200 mL absol. Dichlormethan gelöst, mit 25.1 mL (18.07 g, 178.6 mmol) Triethylamin versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Man tropft dann 7.82 mL (8.60 g, 109.6 mmol) Acetylchlorid hinzu, lässt auf Raumtemp. erwärmen und rührt die Reaktionsmischung 16 h unter Argon. Dann entfernt man die Lösemittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit je 200 mL Toluol. Der gelbe Rückstand wird in 200 mL Ethylacetat aufgenommen und einmal mit 200 mL 1 M $KHSO_4$ -Lsg. und einmal mit 200 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die wässrigen Phasen werden mit 100 mL Ethylacetat zurückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel i. Vak. verdampft. Das Produkt der Acetylierung (2.00 g, 13.78 mmol) wird in 12 mL Allylamin 2 h bei 50 °C unter Argon gerührt. Anschließend entfernt man die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 20 mL Toluol. Man reinigt den Rückstand chromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch $CH_2Cl_2/EtOH$ (50:4).

Ausbeute: 1.64 g (77 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f(\text{Ester}) = 0.11$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1), $R_f = 0.15$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 50:4).

$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ MW: 156.18 EM: 156.0899.

ESI-MS (m/z) = 157.1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 157.1; 179.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 179.1; 335.2 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 335.2.

Ber.: C 53.83 H 7.74 N 17.94

Gef.: C 54.02 H 7.70 N 17.84

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$: 6.97 (s_b , 1H, NH Amid); 5.77 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.11 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 3.91 (d, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly, $J = 5.16$ Hz); 3.82 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, $J = 5.75$ Hz); 1.99 (s, 3H, CH_3 Ac).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB): $\delta(\text{ppm})$: 171.03, 169.06 (2C, C=O Amid); 133.64 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 116.39 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 43.41 (1C, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly); 41.85 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 22.86 (1C, CH_3 NHAc).

***N*-Acetyl-S-[3-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-glycylamido)propyl]-L-cystein-methylester (49)**

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: *N*-*tert*-Butyloxycarbonylglycin-allylamid **44**: 50 mg (0.233 mmol); *N*-Acetyl-L-cystein-methylester: 50 mg (0.280 mmol); ACVA: 10 mg (15 mol%); 4.5 mL MeOH; 8 h.

Die Reinigung erfolgte durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:1) $\rightarrow$ (50:3).

Ausbeute: 68 mg (75 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -7.94^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH); $R_f = 0.18$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50:3), $R_t = 14.06$ min (Säule LUNA/Gradient: 5 % B nach 100 % B in 20 min).

$\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ MW: 391.48 EM: 391.1777.

ESI-MS (m/z) = 314.2 ($[\text{M}-\text{Boc}+\text{Na}]^+$), Ber.: 314.1; 414.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 414.2; 430.2 ($[\text{M}+\text{K}]^+$), Ber.: 430.2.

HR-MS (m/z) = 414.1673 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 414.1675.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 6.63 (m, 2H, 2x NH Amid); 5.47 (t, 1H, NH Urethan, J = 5.70 Hz); 4.77 (m, 1H α-CH Cys); 3.75 (m, 5H, CH₃O-, α-CH₂ Gly); 3.31 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.94 (dd, 1H, β-CH_AH_B Cys, J = 13.98 Hz, J = 5.88 Hz); 2.84 (dd, 1H, β-CH_AH_B Cys, J = 13.98 Hz, J = 5.88 Hz); 2.57 (m, 1H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.03 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.74 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.41 (s, 9H, 3x CH₃ Boc).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ(ppm): 171.43, 170.25, 169.84 (3C, C=O Ester, 2x C=O Amid); 156.11 (1C, C=O Urethan); 80.12 (1C, C_{quart.}-Boc); 52.68, 51.69 (2C, α-CH Cys, CH₃O-); 44.37 (1C, α-CH₂ Gly); 37.94 (1C, -NH-CH₂-); 34.45 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 29.67, 28.76 (2C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 28.30 (3C, 3x CH₃ Boc); 23.04 (1C, CH₃ NHAc).

N-Acetyl-S-[3-(N-acetyl-glycylamido)propyl]-L-cystein-methylester (50)

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A und B).

Eingesetzte Mengen (Methode A): N-Acetylglycin-allylamid **47**: 50 mg (0.320 mmol); N-Acetyl-L-cystein-methylester: 142 mg (0.800 mmol); ACVA: 14 mg (15 mol%); 6 mL Wasser; 8 h.

Eingesetzte Mengen (Methode B): N-Acetylglycin-allylamid **47**: 50 mg (0.320 mmol); N-Acetyl-L-cystein-methylester: 68 mg (0.384 mmol); VA-044: 21 mg (20 mol%); 5 mL Wasser.

Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOH (50:2) → (50:5).

Ausbeute: Methode A: 91 mg (85 %), Methode B: 80 mg (75 %); farbloser, amorpher Feststoff; [α]_D²⁵ = -20.50° (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.10 (CH₂Cl₂/EtOH 50:5).

C₁₃H₂₃N₃O₅S MW: 333.40 EM: 333.1358.

ESI-MS (m/z) = 334.2 ([M+H]⁺), Ber.: 334.1; 356.2 ([M+Na]⁺), Ber.: 356.1.

Ber.: C 46.83 H 6.95 N 12.60 S 9.62

Gef.: C 46.74 H 6.88 N 12.58 S 9.61

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm): 6.74 (m, 1H, -NH-CH₂-); 6.31 (m, 1H, -NH-CH₂-); 6.54 (d, 1H, -NH-CH-, J = 7.71 Hz); 4.79 (m, 1H α -CH Cys); 3.90 (m, 1H, α -CH₂ Gly); 3.75 (s, 3H, CH₃O-); 3.34 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.95 (dd, 1H, β -CH_AH_B Cys, J = 14.15 Hz, J = 6.30 Hz); 2.84 (dd, 1H, β -CH_AH_B Cys, J = 14.15 Hz, J = 6.40 Hz); 2.57 (m, 1H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.05 (s, 3H, CH₃ NHAc); 2.02 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.76 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB): δ (ppm): 171.14, 170.47, 170.09, 169.13 (4C, C=O Ester, 3x C=O Amid); 52.12, 51.57 (2C, α -CH Cys, CH₃O-); 42.88, 37.56 (2C, α -CH₂ Gly, -NH-CH₂-); 33.68 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 29.28, 28.47 (2C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 22.59, 22.56 (2C, 2x CH₃ NHAc).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-glycin-allylamid** (Fmoc-Gly-NHAlI) (**52**)

In 50 mL Dichlormethan werden 1.25 g (4.21 mmol) Fmoc-Gly-OH **51**, 636 mg (4.21 mmol) HOBt (12 % Wasser), 1.44 mL (1.09 g, 8.42 mmol) DIPEA und 1.59 g (4.21 mmol) TBTU gelöst und 15 min unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Zu der gelben Reaktionsmischung werden dann 316 μL (240 mg, 4.21 mmol) Allylamin gelöst in 4 mL Dichlormethan langsam zugetropft. Man rührt 4 h unter Argon bei Raumtemp. Das Lösemittel wird i. Hochvak. entfernt und das verbleibende gelbe Öl in 100 mL Dichlormethan aufgenommen. Man wäscht zweimal mit je 40 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 30 mL ges. NaCl-Lsg., trocknet über MgSO₄ und entfernt das Dichlormethan i. Vakuum. Man reinigt den Rückstand chromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:0.5:0.5) $\rightarrow$ (50:1.5:0.5).

Ausbeute: 2.64 g (90 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.46 (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 50:2:0.5).

C₂₀H₂₀N₂O₃ MW: 336.38 EM: 336.1474.

ESI-MS (m/z) = 359.2 ([M+Na]⁺), Ber.: 359.2; 375.2 ([M+K]⁺), Ber.: 375.2; 695.4 ([2M+Na]⁺), Ber.: 695.3.

Ber.: C 71.41 H 5.99 N 8.33

Gef.: C 71.57 H 5.92 N 8.25

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 7.71 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.71 Hz); 7.54 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 6.99 Hz); 7.38–7.20 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc); 6.71 (s, 1H, NH Amid), 6.05 (s, 1H, NH Urethan); 5.76 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.06 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.36 (d, 2H, CH₂-Fmoc, J = 6.99 Hz); 4.16 (m, 1H, H9-Fmoc); 3.87–3.80 (m, 4H, -CH₂-CH=CH₂, α-CH₂ Gly).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃, BB): δ(ppm): 169.17 (1C, C=O Amid); 156.84 (1C, C=O Urethan); 143.71 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.27 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 133.72 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 127.77 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.09 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.02 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.01 (2C, C4-, C5-Fmoc); 116.46 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 67.13 (1C, CH₂-Fmoc); 47.06 (1C, C9-Fmoc); 44.50 (1C, α-CH₂ Gly); 41.85 (1C, -CH₂-CH=CH₂).

N-Acetyl-L-leucyl-glycin-allylamid (53)

(Ac-Leu-Gly-NHAlI)

Das Glycin-Derivat Fmoc-Gly-NHAlI **52** (2.58 g, 3.74 mmol) wird in 90 mL einer 20%igen Morpholin-DMF-Lsg. gelöst und 2 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Man entfernt das DMF-Morpholin-Gemisch i. Hochvak. und kodestilliert viermal mit 80 mL Toluol. Der Rückstand wird in 20 mL Dichlormethan gelöst und zu einer Lösung aus 728 mg (4.21 mmol) N-Acetyl-L-leucin, 636 mg (4.21 mmol) HOBt (12 % Wasser), 1.44 mL (1.09 g, 8.42 mmol) DIPEA und 1.35 g (4.21 mmol) TBTU gelöst in 20 mL DMF gegeben. Man rührt die Reaktionsmischung 6 h bei Raumtemp. und verdünnt anschließend mit 90 mL Dichlormethan und wäscht die organische Phase zweimal mit je 70 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 70 mL 1 M KHSO₄-Lsg. Die wässrigen Phasen werden einmal mit je 35 mL Dichlormethan zurückextrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ entfernt man das Lösemittel i. Vak. und der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:0.7) → (50:1.1) gereinigt.

Ausbeute: 644 mg (64 %); farbloser, amorpher Feststoff; [α]_D²⁵ = +0.49° (c = 0.50, MeOH); R_f = 0.16 (CH₂Cl₂/MeOH 50:1).

C₁₃H₂₃N₃O₃ MW: 269.34

EM: 269.1739.

ESI-MS (m/z) = 292.3 ($[M+Na]^+$), Ber.: 292.2; 308.2 ($[M+K]^+$), Ber.: 308.2; 561.5 ($[2M+Na]^+$), Ber.: 561.4; 577.4 ($[2M+K]^+$), Ber.: 577.4.

HR-MS (m/z) = 292.1627 ($[M+Na]^+$), Ber.: 292.1637.

300 MHz- 1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm): 8.24 (t, 1H, NH Amid, J = 5.49 Hz); 8.08 (d, 1H, NHAc, J = 7.35 Hz); 7.80 (m, 1H, NH Amid); 5.74 (m, 1H, $-CH_2-CH=CH_2$); 5.06 (m, 2H, $-CH_2-CH=CH_2$); 4.18 (m, 1H, α -CH Leu); 3.76 (m, 4H, $-CH_2-CH=CH_2$, α -CH₂ Gly); 1.83 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.57 (m, 1H, γ -CH Leu); 1.44 (m, 2H β -CH₂ Leu); 0.88 (d, 3H, δ -CH₃ Leu, J = 6.24 Hz); 0.83 (d, 3H, δ -CH₃ Leu, J = 6.24 Hz).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 ; BB): δ (ppm): 172.72, 169.90, 168.63 (3C, 3x C=O Amid); 135.11 (1C, $-CH_2-CH=CH_2$); 115.13 (1C, $-CH_2-CH=CH_2$); 51.65 (1C, α -CH Leu); 42.20 (1C, α -CH₂ Gly), 40.50 (2C, $-CH_2-CH=CH_2$, β -CH₂ Leu (im Lösemittelsignal)); 24.27 (1C, γ -CH Leu); 23.03 (1C, δ -CH₃ Leu); 22.56 (1C, CH₃ NHAc); 21.75 (1C, δ -CH₃ Leu).

***N*-Acetyl-*S*-[3-(*N*-acetyl-*L*-leucyl-glycylamido)propyl]-*L*-cystein (55)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: *N*-Acetyl-*L*-leucyl-glycin-allylamid **53**: 50 mg (0.186 mmol); *N*-Acetyl-*L*-cystein: 38 mg (0.232 mmol); ACVA: 5 mg (10 mol%); 4.5 mL MeOH/Wasser (4:0.5); 7 h. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 20.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:4:0.5) → (50:8:0.5) gereinigt.

Ausbeute: 64 mg (80 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -14.82^\circ$ (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.16 (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:8:0.5)), R_t = 9.47 min (Säule B, Gradient: 5 % B nach 100 % B in 15 min).

C₁₈H₃₂N₄O₆S MW: 432.53 EM: 432.2043.

ESI-MS (negativ) (m/z) = 431.4 ($[M-H]^-$), Ber.: 431.2; 453.4 ($[M+Na-H]^-$), Ber.: 453.2; 469.3 ($[M+K-H]^-$), Ber.: 469.2.

HR-MS (m/z) = 477.1767 ($[M+2Na-H]^+$), Ber.: 477.1760.

300 MHz- 1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm): 8.46 (s, 1H, NH Amid); 8.32 (m, 1H, NH Amid); 7.76 (m, 1H, NH Amid); 4.16 (m, 2H α -CH Cys, α -CH Leu); 3.48 (s, 2H, α -CH₂ Gly (im Wassersignal)); 3.10 (m, 2H, $-NH-CH_2-CH_2-CH_2-S-CH_2-$); 2.90 (m, 1H, β -CH_AH_B Cys);

2.71 (m, 1H, β -CH_AH_B Cys); 2.49 (2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.84 (s, 6H, 2x CH₃ NHAc); 1.59 (m, 3H, β -CH₂ Leu, γ -CH Leu); 1.43 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 0.86 (d, 3H, δ -CH₃ Leu, J = 6.27 Hz); 0.81 (d, 3H, δ -CH₃ Leu, J = 6.24 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆; BB, DEPT): δ (ppm): 174.94, 172.76, 170.02, 168.99, 168.90 (5C, -COOH, 4x C=O Amid); 53.89, 51.77 (2C, α -CH Cys, α -CH Leu); 42.29 (1C, α -CH₂ Gly); 40.49 (1C, β -CH₂ Leu); 37.69 (1C, -NH-CH₂-); 34.14 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 28.96, 28.76 (2C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 24.28 (1C, γ -CH Leu); 23.04 (1C, δ -CH₃ Leu); 22.91 (1C, CH₃ NHAc); 22.58 (1C, CH₃ NHAc); 21.71 (1C, δ -CH₃ Leu).

N-Acetyl-L-leucin-allylamid (57)

(Ac-Leu-NHAlI)

Man löst 500 mg (2.89 mmol) Ac-Leu-OH **56** in 18 mL MeCN (1:5). Zu der Lösung gibt man 217 μ L (165 mg, 2.89 mmol) Allylamin und 894 mg (2.95 mmol) IIDQ. Man lässt 17 h unter Argon bei Raumtemp. rühren. Die Lösung wird mit Essigsäure neutralisiert und i. Vak. konzentriert. Man nimmt den Rückstand in 200 mL Dichlormethan/Ethylacetat (1:1) auf und wäscht zweimal mit 40 mL 1 M HCl-Lsg., einmal mit 60 mL NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Man extrahiert die wässrigen Phasen mit je 30 mL Dichlormethan zurück, trocknet die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird chromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOH (50:1) gereinigt.

Ausbeute: 392 mg (64 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -35.50^\circ$ (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.33 (CH₂Cl₂/EtOH 50:3).

C₁₁H₂₀N₂O₂ MW: 212.29 EM: 212.1525.

ESI-MS (m/z) = 235.1 ([M+Na]⁺), Ber.: 235.2; 251.1 ([M+K]⁺), Ber.: 251.2; 463.3 ([2M+K]⁺), Ber.: 463.3.

HR-MS (m/z) = 235.1422 ([M+Na]⁺), Ber.: 235.1422.

Ber.: C 62.23 H 9.50 N 13.20

Gef.: C 61.97 H 9.41 N 13.17

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm): 7.16 (m, 1H, NH Amid); 6.96 (m, 1H, NH Amid); 5.74 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.10 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.21 (m, 1H, α -CH Leu);

3.81 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 1.93 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.59 (m, 3H, β-CH₂ Leu, γ-CH Leu); 0.89 (m, 6H, 2x δ-CH₃ Leu).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ(ppm): 172.42, 170.35 (2C, 2x C=O Amid); 133.82 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 116.18 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 51.78 (1C, α-CH Leu); 41.75, 41.33 (2C, -CH₂-CH=CH₂, β-CH₂ Leu); 24.76 (1C, γ-CH Leu); 22.77 (1C, δ-CH₃ Leu); 22.97 (1C, CH₃ NHAc); 22.29 (1C, δ-CH₃ Leu).

***N*-Acetyl-S-[3-(*N*-acetyl-L-leucylamido)propyl]-L-cystein-methylester (58)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: *N*-Acetyl-L-leucin-allylamid **57**: 50 mg (0.236 mmol); *N*-Acetyl-L-cystein-methylester: 50 mg (0.283 mmol); ACVA: 5 mg (7.6 mol%), 4.5 mL MeOH/Wasser (4:0.5); 9 h.

Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:2).

Ausbeute: 55 mg (60 %); farbloser, amorpher Feststoff; [α]_D²⁵ = -32.68° (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.13 (CH₂Cl₂/MeOH 50:2), R_t = 9.75 min (Säule B, Gradient: 15 % B nach 100 % B in 20 min).

C₁₇H₃₁N₃O₅S MW: 389.51 EM: 389.1984.

ESI-MS (m/z) = 412.4 ([M+Na]⁺), Ber.: 412.2; 428.3 ([M+K]⁺), Ber.: 428.2.

HR-MS (m/z) = 412.1895 ([M+Na]⁺), Ber.: 412.1882.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ(ppm): 8.37 (d, 1H, NH Amid, J = 8.10 Hz); 7.94 (m, 2H, 2x NH Amid); 4.41 (m, 1H, α-CH Cys oder α-CH Leu); 4.19 (m, 1H, α-CH Cys oder α-CH Leu); 3.62 (s, 3H, CH₃O-); 3.07 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.83 (dd, 1H, β-CH_AH_B Cys, J = 13.98 Hz, J = 5.52 Hz); 2.71 (dd, 1H, β-CH_AH_B Cys, J = 13.59 Hz, J = 5.49 Hz); 2.49 (2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.85 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.81 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.57 (m, 3H, β-CH₂ Leu, γ-CH Leu); 1.38 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 0.85 (d, 3H, δ-CH₃ Leu, J = 6.24 Hz); 0.81 (d, 3H, δ-CH₃ Leu, J = 6.60 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB): δ(ppm): 172.22, 171.40, 169.53, 169.20 (4C, C=O Ester, C=O Amid, 2x C=O NHAc); 52.14, 51.17 (3C, α-CH Cys, α-CH Leu, -OMe); 41.16

(1C, β -CH₂ Leu); 37.55 (1C, -NH-CH₂-); 32.73 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 29.05, 29.00 (2C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 24.37 (1C, γ -CH Leu); 22.97 (1C, δ -CH₃ Leu); 22.58, 22.37 (2C, 2x CH₃ NHAc); 21.81 (1C, δ -CH₃ Leu).

***N*-tert-Butyloxycarbonyl-D/L-alanin-allylamid (60-L)**
(Boc-Ala-NHAlI)

Man löst 800 mg (4.23 mmol) Boc-Ala-OH **59-L** in 50 mL Dichlormethan und gibt 704 mg (4.65 mmol) HOBt, 1.49 g (4.65 mmol) TBTU und 1.67 mL (1.26 g, 9.72 mmol) DIPEA hinzu. Nach 15minütigem Rühren bei Raumtemp. tropft man 316 μ L (241 mg, 4.23 mmol) Allylamin gelöst in 3 mL Dichlormethan hinzu. Man rührt 2 h bei Raumtemp. unter Argon. Danach verdünnt man mit 150 mL Dichlormethan, wäscht zweimal mit je 70 mL ges. NaHCO₃-Lsg., einmal mit 70 mL ges. NaCl-Lsg. und trocknet über MgSO₄. Das Lösemittel entfernt man i. Vak. und reinigt den Rückstand chromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOH (50:0.9).

Ausbeute: 859 mg (89 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25}$ (L-Form) = -17.44° (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.31 (CH₂Cl₂/EtOH 50:2).

C₁₁H₂₀N₂O₃ MW: 228.29 EM: 228.1474.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm): 6.48 (s, 1H, NH Amid); 5.74 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.10 (m, 3H, -CH₂-CH=CH₂, NH Urethan); 4.17 (m, 1H, α -CH Ala); 3.83 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 1.40 (s, 9H, 3 x CH₃ Boc); 1.33 (d, 3H, β -CH₃, J = 6.99 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ (ppm): 172.54 (1C, C=O Amid); 155.52 (1C, C=O Urethan); 133.91 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 116.16 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 80.09 (1C, C_{quart.}-Boc); 50.07 (1C, α -CH Ala); 41.67 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 28.30 (3C, 3x CH₃ Boc); 18.44 (1C, β -CH₃ Ala).

N-Acetyl-L/D-alanin-allylamid (61-L) und (61-D)

(Ac-Ala-NHAlI)

Man löst 810 mg (3.56 mmol) Boc-L/D-Ala-NHAlI **60** in 50 mL TFA/Wasser-Gemisch (48:2) und rührt 1 h bei Raumtemp. Danach verdünnt man mit 50 mL Toluol und entfernt die flüchtigen Bestandteile i. Vakuum. Man kodestilliert zweimal mit je 80 mL Toluol und versetzt den verbleibenden Rückstand mit 30 mL einer auf 0 °C gekühlten Acetanhydrid/Pyridin-Mischung (1:2). Nach einstündigem Rühren entfernt man die Acetanhydrid/Pyridin-Mischung i. Hochvak. und kodestilliert einmal mit 90 mL Toluol. Der hellgelbe Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:2) gereinigt.

Ausbeute: 489 mg (81 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{28}$ (D-Form) = +24.00° (c = 0.65, MeOH), $[\alpha]_D^{23}$ (L-Form) = -41.15° (c = 0.77, MeOH); R_f = 0.18 (CH₂Cl₂/MeOH 50:3).

C₈H₁₄N₂O₂ MW: 170.21 EM: 170.1055.

ESI-MS (m/z) = 171.1 ([M+H]⁺), Ber.: 171.1; 193.1 ([M+Na]⁺), Ber.: 193.1; 209.1 ([M+K]⁺), Ber.: 209.1; 234.1 ([M+Na+MeCN]⁺), Ber.: 234.1.

Ber.: C 56.45 H 8.29 N 16.46

Gef.: C 56.39 H 8.20 N 16.47

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 7.24 (s, 1H, CH₂-NH Amid); 6.85 (d, 1H, NH Amid, J = 7.35 Hz); 5.76 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.09 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.54 (m, 1H, α-CH Ala); 3.80 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 1.94 (s, 3H, CH₃ Ac); 1.33 (d, 3H, β-CH₃, J = 6.96 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ(ppm): 172.58, 170.26 (2C, 2x C=O Amid); 133.73 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 116.19 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 48.78 (1C, α-CH Ala); 41.78 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 23.02 (1C, CH₃ NHAc); 18.50 (1C, β-CH₃ Ala).

N-Acetyl-S-[3-(N-acetyl-L/D-alanylamido)propyl]-L-cystein (62-L) und (62-D)

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: N-Acetyl-D/L-alanin-allylamid **61**: 50 mg (0.294 mmol); N-Acetyl-L-cystein: 55 mg (0.338 mmol); ACVA: 8 mg (10 mol%); 4 mL Wasser/MeOH (1:1); 9 h.

Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (40:10:0.5).

Ausbeute: 81 mg (83 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25}$ (D-Form) = +10.21° (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 40:10:0.5), R_t = 34.67 min (Säule D, isokratisch: 3 % D).

C₁₃H₂₃N₃O₅S MW: 333.40 EM: 333.1358.

ESI-MS (m/z) = 356.2 ([M+Na]⁺), Ber.: 356.1; 372.2 ([M+K]⁺), Ber.: 372.1; 711.4 ([2M+2Na-H]⁺), Ber.: 711.3.

HR-MS (m/z) = 356.1253 ([M+Na]⁺), Ber.: 356.1256.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ(ppm): 8.29 (d, 1H, NH Amid, J = 7.71 Hz); 8.04 (s, 1H, CH₂-NH Amid); 7.65 (d, 1H, NH Amid, J = 6.63 Hz); 4.17 (m, 2H, α-CH Cys, α-CH Ala); 3.06 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.90 (m, 1H, β-CH_AH_B Cys); 2.69 (m, 1H, β-CH_AH_B Cys); 2.46 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.83 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.81 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.58 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.15 (d, 3H, β-CH₃ Ala, J = 6.96 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, DEPT): δ(ppm): 174.44 (1C, -COOH); 172.51 (1C, C=O Amid); 169.14, 168.84 (2C, 2x C=O NHAc); 53.89 (1C, α-CH Cys); 48.41 (1C, α-CH Ala); 37.63 (1C, -NH-CH₂-); 34.44 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 28.94, 28.81 (2C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, β-CH₂ Cys); 22.95 (1C, CH₃ NHAc); 22.67 (1C, CH₃ NHAc); 18.55 (1C, β-CH₃ Ala).

***N*-Acetyl-S-[3-(*N*-acetyl-L/D-alanylamido)propyl]-L-cystein-(3,4-dimethoxy-benzyl)-amid (63-L) und (63-D)**

Man löst 40 mg (0.12 mmol) *N*-Acetyl-S-[3-(*N*-acetyl-L/D-alanylamido)propyl]-L-cystein **62** in 3 mL DMF. Zu dieser Lösung gibt man 19 mg (0.12 mmol) HOBt, 43 µL (0.24 mmol) DIPEA und 41 mg (0.12 mmol) TBTU und rührt 5 min bei Raumtemp. Dann tropft man 21 mg (0.126 mmol) Veratrylamin gelöst in 500 µL DMF hinzu und rührt 2 h. Dann verdünnt man mit 40 mL Ethylacetat und wäscht die Verbindung einmal mit 10 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 10 mL 1 M KHSO₄-Lsg. und trocknet über MgSO₄. Die Verbindung wird mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 33 mg (57 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23}$ (L-Form) = +13.67° (c = 0.50, CHCl₃/MeOH (1:1)); R_f (D-Form) = 0.54 (CHCl₃/MeOH 5:1), R_f (L-Form) = 0.46 (CHCl₃/MeOH 5:1) DC-Platte mit Konzentrierungszone, R_t = 10.90 (Säule B, Gradient: 5 % B nach 100 % B in 20 min), R_t = 15.10-16.20 min (Säule H, Gradient: 5 % B nach 100 % B in 30 min, Fluss: 10 mL, 220 nm).

NP-HPLC-Säule: Nucleosil 50; 5 µm, 250 x 4.00 mm, isokratisch (14 % EtOH, CHCl₃, Fluss: 2 mL/min), R_t (D-Form) = 3.38 min, R_t (L-Form) = 4.60 min.

C₂₂H₃₄N₄O₆S MW: 482.59 EM: 482.2199.

ESI-MS (m/z) = 483.3 ([M+H]⁺), Ber.: 483.2; 505.3 ([M+Na]⁺), Ber.: 505.2; 521.3 ([M+K]⁺), Ber.: 521.2; 987.6 ([2M+Na]⁺), Ber.: 987.4.

HR-MS (m/z) = 483.2277 ([M+H]⁺), Ber.: 483.2276.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ(ppm): 8.56 (m, 1H, -CH₂-NH-); 8.16 (d, 1H, NHAc, J = 8.07 Hz); 7.99 (d, 1H, NHAc, J = 7.20 Hz); 7.86 (m, 1H, -CH₂-NH-); 6.85 (m, 2H, H₂, H₆); 6.76 (d, 1H, H₅, J = 8.07 Hz); 4.40 (m, 1H, α-CH Cys oder α-CH Ala); 4.22-4.14 (m, 3H, α-CH Cys oder α-CH Ala, -CH₂-Veratrylamin); 3.71 (s, 3H, -OMe); 3.70 (s, 3H, -OMe); 3.08 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.90 (dd, 1H, β-CH_AH_B Cys, J = 13.23 Hz, J = 6.24 Hz); 2.69 (m, 1H, β-CH_AH_B Cys, J = 13.23 Hz, J = 6.24 Hz); 2.48 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂- (im Lösemittelsignal)); 1.84 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.80 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.61 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.15 (d, 3H, β-CH₃ Ala, J = 6.99 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB): δ(ppm): 172.40, 170.32, 169.38, 169.05 (4C, 2x C=O Amid, 2x C=O NHAc); 148.71, 147.75 (2C, C₃, C₄); 131.68 (1C, C₁); 119.16 (1C, C₆); 111.73 (1C, C₅); 111.07 (1C, C₂); 55.66, 55.47 (2C, 2x -OMe); 52.64, 48.29 (2C, α-CH Cys, α-CH Ala); 41.87 (1C, -CH₂-Veratrylamin); 37.61 (1C, -NH-CH₂-); 33.46 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 29.02, 28.72 (2C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, β-CH₂ Cys); 22.64 (2C, 2x CH₃ NHAc); 18.46 (1C, β-CH₃ Ala).

***N*-Acetyl-*N*^γ-(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl)-L-arginyl-*N*^{im}-trityl-L-histidin-allylamid (66)**

(Ac-Arg(Mtr)-His(Trt)-NHAlI)

Man löst 3.00 g (4.841 mmol) Fmoc-His(Trt)-OH **64** in 40 mL DMF und versetzt die Lösung nacheinander mit 1.55 g (4.841 mmol) TBTU, 747 mg (4.841 mmol) HOBt, 1.69 mL (1.28 g,

9.68 mmol) DIPEA. Man lässt 10 min bei Raumtemp. rühren und tropft dann 364 μL (276 mg, 4.841 mmol) Allylamin in 1 mL DMF zu und lässt die Reaktionsmischung weitere 4 h bei Raumtemp. unter Argon rühren. Dann entfernt man die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 80 mL Toluol. Man nimmt den Rückstand in 200 mL Dichlormethan auf und wäscht zweimal mit je 50 mL ges. NaHCO_3 -Lsg. und trocknet die organische Phase über MgSO_4 . Nach dem Verdampfen des Lösemittels nimmt man den Rückstand in 70 mL einer 20%igen Morpholin-Lsg. in DMF auf und lässt 2 h bei Raumtemp. rühren. Anschließend verdampft man das Morpholin/DMF-Gemisch i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 90 mL Toluol. Der Rückstand wird in 30 mL DMF aufgenommen und zu einer Lösung von 2.95 g (4.841 mmol) Fmoc-Arg(Mtr)-OH, 1.55 g (4.841 mmol) TBTU, 747 mg (4.841 mmol) HOBt, 1.69 mL (1.28 g, 9.68 mmol) DIPEA in 40 mL DMF getropft. Man lässt 4 h bei Raumtemp. unter Argon rühren und entfernt dann das Lösemittel i. Hochvak. Nach der Aufnahme des Rückstandes in 200 mL Dichlormethan wäscht man die organische Phase dreimal mit je 70 mL ges. NaHCO_3 -Lsg., trocknet die organische Phase über MgSO_4 und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Den Rückstand löst man in 70 mL einer 20%igen Morpholin-Lsg. in DMF und lässt 2 h bei Raumtemp. rühren. Danach entfernt man das Lösemittel i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 90 mL Toluol. Der verbleibende Rückstand wird bei 0 °C mit 60 mL einer 0 °C kalten Pyridin/Acetanhydrid-Mischung (2:1) versetzt und 3 h bei Raumtemp. gerührt. Man entfernt die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak., nimmt den Rückstand in 200 mL Dichlormethan auf und wäscht zweimal mit je 70 mL ges. NaHCO_3 -Lsg. und einmal mit 70 mL 1 M KHSO_4 -Lsg. Man trocknet über MgSO_4 und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:3)).

Ausbeute: 1.62 g (39 % über 5 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +4.11^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3); $R_f = 0.15$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50:3).

$\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}$ MW: 847.04 EM: 846.3887.

ESI-MS (m/z) = 847.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 847.4; 869.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 869.4; 885.1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$), Ber.: 885.4.

HR-MS (m/z) = 869.3764 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 869.3785.

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm): 8.40 (d, 1H, NH Amid); 7.30-7.20 (m, 12H, 6x CH_{ortho} Trt, 6x CH_{meta} Trt); 7.04-7.01 (m, 6H, 3x CH_{para} Trt, $\text{CH}_{\text{arom.}}$ His, 2x NH Amid); 6.63 (s, 1H, CH Mtr oder $\text{CH}_{\text{arom.}}$ His); 6.47 (s, 1H, CH Mtr oder $\text{CH}_{\text{arom.}}$ His); 6.40 (s, 2H, 2x NH Arg);

5.64 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 4.95 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.57 (m, 1H, α -CH His oder α -CH Arg); 4.26 (m, 1H, α -CH His oder α -CH Arg); 3.77 (s, 3H, -OMe); 3.67 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.16 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 3.03 (dd, 2H, β -CH_AH_B His, J = 14.50 Hz, J = 4.80 Hz); 2.85 (dd, 2H, β -CH_AH_B His, J = 14.70 Hz, J = 5.88 Hz); 2.62 (s, 3H, C₆-CH₃-Mtr); 2.55 (s, 3H, C₂-CH₃-Mtr); 2.15 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.88 (s, 3H, C₃-CH₃-Mtr); 1.76-1.24 (m, 4H, β -CH₂ Arg, γ -CH₂ Arg).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ (ppm): 172.01, 171.88, 171.16 (3C, 3x C=O Amid); 158.34, 156.62 (2C, C4-Mtr, C=NH Arg); 142.07 (3C, 3x C_{ipso} Trt); 138.50, 138.30, 136.46, 136.05, 133.79, 133.57 (6C, C2-, C5-His, C1-, C2-, C6-Mtr, -CH₂-CH=CH₂); 129.64, 128.12 (15C, 6x C_{ortho}-Trt, 6x C_{meta}-Trt, 3x C_{para}-Trt); 124.72 (1C, C4-His); 119.89 (1C, C3-Mtr); 115.64 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 111.67 (1C, C5-Mtr); 75.46 (1C, C_{quart.}-Trt); 55.40 (1C, -OMe); 54.15, 53.85 (2C, α -CH Arg, α -CH His); 41.73 (1C, δ -CH₂ Arg); 29.31, 28.79 (2C, β -CH₂ His, β -CH₂ Arg); 25.41 (1C, γ -CH₂ Arg); 22.84 (1C, CH₃ NHAc); 18.86 (1C, C₆-CH₃-Mtr); 18.37 (1C, C₂-CH₃-Mtr); 11.94 (1C, C₃-CH₃-Mtr).

N-Acetyl-L-arginyl-L-histidin-allylamid (67)

(Ac-Arg-His-NHAlI)

Man löst 1.5 g (1.77 mmol) Ac-Arg(Mtr)-His(Trt)-NHAlI **66** in 46 mL eines TFA/TIS/Wasser-Gemisches (40:3:3) und rührt 150 min bei Raumtemp. Dann verdünnt man mit 80 mL Toluol, entfernt alle flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. Man kodestilliert zweimal mit je 80 mL Toluol und verteilt den Rückstand zwischen 100 mL Wasser und 50 mL Diethylether. Man extrahiert dreimal mit je 50 mL Ether und zweimal mit einem Diethylether/Dichlormethan-Gemisch. Abschließend lyophilisiert man die wässrige Phase.

Ausbeute: 627 mg (90 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -9.00^\circ$ (c = 1.00, MeOH); R_t = 7.58 min (Säule D, Gradient: 0 % D nach 7 % D in 15 min).

C₁₇H₂₈N₈O₃ MW: 392.46 EM: 392.2284.

ESI-MS (m/z) = 393.3 ([M+H]⁺), Ber.: 393.2; 415.3 ([M+Na]⁺), Ber.: 415.2.

HR-MS (m/z) = 415.2191 ([M+Na]⁺), Ber.: 415.2182.

300 MHz-¹H-NMR (MeOH-d₄): δ (ppm): 8.81 (s, 1H, CH_{arom.} His); 7.43 (s, 1H, CH_{arom.} His); 5.85 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.15 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.74 (m, 1H, α -CH His oder α -CH Arg); 4.24 (m, 1H, α -CH His oder α -CH Arg); 3.85 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂);

3.35-3.20 (m, 4H, β -CH₂ His, δ -CH₂ Arg (teilweise im Lösemittelsignal)), 2.07 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.78 (s_b, 2H, β -CH₂ Arg); 1.66 (s_b, γ -CH₂ Arg).

75.5 MHz-¹³C-NMR (MeOH-d₄; BB): δ (ppm): 174.72, 174.28, 171.87 (3C, 3x C=O Amid); 158.69 (1C, C=NH Arg); 135.12 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 134.94 (1C, C2 His); 131.36 (1C, C5 His); 118.61 (1C, C4 His); 116.44 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 55.34, 54.06 (2C, α -CH His, α -CH Arg); 42.85, 41.86 (2C, -CH₂-CH=CH₂, δ -CH₂ Arg); 29.52, 27.75 (2C, β -CH₂ Arg, β -CH₂ His); 26.24 (1C, γ -CH₂ Arg); 22.64 (1C, CH₃ NHAc).

***N*-Acetyl-S-[3-(*N*-acetyl-L-arginyl-L-histidinylamido)propyl]-L-cystein-methylester (68)**

Die Synthese erfolgte nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: *N*-Acetyl-L-arginyl-L-histidin-allylamid **67**: 45 mg (0.089 mmol); *N*-Acetyl-L-cystein-methylester: 22 mg (0.124 mmol); ACVA: 5 mg (20 mol%); 4 mL Wasser; 8 h.

Umsatz: ca. 50-60 %; R_t = 21.87 min (Säule D, Gradient: 0 % D nach 7 % D in 15 min und dann 7 % D nach 100 % D in 45 min).

C₂₃H₃₉N₉O₆S MW: 569.68 EM: 569.2744.

ESI-MS (m/z) = 285.67 ([M+2H]²⁺/2), Ber.: 285.64; 570.35 ([M+H]⁺), Ber.: 570.27.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*N*^{im}-trityl-L-histidin-allylamid (65)** (Fmoc-His(Trt)-NHAlI)

Die Aminosäure Fmoc-His(Trt)-OH **64** (4.0 g, 6.46 mmol) wird in 50 mL DMF gelöst. Zu der Lösung gibt man 977 mg (6.46 mmol) HOBt, 2.07 g (6.46 mmol) TBTU und 2.21 mL (1.67 g, 12.92 mmol) DIPEA und lässt 15 min bei Raumtemp. unter Argon rühren. Dann tropft man 369 mg (483 μ L, 6.47 mmol) Allylamin gelöst in 5 mL DMF hinzu und lässt die Reaktionsmischung 4 h bei Raumtemp. und unter Argon rühren. Anschließend entfernt man das DMF i. Hochvak. und nimmt den Rückstand in 350 mL Dichlormethan auf. Man wäscht zweimal mit je 100 mL ges. NaHCO₃-Lsg. sowie einmal mit 100 mL ges. NaCl-Lsg., trocknet über MgSO₄ und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Die chromatographische Reinigung

erfolgt an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:2).

Ausbeute: 3.73 g (88 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -7.17^\circ$ (c = 1.00, DMSO); $R_f = 0.27$ (CH₂Cl₂/MeOH 50:2).

C₄₃H₃₈N₄O₃ MW: 658.79 EM: 658.2944.

ESI-MS (m/z) = 659.4 ([M+H]⁺), Ber.: 659.3; 681.4 ([M+Na]⁺), Ber.: 681.3.

HR-MS (m/z) = 681.2817 ([M+Na]⁺), Ber.: 681.2842.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ(ppm): 8.06 (t, 1H, -NH-CH₂-, J = 5.49 Hz); 7.87 (d, 2H, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.67 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.49 (d, 1H, NH Urethan); 7.42-6.95 (m, 20H, 15x CH_{arom.} Trt, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc, ε-CH His); 6.69 (s, 1H, δ-CH His); 5.70 (m, 1H, -CH₂CH=CH₂); 4.98 (m, 2H, -CH₂CH=CH₂); 4.25 (m, 1H, α-CH His); 4.20-4.00 (m, 3H, H9-, CH₂-Fmoc); 3.65 (s_b, 2H, -CH₂CH=CH₂); 2.87 (dd, 1H, β-CH_AH_B His, J = 14.00 Hz, J = 5.52 Hz); 2.74 (dd, 1H, β-CH_AH_B His, J = 14.70 Hz, J = 5.12 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, DEPT): δ(ppm): 171.13 (1C, C=O Amid); 155.84 (1C, C=O Urethan); 143.93, 143.84 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 142.41 (3C, 3x C_{ipso} Trt); 140.82, 140.79 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 137.70 (1C, C2 His); 137.93 (1C, C5 His); 135.22 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 129.36, 128.19, 128.04, 127.74, 127.16, 125.45, 125.37 (21C, 6x C_{ortho} Trt, 6x C_{meta} Trt, C3-, C6-, C2-, C7-, C1-, C8-Fmoc, 3x C_{para} Trt); 120.20 (2C, C4-, C5-Fmoc); 118.91 (1C, C4 His); 115.00 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 65.81 (1C, CH₂-Fmoc); 54.90 (1C, α-CH His); 46.76 (1C, C9-Fmoc); 40.94 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 31.23 (1C, β-CH₂ His).

N-Acetyl-L-histidin-allylamid (69)

(Ac-His-NHAlI)

Man versetzt 2.10 g (3.19 mmol) Fmoc-His(Trt)-NHAlI **65** mit 60 mL einer Mischung aus DMF und Morpholin (8:2) und rührt 90 min bei Raumtemp. Die flüchtigen Bestandteile werden i. Hochvak. entfernt und man kodestilliert dreimal mit je 100 mL Toluol. Anschließend löst man den Rückstand in 30 mL Acetanhydrid/Pyridin (1:2) bei 0 °C und rührt 3 h bei Raumtemp. unter Argon. Das Acetanhydrid/Pyridin-Gemisch wird dann i. Hochvak. entfernt und man kodestilliert dreimal mit je 90 mL Toluol. Der Rückstand wird in 250 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit je 90 mL 1 M KHSO₄-Lsg. und einmal mit 90 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄

getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Den Rückstand löst man in 60 mL einer TFA/TIS/H₂O-Mischung (38:2.5:1) und rührt 1 h bei Raumtemp. unter Argon. Dann kodestilliert man dreimal mit je 50 mL Toluol. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (5:1) → CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ (5:3:0.01).

Ausbeute: 506 mg (66 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -5.23^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH); $R_f(\text{Acetylierung}) = 0.09$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 70:2:1), $R_f = 0.22$ (CH₂Cl₂/MeOH 5:1), $R_t = 7.23$ min (Säule D, 0 % D nach 7 % D in 15 min).

C₁₁H₁₆N₄O₂ MW: 236.27 EM: 236.1273.

ESI-MS (m/z) = 237.1 ($[M+H]^+$), Ber.: 237.1; 259.1 ($[M+Na]^+$), Ber.: 259.1; 275.0 ($[M+K]^+$), Ber.: 275.1; 300.0 ($[M+Na+MeCN]^+$), Ber.: 300.2; 495.0 ($[2M+Na]^+$), Ber.: 495.3; 511.1 ($[2M+K]^+$), Ber.: 511.3.

HR-MS (m/z) = 259.1153 ($[M+Na]^+$), Ber.: 259.1171.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm): 10.79 (s, 1H, NH His); 8.05 (m, 2H, 2x NH Amid); 7.54 (s, 1H, ϵ -CH His); 6.76 (s, 1H, δ -CH His); 5.72 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 4.98 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.43 (m, 1H, α -CH His); 3.64 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 2.88 (dd, β -CH_AH_B His, $J = 14.70$ Hz, $J = 5.49$ Hz); 2.73 (dd, β -CH_AH_B His, $J = 14.70$ Hz, $J = 5.49$ Hz); 1.81 (s, 3H, NHAc).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB): δ (ppm): 171.15, 169.23 (2C, 2x C=O Amid); 135.23, 134.62, 133.36 (3C, -CH₂-CH=CH₂, C2 His, C5 His); 117.13 (1C, C4 His); 114.86 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 52.98 (1C, α -CH His); 40.86 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 29.75 (1C, β -CH₂ His); 22.74 (1C, CH₃ NHAc).

***N*-Acetyl-S-[3-(*N*-acetyl-*N*^{im}-tosyl-L-histidinylamido)propyl]-L-cystein-methylester (70)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: *N*-Acetyl-L-histidin-allylamid **69**: 45 mg (0.191 mmol); *N*-Acetyl-L-cystein-methylester: 41 mg (0.229 mmol); ACVA: 6 mg (10 mol%), 3.5 mL Wasser; 8 h.

Das Rohprodukt der Radikalreaktion wird in 2 mL einer Chloroform/Methanol-Mischung (2:1) aufgenommen und mit 80 mg (0.420 mmol) Tosylchlorid sowie 114 μ L (86 mg, 0.666 mmol) DIPEA versetzt. Man rührt die Reaktionsmischung 14 h und entfernt im Anschluss die

flüchtigen Bestandteile i. Vakuum. Die Reinigung des öligen Rückstandes erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (50:2).

Ausbeute: 49 mg (45 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5.81^\circ$ ($c = 0.74$, MeOH); $R_f = 0.11$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50:2), $R_t = 9.28$ min (Säule B, 35 % B nach 100 % B in 15 min).

$\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$ MW: 567.67 EM: 567.1821.

ESI-MS (m/z) = 590.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 590.2; 606.3 ($[\text{M}+\text{K}]^+$), Ber.: 606.2.

HR-MS (m/z) = 568.1885 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 568.1900.

300 MHz- ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta(\text{ppm})$: 8.36 (d, 1H, NH Amid, $J = 8.07$ Hz); 8.23 (s, 1H, ϵ -CH His); 7.98 (d, 1H, NH Amid, $J = 8.07$ Hz); 7.94-7.88 (m, 3H, -NH-CH₂-, 2x CH_{arom.} Tos); 7.47 (d, 2H, 2x CH_{arom.} Tos, $J = 8.16$ Hz); 7.31 (s, 1H, δ -CH His); 4.40 (m, 2H, α -CH Cys, α -CH His); 3.62 (s, 3H, CH₃O-); 3.00 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.86-2.57 (m, 4H, β -CH₂ Cys, β -CH₂ His); 2.45-2.31 (m, 5H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, -CH₃ Tos); 1.84 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.71 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.51 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$; BB, DEPT): $\delta(\text{ppm})$: 171.42, 170.79, 169.53, 169.17 (4C, 1x C=O Ester, 1x C=O Amid, 2x C=O NHAc); 146.39 (1C, H₃C-C_{ipso} Tos); 141.06 (1C, -O₂S-C_{ipso} Tos); 136.70 (1C, C2 His); 134.54 (1C, C5 His); 130.66 (2C, C3 Tos, C5 Tos); 127.25 (2C, C2 Tos, C6 Tos); 114.62 (1C, C4 His); 52.14, 51.96 (3C, α -CH Cys, α -CH His, CH₃O-); 37.57 (1C, -NH-CH₂-); 32.73 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 30.81, 28.97, 28.87 (3C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, β -CH₂ His, β -CH₂ Cys); 22.52 (1C, CH₃ NHAc); 22.37 (1C, CH₃ NHAc); 21.23 (1C, CH₃ Tos).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-arginin-allylamid (72)**

(Fmoc-Arg-NHAl)

In 20 mL DMF löst man 1.30 g (2.00 mmol) Fmoc-Arg(Pbf)-NHAl **71** und man versetzt die Lösung mit 303 mg (2.00 mmol) HOBt, 686 μL (4.00 mmol) DIPEA und 644 mg (2.00 mmol) TBTU und rührt 10 min bei Raumtemp. unter Argon. Dann tropft man langsam 150 μL (115 mg, 2.00 mmol) Allylamin gelöst in 1 mL DMF zu und rührt 4 h bei Raumtemp. unter Argon. Danach entfernt man das Lösemittel i. Hochvak. und nimmt den öligen Rückstand in 100 mL Dichlormethan auf und wäscht einmal mit 30 mL Wasser, zweimal mit je 30 mL ges. NaHCO_3 -Lsg. und einmal mit 30 mL 1 M KHSO_4 -Lsg. Man trocknet die

organische Phase über MgSO_4 und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird in einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und Wasser (38:1:1) gelöst und 2 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Anschließend entfernt man das Lösemittel i. Vak. und kodestilliert dreimal mit je 40 mL Toluol. Dann digeriert man den Rückstand fünfmal mit je 20 mL Pentan und je 20 mL Diethylether. Abschließend fällt man das Produkt aus Dichlormethan mit Diethylether aus.

Ausbeute: 700 mg (80 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -4.97^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH); $R_f = 0.25$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc}$ 5:1.3:0.05), $R_t = 18.32$ min (Säule B, Gradient: 15 % D nach 90 % D in 35 min).

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3$ MW: 435.52 EM: 435.2270.

ESI-MS (m/z) = 436.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 436.2.

HR-MS (m/z) = 436.2353 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 436.2348.

300 MHz- ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta(\text{ppm})$: 8.29 (t, 1H, NH Amid, $J = 5.50$ Hz); 7.87 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.72 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.51 (m, 1H, NH Urethan); 7.41 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.31 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 5.76 (m, 1H, - $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$); 5.09 (m, 2H, - $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$); 4.25 (m, 3H, $\alpha\text{-CH Arg}$, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$); 3.98 (m, 1H, H9-Fmoc); 3.39 (m, 2H, - $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$); 3.07 (m, 2H, $\delta\text{-CH}_2 \text{ Arg}$); 1.70-1.35 (m, 4H, $\beta\text{-CH}_2 \text{ Arg}$, $\gamma\text{-CH}_2 \text{ Arg}$).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($\text{MeOH}-d_4$; BB): $\delta(\text{ppm})$: 174.37 (1C, C=O Amid); 158.60 (2C, C=O Urethan, C=NH Arg); 145.32, 145.17 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 142.64 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 135.24 (1C, - $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$); 128.83 (2C, C3-, C6-Fmoc); 128.20 (2C, C2-, C7-Fmoc); 126.19 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.96 (2C, C4-, C5-Fmoc); 116.31 (1C, - $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$); 67.92 (1C, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$); 56.13 (1C, $\alpha\text{-CH Arg}$); 49.00 (1C, C9-Fmoc (im Lösemittelsignal)); 42.70, 41.96 (2C, $\beta\text{-CH}_2 \text{ Arg}$, - $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$); 30.40 (1C, $\delta\text{-CH}_2 \text{ Arg}$); 26.42 (1C, $\gamma\text{-CH}_2 \text{ Arg}$).

***N*-Acetyl-*S*-[3-(*N*-(9*H*-fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-arginylamido)propyl]-*L*-cystein-methylester (73)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode B).

Eingesetzte Mengen: *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-arginin-allylamid **72**: 50 mg (0.091 mmol); *N*-Acetyl-*L*-cystein-methylester: 24 mg (0.137 mmol); VA-044: 8 mg (25 mol%); 4 mL Wasser/MeOH (1:1).

Die Reinigung erfolgt durch präparative RP-HPLC.

Ausbeute: 32 mg (48 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -21.61^\circ$ ($c = 0.67$, MeOH); $R_t = 18.40$ min (Säule B, Gradient: 15 % D nach 90 % D in 35 min), $R_t = 38.5$ -43.5 min (Säule F, Gradient: 15 % D nach 90 % D in 85 min, Fluss: 25 mL, 216 nm).

$C_{30}H_{40}N_6O_6S$ MW: 612.74 EM: 612.2730

ESI-MS (m/z) = 613.5 ($[M+H]^+$), Ber.: 613.3.

HR-MS (m/z) = 613.2825 ($[M+H]^+$), Ber.: 613.2808.

300 MHz- 1H -NMR (DMSO- d_6): δ (ppm): 8.40 (d, 1H, NH Amid, $J = 7.74$ Hz); 7.98 (t, 1H, -CH₂-NH- Amid, $J = 5.30$ Hz); 7.87 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.72 (m, 3H, H1-, H8-Fmoc, NH Urethan oder NH Amid); 7.51 (d, 1H, NH Urethan oder NH Amid, $J = 8.07$ Hz); 7.41 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.31 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 4.42 (m, 1H, α -CH Cys oder α -CH Arg); 4.29-2.0 (m, 3H, CH₂-Fmoc, α -CH Cys oder α -CH Arg); 3.91 (m, 1H, H9-Fmoc); 3.70 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 3.61 (s, 3H, -OMe); 3.12-3.00 (m, 4H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.83 (d, 1H, β -CH_AH_B Cys, $J = 13.59$ Hz, $J = 5.50$ Hz); 2.73 (d, 1H, β -CH_AH_B Cys, $J = 13.59$ Hz, $J = 8.46$ Hz); 1.85 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.65-1.40 (m, 6H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, β -CH₂ Arg, γ -CH₂ Arg).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (MeOH- d_4 ; BB, DEPT): δ (ppm): 174.54 (1C, -COOMe); 173.37, 172.68 (2C, C=O Amid, C=O NHAc); 158.65, 158.48 (2C, C=O Urethan, C=NH Arg); 145.35, 145.17 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 142.65 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 128.84 (2C, C3-, C6-Fmoc); 128.20 (2C, C2-, C7-Fmoc); 126.16 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.99 (2C, C4-, C5-Fmoc); 67.87 (1C, CH₂-Fmoc); 56.17, 53.69 (2C, α -CH Cys, α -CH Arg); 52.92 (1C, -OMe); 48.46 (1C, C9-Fmoc); 41.93 (1C, δ -CH₂ Arg); 39.25 (1C, -NH-CH₂-); 34.26 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 30.28, 30.10 (3C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, β -CH₂ Cys, β -CH₂ Arg); 26.46 (1C, γ -CH₂ Arg); 22.39 (1C, CH₃ NHAc).

N-Acetyl-L-tryptophan-allylamid (75)

(Ac-Trp-NHAlI)

1.00 g (4.06 mmol) Ac-Trp-OH **74**, 615 g (4.06 mmol) HOBt, 1.30 g (4.06 mmol) TBTU und 695 μ L (525 mg, 123 mmol) DIPEA werden in 50 mL DMF gelöst. Zu der Lösung tropft man 304 μ L (232 mg, 4.06 mmol) Allylamin gelöst in 3 mL DMF. Man rührt 2 h bei Raumtemp. unter Argon. Man entfernt das Lösemittel i. Hochvak. und nimmt den gelblichen Rückstand in 150 mL Dichlormethan auf. Die organische Phase wäscht man zweimal mit je 70 mL ges. NaHCO₃-Lsg., einmal mit 70 mL ges. NaCl-Lsg. und trocknet über MgSO₄. Das Lösemittel entfernt man i. Vak. und reinigt den Rückstand chromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:2) → CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ (50:3:0.1).

Ausbeute: 885 mg (76 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +6.72^\circ$ (c = 1.00, MeOH); $R_f = 0.20$ (CH₂Cl₂/MeOH 50:2).

C₁₆H₁₉N₃O₂ MW: 285.34 EM: 285.1477.

ESI-MS (m/z) = 308.3 ([M+Na]⁺), Ber.: 308.2; 324.1 ([M+K]⁺), Ber.: 324.2; 349.2 ([M+Na+MeCN]⁺), Ber.: 349.2; 365.1 ([M+K+MeCN]⁺), Ber.: 365.2.

HR-MS (m/z) = 308.1367 ([M+Na]⁺), Ber.: 308.1375.

Ber.: C 67.35 H 6.71 N 14.73

Gef.: C 67.31 H 6.75 N 14.60

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm): 10.79 (s, 1H, NH Trp); 8.15 (t, 1H, -NH-CH₂-, J = 5.50 Hz); 8.70 (d, 1H, NH Amid, J = 8.07 Hz); 7.59 (d, 1H, CH C4 oder C7 Trp, J = 7.74 Hz); 7.31 (d, 1H, CH C4 oder C7 Trp, J = 8.07 Hz); 7.12 (m, 1H, CH C2 Trp); 7.05 (t, 1H, CH C5 oder C6 Trp, J = 7.32 Hz); 6.96 (t, 1H, CH C5 oder C6 Trp, J = 7.32 Hz); 5.71 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.02 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.51 (m, 1H, α -CH Trp); 3.67 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.07 (dd, 1H, β -CH_AH_B Trp, J = 14.50 Hz, J = 5.30 Hz); 2.90 (dd, 1H, β -CH_AH_B Trp, J = 14.70 Hz, J = 5.50 Hz); 1.77 (s, 3H, CH₃ NHAc).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆; BB): δ (ppm): 171.64, 169.17 (2C, 2x C=O Amid); 136.16 (1C, C8 Trp); 135.25 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 127.43 (1C, C9 Trp); 123.61 (1C, C2 Trp); 120.93 (1C, C4 Trp); 118.61, 118.26 (2C, C5, C6 Trp); 115.04 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 111.36 (1C, C7 Trp); 110.39 (1C, C3 Trp); 53.64 (1C, α -CH Trp); 40.95 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 28.15 (1C, β -CH₂ Trp); 22.70 (1C, CH₃ NHAc).

***N*-Acetyl-S-[3-(*N*-acetyl-L-tryptophanlamido)propyl]-L-cystein-methylester (76)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A und B).

Eingesetzte Mengen (Methode A): *N*-Acetyl-L-tryptophan-allylamid **75**: 50 mg (0.175 mmol); *N*-Acetyl-L-cystein-methylester: 37 mg (0.210 mmol); ACVA: 7 mg (15 mol%); 4 mL Wasser/MeOH (1:1); 8 h.

Eingesetzte Mengen (Methode B): *N*-Acetyl-L-tryptophan-allylamid **75**: 50 mg (0.175 mmol); *N*-Acetyl-L-cystein-methylester: 46 mg (0.263 mmol); VA-044: 14 mg (25 mol%); 4 mL Wasser/MeOH (2:1).

Die Reinigung erfolgt durch präparative RP-HPLC.

Ausbeute: Methode A: 40 mg (49 %), Methode B: 57 mg (71 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -4.60^\circ$ ($c = 0.67$, MeOH); $R_f = 0.39$ (CH₂Cl₂/MeOH 50:4), $R_t = 8.13$ min (Säule B, Gradient: 25 % B nach 60 % B in 15 min); $R_t = 24.49$ -28.65 min (Säule F, isokratisch: 35 % B, 278 nm).

C₂₂H₃₀N₄O₅S MW: 462.56 EM: 462.1937.

ESI-MS (m/z) = 485.6 ($[M+Na]^+$), Ber.: 485.2; 501.5 ($[M+K]^+$), Ber.: 501.2.

HR-MS (m/z) = 485.1823 ($[M+Na]^+$), Ber.: 485.1835.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm): 10.79 (s, 1H, NH Trp); 8.37 (d, 1H, NH Amid, $J = 8.07$ Hz); 8.02 (d, 1H, NH Amid, $J = 8.10$ Hz); 7.96 (t, 1H, -NH-CH₂-, $J = 5.49$ Hz); 7.57 (d, 1H, CH C4 oder C7 Trp, $J = 7.71$ Hz); 7.30 (d, 1H, CH C4 oder C7 Trp, $J = 7.71$ Hz); 7.09 (m, 1H, CH C2 Trp); 7.04 (t, 1H, CH C5 oder C6 Trp, $J = 7.71$ Hz); 6.95 (t, 1H, CH C5 oder C6 Trp, $J = 7.35$ Hz); 4.42 (m, 2H, α -CH Cys, α -CH Trp); 3.62 (s, 3H, CH₃O-); 3.03 (m, 3H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, β -CH_AH_B Trp); 2.91-2.75 (m, 2H, β -CH_AH_B Cys, β -CH_AH_B Trp); 2.71 (dd, 1H, β -CH_AH_B Cys, $J = 13.59$ Hz, $J = 5.49$ Hz); 2.37 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.85 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.77 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.54 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB): δ (ppm): 171.69, 171.42, 169.54, 169.15 (4C, 1x C=O Ester, 1x C=O Amid, 2x C=O NHAc); 136.15 (1C, C8 Trp); 127.41 (1C, C9 Trp); 123.55 (1C, C2 Trp); 120.93 (1C, C4 Trp); 118.58, 118.26 (2C, C5, C6 Trp); 111.34 (1C, C7 Trp); 110.37 (1C, C3 Trp); 52.14, 51.17 (3C, α -CH Cys, α -CH Trp, CH₃O-); 37.63 (1C, -NH-CH₂); 32.72 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 28.96, 29.91, 28.12 (3C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, β -CH₂ Trp, β -CH₂ Cys); 22.68 (1C, CH₃ NHAc); 22.38 (1C, CH₃ NHAc).

***N*-Acetyl-*S*-[3-(*N*-benzyloxycarbonyl-*L*-phenylalanyl-*L*-alanylamido)propyl]-*L*-cystein
(78)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: *N*-Benzyloxycarbonyl-*L*-phenylalanyl-*L*-alanin-allylester **77**: 60 mg (0.146 mmol); *N*-Acetyl-*L*-cystein: 33 mg (0.204 mmol); ACVA: 8 mg (20 mol%); 3.5 mL MeOH/Wasser (4:1); 4 h.

Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:2:0.5).

Ausbeute: 46 mg (55 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -15.58^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH); $R_f = 0.08$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 50:2:0.5), $R_t = 9.40$ min (Säule B, Gradient: 40 % B nach 100 % B in 15 min).

C₂₈H₃₅N₃O₈S MW: 573.66 EM: 573.2145.

ESI-MS (negativ) (m/z) = 572.04 ($[M-H]^-$), Ber.: 572.66.

HR-MS (m/z) = 596.2014 ($[M+Na]^+$), Ber.: 596.2043.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm): 8.51 (d, 1H, NH Amid, $J = 6.99$ Hz); 8.23 (d, 1H, NH Amid, $J = 8.07$ Hz); 7.49 (d, 1H, NH Urethan, $J = 8.82$ Hz); 7.31-7.16 (m, 10H, 5H_{arom.} Phe, 5H_{arom.} Cbz); 4.91 (s, 2H, CH₂-Cbz); 4.40-4.25 (m, 3H, α -CH Cys, α -CH Ala, α -CH Phe); 4.07 (m, 2H, -COO-CH₂-); 3.01-2.52 (m, 6H, β -CH₂ Phe, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.84-1.77 (m, 5H, CH₃ NHAc, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.30 (d, 3H, β -CH₃ Ala, $J = 7.35$ Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, DEPT): δ (ppm): 172.55, 172.31, 171.79, 169.44 (4C, -COOH, C=O Amid, C=O NHAc, C=O Ester); 155.96 (1C, C=O Urethan); 138.24, 137.13 (2C, C_{ipso} Phe, C_{ipso} Cbz); 129.30, 128.37, 128.13, 127.76, 127.53, 126.35 (10C, 5x CH_{arom.} Phe, 5x CH_{arom.} Cbz); 65.28, 63.15 (2C, CH₂-Cbz, -COO-CH₂-); 55.91, 52.14, 47.86 (3C, α -CH Cys, α -CH Ala, α -CH Phe); 37.51 (1C, β -CH₂ Phe); 32.85 (1C, -O-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 28.19, 27.94 (2C, -O-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 22.44 (1C, CH₃ NHAc); 16.96 (1C, β -CH₃ Ala).

N-(5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-glycylglycin-allylamid (82)

In 15 mL dest. Wasser werden 490 mg (3.71 mmol) Glycylglycin zusammen mit 512 mg (3.71 mmol) Kaliumcarbonat gelöst. Zu dieser Lösung tropft man 1.00 g (3.71 mmol) Dansylchlorid (5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfochlorid, DNSCl) gelöst in 10 mL DMF. Die Reaktionsmischung wird 16 h bei Raumtemp. gerührt. Man versetzt mit 60 mL Wasser und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 18 mL DMF aufgenommen, und man gibt nacheinander 561 mg (3.71 mmol) HOBt, 1.27 mL (958 mg, 7.42 mmol) DIPEA und 1.19 g (3.71 mmol) TBTU hinzu. Man rührt 5 min bei Raumtemp. unter Argon und tropft anschließend 300 µL (229 mg, 4.02 mmol) Allylamin gelöst in 2 mL DMF hinzu. Die Reaktionslösung wird 5 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Das Lösemittel wird i. Hochvak. entfernt und der Rückstand in 150 mL Dichlormethan aufgenommen. Man wäscht je einmal mit 40 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und 40 mL ges. NaCl-Lsg. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und das Dichlormethan i. Vak. verdampft. Die Reinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:1) → (50:3).

Ausbeute: 770 mg (51 %); gelber, amorpher Feststoff; R_f = 0.51 (CH₂Cl₂/MeOH 50:5).

C₁₉H₂₄N₄O₄S MW: 404.48 EM: 404.1518.

ESI-MS (m/z) = 427.1 ([M+Na]⁺), Ber.: 427.1; 468.2 ([M+Na+MeCN]⁺), Ber.: 468.2; 831.1 ([2M+Na]⁺), Ber.: 831.3.

FD-MS (m/z) = 404.7 ([M]⁺), Ber.: 404.2.

Ber.:	C 56.42	H 5.98	N 13.85	S 7.93
-------	---------	--------	---------	--------

Gef.:	C 56.40	H 5.99	N 13.86	S 7.97
-------	---------	--------	---------	--------

300 MHz-¹H-NMR (DMSO): δ(ppm): 8.45 (d, 1H, CH_{arom.} Dansyl, J = 8.46 Hz); 8.29 (m, 2H, 1x oder 2x CH_{arom.} Dansyl oder -NH-CH₂-, J = 7.71 Hz); 8.10 (m, 2H, 1x oder 2x CH_{arom.} Dansyl oder -NH-CH₂-); 7.92 (t, 1H, -NH-CH₂-, J = 5.16 Hz); 7.59 (m, 2H, 1x oder 2x CH_{arom.} Dansyl oder 1x oder 2x -NH-CH₂-); 7.24 (d, 1H, CH_{arom.} Dansyl, J = 7.71 Hz); 5.74 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.07 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.69 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.62 (d, 2H, α-CH₂ Gly, J = 5.88 Hz); 3.49 (d, 2H, α-CH₂ Gly, J = 5.88 Hz); 2.81 (s, 6H, -N-(CH₃)₂).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO; BB, DEPT): δ(ppm): 168.35, 168.15 (2C, 2x C=O Amid); 151.45 (1C, C-5 Dansyl); 135.79 (1C, C-1 Dansyl); 135.14 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 129.63 (1C, C-4 Dansyl); 129.17 (2C, C-4a, C-8a Dansyl); 128.37, 128.03 (2C, C-3, C-7 Dansyl);

123.64 (1C, C-2 Dansyl); 119.30 (1C, C-8 Dansyl); 115.27 (1C, C-6 Dansyl); 115.24 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 45.25 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 45.18 (2C, -N-(CH₃)₂); 42.11 (1C, α-CH₂ Gly); 40.86 (1C, α-CH₂ Gly).

***N*-Acetyl-*S*-[3-(*N*-(5-dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-glycylglycylamido)propyl]-*L*-cystein-methylester (82)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode B).

Eingesetzte Mengen: *N*-(5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl)-glycylglycin-allylamid **81**: 45 mg (0.111 mmol); *N*-Acetyl-*L*-cystein-methylester: 28 mg (0.155 mmol); VA-044: 9 mg (25 mol%); MeOH/Wasser (2:1).

Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (50:1) → (50:2).

Ausbeute: 43 mg (67 %); gelber, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -9.50^\circ$ (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.13 (CH₂Cl₂/MeOH 50:2), R_t = 11.19 min (Säule B, Gradient: 10 % B nach 100 % B in 15 min).

C₂₅H₃₅N₅O₇S₂ MW: 581.71 EM: 581.1978.

ESI-MS (m/z) = 582.1 ([M+H]⁺), Ber.: 582.2; 604.2 ([M+Na]⁺), Ber.: 604.2; 620.2 ([M+K]⁺), Ber.: 620.2.

HR-MS (m/z) = 604.1869 ([M+Na]⁺), Ber.: 604.1876.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO): δ(ppm): 8.45 (d, 1H, CH_{arom.} Dansyl, J = 8.46 Hz); 8.37 (d, 1H, NHAc, J = 7.71 Hz); 8.29 (m, 2H, 1x oder 2x CH_{arom.} Dansyl oder -NH-CH₂-); 8.10 (m, 2H, 1x oder 2x CH_{arom.} Dansyl oder -NH-CH₂-); 7.77 (t, 1H, -NH-CH₂-, J = 5.16 Hz); 7.58 (m, 2H, 1x oder 2x CH_{arom.} Dansyl oder 1x oder 2x -NH-CH₂-); 7.24 (d, 1H, CH_{arom.} Dansyl, J = 7.71 Hz); 4.41 (m, 1H, α-CH Cys); 3.61 (s, 3H, CH₃O-); 3.57 (m, 2H, α-CH₂ Gly); 3.48 (sb, 2H, α-CH₂ Gly); 3.09 (m, 2H, NH-CH₂-); 2.88 (m, 1H, β-CH_AH_B); 2.81 (s, 6H, -N-CH₃); 2.88 (dd, 1H, β-CH_AH_B, J = 13.80 Hz, J = 8.25 Hz); 2.48 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂- (im Lösemittelsignal)); 1.84 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.60 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO; BB, DEPT): δ(ppm): 171.40, 169.54, 168.45, 168.14 (4C, 3x C=O Amid, 1x C=O Ester); 151.45 (1C, C-5 Dansyl); 135.71 (1C, C-1 Dansyl); 129.65 (1C, C-4 Dansyl); 129.15 (2C, C-4a, C-8a Dansyl); 128.39, 128.03 (2C, C-3, C-7 Dansyl);

123.63 (1C, C-2 Dansyl); 119.27 (1C, C-8 Dansyl); 115.27 (1C, C-6 Dansyl); 52.14 (2C, α -CH Cys, CH₃O-); 45.24 (1C, α -CH₂ Gly); 45.18 (2C, -N-(CH₃)₂); 42.11 (1C, α -CH₂ Gly); 37.60 (1C, -NH-CH₂-); 32.64 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 29.03, 28.94 (2C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 22.38 (1C, CH₃, NHAc).

Biotin-allylamid (84)

Man löst 500 mg (2.05 mmol) Biotin in 20 mL DMF und gibt 432 mg (2.25 mmol) EDAC, 310 mg (2.05 mmol) HOBt und 226 μ L (207 mg, 2.05 mmol) NMM. Man lässt dann 10 min bei Raumtemp. rühren und gibt dann 129 mg (2.05 mmol) Allylamin dazu. Man rührt die Reaktionsmischung 20 h unter Argon bei Raumtemp. Dann entfernt man alle flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. Man digeriert die Lösung mehrmals mit Dichlormethan, Ethylacetat, Dioxan/Wasser (5:1) und Diethylether.

Ausbeute: 494 mg (85 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +37.28^\circ$ (c = 1.00, DMSO); $R_f = 0.23$ (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc 50:3:0.5), $R_t = 16.75$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 50 % D in 30 min).

C₁₃H₂₁N₃O₂S MW: 283.39 EM: 283.1354.

ESI-MS (m/z) = 306.1 ([M+Na]⁺), Ber.: 306.1; 589.3 ([2M+Na]⁺), Ber.: 589.2.

HR-MS (m/z) = 284.1440 ([M+Na]⁺), Ber.: 284.1432.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm): 7.94 (t, 1H, -NH-CH₂-, J = 5.52 Hz); 6.45 (s, 1H, -CO-NH-CH-CH-); 6.38 (s, 1H, -CO-NH-CH-CH₂-); 5.75 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.06 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.29 (m, 1H, -CO-NH-CH-CH₂-); 4.12 (m, 1H, -CO-NH-CH-CH-); 3.66 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.09 (m, 1H, -CO-NH-CH-CH-); 2.80 (dd, 1H, -CO-NH-CH-CH_AH_B-, J = 5.15 Hz, J = 12.50 Hz); 2.56 (d, 1H, -CO-NH-CH-CH_AH_B-, J = 12.51 Hz); 2.08 (t, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-, J = 7.36 Hz); 1.46 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 1.28 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆; BB): δ (ppm): 174.64 (1C, C=O Amid); 162.88 (1C, -NH-CO-NH-); 135.67 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 114.98 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 61.17 (1C, -CO-NH-CH-CH-); 59.17 (1C, -CO-NH-CH-CH₂-); 55.53 (1C, -CO-NH-CH-CH-); 40.86 (1C, -NH-CH₂-); 35.22 (1C, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 28.34, 28.15 (2C, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 25.41 (1C, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-).

***N*-Acetyl-S-[3-(biotinylamido)propyl]-L-cystein-methylester (85)**

Die Synthese erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur radikalischen Addition (Methode A).

Eingesetzte Mengen: Biotin-allylamid **84**: 40 mg (0.141 mmol); *N*-Acetyl-L-cystein-methylester: 35 mg (0.197 mmol); ACVA: 6 mg (15 mol%); 3 mL Wasser/MeOH (1:1); 8 h.

Die Reinigung erfolgt durch präparative RP-HPLC.

Ausbeute: 20 mg (31 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +22.34^\circ$ ($c = 0.50$, H₂O/MeCN (1:1)); $R_t = 15.35$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 50 % D in 30 min), $R_t = 8.89$ -12.70 min (Säule G, Gradient: 5 % D nach 20 % D in 30 min, Fluss: 10 mL, 205 nm).

C₁₉H₃₂N₄O₅S₂ MW: 460.61 EM: 460.1814.

ESI-MS (m/z) = 483.2 ($[M+Na]^+$), Ber.: 483.2; 943.4 ($[2M+Na]^+$), Ber.: 943.4.

HR-MS (m/z) = 483.1725 ($[M+Na]^+$), Ber.: 483.1712.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆, ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 8.37 (d, 1H, NHAc, $J = 6.63$ Hz); 7.78 (t, 1H, -NH-CH₂-, $J = 5.67$ Hz); 6.41 (s, 1H, -CO-NH-CH-CH-); 6.35 (s, 1H, -CO-NH-CH-CH₂-); 4.42 (m, 1H, α -CH Cys); 4.29 (m, 1H, -CO-NH-CH-CH₂-); 4.11 (m, 1H, -CO-NH-CH-CH-); 3.60 (s, 3H, -OMe); 3.12-3.04 (m, 3H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-, -CO-NH-CH-CH-); 2.87-2.77 (m, 2H, β -CH_AH_B Cys, -CO-NH-CH-CH_AH_B-); 2.72 (dd, 1H, β -CH_AH_B Cys, $J = 8.21$ Hz, $J = 13.70$ Hz); 2.56 (d, 1H, -CO-NH-CH-CH_AH_B-, $J = 12.12$ Hz); 2.46 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 2.03 (t, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-, $J = 7.44$ Hz); 1.84 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.60 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 1.49 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 1.29 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, HMQC): δ (ppm): 171.96, 171.29 (1C, C=O Amid, C=O NHAc); 169.36 (1C, -COOMe); 162.68 (1C, -NH-CO-NH-); 61.01 (1C, -CO-NH-CH-CH-); 59.17 (1C, -CO-NH-CH-CH₂-); 37.39 (1C, -NH-CH₂-); 35.18 (1C, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 32.57 (1C, β -CH₂ Cys); 29.05 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 28.96 (1C, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-S-CH₂-); 28.19 (1C, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 28.00 (1C, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 25.26 (1C, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-); 22.24 (1C, CH₃ NHAc).

5.6 Versuche zu Kapitel 3.3.4

Mono-*N*-allylamido-bernsteinsäure (87)

In 200 mL absol. Dichlormethan werden 20 g (0.133 mmol) Bernsteinsäuremonomethylesterchlorid **89** gelöst. Unter Feuchtigkeitsausschluss werden 7.58 g (0.133 mmol, 9.97 mL) Allylamin und 13.46 g (0.133 mmol, 18.54 mL) Triethylamin gelöst in 50 mL absol. Dichlormethan bei 0 °C zugetropft. Man rührt 3 h bei Raumtemp. unter Argon. Anschließend verdünnt man die Reaktionsmischung mit 150 mL Dichlormethan und wäscht die organische Phase zweimal mit je 100 mL 1 M KHSO₄-Lsg. Man trocknet über MgSO₄ und verdampft das Lösemittel i. Vakuum.

Der Rückstand wird in 70 mL THF gelöst und man gibt 10 mL 1 N LiOH-Lsg. hinzu. Anschließend wird die Reaktionsmischung 2 h bei Raumtemp. gerührt. Man fügt 250 mL Wasser hinzu und schüttelt einmal mit 200 mL Diethylether. Man stellt dann mit KHSO₄ einen pH = 2 ein und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit 150 mL Essigester. Man trocknet über MgSO₄ und verdampft das Dichlormethan i. Vakuum. Die Allylamido-carbonsäure verbleibt als farbloser Feststoff in hoher Reinheit.

Ausbeute: 17.0 g (81 % über 2 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f(\text{Ester}) = 0.42$ (CH₂Cl₂/MeOH 50:3), $R_f(\text{Säure}) = 0.39$ (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 50:5:0.5).

C₇H₁₁NO₃ MW: 157.17 EM: 157.0739.

ESI-MS (negativ) (m/z) = 156.1 ([M-H]⁻), Ber.: 156.2; 313.2 ([2M-H]⁻), Ber.: 350.3.

Ber.: C 53.49 H 7.05 N 8.91

Gef.: C 53.51 H 7.03 N 8.92

300 MHz-¹H-NMR (Aceton-d₆): δ(ppm): 7.34 (s_b, 1H, NH Amid); 5.81 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.20-5.00 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.80 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 2.60 (m, 2H, -CONH-CH₂-CH₂-COOH); 2.50 (m, 2H, -CONH-CH₂-CH₂-COOH).

75.5 MHz-¹³C-NMR (Aceton-d₆; BB): δ(ppm): 174.04, 172.23 (2C, -COOH, C=O Amid); 136.02 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 115.48 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 42.19 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 30.99 (1C, -CONH-CH₂-CH₂-COOH); 29.68 (1C, -CONH-CH₂-CH₂-COOH (im Lösemittelsignal)).

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Festphasensynthese der Peptide und Glycopeptide:

a) Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und Kupplung der Aminosäuren:

Die Peptide und Glycopeptide wurden unter Anwendung eines Perkin-Elmer (Applied Biosystems ABI 433 A) Peptidsynthesizers hergestellt.

Als Harz wird 4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)-butansäure(HMPB)-Benzylhydridamid(BHA)-Polystyrol-Harz beladen mit Fmoc-L-Alanin **86** als Startaminosäure eingesetzt. Das Harz wird in einem mit Papierfiltern verschlossenen Reaktor vorgelegt. Die exakten Mengen sind bei den Daten der einzelnen Verbindungen aufgeführt.

Die Fmoc-Abspaltungen werden in drei bis vier Zyklen von je drei Minuten mit einer 20%igen Lsg. von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) vorgenommen. Nach jeder Abspaltung wird die UV-Absorption der Abspalllösung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm bestimmt. Ändert sich der Wert der gemessenen Absorption um mehr als 10 % im Vergleich zum vorherigen Messwert wird ein weiterer Abspaltzyklus durchgeführt.

Die Kupplungen werden mit je 1 mmol Fmoc-L-Aminosäure, HBTU, HOBt und 10 Äquiv. DIPEA in 4 mL DMF/NMP (1:1) (entspricht vier Äquivalenten bezüglich 0.25 mmol an mit Aminosäure beladenem Harz bzw. zehn Äquivalenten bezüglich 0.1 mmol an mit Aminosäure beladenem Harz) innerhalb von 20 Minuten durchgeführt. Das Entfernen überschüssiger Reagenzien erfolgt durch Waschen mit NMP.

Die Kupplung der Saccharid-Bausteine erfolgt manuell. Dazu werden in einer Kartusche der Saccharid-Baustein, HOAt, HATU und *N*-Methylmorpholin bzw. DIPEA in 2 mL NMP gemischt, drei Minuten geschüttelt und zum Harz in den Reaktor gegeben. Man spült mit 2-4 mL NMP/DMF (1:1) die Kartusche nach. Die Reaktionszeit sowie die eingesetzten Mengen sind bei den einzelnen Verbindungen aufgeführt.

Nach jeder Kupplung wird mit einer Mischung aus Ac_2O (190 μL)/DIPEA (90 μL)/HOBt (8 mg) in 4 mL NMP ein Cappingschritt durchgeführt.

Nach abgeschlossener Synthese wird das Harz im Synthesizer ausgiebig mit NMP und CH_2Cl_2 gewaschen.

b) Abspaltung vom polymeren Träger:^[276]

Man überführt das Harz zur Abspaltung vom polymeren Träger in einen Festphasenreaktor (100 mL-Kolben mit Fritte und Schliffhahn am Boden) und trocknet es i. Hochvak. Dann versetzt man das Harz mit 20 mL einer 1%igen Lsg. von Trifluoressigsäure in CH₂Cl₂ (2.61 mmol TFA) und schüttelt vier Minuten bei Raumtemp. Man saugt ab, versetzt das Harz mit 20 mL CH₂Cl₂ und schüttelt weitere drei Minuten. Das Filtrat fließt in einen Kolben, in dem 2.1 mL einer 10%igen Lösung von Pyridin in MeOH (2.61 mmol Pyridin) vorgelegt sind. Dieser Abspaltvorgang wird insgesamt viermal (0.1 mmol Ansatz) bzw. fünfmal (0.25 mmol Ansatz) durchgeführt. Abschließend wird das Harz mit 20 mL MeOH gewaschen.

Man vereinigt die Peptid enthaltenden Lösungen aus den Abspaltvorgängen (DC-Kontrolle) und verdampft das MeOH/CH₂Cl₂-Gemisch bei 35 °C i. Vakuum. Der verbleibende Rückstand wird in 60 mL Dichlormethan gelöst. Dann wäscht man die organische Phase viermal mit je 20 mL 0.5%iger Essigsäure bzw. 0.1%iger Trifluoressigsäure und zweimal mit je 20 mL Wasser. Anschließend entfernt man das Dichlormethan i. Vak., nimmt in 40 mL Wasser auf (Anlösen in 2 mL MeCN) und lyophilisiert abschließend.

Mono-N-allylamido-succinyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (91)

(AllHN-COCH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr-Ser(α -GalNAc)-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 196 mg (0.10 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Für den Einbau der Glycosylaminosäure wird die automatisierte Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 105 mg (0.160 mmol) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH **22**, 64 mg (0.168 mmol) HATU, 23 mg (0.168 mmol) HOAt, 57 μ L (43 mg, 0.337 mmol) DIPEA in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt und 6 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung werden die überschüssigen Reagenzien abfiltriert, das Harz wird mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen und anschließend mit Capping-Reagenz versetzt. Die Anknüpfung der verbleibenden Aminosäuren sowie des Spacers **87** erfolgt wieder nach dem allgemeinen

Kupplungsprotokoll statt. Nach der Kupplung des Spacers **87** entfällt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on sowie der Acetylierungsschritt. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen löst man das Glycopeptid in 25 mL einer Trifluoressigsäure/Anisol/Wasser-Mischung (25:0.9:0.9) und rührt 2 h bei Raumtemp. Danach verdünnt man mit 20 mL Toluol und entfernt die Lösemittel i. Vakuum. Es wird anschließend dreimal mit je 15 mL Toluol kodestilliert. Man digeriert den zurückbleibenden Rückstand dreimal mit je 10 mL *n*-Pentan und viermal mit je 12 mL Diethylether. Der farblose, amorphe Feststoff wird in 25 mL absol. MeOH aufgenommen und mit einer 1%igen NaOMe-Lsg. in absol. MeOH auf pH = 8.5-9 eingestellt. Man rührt die Reaktionslösung 12 h bei Raumtemp. unter Argon. Dann neutralisiert man mit Trifluoressigsäure (5 % in MeOH) und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Der resultierende Feststoff wird mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 78 mg (43 % über 35 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -83.43^\circ$ ($c = 0.75$, H₂O); $R_t = 14.17$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 50 % D in 30 min), $R_t = 16.46$ -24.04 min (Säule G, Gradient: 5 % D nach 40 % D in 85 min).

C₇₆H₁₂₃N₂₁O₃₁ MW: 1826.91 g/mol EM: 1825.8694

ESI-MS (m/z) = 935.91 ($[M+2Na]^{2+}/2$), Ber.: 935.94; 946.90 ($[M+3Na-H]^{2+}/2$), Ber.: 946.94; 1849.85 ($[M+Na]^+$), Ber.: 1849.87; 1871.83 ($[M+2Na-H]^+$), Ber.: 1871.87.

HR-MS (m/z) = 1826.8761 ($[M+H]^+$), Ber.: 1826.8772; 1827.8779 ($[M+H]^+$), Ber.: 1827.8805; 1828.8833 ($[M+H]^+$), Ber.: 1828.8839.

400 MHz-¹H-NMR (D₂O; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 5.69 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.00 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.73 (d, 1H, H1-Gal, $J = 3.72$ Hz); 4.60 (m, 1H, α -CH Asp); 4.53-4.38 (m, 5H, α -CH Arg, 2x α -CH Ala, α -CH Ser, α -CH Ser_{Tn} (4.40)); 4.28-4.17 (m, 7H, 1x α -CH Ala, 3x α -CH Pro, 3x α -CH Thr); 4.13-4.00 (m, 5H, α -CH Val (4.06), 3x β -CH Thr, H2-Gal (4.03)); 3.90-3.34 (m, 21H, H3-, H4-, H5-, H6a- (3.79), H6b-Gal (3.66), 2x α -CH₂ Gly, 3x δ -CH_AH_B Pro (3.68), 3x δ -CH_AH_B Pro (3.52), β -CH₂ Ser, β -CH_AH_B Ser (3.77), β -CH_AH_B Ser (3.60), CH₂-CH=CH₂ (3.64)); 3.07 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.83 (dd, 1H, β -CH_AH_B Asp, $J = 6.44$ Hz, $J = 17.00$ Hz); 2.74 (dd, 1H, β -CH_AH_B Asp, $J = 6.84$ Hz, $J = 17.00$ Hz); 2.46 (m, 4H, -CH₂-CH₂-); 2.20-2.08 (m, 3H, 3x β -CH_AH_B Pro); 2.01-1.69 (m, 14H, CH₃ NHAc (1.89), β -CH Val (1.98), β -CH_AH_B Arg (1.74), 3x γ -CH₂ Pro (1.89), 3x β -CH_AH_B Pro (1.79)); 1.65-1.49 (m, 3H, β -CH_AH_B Arg (1.63), γ -CH₂ Arg (1.59)); 1.29 (d, 3H, 1x β -CH₃ Ala, $J = 7.10$

Hz); 1.25-1.22 (m, 6H, 2x β -CH₃ Ala); 1.10-1.02 (m, 9H, 3x γ -CH₃ Thr); 0.81 (d, 3H, 1x γ -CH₃ Val, $J = 6.96$ Hz); 0.78 (d, 3H, 1x γ -CH₃ Val, $J = 6.84$ Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (D₂O; BB, HSQC): δ (ppm): 174.45, 174.29, 173.96, 173.94, 173.77, 173.44, 173.07, 172.55, 172.50, 172.30, 171.95, 171.63, 171.55, 171.33, 171.26, 171.18, 171.10, 171.05, 170.30, 163.09, 162.74 (20C, 2x -COOH, 1x C=O GalNHAc, 17x C=O Amid: 3x Thr, 2x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 2x Gly, 3x Pro, 1x Arg, 2x -CH₂-CH₂-CO); 156.64 (1C, C=NH Arg); 133.53 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 115.28 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 97.67 (1C, C1-Gal); 71.20, 68.37, 67.70 (3C, C3-, C4-, C5-Gal); 66.95 (3C, 3x β -CH Thr); 66.71 (1C, C6-Gal); 61.10, 60.76, 60.38 (3C, 2x β -CH₂ Ser, 1x α -CH Pro); 60.26, 60.03 (2C, 2x α -CH Pro); 59.43 (1C, α -CH Val); 58.87 (3C, 3x α -CH Thr); 55.58 (1C, α -CH Ser_{Th}); 53.02, 51.09 (2C, α -CH Arg, α -CH Ser); 50.04 (1C, α -CH Asp); 49.59 (1C, C2-Gal); 48.77 (1C, 1x α -CH Ala); 47.85, 47.73, 47.60 (5C, 2x α -CH Ala, 3x δ -CH₂ Pro); 42.39 (2C, 2x α -CH₂ Gly); 41.42 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 40.47 (1C, δ -CH₂ Arg); 35.06 (1C, β -CH₂ Asp); 30.74, 30.70 (2C, -CH₂-CH₂-); 29.98 (1C, β -CH Val); 29.30, 29.27, 29.16 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 27.44 (1C, β -CH₂ Arg); 24.70, 24.59 (3C, 3x γ -CH₂ Pro); 23.94 (1C, γ -CH₂ Arg); 22.04 (1C, CH₃ NHAc); 18.82, 18.68, 18.65, 18.34, 17.61 (5C, 3x γ -CH₃ Thr, 2x γ -CH₃ Val); 16.11, 15.46, 15.06 (3C, 3x β -CH₃ Ala).

Mono-N-allylamido-succinyl-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-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (93)

(AllHN-COCH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1-3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 196 mg (0.10 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Für den Einbau der Glycosylaminosäure wird die automatisierte Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 120 mg (0.125 mmol) Fmoc-Thr(β -Ac₄Gal-(1-3)- α -GalAc₂NAc)-OH **39**, 17 mg (0.125 mmol) HOAt, 43 μ L (32 mg, 0.250 mmol) DIPEA, 48 mg

(0.125 mmol) HATU in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt und 6 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung werden die überschüssigen Reagenzien abfiltriert und das Harz wird mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen und anschließend mit Capping-Reagenz versetzt. Die Anknüpfung der letzten Aminosäuren sowie des Spacers **87** erfolgt wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll. Nach der Kupplung des Spacers **87** entfällt die Abspaltung Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on sowie der Acetylierungsschritt. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen löst man das Glycopeptid in 20 mL einer Trifluoressigsäure/Anisol/Wasser-Mischung (25:0.9:0.9) und rührt 2 h bei Raumtemp. unter Argon. Danach verdünnt man mit 15 mL Toluol und entfernt die Lösemittel i. Vakuum. Es wird anschließend dreimal mit je 20 mL Toluol kodestilliert. Man digeriert den zurückbleibenden Rückstand dreimal mit je 10 mL *n*-Pentan und viermal mit je 12 mL Diethylether. Der farblose, amorphe Feststoff wird in 25 mL absol. MeOH aufgenommen und mit einer 1%igen NaOMe-Lsg. in absol. MeOH auf pH = 9 eingestellt. Man rührt die Reaktionslösung 13 h bei Raumtemp. unter Argon. Dann neutralisiert man mit Trifluoressigsäure (5 % in MeOH) und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Der resultierende Feststoff wird mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 77 mg (39 % über 35 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -67.88^\circ$ ($c = 0.50$, H₂O); $R_t = 9.83$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 100 % D in 20 min), $R_t = 16.68$ -27.87 min (Säule G, Gradient: 5 % D nach 100 % D in 70 min, 216 nm).

C₈₂H₁₃₃N₂₁O₃₆

MW: 1989.05 g/mol

EM: 1987.9222

ESI-MS (m/z) = 1006.50 ($[M+H+Na]^{2+}/2$), Ber.: 1006.46; 1017.49 ($[M+2Na]^{2+}/2$), Ber.: 1017.45; 1028.48 ($[M+3Na-H]^{2+}/2$), Ber.: 1028.44; 2032.95 ($[M+2Na-H]^+$), Ber.: 2032.89.

HR-MS (m/z) = 1988.9291 ($[M+H]^+$), Ber.: 1988.9300; 1989.9310 ($[M+H]^+$), Ber.: 1989.9334; 1990.9310 ($[M+H]^+$), Ber.: 1990.9367.

400 MHz-¹H-NMR (D₂O; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 5.70 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.01 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.82 (d, 1H, H1-GalNAc, $J = 3.84$ Hz); 4.59 (m, 1H, α -CH Asp); 4.55-4.03 (m, 18H, α -CH Arg (4.53), α -CH Thr_T (4.52), 3x α -CH Ala (4.45, 4.37, 4.22), 2x α -CH Ser (4.41, 4.34), 3x α -CH Pro (4.28), 2x α -CH Thr (4.10, 4.25), α -CH Val (4.19), 2x β -CH Thr (4.11), β -CH Thr_T (4.22), H2-GalNAc (4.07), H1-Gal (4.32)); 3.96-3.90 (m, 2H, H4- oder H5-GalNAc oder -Gal (3.94), H3-GalNAc (3.91)); 3.89-3.82 (4H, 2x α -CH₂ Gly); 3.81-3.59 (m, 14H, H4- oder H5-GalNAc oder -Gal (3.78), H6-Gal, H6-GalNAc, 3x δ -CH_AH_B Pro

(3.70), 2x β -CH₂ Ser, -CH₂-CH=CH₂ (3.66)); 3.58-3.44 (m, 5H, 3x δ -CH_AH_B Pro (3.54), H3-Gal (3.48), H4- oder H5-GalNAc oder -Gal (3.51)); 3.37 (m, 1H, H2-Gal); 3.08 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.80 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.47 (m, 4H, -CH₂-CH₂-); 2.24-2.07 (m, 3H, 3x β -CH_AH_B Pro); 2.01-1.67 (m, 14H, CH₃ NHAc (1.89), β -CH Val (1.97), β -CH_AH_B Arg (1.72), 3x γ -CH₂ Pro (1.93), 3x β -CH_AH_B Pro (1.80)); 1.65-1.48 (m, 3H, β -CH_AH_B Arg (1.64), γ -CH₂ Arg (1.56)); 1.31-1.21 (m, 9H, 3x β -CH₃ Ala); 1.15-1.05 (m, 9H, 3x γ -CH₃ Thr); 0.83 (m, 6H, 2x γ -CH₃ Val).

100.6 MHz-¹³C-NMR (D₂O; BB, HSQC): δ (ppm): 176.74, 175.39, 174.90, 174.47, 174.12, 173.97, 173.85, 173.64, 173.47, 173.09, 172.54, 171.96, 171.57, 171.50, 171.45, 171.36, 171.24, 170.70, 163.16, 162.81 (20C, 2x -COOH, 1x C=O GalNHAc, 17x C=O Amid: 3x Thr, 2x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 2x Gly, 3x Pro, 1x Arg, 2x -CH₂-CH₂-CO-); 156.65 (1C, C=NH Arg); 133.55 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 115.28 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 104.60 (1C, C1-Gal); 99.13 (1C, C1-GalNAc); 77.02, 77.09 (2C, β -CH Thr_T, C3-GalNAc); 74.95 (1C, C4- oder C5-GalNAc oder -Gal); 72.45 (1C, C3-Gal); 70.91 (1C, C4- oder C5-GalNAc oder -Gal); 70.54 (1C, C2-Gal); 68.87 (1C, C2-GalNAc); 68.54 (1C, C4- oder C5-GalNAc oder -Gal); 66.96 (2C, 2x β -CH Thr); 61.38, 61.29, 61.12, 60.98, 60.77, 60.52, 60.05 (7C, 2x β -CH₂ Ser, 3x α -CH Pro, C6-Gal, C6-GalNAc); 59.37, 58.87 (2C, α -CH Val, 1x α -CH Thr); 56.94 (1C, α -CH Thr_T); 55.59, 54.96 (2C, 2x α -CH Ser); 51.09 (1C, α -CH Arg); 50.15 (1C, α -CH Asp); 48.91 (1C, 1x α -CH Ala); 47.86, 47.74, 47.60 (6C, 2x α -CH Ala, 3x δ -CH₂ Pro, 1x α -CH Thr); 42.37 (2C, 2x α -CH₂ Gly); 41.42 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 40.48 (1C, δ -CH₂ Arg); 35.06 (1C, β -CH₂ Asp); 30.76, 30.71 (2C, -CH₂-CH₂-); 30.07 (1C, β -CH Val); 29.31, 29.16 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 27.43 (1C, β -CH₂ Arg); 24.71, 24.61 (3C, 3x γ -CH₂ Pro); 23.95 (1C, γ -CH₂ Arg); 22.27 (1C, CH₃ NHAc); 18.80, 18.68, 18.46, 18.35, 17.85 (5C, 3x γ -CH₃ Thr, 2x γ -CH₃ Val); 16.18, 15.21, 15.06 (3C, 3x β -CH₃ Ala).

Mono-*N*-allylamido-succinyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-O-*tert*-butyl-L-aspartyl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*'-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (95)

(AllHN-COCH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ser(*t*Bu)-Ala-Pro-Asp(*Ot*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-OH)

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 196 mg (0.10 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Für den Einbau der Glycosylaminosäure wird die automatisierte Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 147 mg (0.125 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH **36**, 18 mg (0.131 mmol) HOAt, 50 mg (0.131 mmol) HATU, 45 μ L (34 mg, 0.263 mmol) DIPEA in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt und 6 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung werden die überschüssigen Reagenzien abfiltriert und das Harz wird mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen und anschließend mit Capping-Reagenz versetzt. Die Anknüpfung der verbleibenden Aminosäuren sowie des Spacers **87** erfolgt wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll statt. Nach der Kupplung des Spacers **87** entfällt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on sowie der Acetylierungsschritt. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Ausbeute: 269 mg (89 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_t = 22.13 min (Säule B, Gradient: 50 % D nach 75 % D in 40 min).

C₁₄₀H₂₁₆N₂₂O₄₈S MW: 3007.40 g/mol EM: 3005.4858

ESI-MS (m/z) = 1526.23 ($[M+2Na]^{2+}/2$), Ber.: 1526.23; 3029.44 ($[M+Na]^+$), Ber.: 3029.49.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 8.21 (d, 1H, NH Asp, J = 7.08 Hz); 8.16 (m, 1H, 1x NH Gly); 8.03 (m, 3H, 1x NH Gly, 2x NH Thr); 8.01-7.89 (m, 7H, 2x NH Ser, NH Arg, NH Val, -NH-CH₂-CH=CH₂, 1x NH Ala, NH Thr_{STn}); 7.72 (d, 1H, SialNHAc, J = 9.35 Hz); 7.63 (d, 1H, 1x NH Ala, J = 8.30 Hz); 7.40-7.33 (m, 5H, 5x CH_{arom.}-Bn-Ester); 7.20 (d, 1H, 1x NH Ala, J = 7.73 Hz); 7.14 (d, 1H, GalNHAc, J = 9.01 Hz);

6.37 (s_b, 1H, NH-Arg); 5.75 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.20-5.10 (m, 2H, H3-Gal (5.15), H6-Sial (5.18)); 5.22 (s, 2H, CH₂-Bn-Ester); 5.02-4.97 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.91 (m, 1H, H4-Gal); 4.86 (d, 1H, H1-Gal, J = 3.06 Hz); 4.69 (m, 1H, H4-Sial); 4.61-4.09 (m, 17H, α-CH Asp (4.56), α-CH Val (4.48), α-CH Thr_{STn}, 2x α-CH Ala (4.41, 4.38), 2x α-CH Thr (4.49), 1x α-CH Ser (4.36), 3x α-CH Pro (4.28), 1x α-CH Ser (4.29), 1x α-CH Ala (4.23), α-CH Arg (4.23), H9a-(4.12), H8-Sial (4.19), H2-Gal (4.15), β-CH Thr_{STn} (4.19)); 4.08-3.82 (m, 6H, H5-Gal, H5- (3.84), H7- (4.02), H9b-Sial (3.95), 2x β-CH Thr (3.92)); 3.79-3.63 (m, 7H, 2x α-CH₂ Gly (3.73), H6a-Gal (3.71), -CH₂-CH=CH₂ (3.64)); 3.62-3.27 (m, 10H, 3x δ-CH₂ Pro (3.50), 2x β-CH₂ Ser (3.40)); 3.10-2.95 (m, 3H, H6b-Gal (3.05), δ-CH₂ Arg (3.00)); 2.69 (m, 1H, β-CH_AH_B Asp); 2.57 (m, 2H, CH₂-4-Pmc); 2.52-2.38 (m, 8H, CH₃-5-Pmc (2.46), CH₃-7-Pmc (2.45), β-CH_AH_B Asp (2.42), H3_{aq}-Sial (2.52)); 2.34 (s, 4H, -CH₂-CH₂-); 2.10-1.78 (m, 44H, 3x β-CH_AH_B Pro (1.96), 3x β-CH_AH_B Pro (1.83), 3x γ-CH_AH_B Pro (1.91), 3x γ-CH_AH_B Pro (1.81), β-CH Val (1.96), 6x CH₃ OAc (2.01, 1.92, 1.85), CH₃ NHAc (1.81), CH₃-8-Pmc (2.01), 2x CH₃-2-Pmc); 1.75 (m, 3H, CH₂-3-Pmc, J = 6.80 Hz, β-CH_AH_B Arg); 1.70-1.59 (m, 4H, β-CH_AH_B Arg (1.63), CH₃ NHAc (1.65)); 1.58 (m, 1H, H3_{ax}-Sial); 1.42 (m, 2H, γ-CH₂ Arg); 1.34 (s, 9H, 3x CH₃ tBu-Ester); 1.27 (d, 3H, 1x β-CH₃ Ala, J = 7.23 Hz); 1.25-1.02 (m, 45H, 12x CH₃ tBu-Ether (1.24, 1.10, 1.05), 2x β-CH₃ Ala (1.17), γ-CH₃ Thr_{STn}); 1.00 (d, 3H, 1x γ-CH₃ Thr, J = 6.32 Hz); 0.94 (d, 3H, 1x γ-CH₃ Thr, J = 6.41 Hz); 0.87 (d, 3H, 1x γ-CH₃ Val, J = 6.74 Hz); 0.81 (d, 3H, 1x γ-CH₃ Val, J = 6.58 Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; HSQC): δ(ppm): 135.38 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 115.00 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 98.45 (1C, C1-Gal); 75.68 (1C, β-CH Thr_{STn}); 71.77 (1C, C5-Gal); 68.96 (1C, C4-Sial); 68.65, 66.99, 66.97 (8C, α-CH Thr_{STn}, C4-, C3-Gal, C6-, C7-, C8-Sial, 2x β-CH Thr); 62.80 (1C, C6-Gal); 61.91 (1C, C9-Sial); 61.64 (2C, 2x β-CH₂ Ser); 59.22, 57.16, 57.20 (7C, 3x α-CH Pro, 3x α-CH Ala, α-CH Arg); 53.15, 53.01 (2C, 2x α-CH Ser); 49.61 (1C, α-CH Val); 49.28 (1C, α-CH Asp); 47.55, 47.01, 46.30, 46.14 (7C, 3x δ-CH₂ Pro, C2-Gal, 2x α-CH Thr, C5-Sial); 42.01 (2C, 2x α-CH₂ Gly); 40.77 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 39.97 (1C, δ-CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 37.92 (1C, C3-Sial); 37.00 (1C, β-CH₂ Asp); 32.00 (1C, CH₂-3-Pmc); 30.68 (5C, -CH₂-CH₂-, 2x CH₃-2-Pmc, β-CH Val); 29.58 (3C, 3x β-CH₂ Pro); 28.89 (1C, β-CH₂ Arg); 27.84, 27.51, 26.98, 26.32 (17C, 12x CH₃ tBu-Ether, 3x CH₃ tBu-Ester); 24.72, 24.52 (4C, γ-CH₂ Arg, 3x γ-CH₂ Pro); 22.87, 22.59 (2C, 2x CH₃ NHAc); 20.64, 20.59, 20.54 (7C, CH₂-4-Pmc, 6x CH₃ OAc); 19.10, 19.04 (3C, 3x γ-CH₃ Thr);

18.93, 18.15, 18.04 (3C, 2x γ -CH₃ Val, CH₃-5-Pmc); 17.54 (1C, β -CH₃ Ala); 17.04 (1C, CH₃-7-Pmc); 16.85 (2C, 2x β -CH₃ Ala); 11.86 (1C, CH₃-8-Pmc).

***N*-Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-O-*tert*-butyl-L-aspartyl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*'-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (98)**

(Cbz-Gly-Val-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ser(*t*Bu)-Ala-Pro-Asp(*Ot*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-OH)

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 490 mg (0.10 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Für den Einbau der Glycosylaminosäure wird die automatisierte Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 147 mg (0.125 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH **36**, 18 mg (0.131 mmol) HOAt, 50 mg (0.131 mmol) HATU, 45 μ L (34 mg, 0.263 mmol) DIPEA in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt und 6 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung werden die überschüssigen Reagenzien abfiltriert und das Harz wird mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen und anschließend mit Capping-Reagenz versetzt. Die Anknüpfung der verbleibenden Aminosäuren erfolgt wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll statt. Nach der Kupplung der letzten Aminosäure entfällt die Abspaltung Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on sowie der Acetylierungsschritt. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Ausbeute: 553 mg (74 % über 31 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -41.99^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH); $R_t = 14.54$ min (Säule B, Gradient: 50 % D nach 100 % D in 20 min).

C₁₄₁H₂₁₃N₂₁O₄₈S MW: 3002.38 g/mol EM: 3000.4593

ESI-MS (m/z) = 1512.75 ($[M+H+Na]^{2+}/2$), Ber.: 1512.75; 1523.74 ($[M+2Na]^{2+}/2$), Ber.: 1523.72; 3002.47 ($[M+H]^+$), Ber.: 3002.47; 3024.44 ($[M+Na]^+$), Ber.: 3024.45.

HR-MS (m/z) = 3023.4526 ($[M+Na]^+$), Ber.: 3023.4490; 3024.4470 ($[M+Na]^+$), Ber.: 3024.4524; 3025.4473 ($[M+Na]^+$), Ber.: 3025.4557.

400 MHz- ^1H -NMR (DMSO- d_6 ; ^1H - ^1H -COSY): δ (ppm): 8.21 (d, 1H, NH Asp, $J = 7.60$ Hz); 8.09-7.90 (m, 6H, NH Val, NH Gly, NH Arg, 2x NH Thr, 1x NH Ala); 7.86-7.79 (m, 3H, 2x NH Ser, 1x NH Thr); 7.73 (d, 1H, NH SialNHAc, $J = 9.36$ Hz); 7.64 (d, 1H, 1x NH Ala, $J = 8.20$ Hz); 7.46 (t, 1H, NH Urethan, $J = 6.44$ Hz); 7.37-7.29 (m, 10H, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Bn-Ester, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Cbz); 7.21 (d, 1H, 1x NH Ala, $J = 7.86$ Hz); 7.10 (d, 1H, NH GalNHAc, $J = 9.16$ Hz); 6.40 (sb, 1H, NH-Arg); 5.25-5.18 (m, 3H, CH_2 -Bn-Ester, H3-Gal (5.19)); 5.16 (m, 1H, H4-Gal); 5.09 (m, 1H, H6-Sial); 5.01 (s, 2H, CH_2 -Cbz); 4.93 (m, 1H, α -CH Thr_{STn}); 4.88 (d, 1H, H1-Gal, $J = 2.96$ Hz); 4.70 (m, 1H, H4-Sial); 4.58-4.42 (m, 6H, α -CH Asp (4.53), α -CH Val, α -CH Ala, 2x α -CH Thr (4.60), α -CH Arg (4.45)); 4.37 (m, 1H, α -CH Ser); 4.33-4.12 (m, 9H, 3x α -CH Pro, 2x α -CH Ala (4.21), H9a-Sial (4.14), H2-Gal (4.13), β -CH Thr_{STn} (4.20), α -CH Ser (4.32); 4.06-4.03 (m, 2H, H5-Gal, H8-Sial); 3.98-3.84 (m, 6H, H5- (3.92), H7- (3.85), H9b-Sial (3.97), H3-Gal (3.95), β -CH Thr₁ (3.93), β -CH Thr₂ (3.87)); 3.79-3.65 (m, 5H, 2x α -CH₂ Gly, H6a-Gal (3.71)); 3.63-3.43 (m, 10H, 2x β -CH₂ Ser, 3x δ -CH₂ Pro); 3.10-2.99 (m, 3H, δ -CH₂ Arg, H6b-Gal (3.07)); 2.71 (m, 1H, β -CH_AH_B Asp); 2.60-2.54 (m, 3H, CH_2 -4-Pmc (2.57), H3_{aq.}-Sial (2.52)); 2.52-2.43 (m, 7H, CH_3 -5-Pmc (2.46), CH_3 -7-Pmc (2.45), β -CH_AH_B Asp); 2.07-1.74 (m, 44H, 3x β -CH_AH_B Pro (1.98, 1.76), 3x β -CH_AH_B Pro (1.85, 1.66), 3x γ -CH_AH_B Pro (1.92), 3x γ -CH_AH_B Pro (1.83), β -CH_AH_B Arg (1.95), β -CH Val (1.94), 6x CH_3 OAc, CH_3 NHAc (1.82), CH_3 -8-Pmc (2.01), 2x CH_3 -2-Pmc (1.91, 1.93)); 1.75 (t, 2H, CH_2 -3-Pmc, $J = 6.60$ Hz); 1.66 (m, 5H, β -CH_AH_B Arg, H3_{ax.}-Sial (1.61), CH_3 NHAc); 1.42 (m, 2H, γ -CH₂ Arg); 1.35 (s, 9H, 3x CH_3 *t*Bu-Ester); 1.27 (d, 3H, β -CH₃ Ala, $J = 7.04$ Hz); 1.12-1.06 (m, 45H, 12x CH_3 *t*Bu-Ether, 2x β -CH₃ Ala, γ -CH₃ Thr_{STn} (1.09)); 1.01 (d, 3H, γ -CH₃ Thr₁, $J = 6.24$ Hz); 0.94 (d, 3H, γ -CH₃ Thr₂, $J = 6.24$ Hz); 0.88 (d, 3H, γ -CH₃ Val, $J = 6.64$ Hz); 0.81 (d, 3H, γ -CH₃ Val, $J = 6.64$ Hz).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 ; BB, HSQC, HMBC): δ (ppm): 174.12 (1C, -COOH); 172.49, 172.38, 172.00, 171.87, 171.39, 171.02, 170.94, 170.40, 170.34, 170.23, 170.10, 169.91, 169.82, 169.61, 169.35, 169.27, 167.22 (24C, 1x C=O *t*Bu-Ester, 1x C=O Bn-Ester, 1x C=O GalNHAc, 1x C=O SialNHAc, 6x C=O OAc, 14x C=O Amid: 3x Thr, 2x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 3x Pro, 1x Arg); 157.33, 156.41 (2C, C=NH Arg, C=O Urethan); 152.78 (1C, C8a-Pmc); 137.52 (1C, C_{quart.}-Cbz); 135.47 (1C, C_{quart.}-Bn-Ester); 134.99 (1C, C5-Pmc); 134.54 (1C, C6-Pmc); 129.00, 128.92, 128.88, 128.79, 128.46, 128.30, 128.22, 128.10 (11C, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Bn-Ester, 5x $\text{CH}_{\text{arom.}}$ -Cbz, C7-Pmc); 123.11 (1C, 4a-Pmc); 118.17 (1C, C8-Pmc); 98.85, 98.53 (2C, C1-Gal, C2-Sial); 80.65 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 76.16 (1C, β -CH Thr_{STn}); 74.23, 74.05, 73.89, 73.60, 73.40 (5C, 4x C_{quart.}-*t*Bu-Ether, C2-Pmc); 72.26 (1C, C5-Gal);

69.47 (1C, C6-Sial); 69.16 (1C, C4-Sial); 67.87, 67.81, 67.41, 67.30 (8C, α -CH Thr_{STn}, C4-, C3-Gal, CH₂-Bn-Ester, C7-, C8-Sial, 2x β -CH Thr); 65.85 (1C, CH₂-Cbz); 63.40 (1C, C6-Gal); 62.35, 62.16 (3C, C9-Sial, 2x β -CH₂ Ser); 60.01, 59.63, 59.45, 57.80, 57.38, 56.55, 56.35 (7C, 3x α -CH Pro, 3x α -CH Ala, α -CH Arg); 53.61, 53.44 (2C, 2x α -CH Ser); 50.15 (1C, α -CH Val); 49.69 (1C, α -CH Asp); 48.05 (1C, C5-Sial); 47.26, 47.02, 46.77 (3C, 3x δ -CH₂ Pro); 46.63, 46.58 (3C, C2-Gal, 2x α -CH Thr); 43.83, 42.34 (2C, 2x α -CH₂ Gly); 40.27 (1C, δ -CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 38.02 (1C, C3-Sial); 37.16 (1C, β -CH₂ Asp); 32.60 (1C, CH₂-3-Pmc); 31.61 (3C, 2x CH₃-2-Pmc, β -CH Val); 29.59, 29.30 (4C, 3x β -CH₂ Pro, β -CH₂ Arg); 28.49, 28.43, 28.33, 28.08, 27.62, 27.55, 26.90, 26.87 (15C, 12x CH₃ *t*Bu-Ether, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 25.11, 24.88, 24.81, 24.70 (4C, γ -CH₂ Arg, 3x γ -CH₂ Pro); 23.27, 23.04 (2C, 2x CH₃ NHAc); 21.27, 21.24, 21.12, 21.08, 21.02, 20.94, 20.72 (7C, CH₂-4-Pmc, 6x CH₃ OAc); 19.60, 19.51 (3C, 3x γ -CH₃ Thr); 18.74, 18.64, 18.55 (3C, 2x γ -CH₃ Val, CH₃-5-Pmc); 18.12 (1C, β -CH₃ Ala); 17.56 (1C, CH₃-7-Pmc); 17.30, 17.18 (2C, 2x β -CH₃ Ala); 12.38 (1C, CH₃-8-Pmc).

Glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-O-*tert*-butyl-L-aspartyl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (99)

(H-Gly-Val-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ser(*t*Bu)-Ala-Pro-Asp(O*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-OH)

Eine Lösung von 10.0 mg (0.045 mmol) Pd(OAc)₂, 0.25 mL (1.6 mmol) Triethylsilan und Triethylamin (22 μ L, 0.157 μ mol) in 4 mL absol. Dichlormethan rührt man 10 min unter Argon bei Raumtemp. Diese Suspension gibt man mittels einer Spritze zu der Lösung des Glycopeptids **98** 330 mg (0.110 mmol) in 6 mL Dichlormethan. Man rührt die Reaktionsmischung 3 h unter Argon bei Raumtemp. und verdünnt dann mit 40 mL Dichlormethan. Die organische Phase wird dreimal mit 10 mL ges. NH₄Cl-Lsg. gewaschen und die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wird i. Vak. verdampft.

Man nimmt den Rückstand in MeOH auf, filtriert über eine RP-Kieselgel-Kartusche und wäscht mit 50 mL MeOH nach. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand zweimal mit Toluol kodestilliert und der verbleibende Rückstand in Methanol angelöst und lyophilisiert. Die Verbindung kann ohne weitere Reinigungsoperationen im nächsten Syntheseschritt eingesetzt werden.

Ausbeute: 306 mg (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; $R_t = 18.21$ min (Säule B, Gradient: 50 % D nach 75 % D in 40 min).

$C_{126}H_{201}N_{21}O_{46}S$

MW: 2778.12 g/mol

EM: 2776.3755

ESI-MS (m/z) = 2778.43 ($[M+H]^+$), Ber.: 2778.39; 2800.43 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2800.37.

Mono-*N*-allylamido-succinyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-O-*tert*-butyl-L-aspartyl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-*N'*-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-*tert*-butyl-L-seryl-O-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (100)

(AllHN-COCH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOH-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ser(*t*Bu)-Ala-Pro-Asp(*Ot*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-OH)

Man löst 35 mg (0.222 mmol) Mono-*N*-Allylamidobornsteinsäure **87** in 1.5 mL DMF und gibt nacheinander 30 mg (0.222 mmol) HOBt, 76 μ L (57 mg, 0.74 mmol) DIPEA und 71 mg (0.222 mmol) TBTU hinzu. Man lässt die Reaktionsmischung 15 min unter Argon bei Raumtemp. rühren und tropft diese dann zu der Lösung des Glycopeptids **99** 306 mg (0.110 mmol) in 3 mL DMF. Die Lösung rührt man 7 h bei Raumtemp. unter Argon und entfernt im Anschluss die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. Man nimmt den Rückstand in 40 mL Dichlormethan auf und wäscht die organische Phase zweimal mit je 10 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 1 M KHSO₄-Lsg. Nach dem Entfernen des Lösemittels i. Vak. reinigt man die Verbindung mittels präparative RP-HPLC.

Ausbeute: 224 mg (69 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -41.20^\circ$ ($c = 0.65$, MeOH); $R_t = 18.21$ min (Säule B, Gradient: 50 % D nach 75 % D in 40 min), $R_t = 32.40$ -33.80 min (Säule F, Gradient: 50 % D nach 75 % D in 120 min, 214 nm).

C₁₃₃H₂₁₀N₂₂O₄₈S

MW: 2917.27 g/mol

EM: 2915.4389

HR-MS (m/z) = 1502.6943 ([M+4Na-2H]²⁺/2), Ber.: 1502.6913; 1503.6957([M+4Na-2H]²⁺/2), Ber.: 1503.6946; 1503.1941 ([M+4Na-2H]²⁺/2), Ber.: 1503.1929.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 8.21 (m, 1H, NH Asp); 8.14 (m, 1H, 1x NH Gly); 8.09-8.05 (m, 3H, 1x NH Gly, 2x NH Thr); 8.00-7.90 (m, 7H, 2x NH Ser, NH Arg, NH Val, -NH-CH₂-CH=CH₂, 1x NH Ala, NH Thr_{STn}); 7.76 (m, 1H, SialNHAc); 7.63 (d, 1H, 1x NH Ala, J = 8.20 Hz); 7.21 (m, 1H, 1x NH Ala); 7.15 (d, 1H, GalNHAc, J = 9.56 Hz); 6.39 (s_b, 1H, NH-Arg); 5.75 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.26-5.20 (m, 2H, H3-Gal (5.23), H6-Sial (5.22)); 5.18-4.99 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.95 (m, 1H, H4-Gal); 4.95 (m, 1H, α-CH Thr_{STn}); 4.88 (d, 1H, H1-Gal, J = 3.22 Hz); 4.69 (m, 1H, H4-Sial); 4.59-4.33 (m, 7H, α-CH Asp (4.56), α-CH Val (4.48), 2x α-CH Ala (4.44, 4.39), 2x α-CH Thr (4.54, 4.46), 1x α-CH Ser (4.37)); 4.32-4.10 (m, 11H, 3x α-CH Pro (4.27), 1x α-CH Ser (4.29), 1x α-CH Ala (4.24), α-CH Arg (4.26), H9a-Sial (4.11), H2-Gal (4.16), β-CH Thr_{STn} (4.23), H8-Sial (4.16)); 4.05 (m, 1H, H5-Gal); 3.99-3.80 (m, 5H, H5- (3.85), H7- (3.93), H9b-Sial (3.96), 2x β-CH Thr (3.97-3.84)); 3.79-3.60 (m, 7H, 2x α-CH₂ Gly (3.74), H6a-Gal (3.72), -CH₂-CH=CH₂ (3.66)); 3.61-3.35 (m, 10H, 3x δ-CH_AH_B Pro (3.61), 3x δ-CH_AH_B Pro (3.51), 2x β-CH_AH_B Ser (3.48), 2x β-CH_AH_B Ser (3.41)); 3.18 (m, 1H, H6b-Gal); 3.02 (s_b, 2H, δ-CH₂ Arg); 2.69 (m, 1H, β-CH_AH_B Asp); 2.64 (m, 4H, -CH₂-CH₂-); 2.57 (m, 2H, CH₂-4-Pmc); 2.52-2.40 (m, 8H, CH₃-5-Pmc (2.46), CH₃-7-Pmc (2.45), β-CH_AH_B Asp (2.43), H3_{aq}-Sial (2.43)); 2.10-1.80 (m, 44H, 3x β-CH_AH_B Pro (1.99), 3x β-CH_AH_B Pro (1.84), 3x γ-CH_AH_B Pro (1.92), 3x γ-CH_AH_B Pro (1.82), β-CH_AH_B Arg (1.76), β-CH Val (1.98), 6x CH₃ OAc (2.07, 2.00, 1.92, 1.89, 1.84), CH₃ NHAc (1.82), CH₃-8-Pmc (2.01), 2x CH₃-2-Pmc (1.98)); 1.76 (t, 2H, CH₂-3-Pmc, J = 6.80 Hz); 1.70-1.60 (m, 4H, β-CH_AH_B Arg (1.69), CH₃ NHAc); 1.55 (m, 1H, H3_{ax}-Sial); 1.42 (m, 2H, γ-CH₂ Arg); 1.35 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.27 (d, 3H, 1x β-CH₃ Ala, J = 7.20 Hz); 1.20-1.06 (m, 45H, 12x CH₃ *t*Bu-Ether, 2x β-CH₃ Ala, γ-CH₃ Thr_{STn} (1.14)); 1.01 (d, 3H, γ-CH₃ Thr, J = 6.28 Hz); 0.95 (d, 3H, γ-CH₃ Thr, J = 6.08 Hz); 0.88 (d, 3H, γ-CH₃ Val, J = 6.64 Hz); 0.82 (d, 3H, γ-CH₃ Val, J = 6.64 Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, HSQC, HMBC): δ(ppm): 177.79, 174.12 (2C, 2x -COOH); 174.11, 172.38, 172.35, 171.99, 171.90, 171.61, 171.39, 171.02, 170.90, 170.45, 170.36, 170.23, 170.11, 169.95, 169.81, 169.61, 169.50, 169.42, 169.36, 169.27, 169.05 (26C, 1x C=O *t*Bu-Ester, 1x C=O GalNHAc, 1x C=O SialNHAc, 6x C=O OAc, 17x C=O Amid: 3x Thr, 2x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 2x Gly, 3x Pro, 1x Arg, 2x -CH₂-CH₂-CO-); 158.54 (1C, C=NH Arg); 152.80 (1C, C8a-Pmc); 135.85 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 135.00 (1C, C5-Pmc);

134.55 (1C, C6-Pmc); 128.26 (1C, C7-Pmc); 123.12 (1C, 4a-Pmc); 118.18 (1C, C8-Pmc); 115.43 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 98.92, 98.63 (2C, C1-Gal, C2-Sial); 80.65 (1C, C_{quart.}-tBu-Ester); 76.13 (1C, β-CH Thr_{STn}); 74.23, 74.05, 73.90, 73.59, 73.39 (5C, 4x C_{quart.}-tBu-Ether, C2-Pmc); 71.86 (1C, C5-Gal); 69.72 (1C, C6-Sial); 69.11 (1C, C4-Sial); 68.27, 67.55, 67.41, 67.30 (7C, α-CH Thr_{STn}, C4-, C3-Gal, C7-, C8-Sial, 2x β-CH Thr); 63.20 (1C, C6-Gal); 62.41, 62.17 (3C, C9-Sial, 2x β-CH₂ Ser); 60.00, 59.62, 59.44, 57.80, 57.66, 57.30, 56.59 (7C, 3x α-CH Pro, 3x α-CH Ala, α-CH Arg); 53.61, 53.44 (2C, 2x α-CH Ser); 50.15 (1C, α-CH Val); 49.68 (1C, α-CH Asp); 48.23 (1C, C5-Sial); 47.26, 47.01, 46.79, 46.62 (6C, 3x δ-CH₂ Pro, C2-Gal, 2x α-CH Thr); 42.47, 42.32 (2C, 2x α-CH₂ Gly); 41.28 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 40.30 (1C, δ-CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 38.25 (1C, C3-Sial); 37.15 (1C, β-CH₂ Asp); 32.59 (1C, CH₂-3-Pmc); 31.18, 31.06, 31.01 (3C, 2x CH₃-2-Pmc, β-CH Val); 29.58, 29.32 (4C, 3x β-CH₂ Pro, β-CH₂ Arg); 28.51, 28.49, 28.32, 28.08, 27.81, 27.60, 27.54, 26.90, 26.87 (17C, 12x CH₃ tBu-Ether, 3x CH₃ tBu-Ester, -CH₂-CH₂-); 25.11, 24.87, 24.82, 24.70 (4C, γ-CH₂ Arg, 3x γ-CH₂ Pro); 23.27, 23.01 (2C, 2x CH₃ NHAc); 21.30, 21.24, 21.15, 21.04, 20.97, 20.85 (7C, CH₂-4-Pmc, 6x CH₃ OAc); 19.64, 19.51, 19.47 (3C, 3x γ-CH₃ Thr); 18.87, 18.70, 18.64 (3C, 2x γ-CH₃ Val, CH₃-5-Pmc); 18.10 (1C, β-CH₃ Ala); 17.56 (1C, CH₃-7-Pmc); 17.33, 17.18 (2C, 2x β-CH₃ Ala); 12.38 (1C, CH₃-8-Pmc).

Mono-N-allylamido-succinyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero-α-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (101)

(AllHN-COCH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(α-NeuNAcCOOH-(2-6)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)

Man löst 120 mg (0.041 mmol) des Glycopeptids **100** in 20 mL einer TFA/Thioanisol/Wasser-Mischung (25:0.9:0.9) und rührt 2 h unter Argon bei Raumtemp. Dann verdünnt man mit 15 mL Toluol, entfernt die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 20 mL Toluol. Dann digeriert man je viermal mit je 8 mL Pentan und Diethylether. Der verbleibende Feststoff wird lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 50 mL absol. Methanol gelöst und mit einer 1%igen NaOMe-Lsg. stellt man einen pH-Wert von 9 ein. Die Lösung rührt man 13 h bei Raumtemp. unter Argon. Dann neutralisiert man mit

Trifluoressigsäure (5 % in MeOH) und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Der resultierende Feststoff wird mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 56 mg (64 % über 2 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -49.37^\circ$ ($c = 1.00$, H_2O); $R_t = 11.59$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 40 % D in 20 min), $R_t = 18.32$ -22.82 min (Säule G, Gradient: 5 % D nach 37 % D in 60 min, Fluss: 15 mL, 216 nm).

$C_{87}H_{140}N_{22}O_{39}$

MW: 2118.17 g/mol

EM: 2116.9648

ESI-MS (m/z) = 1071.07 ($[M+Na+H]^{2+}/2$), Ber.: 1070.99; 2119.14 ($[M+H]^+$), Ber.: 2118.97.

HR-MS (m/z) = 2118.9705 ($[M+H]^+$), Ber.: 2118.9760; 2117.9707 ($[M+H]^+$), Ber.: 2117.9726; 2119.9807 ($[M+H]^+$), Ber.: 2119.9793.

400 MHz- 1H -NMR (D_2O ; 1H - 1H -COSY): δ (ppm): 5.69 (m, 1H, $-CH_2-CH=CH_2$); 4.99 (m, 2H, $-CH_2-CH=CH_2$); 4.80 (d, 1H, H1-Gal, $J = 3.72$ Hz); 4.58 (m, 1H, α -CH Asp); 4.53-4.50 (m, 2H, α -CH Thr_{STn}, α -CH Arg); 4.45 (m, 1H, 1x α -CH Ala); 4.39 (m, 1H, 1x α -CH Ser); 4.35-4.31 (m, 2H, 1x α -CH Ser (4.33), 1x α -CH Ala (4.35)); 4.30-4.21 (m, 6H, 3x α -CH Pro (4.26), α -CH Ala (4.24), 1x α -CH Thr (4.28)); 4.20-4.05 (m, 4H, α -CH Val (4.15), 1x α -CH Thr (4.18), 2x β -CH Thr, β -CH Thr_{STn} (4.14)); 3.99-3.89 (m, 2H, H5- (3.95), H2-Gal (3.92)); 3.87-3.76 (m, 6H, 2x α -CH₂ Gly, H6a- (3.82), H4-Gal (3.83)); 3.75-3.67 (m, 10H, 3x δ -CH_AH_B Pro (3.68), H3-Gal (3.71), 1x β -CH₂ Ser, 1x β -CH_AH_B Ser, H5- (3.73), H6- (3.72), H9a-Sial (3.72)); 3.66-3.62 (m, 4H, 1x β -CH_AH_B Ser, $-CH_2-CH=CH_2$, H8-Sial); 3.61-3.39 (m, 6H, 3x δ -CH_AH_B Pro, H6b-Gal (3.52), H4- (3.57), H9b-Sial (3.50)); 3.42 (m, 1H, H7-Sial); 3.07 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.83 (dd, 1H, β -CH_AH_B Asp, $J = 6.34$ Hz, $J = 17.10$ Hz); 2.76 (dd, 1H, β -CH_AH_B Asp, $J = 6.94$ Hz, $J = 17.10$ Hz); 2.54 (dd, 1H, H3_{aq}-Sial, $J = 4.50$ Hz, $J = 12.52$ Hz); 2.46 (s_b, 4H, $-CH_2-CH_2-$); 2.23-2.08 (m, 3H, 3x β -CH_AH_B Pro); 2.01-1.61 (m, 17H, 2x CH₃ NHAc, β -CH Val (1.95), β -CH_AH_B Arg (1.71), 3x γ -CH₂ Pro (1.89), 3x β -CH_AH_B Pro (1.79)); 1.63-1.47 (m, 4H, H3_{ax}-Sial (1.61), β -CH_AH_B Arg (1.61), γ -CH₂ Arg (1.54)); 1.29-1.22 (m, 9H, 3x β -CH₃ Ala); 1.15 (d, 3H, 1x γ -CH₃ Thr, $J = 6.24$ Hz); 1.09-1.04 (m, 6H, 2x γ -CH₃ Thr); 0.83 (d, 3H, 1x γ -CH₃ Val, $J = 5.28$ Hz); 0.80 (d, 3H, 1x γ -CH₃ Val, $J = 5.48$ Hz).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR (D_2O ; BB, HSQC, HMBC): δ (ppm): 176.14, 176.09, 175.39, 174.89, 174.46, 174.02, 173.94, 173.80, 173.64, 173.47, 173.14, 173.08, 172.03, 171.95, 171.63, 171.56, 171.47, 171.33, 171.29, 171.25, 171.18, 170.69 (22C, 3x $-COOH$, 1x C=O GalNHAc, 1x C=O SialNHAc, 17x C=O Amid: 3x Thr, 2x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 2x Gly, 3x Pro, 1x Arg, 2x $-CH_2-CH_2-CO$); 156.64 (1C, C=NH Arg); 133.55 (1C, $-CH_2-CH=CH_2$); 115.28 (1C, $-CH_2-CH=CH_2$); 99.33, 99.17 (2C, C1-Gal, C2-Sial); 77.43 (1C, β -CH Thr_{STn});

72.67 (1C, C8-Sial); 71.16 (1C, C6-Sial); 69.85 (1C, C5-Gal); 68.58 (1C, C4-Gal); 68.24, 68.08 (2C, C3-Gal, C7-Sial); 67.68 (1C, C4-Sial); 67.01, 66.95 (2C, 2x β -CH Thr); 63.93 (1C, C6-Gal); 62.77 (1C, C9-Sial); 61.41, 61.10 (2C, 2x β -CH₂ Ser); 60.76, 60.57, 60.03 (3C, 3x α -CH Pro); 59.39 (1C, α -CH Val); 58.87, 58.85 (2C, 2x α -CH Thr); 56.99 (1C, α -CH Arg); 55.58, 54.91 (2C, 2x α -CH Ser); 51.71 (1C, C5-Sial); 51.08 (1C, α -CH Thr_{STn}); 50.14 (1C, α -CH Asp); 49.50 (1C, C2-Gal); 48.67 (1C, 1x α -CH Ala); 47.85, 47.74, 47.60 (5C, 2x α -CH Ala, 3x δ -CH₂ Pro); 42.38 (2C, 2x α -CH₂ Gly); 41.42 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 40.49 (1C, δ -CH₂ Arg); 39.47 (1C, C3-Sial); 34.85 (1C, β -CH₂ Asp); 30.77, 30.74 (2C, -CH₂-CH₂-); 30.01 (1C, β -CH Val); 29.30, 29.26, 29.16 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 27.43 (1C, β -CH₂ Arg); 24.70, 24.60 (3C, 3x γ -CH₂ Pro); 23.97 (1C, γ -CH₂ Arg); 22.20, 22.00 (2C, 2x CH₃ NHAc); 18.80, 18.69, 18.42 (3C, 3x γ -CH₃ Thr); 17.73 (2C, 2x γ -CH₃ Val); 16.15, 15.11 (3C, 3x β -CH₃ Ala).

5.7 Versuche zu Kapitel 3.4

9-Hydroxy-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester^[409] (104)

(HO(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂COOtBu)

Zu einer Lösung von 57.80 mL (33.97 g, 0.32 mol) Diethylenglycol in 200 mL absol. THF gibt man 100 mg (4.35 mmol) Natrium. Anschließend setzt man 14.60 mL (16.26 g, 0.13 mol) Acrylsäure-*tert*-butylester gelöst in 30 mL absol. THF zu und lässt 36 h bei Raumtemp. unter Argon rühren. Die Lösung wird mit 1 M HCl neutralisiert und das Lösemittel i. Vak. abdestilliert. Der viskose, ölige Rückstand wird in 100 mL ges. NaCl-Lsg. aufgenommen. Die wässrige Phase extrahiert man fünfmal mit je 70 mL Ethylacetat. Das Ethylacetat wird i. Vak. entfernt und das Produkt i. Hochvak. von Lösemittelresten befreit.

Ausbeute: 23.0 g (77 %); farbloses, Öl; $R_f = 0.46$ (Ethylacetat).

C₁₁H₂₂O₅ MW: 234.29 EM: 234.1467.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 3.67-3.59 (m, 10H, 5x -CH₂O-); 2.43 (t, 2H, -CH₂-COOtBu, J = 6.27 Hz); 1.36 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ(ppm): 170.85 (1C, C=O Ester); 80.61 (1C, C_{quart} *t*Bu-Ester); 72.43 (1C, HO-CH₂-CH₂-); 70.43, 70.28, 70.19 (3C, 3x -CH₂O-); 66.76 (1C, -CH₂-CH₂-COOtBu); 61.51 (1C, HO-CH₂-); 36.08 (1C, -CH₂-COOtBu); 28.03 (3C, 3x CH₃ *t*Bu-Ester).

9-Azido-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (106)

(N₃(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂COOtBu)

Man löst 23.66 g (101.0 mmol) HO(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂COOtBu **104** in 137 mL absol. Dichlormethan und versetzt mit 34.19 mL (24.81 g, 254.0 mmol) Triethylamin. Bei 0 °C werden langsam 16.20 mL (23.98 g, 215.0 mmol) Methansulfonylchlorid zugetropft. Nach 4 h wird von ausgefallenem Triethylaminhydrochlorid abfiltriert. Man wäscht den Filterkuchen mit 300 mL CH₂Cl₂ nach. Anschließend wird das Filtrat zweimal mit je 100 mL Eiswasser und 300 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Man trocknet über MgSO₄ und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird in 140 mL DMF gelöst und mit 40.34 g (625.1 mmol) Natriumazid im Überschuss versetzt. Man rührt die Suspension 14 h unter Argon bei 60 °C. Das DMF wird danach i. Hochvak. entfernt und dreimal mit je 200 mL Toluol

kodestilliert. Der Rückstand wird in 200 mL Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wird fünfmal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet. Der nach dem Abdestillieren des Lösemittels verbleibende, gelbe Rückstand (nur die Hälfte!) wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 10.0 cm) im Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (2:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.81 g (52 %); farbloses Öl; $R_f(\text{Mesylat}) = 0.63$ (Ethylacetat), $R_f(\text{Azid}) = 0.24$ (Petrolether/Ethylacetat 2:1).

$\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4$ MW: 259.30 EM: 259.1532.

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$: 3.70-3.57 (m, 8H, 4x $-\text{CH}_2\text{O}-$); 3.34 (t, 2H, N_3-CH_2- , $J = 5.13$ Hz); 2.47 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COOtBu}$, $J = 6.24$ Hz); 1.41 (s, 9H, 3x CH_3 *t*Bu-Ester).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB): $\delta(\text{ppm})$: 170.83 (1C, $\text{C}=\text{O}$ Ester); 80.46 (1C, C_{quart} *t*Bu-Ester); 70.58, 70.38, 69.99 (3C, 3x $-\text{CH}_2\text{O}-$); 66.92 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOtBu}$); 50.66 (1C, N_3-CH_2-); 36.23 (1C, $-\text{CH}_2-\text{COOtBu}$); 28.04 (3C, 3x CH_3 *t*Bu-Ester).

9-Amino-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (107)

$(\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOtBu})$

13.2 g Nickel-Aluminium-Legierung werden in einem 1L-Erlenmeyerkolben in 350 mL dest. Wasser suspendiert. Dann werden ca. 20 g festes NaOH ohne Kühlen so schnell zugegeben, dass die Lösung gerade nicht überschäumt. Wenn bei weiterer NaOH-Zugabe keine Reaktion mehr stattfindet, lässt man 10 Minuten stehen und hält 30 Minuten auf dem Wasserbad bei 70 °C. Anschließend wird die überstehende wässrige Phase dekantiert und der schwammige Rückstand mit dest. Wasser mehrmals gewaschen ($\text{pH} = 8.0$). Man wäscht dann nochmals zweimal mit je 150 mL Isopropanol und spült das Raney-Nickel mit 80 mL Isopropanol in den Reaktionskolben in dem 13.5 g (57.86 mmol) 10-Azido-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester **106** in 80 mL entgastem Isopropanol vorgelegt sind. Man leitet bei Raumtemp. 10 h mittels einer Kanüle Wasserstoff durch die Lösung. Der Katalysator wird über „Hyflo-Supercel[®]“ abfiltriert und zweimal mit je 200 mL Isopropanol nachgewaschen. Man entfernt das Lösemittel i. Vak. und das farblose Öl wird ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 9.86 g (81 %); farbloses Öl.

$C_{11}H_{23}NO_4$

MW: 233.31

EM: 233.1627.

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm): 3.64 (t, 2H, $-CH_2-CH_2-COOtBu$, $J = 6.27$ Hz); 3.53 (s, 4H, 2x $-CH_2O-$); 3.42 (t, 2H, $NH_2-CH_2-CH_2-$, $J = 5.13$ Hz); 2.78 (t, 2H, NH_2-CH_2- , $J = 5.16$ Hz); 2.43 (t, 2H, $-CH_2-COOtBu$, $J = 6.24$ Hz); 1.37 (s, 9H, 3x CH_3 tBu -Ester); 1.21 (s_b , 2H, NH_2).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($CDCl_3$; BB): δ (ppm): 170.80 (1C, $C=O$ Ester); 80.42 (1C, $C_{quart.}$ - tBu -Ester); 73.42 (1C, $NH_2-CH_2-CH_2-$); 70.26, 70.16 (2C, 2x $-CH_2O-$); 66.82 (1C, $-CH_2-CH_2-COOtBu$); 41.75 (1C, NH_2-CH_2-); 36.19 (1C, $-CH_2-COOtBu$); 28.01 (3C, 3x CH_3 tBu -Ester).

(12-(S-Acetyl-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester (109)

1.33 g (9.00 mmol) S-Acetyl-3-mercaptopropionsäure **108** werden in 50 mL DMF gelöst. Man gibt nacheinander 1.38 g (9.00 mmol) HOBt, 3.08 mL (2.33 g, 18.00 mmol) DIPEA und 341 mg (9.00 mmol) HBTU zu und lässt 5 min bei Raumtemp. unter Argon rühren. Dann tropft man 2.00 g (8.57 mmol) $NH_2(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2COOtBu$ **107** gelöst in 15 mL DMF zu und lässt die Reaktionsmischung 1 h unter Argon bei Raumtemp. rühren. Die Lösung wird i. Hochvak. von DMF befreit und das gelbe Öl durch Flash-Chromatographie im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (5:1) $\rightarrow$ (1:3) an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 2.00 g (64 %); hellgelbes Öl; $R_f = 0.22$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2).

$C_{16}H_{29}NO_6S$

MW: 363.47

EM: 363.1716.

Analytische Daten: s. Diplomarbeit S. Wittrock.^[410]

(12-(S-Acetyl-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonansäure (110)

2.00 g (5.50 mmol) (12-(S-Acetyl-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester **109** werden in 40 mL Trifluoressigsäure und 2 mL Wasser gelöst und bei Raumtemp. gerührt. Nach 2 h wird die Reaktionsmischung durch Zufügen von 60 mL Toluol verdünnt und die Lösemittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit je 60 mL Toluol kodestilliert.

Ausbeute: 1.69 g (quant.); leichtgelblicher, wachsartiger Feststoff; $R_f = 0.43$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ 90:10:1:1).

$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{S}$ MW: 307.36 EM: 307.1090.

ESI-MS (m/z) = 308.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 308.1; 330.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 330.1.

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$: 6.58 (sb, 1H, NH Amid); 3.76 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$, $J = 5.88$ Hz); 3.64-3.59 (m, 4H, 2x $-\text{CH}_2\text{O}-$); 3.54 (t, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $J = 4.80$ Hz); 3.45 (m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 3.10 (m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$); 2.61 (t, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ oder $-\text{CH}_2-\text{COOH}$, $J = 5.52$ Hz); 2.54 (t, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ oder $-\text{CH}_2-\text{COOH}$, $J = 6.99$ Hz); 2.32 (s, 3H, CH_3 SAc).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB): $\delta(\text{ppm})$: 197.39 (1C, C=O Thioester); 174.62 (1C, $-\text{COOH}$); 171.52 (1C, C=O Amid); 70.08, 69.81, 69.62 (3C, 3x $-\text{CH}_2\text{O}-$); 66.14 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$); 43.39 (1C, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$); 39.36 (1C, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 35.96 (1C, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$); 30.62 (1C, CH_3 SAc); 25.24 (1C, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$).

[(12-(S-[3-(N-propylamido-(succinyl-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-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin)])-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonanylamido]-BSA (112)

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur radikalischen Biokonjugation:

Zu 100 mg (1.499 μmol) BSA in 7 mL dest. Wasser gibt man 92 mg (0.300 mmol) (12-(S-Acetyl-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonansäure **110**, 58 mg (0.300 mmol) EDAC und 8 mg (0.060 mmol) HOBt. Durch den Zusatz von 5%iger NaHCO_3 -Lsg. erhöht man den pH-Wert auf 6.5. Man rührt 12 h gelinde bei Raumtemp.

Molekulargewicht: 73639 g/mol, 23 Spacer-Moleküle pro BSA-Molekül.

Alternative Reaktionsführung: Man löst 153 mg (0.50 mmol) (12-(S-Acetyl-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonansäure **110** und 58 mg (0.50 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 1.5 mL DMF. Dann gibt man 115 mg (0.600 mmol) EDAC hinzu und lässt 15 min bei Raumtemp. rühren. Die Lösung gibt man dann zu 100 mg (1.499 μmol) BSA in 7 mL dest. Wasser und rührt langsam 6 h.

Molekulargewicht: 80936 g/mol, 46 Spacer-Moleküle pro BSA-Molekül.

Die Protein-Lösung wird dann in einen Cellulose-Dialysierschlauch (Ausschlussgrenze (MWCO) 25000, Durchmesser 10 mm, Volumen 10 mL, Spectra/Por® Float A Lyzer, Fa. Roth) überführt und 10 h gegen 5 L dest. Wasser dialysiert (Wechsel des Wassers alle zwei Stunden, insgesamt 5 Wechsel). Danach wird die Lösung gefriergetrocknet.

30 mg des Lyophilisats werden in 10 mL entgaster 0.075 M Hydroxylamin-Lsg. unter Argon eine Stunde langsam gerührt. Dann dialysiert man 8 h gegen 5 L dest. Wasser (2 Wechsel). Während dieser Dialyse strömt ständig Stickstoff durch die Dialysier-Lösung. Anschließend erfolgt eine Gefriertrocknung. Das Lyophilisat (20 mg, 0.2532 µmol) wird in 5 mL entgastem Wasser gelöst. Dazu gibt man dann 23 mg (11.646 µmol) des Glycopeptids **93** sowie 1 mg (31 mol%) ACVA. Unter Argon bestrahlt man unter Rühren die Reaktionslösung mittels der Quecksilberniederdrucklampe 8 h lang. Danach wird die Lösung 48 h gegen 5 L dest. Wasser dialysiert (Wechsel des Wassers alle zwei Stunden, insgesamt 10 Wechsel), und abschließend wird lyophilisiert.

Ausbeute: 13.6 mg, leichtgelbliches Lyophilisat.

Bestimmung der Beladungsdichte des Neoglycoproteins **112**.^[286]

Erstellung der Kalibriergerade:

49.34 mg Galactose werden in 100 mL dest. Wasser gelöst. Zur Herstellung der Stammlösung werden 10 mL dieser Lösung mit dest. Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Die Stammlösung wird dann wie folgt verdünnt:

0 mL Stammlösung auf 10 mL	Konzentration pro 2 mL: 0 µg	Extinktion: 0.025
1 mL Stammlösung auf 10 mL	Konzentration pro 2 mL: 9.87 µg	Extinktion: 0.079
2 mL Stammlösung auf 10 mL	Konzentration pro 2 mL: 19.74 µg	Extinktion: 0.147
3 mL Stammlösung auf 10 mL	Konzentration pro 2 mL: 29.60 µg	Extinktion: 0.220
4 mL Stammlösung auf 10 mL	Konzentration pro 2 mL: 39.47 µg	Extinktion: 0.307
5 mL Stammlösung auf 10 mL	Konzentration pro 2 mL: 49.34 µg	Extinktion: 0.405
6 mL Stammlösung auf 10 mL	Konzentration pro 2 mL: 59.21 µg	Extinktion: 0.469

Je 2 mL dieser Kalibrierlösung werden mit 50 µL einer 80%igen Lösung von Phenol in Wasser versetzt und intensiv durchmischt. Zu dieser Lösung werden bei 0 °C 5 mL konz. Schwefelsäure mittels einer Vollpipette gegeben (Starke Erwärmung!). Nach 10 min werden die bereits gelblich verfärbten Lösungen gründlich geschüttelt und weitere 30 min stehengelassen. Anschließend wird die Extinktion der Lösungen bei einer Wellenlänge von

$\lambda = 490 \text{ nm}$ in einer 1 cm-Quarzküvette gegen eine Referenzprobe (2 mL dest. Wasser) gemessen.

Zur Ermittlung des Kohlenhydratgehaltes werden 1.49 mg des Neoglycoproteins **112** in 2 mL dest. Wasser gelöst und die Absorption gemäß der obigen Vorschrift gegen eine Blindprobe (2.01 mg modifiziertes Protein **111**, 2 mL dest. Wasser, 5 mL konz. Schwefelsäure und 50 μL Phenol-Lsg.) bestimmt. Durch lineare Regression ergibt sich folgende Eichgerade: $y = 7.7592 \cdot 10^{-3}x + 6.2911 \cdot 10^{-3}$; $R^2 = 0.994$; y ist die Extinktion und x die Konzentration in $\mu\text{g}/2\text{mL}$.

Messwert für Neoglycoprotein **112**: 1.49 mg pro 2 mL Extinktion: 0.246

Daraus ergibt sich eine Beladung von 0.1715 μmol Glycopeptid **93** pro 1.49 mg modifiziertes BSA **111**. Dies entspricht einer mittleren Beladung von 9 Molekülen des Glycopeptids **93** pro Molekül BSA.

[(12-(S-[3-(N-propylamido-(succinyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin))]-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonanylamido]-BSA (113)

Die Synthese erfolgte analog zur Herstellung des Neoglycoproteins **112**.

Eingesetzte Mengen: Deacetyliertes BSA: 20 mg (0.2532 μmol); Glycopeptid **91**: 21.3 mg (11.646 μmol); ACVA: 1 mg (31 mol%); 5 mL Wasser.

Ausbeute: 9 mg, leichtgelbliches Lyophilisat.

[(12-(S-[3-(N-propylamido-(succinyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-6-O-[(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin))]-3-mercaptopropionyl)amido)-4,7-dioxa-nonanylamido]-BSA (114)

Die Synthese erfolgte analog zur Herstellung des Neoglycoproteins **112**.

Eingesetzte Mengen: Deacetyliertes BSA: 20 mg (0.2532 μmol); Glycopeptid **101**: 24.7 mg (11.646 μmol); ACVA: 1 mg (31 mol%); 5 mL Wasser.

Ausbeute: 14 mg, leichtgelbliches Lyophilisat.

5.8 Versuche zu Kapitel 3.5.1

N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*O*-allyl-L-serin^[306] (116)

(Boc-Ser(All)-OH)

Es werden 15.0 g (73.1 mmol) Boc-Ser-OH **115** in 30 mL absol. DMF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wird langsam eine Lösung von 6.43 g (160.8 mmol) Natriumhydrid (60%ige Dispersion in Mineralöl) in 300 mL absol. DMF gegeben. Anschließend werden 6.2 mL Allylbromid (8.84 g, 73.1 mmol) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Man entfernt das DMF i. Hochvak. und kodestilliert viermal mit je 150 mL mit Toluol. Der Rückstand wird in 300 mL Wasser aufgenommen und die wässrige Phase dreimal mit je 300 mL Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wird gefriergetrocknet. Die Verbindung wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktionsstufe eingesetzt.

Zur Analyse werden 300 mg des Lyophilisats in Wasser aufgenommen und mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt. Man extrahiert zweimal mit je 40 mL CH_2Cl_2 . Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 17.9 g (quant.); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +21.62^\circ$ ($c = 0.89$, CHCl_3);

$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ MW: 245.27 EM: 245.1263.

ESI-MS (m/z) = 268.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 268.1; 290.3 ($[\text{M}+2\text{Na}]^+$), Ber.: 290.1.

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm): 5.75-5.90 (m, 1H, -O-CH₂-CH=CH₂); 5.41 (d, 1H, NH Urethan, $J = 8.43$ Hz); 5.10-5.30 (m, 2H, -O-CH₂-CH=CH₂); 4.41-4.44 (m, 1H, α -CH Ser); 3.98 (d, 2H, -O-CH₂-CH=CH₂, $J = 5.51$ Hz); 3.61-3.89 (m, 2H, β -CH₂ Ser); 1.42 (s, 9H 3x CH₃ Boc).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB): δ (ppm): 175.30 (1C, -COOH); 155.73 (1C, C=O Urethan); 133.85 (1C, -O-CH₂-CH=CH₂); 117.70 (1C, -O-CH₂-CH=CH₂); 80.30 (1C, C_{quart.}-Boc); 72.34 (1C, -O-CH₂-CH=CH₂); 69.57 (1C, β -CH₂ Ser); 53.77 (1C, α -CH Ser); 28.26 (3C, 3x CH₃ Boc).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-allyl-L-serin (117)**

(Fmoc-Ser(OAll)-OH)

N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*O*-allyl-L-serin **116** (17.0 g, 69.3 mmol) werden in 60 mL TFA und 1 mL Wasser gelöst und 95 min bei Raumtemp. gerührt. Die Trifluoressigsäure wird i. Vak. entfernt, und man kodestilliert viermal mit je 200 mL Toluol. Der Rückstand wird in 250 mL Aceton/Wasser (1:1) aufgenommen und nacheinander mit 12.26 g (146.0 mmol) NaHCO₃ und 23.6 g (70.0 mmol) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) versetzt. Man rührt 65 h bei Raumtemp. Die Reaktionsmischung wird mit 1 N HCl auf pH 2 eingestellt und zweimal mit je 300 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird je einmal mit 200 mL Wasser und mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Man trocknet über MgSO₄ und entfernt das Dichlormethan i. Vakuum. Der gelbliche Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH (50:4:0.5) gereinigt.

Ausbeute: 20.2 g, (79 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +21.54^\circ$ (c = 1.00, MeOH); $R_f = 0.11$ (CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH 50:4:0.5).

C₂₁H₂₁NO₅ MW: 367.40 EM: 367.1420.

ESI-MS (m/z) = 390.1 ([M+Na]⁺), Ber.: 390.1; 757.3 ([2M+Na]⁺), Ber.: 757.3; 1124.6 ([3M+Na]⁺), Ber.: 1124.4.

Ber.: C 68.65 H 5.76 N 3.81

Gef.: C 68.60 H 5.66 N 3.91

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm): 12.80 (s_b, 1H, COOH); 7.88 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.74 Hz); 7.80-7.55 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.10-7.50 (m, 5H, H2-, H3-, H6-, H7- Fmoc, NH Urethan); 5.79-5.91 (m, 1H, -O-CH₂-CH=CH₂); 5.12-5.28 (m, 2H, -O-CH₂-CH=CH₂); 4.15-4.35 (m, 3H, CH₂-Fmoc, α-CH Ser); 3.94 (m, 1H, H9-Fmoc); 3.55-3.75 (m, 4H, -O-CH₂-CH=CH₂, β-CH₂ Ser).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB): δ (ppm): 171.79 (1C, -COOH); 156.16 (Urethan C=O); 143.93 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 140.81 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 135.00 (1C, -O-CH₂-CH=CH₂); 127.75 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.18 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.43 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.20 (2C, C4-, C5-Fmoc); 116.81 (1C, -O-CH₂-CH=CH₂); 71.22 (1C, -O-CH₂-CH=CH₂); 69.14 (1C, CH₂-Fmoc); 65.88 (1C, β-CH₂ Ser); 54.34 (1C, α-CH Ser); 46.73 (1C, C9-Fmoc).

***N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-glycin-*O*-allylester (119)**

(Boc-Gly-OAll)

Man löst 12.00 g (68.50 mmol) Boc-Gly-OH **118** in 100 mL Methanol und gibt 11.16 g (34.25 mmol) Cäsiumcarbonat hinzu. Man lässt 15 min bei Raumtemp. rühren und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Das viskose Öl wird in 100 mL DMF gelöst, und man tropft 18.96 mL (13.26 g, 109.61 mmol) Allylbromid hinzu. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei Raumtemp. gerührt. Man entfernt das DMF i. Hochvak. und kodestilliert viermal mit je 100 mL Toluol. Anschließend nimmt man den Rückstand in 300 mL Dichlormethan auf und wäscht die organische Phase viermal mit je 100 mL Wasser sowie zweimal mit je 90 mL ges. NaCl-Lsg. Man trocknet über MgSO₄ und entfernt das Lösemittel i. Vakuum. Das Produkt kann in der nächsten Reaktionsstufe ohne weitere Reinigung eingesetzt werden.

Ausbeute: 13.75 g (93 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.43$ (CH₂Cl₂/MeOH 50:0.5).

C₁₀H₁₇NO₄ MW: 215.25 EM: 215.1158.

ESI-MS (m/z) = 238.0 ([M+Na]⁺), Ber.: 238.1; 254.0 ([M+K]⁺), Ber.: 254.2; 453.2 ([2M+Na]⁺), Ber.: 453.3.

Ber.: C 55.80 H 7.96 N 6.51

Gef.: C 55.77 H 7.96 N 6.58

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm): 5.85 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.25 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 5.06 (s, 1H, NH Urethan); 4.59 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.89 (d, 2H, α -CH₂ Gly, $J = 4.24$ Hz); 1.40 (s, 9H, 3x CH₃ Boc).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ (ppm): 170.04 (1C, C=O Ester); 155.69 (1C, C=O Urethan); 131.55 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 118.76 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 79.91 (1C, C_{quart.}-Boc); 65.77 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 42.39 (1C, α -CH₂ Gly); 28.24 (3C, 3x CH₃ Boc).

2-(*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl))-amino-4-pentensäure^[316] (120)

(Boc-(*R,S*)-AllGly-OH)

Zu einer Lösung von 5.70 mL (4.79 g, 33.90 mmol) Isopropylcyclohexylamin in 98 mL absol. THF werden bei 0 °C 18 mL (28.8 mmol) 1.6 M *n*-Butyllithium-Lösung in Hexan gegeben. Nach 10 min kühlt man die Lösung auf -78 °C ab und tropft 3.00 g (13.94 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-glycin-*O*-allylester **119** gelöst in 15 mL absol. THF innerhalb von drei Minuten zu. Man rührt 15 min unter Argon, gibt 3.75 mL (3.22 g, 29.65 mmol) Trimethylsilylchlorid hinzu und rührt weitere 10 min. Dann lässt man innerhalb von 20 min auf Raumtemp. kommen. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei 65 °C gerührt und anschließend mit 75 mL MeOH versetzt und 15 min gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 250 mL Diethylether verdünnt und viermal mit je 90 mL 0.3 N NaOH extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal mit 100 mL Diethylether gewaschen, anschließend mit 1 M KHSO₄-Lsg. auf pH = 3 eingestellt und mit NaCl gesättigt. Man extrahiert dreimal mit je 100 mL Dichlormethan, einmal mit 100 mL Ethylacetat und trocknet die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄. Das Produkt wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH (50:4:0.5) gereinigt.

Ausbeute: 1.99 g (66 %); farbloser, amorpher Feststoff; *R*_f = 0.16 (CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH 50:4:0.5).

C₁₀H₁₇NO₄ MW: 215.25 EM: 215.1158.

ESI-MS (negativ) (*m/z*) = 214.1 ([*M*-H]⁻), Ber.: 214.1.

Ber.: C 55.80 H 7.96 N 6.51

Gef.: C 55.83 H 7.84 N 6.53

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 6.25 (s, 1H, NH Urethan); 5.69 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.09 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.36 (d, 1H, α-CH, *J* = 5.88 Hz); 2.51 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 1.40 (s, 9H, 3x CH₃ Boc).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, DEPT): δ(ppm): 176.25 (1C, -COOH); 155.48 (1C, C=O Urethan); 132.13 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 119.28 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 80.21 (1C, C_{quart.}-Boc); 52.72 (1C, α-CH); 36.40 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 28.24 (3C, 3x CH₃ Boc).

(S)-N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-(R,S)-allylglycyl-L-alanin (123)

(Fmoc-(R,S)-AllGly-L-Ala-OH)

Man löst 1.23 g (5.71 mmol) *rac*-Boc-AllGly-OH **120** in 20 mL DMF und gibt 872 mg (5.71 mmol) HOBt, 1.84 g (5.71 mmol) TBTU und 691 μ L (560 mg, 11.42 mmol) NMM hinzu. Man rührt 10 min, gibt 560 mg (6.29 mmol) L-Alanin, gelöst in 5 mL Wasser, versetzt mit 381 μ L (308 mg, 11.42 mmol) NMM, hinzu und lässt 9 h rühren. Anschließend entfernt man das Lösemittel i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 80 mL Toluol. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt analog zur Synthese von Fmoc-L-Ser(OAll)-OH **117**. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/AcOH (50:1:0.5).

Ausbeute: 959 mg (41 % über 3 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23}$ (Fmoc-L-AllGly-L-Ala-OH) = -13.98° (c = 1.00, MeOH); R_f = 0.28 (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 50:2:0.5), R_t (Fmoc-L-AllGly-L-Ala-OH) = 70.03 min (Säule B, isokratisch 35 % D, Fluss: 2 mL/min).

C₂₃H₂₄N₂O₅ MW: 408.45 EM: 408.1685.

ESI-MS (m/z) = 409.2 ([M+H]⁺), Ber.: 409.2; 431.3 ([M+Na]⁺), Ber.: 431.2; 447.3 ([M+K]⁺), Ber.: 447.2.

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm): 12.57 (s_b, 1H, -COOH); 8.23 (d, 1H, NH Amid, J = 7.35 Hz); 7.87 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.74 Hz); 7.71 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.48 (d, 1H, NH Urethan, J = 8.46 Hz); 7.41 (t, 2H, H3-, H7-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.31 (t, 2H, H2-, H6-Fmoc, J = 7.35 Hz); 5.75 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.05 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.28-4.06 (m, 5H, H9-, CH₂-Fmoc, α -CH Ala, α -CH AllGly); 2.30 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 1.27 (d, 3H, β -CH₂ Ala, J = 6.00 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, DEPT): δ (ppm): 174.11 (1C, C=O Ester); 171.24 (1C, C=O Amid); 155.93 (1C, C=O Urethan); 143.99, 143.89 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 140.82 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 134.54 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 127.74 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.17 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.45 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.21 (2C, C4-, C5-Fmoc); 117.59 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 65.75 (1C, CH₂-Fmoc); 54.07 (1C, C9-Fmoc); 47.59, 46.75 (2C, α -CH AllGly, α -CH Ala); 36.40 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 17.25 (1C, β -CH₃ Ala).

2-(*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl))-amino-4-pentensäureethylester^[318] (124)(Boc-(*R,S*)-AllGly-OEt)

Man löst 3.50 g (16.27 mmol) (*R,S*)-*N*-Boc-Allylglycin **120** und 2.52 mL (1.83 g, 18.06 mmol) Triethylamin in 45 mL Dichlormethan und gibt bei 0 °C 1.66 mL (1.89 g, 17.41 mmol) Chlorameisensäureethylester hinzu. Die Reaktionslösung wird 5 min bei 0 °C gerührt und mit 196 mg (1.60 mmol) DMAP versetzt. Man rührt 4 h bei 0 °C, lässt auf Raumtemp. erwärmen, rührt weitere 2 h und verdünnt mit 100 mL Dichlormethan. Man wäscht die organische Phase je einmal mit 50 mL ges. NaHCO₃-Lsg., 50 mL 1 M KHSO₄-Lsg. und 50 mL ges. NaCl-Lsg. Die wässrigen Phasen werden mit 20 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Der ölige Rückstand wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 36.0 cm, Durchmesser = 3.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/Cyclohexan/EtOAc (30:30:0.9) gereinigt.

Ausbeute: 2.89 g (73 %); farbloses, zähes Öl; R_f = 0.28 (CH₂Cl₂/Cyclohexan/EtOAc 30:30:1.5).

C₁₂H₂₁NO₄ MW: 243.30 EM: 243.1471.

ESI-MS (m/z) = 266.1 ([M+Na]⁺), Ber.: 266.2.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 5.66 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.08 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 5.01 (m, 1H, NH Urethan); 4.32 (m, 2H, α-CH); 4.15 (m, 2H, -O-CH₂-CH₃); 2.47 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 1.41(s, 9H, 3x CH₃ Boc); 1.25 (t, 3H, -O-CH₂-CH₃, J = 7.17 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, DEPT): δ(ppm): 172.00 (1C, C=O Ester); 155.18 (1C, C=O Urethan); 132.32 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 119.00 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 79.79 (1C, C_{quart}-Boc); 61.27 (1C, -O-CH₂-CH₃); 52.89 (1C, α-CH); 36.82 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 28.27 (3C, 3x CH₃ Boc); 14.19 (1C, -O-CH₂-CH₃).

(*S*)-2-(*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl))-amino-4-pentensäure^[319] (125)(Boc-(*S*)-AllGly-OH)

Der racemische 2-(*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl))-amino-4-pentensäureethylester **124** (5.00 g (20.55 mmol)) wird in 300 mL 0.1 M Na-Phosphatpuffer (pH 8) emulgiert. Zu dieser Emulsion gibt man 70 mg α-Chymotrypsin aus Rinderpankreas (27270 Fluka) gelöst in 20 mL 0.1 M Na-Phosphatpuffer (pH 8). Man rührt bei 37 °C 40 h und reguliert den pH-Wert

mittels 0.5 N Natronlauge. Nicht umgesetzten Ester gewinnt man durch mehrmalige Extraktion der wässrigen Phase mit Ethylacetat (viermal mit je 100 mL) zurück. Die wässrige Phase wird mit 1 M KHSO₄-Lsg. auf pH 3 eingestellt und sechsmal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert. Man trocknet mit MgSO₄ und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktionsstufe eingesetzt.

Ausbeute: 1.64 g (74 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{24} = +10.8^\circ$ ($c = 0.50$, MeOH), $[\alpha]_D^{20}$ (Lit.^{[411]) = $+9.5^\circ$ ($c = 0.50$ in MeOH); $R_f = 0.16$ (CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH 50:4:0.5).}

C₁₀H₁₇NO₄ MW: 215.25 EM: 215.1158.

Ber.: C 55.80 H 7.96 N 6.51

Gef.: C 55.67 H 7.83 N 6.43

NMR-Daten: siehe Verbindung **120**.

(S)-N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-amino-4-pentensäure (126)

(Fmoc-(S)-AllGly-OH)

In 50 mL einer TFA/Wasser-Mischung (5:0.15) werden 2.66 g (0.012 mmol) (S)-2-(*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl))-amino-4-pentensäure **125** gelöst und 90 min bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Man entfernt die Trifluoressigsäure i. Vak., kodestilliert zweimal mit je 60 mL Toluol und lyophilisiert den Rückstand. Das Lyophilisat wird in 30 mL Wasser aufgenommen und mit 2.63 g (0.031 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Dann gibt man 4.81 g (0.0143 mmol) Fmoc-OSu in 60 mL Dioxan hinzu und rührt die Reaktionsmischung 16 h bei Raumtemp. Anschließend stellt man mit 1 M KHSO₄-Lsg. einen pH-Wert von 3 ein, entfernt das Dioxan i. Vak. und extrahiert viermal mit je 60 mL Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel i. Vak. verdampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH (50:0.5:0.5) gereinigt.

Ausbeute: 3.15 g (78 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +14.66^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl₃); $R_f = 0.17$ (CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH 50:0.5:0.5).

C₂₀H₁₉NO₄ MW: 337.37 EM: 337.1314.

ESI-MS (m/z) = 360.1 ($[M+Na]^+$), Ber.: 360.1; 697.3 ($[2M+Na]^+$), Ber.: 697.3.

Ber.: C 71.20 H 5.68 N 4.15

Gef.: C 71.04 H 5.62 N 4.20

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ(ppm): 9.81 (s_b, 1H, -COOH); 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.41-7.24 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, J = 7.35 Hz); 7.32-7.27 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, J = 7.35 Hz); 5.71 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.31 (d, 1H, NH Urethan, J = 8.10 Hz); 5.15 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.53-4.39 (m, 3H, CH₂-Fmoc, α-CH); 4.21 (t, 1H, H9-Fmoc, J = 6.99 Hz); 2.60 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ(ppm): 176.49 (1C, -COOH); 155.93 (1C, C=O Urethan); 143.77, 143.65 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.31 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 131.73 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 127.74 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.07 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.06 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.00, 119.79 (3C, C4-, C5-Fmoc, -CH₂-CH=CH₂); 67.21 (1C, CH₂-Fmoc); 53.08 (1C, α-CH); 47.09 (1C, C9-Fmoc); 36.34 (1C, -CH₂-CH=CH₂).

5.9 Versuche zu Kapitel 3.5.3

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-allyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*'-(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-*O*-allyl-L-seryl-L-prolyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (131)**

(Ac-Val-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(O*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Mtr)-Pro-Ala-Ser(All)-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-OH)

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 490 mg (0.25 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet acidolytisch nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Ausbeute: 511 mg (90 %); farbloser, amorpher Feststoff; [α]_D²⁵ = -43.64° (c = 0.98, MeOH); R_t = 7.69 min (Säule B, Gradient: 65 % D nach 100 % D in 13 min).

C₁₀₇H₁₇₈N₂₀O₃₁S MW: 2272.74 EM: 2271.2688

MALDI-MS (m/z) = 2274.2 ([M+H]⁺), Ber.: 2274.3; 2296.1 ([M+Na]⁺), Ber.: 2296.3; 2312.3 ([M+K]⁺), Ber.: 2312.2; 2318.0 ([M+2Na-H]⁺), Ber.: 2318.3.

HR-MS (m/z) = 2294.2566 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2294.2585; 2295.2576 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2295.2619; 2296.2646 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2296.2652.

400 MHz- 1H -NMR (DMSO- d_6 ; 1H - 1H -COSY): δ (ppm): 8.23 (d, 1H, NH Asp, J = 7.44 Hz); 8.12 (d, 1H, NH Ala, J = 7.04 Hz); 8.05-7.79 (m, 8H, NH Arg, NH Ser₁ (8.00), NH Ser₂ und ₃ (7.84), NH Ala, 2x NH Thr, NH Gly); 7.67-7.58 (m, 3H, NH Val, NH Ser₄ (7.56), NH Thr); 7.18 (d, 1H, NH Ala, J = 7.84 Hz); 6.66 (s, 1H, CH_{arom.}); 6.38 (s_b, 1H, NH-Arg); 5.87-5.75 (m, 2H, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 5.24, 5.19 (m, je 1H, 2x -O-CH₂-CH=CH_AH_B); 5.12, 5.09 (m, je 1H, 2x -O-CH₂-CH=CH_AH_B); 4.69 (m, 1H, α -CH Ser₁); 4.59-4.52 (m, 2H, α -CH Asp, α -CH Ala); 4.51-4.42 (m, 2H, α -CH Arg, α -CH Ser₂ (4.45)); 4.41-4.33 (m, 2H, α -CH Ser₃ und α -CH Ser₄); 4.32-4.17 (m, 9H, α -CH Val (4.26), 3x α -CH Thr, 2x α -CH Ala (4.22, 4.18), 3x α -CH Pro); 3.98-3.84 (m, 7H, 3x β -CH Thr, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 3.76 (s, 3H, -OMe); 3.71 (d, 2H, α -CH₂ Gly, J = 4.68 Hz); 3.66-3.56 (m, 4H, 3x δ -CH_AH_B Pro, 1x β -CH_AH_B Ser₁ (3.60)); 3.57-3.46 (m, 7H, 3x δ -CH_AH_B Pro, 1x β -CH_AH_B Ser₁ (3.49) 3x β -CH_AH_B Ser_{2,3,4} (3.49)); 3.45-3.38 (m, 3H, 3x β -CH_AH_B Ser_{2,3,4} (3.43)); 3.00 (s_b, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.69 (dd, 1H, β -CH_AH_B Asp, J = 6.68 Hz, J = 16.40 Hz); 2.58 (s, 3H, C₆-CH₃-Mtr); 2.50 (s, 3H, C₂-CH₃-Mtr (im Lösemittelsignal)); 2.42 (dd, 1H, β -CH_AH_B Asp, J = 6.64 Hz, J = 16.44 Hz); 2.02-1.93 (m, 7H, β -CH Val (1.97), 3x β -CH_AH_B-Pro, C₃-CH₃-Mtr); 1.92-1.71 (m, 13H, 3x β -CH_AH_B Pro, 3x γ -CH₂ Pro, β -CH_AH_B Arg (1.82), CH₃ NHAc (1.89)); 1.63 (s_b, 1H, β -CH_AH_B Arg); 1.42 (m, 2H, γ -CH₂ Arg); 1.35 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.27 (d, 3H, β -CH₃ Ala, J = 7.04 Hz); 1.19-1.04 (m, 61H, 15x CH₃ *t*Bu-Ether, 2x β -CH₃ Ala); 1.03-0.97 (m, 6H, 2x γ -CH₃ Thr); 0.94 (m, 3H, γ -CH₃ Thr); 0.84 (d, 3H, γ -CH₃ Val, J = 7.04 Hz); 0.82 (d, 3H, γ -CH₃ Val, J = 7.04 Hz).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 ; HMQC): δ (ppm): 173.55 (1C, -COOH); 172.04, 171.46, 171.07, 170.95, 169.90, 169.69, 169.40, 169.26, 169.22, 168.97, 168.79, 168.61, 168.40, 168.24 (18C, 1x C=O *t*Bu-Ester, 1x NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 4x Ser, 1x Asp, 1x Val, 3x Ala, 1x Gly, 3x Pro, 1x Arg); 157.33 (1C, C=NH Arg); 156.04 (1C, C₄-Mtr); 137.50 (1C, C₁-Mtr); 135.47 (1C, C₂-Mtr); 134.77, 134.73 (3C, 2x -O-CH₂-CH=CH₂, C₆-Mtr); 123.39 (1C, C₃-Mtr); 116.57, 116.36 (2C, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 111.57 (1C, C₅-Mtr); 80.09 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 73.91, 73.67, 73.52, 73.02, 72.88 (5C, 5x C_{quart.}-*t*Bu-Ether); 71.14, 70.99 (2C, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 69.48, 68.99 (2C, 2x β -CH₂ Ser); 66.83, 66.59 (3C, 3x β -CH Thr); 61.71, 61.60 (2C, 2x β -CH₂ Ser); 59.57 (1C, α -CH Val); 59.25, 58.89, 57.75, 57.25, 57.12, 56.79 (6C, 3x α -CH Pro, 3x α -CH Thr); 55.34 (1C, -OCH₃); 53.10, 52.95, 52.43,

50.44 (4C, 4x α -CH Ser); 49.15 (1C, α -CH Arg); 47.83 (1C, α -CH Asp); 47.49, 46.77, 46.35, 46.11 (6C, 3x α -CH Ala, 3x δ -CH₂ Pro); 41.71 (1C, α -CH₂ Gly); 39.89 (1C, δ -CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 36.60 (1C, β -CH₂ Asp); 30.00, 29.03 (4C, β -CH₂ Arg, 3x β -CH₂ Pro); 27.92, 27.85, 27.77, 27.53, 26.98 (18C, 15x CH₃ *t*Bu-Ether, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 24.60 (1C, γ -CH₂ Arg); 24.16 (3C, 3x γ -CH₂ Pro); 23.54 (1C, β -CH Val); 22.31 (2C, C₆-CH₃-Mtr, CH₃ NHAc); 19.17 (1C, γ -CH₃ Val); 18.94, 18.85, 18.34 (3C, 3x γ -CH₃ Thr); 17.88 (2C, γ -CH₃ Val, C₂-CH₃-Mtr); 17.55, 16.97 (3C, 3x β -CH₃ Ala); 11.63 (1C, C₃-CH₃-Mtr).

***N*²-(*N*-Acetyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl)-[C¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-diyl-L-prolyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (132)**

Das Peptid **131** (50 mg, 0.022 mmol, 3 mM) wird in 7 mL entgastem absol. Dichlormethan gelöst. Dann gibt man 20 mol% (4 mg) Grubbs-Katalysator 1. Generation (Benzyliden-bis(tricyclohexylphosphin)dichlororuthenium) unter Argon hinzu und erwärmt unter Argon 11 h unter Rückfluss. Danach gibt man nochmals diegleiche Menge an Katalysator hinzu und erwärmt weitere 12 h unter Argon und Rückfluss. Anschließend entfernt man das Lösemittel i. Vak. und reinigt die Verbindung mittels präparativer HPLC.

Ausbeute: 26 mg (52 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_t = 17.52 min (Säule A, isokratisch: 60 % D), R_t = 20.80-24.12 min (Säule E, isokratisch: 60 % D, Fluss: 25 mL, 213 nm).

C₁₀₅H₁₇₄N₂₀O₃₁S

MW: 2244.69

EM: 2243.2375

ESI-MS (m/z) = 2245.30 ($[M+H]^+$), Ber.: 2245.25; 2267.28 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2267.23; 2283.28 ($[M+K]^+$), Ber.: 2283.21.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 8.40-8.22, 8.11-7.77, 7.67-7.55 (m, 14H, NH Asp, 3x NH Ala, 1x NH Arg, 4x NH Ser, 3x NH Thr, 1x NH Gly, 1x NH Val); 6.67 (s, 1H, CH_{arom}); 6.42 (sb, 1H, NH-Arg); 5.67 (m, 2H, -O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-); 4.71 (m, 1H, 1x α -CH Ser_{1,2}); 4.65-4.44 (m, 2H, 1x α -CH Ser_{1,2}, 1x α -CH Ala); 4.43-4.31 (m, 4H, 2x α -CH Ser_{3,4} (4.37), α -CH Asp, α -CH Arg); 4.15-4.30 (m, 9H, 3x α -CH Pro (4.29), 2x α -CH Ala, 3x α -CH Thr, α -CH Val); 4.06-3.82 (m, 7H, 2x β -CH Thr, β -CH Thr₁ (3.88),

-O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-); 3.79 (s, 3H, -OMe); 3.71 (d, 2H, α-CH₂ Gly, J = 5.34 Hz); 3.68-3.29 (m, 14H, 3x δ-CH_AH_B Pro (3.61), 3x δ-CH_AH_B Pro (3.51), 2x β-CH_AH_B Ser_{1,2} (3.65), 2x β-CH_AH_B Ser_{1,2} (3.51), 2x β-CH_AH_B-OH Ser_{3,4} (3.55), 2x β-CH_AH_B-OH Ser_{3,4} (3.45)); 3.02 (s_b, 2H, δ-CH₂ Arg); 2.75 (m, 1H, β-CH_AH_B Asp); 2.60 (s, 3H, C₆-CH₃-Mtr); 2.50 (s, 3H, C₂-CH₃-Mtr (im Lösemittelsignal)); 2.59 (m, 1H, β-CH_AH_B Asp); 2.06-1.95 (m, 7H, β-CH Val (2.02), 3x β-CH_AH_B-Pro (2.02), C₃-CH₃-Mtr (2.04)); 1.94-1.71 (m, 12H, 3x β-CH_AH_B Pro (1.90), 3x γ-CH₂ Pro, CH₃-NHAc (1.90)); 1.70 (m, 1H, β-CH_AH_B Arg); 1.53 (m, 1H, β-CH_AH_B Arg); 1.43 (m, 2H, γ-CH₂ Arg); 1.38 (s, 9H, 3x CH₃ tBu-Ester); 1.28 (d, 3H, 1x β-CH₃ Ala, J = 6.95 Hz); 1.19-1.07 (m, 51H, 15x CH₃ tBu-Ether, 2x β-CH₃ Ala (1.16)); 1.02-0.97 (m, 6H, 2x γ-CH₃ Thr); 0.88 (d, 3H, γ-CH₃ Thr₁, J = 6.30 Hz); 0.84 (d, 3H, γ-CH₃ Val, J = 6.65 Hz); 0.82 (d, 3H, γ-CH₃ Val, J = 6.88 Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆; HMQC): δ (ppm): 128.52 (2C, -O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-); 111.65 (1C, C₅-Mtr); 70.33 (2C, -O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-); 69.90, 69.20 (2C, 2x β-CH₂ Ser_{1,2}); 66.64, 66.08, 65.94 (3C, 3x β-CH Thr); 61.50 (2C, 2x β-CH₂ Ser_{3,4}); 59.60 (3C, 3x α-CH Pro); 57.20 (1C, 1x α-CH Ala); 55.38 (1C, -OCH₃); 53.20 (2C, 2x α-CH Ser_{3,4}); 52.80 (1C, α-CH Arg); 50.90 (1C, 1x α-CH Ser_{1,2}); 50.71 (1C, 1x α-CH Ser_{1,2}); 50.30 (1C, α-CH Asp); 47.80, 47.40 (5C, 3x α-CH Thr, 1x α-CH Ala, α-CH Val); 46.61, 46.35, 46.31 (3C, 3x δ-CH₂ Pro); 46.00 (1C, 1x α-CH Ala); 41.93 (1C, α-CH₂ Gly); 40.05 (1C, δ-CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 36.39 (1C, β-CH₂ Asp); 29.72 (1C, β-CH Val); 28.79, 28.62 (3C, 3x β-CH₂ Pro); 28.22 (1C, β-CH₂ Arg); 27.97, 27.85, 27.80, 27.52, 26.91 (18C, 15x CH₃ tBu-Ether, 3x CH₃ tBu-Ester); 24.72 (1C, γ-CH₂ Arg); 24.13 (3C, 3x γ-CH₂ Pro); 22.31, 22.19 (2C, C₆-CH₃-Mtr, CH₃ NHAc); 19.05 (1C, 1x γ-CH₃ Val); 18.57, 18.51, 18.47 (3C, 3x γ-CH₃ Thr); 17.88, 17.86 (2C, 1x γ-CH₃ Val, C₂-CH₃-Mtr); 17.78, 16.74 (3C, 3x β-CH₃ Ala); 11.49 (1C, C₃-CH₃-Mtr).

***N*²-(*N*-Acetyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dieryl-L-prolyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (133)**

Man löst 11.7 mg (0.052 mmol) Pd(OAc)₂ und 59 mg (0.0263 mmol) Cyclopeptid **132** in 6 mL einer THF/Wasser-Mischung (2:1) und gibt 0.3 mL (1.6 mmol) Triethylsilan, Triethylamin (22 µL, 0.157 mmol) sowie 2 Tropfen Propiolsäuremethylester hinzu. Man rührt 24 h unter Argon bei Raumtemp. wobei man nochmals 0.5 mL (1.6 mmol) Triethylsilan verteilt über 5 h zutropft. Man verdünnt mit 40 mL Wasser und lyophilisiert, nimmt anschließend in 9 mL MeOH auf und filtriert über eine RP-Kieselgel-Kartusche. Das Lösemittel wird i. Vak. verdampft, der Rückstand zweimal mit Toluol kodestilliert und der verbleibende Rückstand in Methanol angelöst und nochmals lyophilisiert. Der Rückstand wird zweimal mit Diethylether digeriert und durch präparative RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 36 mg (61 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -33.67^\circ$ ($c = 1.00$, MeOH); $R_t = 15.48$ min (Säule B, Gradient: 50 % D nach 100 % D in 30 min), $R_t = 28.60$ -30.65 min (Säule H, Gradient: 45 % D nach 100 % D in 95 min, Fluss: 25 mL/min, 210 nm).

C₁₀₅H₁₇₆N₂₀O₃₁S

MW: 2246.70

EM: 2245.2531

ESI-MS (m/z) = 1135.12 ($[M+H+Na]^{2+}/2$), Ber.: 1135.13; 1146.11 ($[M+2Na]^{2+}/2$), Ber.: 1146.12; 2247.24 ($[M+H]^+$), Ber.: 2247.26; 2269.20 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2269.25.

HR-MS (m/z) = 2268.2395 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2268.2429; 2269.2366 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2269.2462; 2270.2485 ($[M+Na]^+$), Ber.: 2270.2496.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 8.42-8.26 (m, 2H, NH Asp, 1x NH Ser); 8.06-7.89 (m, 5H, 1x NH Ala; 3x NH Thr, NH Gly); 7.88-7.73 (m, 3H, NH Arg, NH Val, 1x NH Ser); 7.71-7.49 (m, 2H, 2x NH Ser); 7.09-6.99 (m, 2H, 2x NH Ala); 6.67 (s, 1H, CH_{arom}); 6.43 (s_b, 1H, NH-Arg); 4.68 (m, 1H, 1x α -CH Ser); 4.62-4.44 (m, 3H, α -CH Asp (4.51), 1x α -CH Ser, 1x α -CH Ala); 4.45-4.33 (m, 2H, 2x α -CH Ser); 4.32-4.15 (m, 10H, 3x α -CH Pro, α -CH Arg, 2x α -CH Ala, α -CH Val (4.22), 3x α -CH Thr (4.23)); 3.98-3.88 (m, 3H, 3x β -CH Thr); 3.77 (s, 3H, -O-CH₃); 3.71 (m, 2H, α -CH₂ Gly); 3.68-3.22 (m, 18H, 3x δ -CH₂ Pro (3.54), 2x β -CH_AH_B Ser_{tBu} (3.50), 2x β -CH_AH_B Ser_{tBu} (3.42), 2x β -CH₂ Ser, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O- (3.54-3.26)); 3.02 (s_b, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.75 (m, 1H, β -CH_AH_B Asp); 2.57 (s, 3H, C₆-CH₃-Mtr); 2.49 (s, 3H, C₂-CH₃-Mtr (im Lösemittelsignal)); 2.46 (m, 1H, β -CH_AH_B Asp); 1.92-1.71 (m, 20H, β -CH Val (1.99), C₃-CH₃-Mtr (2.03), 3x β -CH_AH_B-Pro (2.00),

3x β -CH_AH_B Pro (1.87), 3x γ -CH₂ Pro (1.91), β -CH_AH_B Arg (1.69), CH₃ NHAc (1.90)); 1.44 (m, 1H, β -CH_AH_B Arg); 1.44 (m, 2H, γ -CH₂ Arg); 1.35 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.27 (d, 3H, β -CH₃ Ala, *J* = 7.00 Hz); 1.19-1.04 (m, 55H, 15x CH₃ *t*Bu-Ether, 2x β -CH₃ Ala (1.13, 1.15), -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O- (1.32-1.14)); 1.07-0.94 (m, 9H, 3x γ -CH₃ Thr); 0.86 (d, 3H, 1x γ -CH₃ Val, *J* = 7.92 Hz); 0.82 (d, 3H, 1x γ -CH₃ Val, *J* = 7.49 Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, HMQC): δ (ppm): 174.10 (1C, -COOH); 172.19, 171.58, 169.97, 169.93, 169.85, 169.82, 169.35, 169.26, 169.24, 169.04, 168.49, 168.48 (18 C, 1x C=O *t*Bu-Ester, 1x C=O NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 4x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 3x Pro, 1x Arg); 156.54, 156.51 (2C, C=NH Arg, C₄-Mtr); 138.07 (1C, C₁-Mtr); 136.12 (1C, C₂-Mtr); 134.92 (1C, C₆-Mtr); 123.96 (1C, C₃-Mtr); 112.14 (1C, C₅-Mtr); 80.63 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 74.80, 74.46, 74.22, 73.57, 73.34 (5C, 5x C_{quart.}-*t*Bu-Ether); 70.97, 70.71 (4C, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, 2x β -CH₂ Ser); 67.38, 67.15 (3C, 3x β -CH Thr); 62.15 (2C, 2x β -CH₂ Ser_{*t*Bu}); 60.14 (3C, 3x α -CH Pro); 58.32, 57.80, 57.64 (6C, 3x α -CH Thr, 2x α -CH Ala, α -CH Arg); 55.90 (1C, -OCH₃); 53.47 (4C, 4x α -CH Ser); 48.02, 47.20, 46.96 (6C, α -CH Asp, α -CH Val, 3x δ -CH₂ Pro, 1x α -CH Ala); 42.29 (1C, α -CH₂ Gly); 40.30 (1C, δ -CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 36.99 (1C, β -CH₂ Asp); 30.55 (1C, β -CH Val); 29.58 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 28.95, 28.46, 28.38, 28.30, 28.08, 27.52 (20C, 15x CH₃ *t*Bu-Ether, 3x CH₃ *t*Bu-Ester, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 26.50 (1C, β -CH₂ Arg); 26.22 (1C, γ -CH₂ Arg); 24.76 (3C, 3x γ -CH₂ Pro); 24.06 (1C, C₆-CH₃-Mtr); 22.84 (1C, CH₃ NHAc); 19.71 (1C, 1x γ -CH₃ Val); 19.46, 18.88, 18.86 (3C, 3x γ -CH₃ Thr); 18.40, 18.07 (2C, 1x γ -CH₃ Val, C₂-CH₃-Mtr); 17.45, 17.36 (3C, 3x β -CH₃ Ala); 12.16 (1C, C₃-CH₃-Mtr).

***N*²-(*N*-Acetyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (134)**

Man löst 36 mg (0.016 mmol) des Cyclopeptids **133** in 15 mL einer TFA/Thioanisol/Wasser-Mischung (25:0.9:0.9) und rührt 2 h unter Argon bei Raumtemp. Dann verdünnt man mit 15 mL Toluol, entfernt die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 20 mL Toluol. Dann digeriert man je dreimal mit je 8 mL Pentan und Diethylether und reinigt den Rückstand mittels präparativer RP-HPLC.

Ausbeute: 13 mg (48 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = -98.55^\circ$ ($c = 0.50$, $H_2O/MeOH$ (1:1)); $R_t = 6.60$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 50 % D in 15 min); $R_t = 15.60$ -17.60 min (Säule G, Gradient: 5 % D nach 50 % D in 37 min, Fluss: 15 mL, 214 nm).

$C_{71}H_{116}N_{20}O_{28}$

MW: 1697.80

EM: 1696.8268

ESI-MS (m/z) = 860.39 ($[M+H+Na]^{2+}/2$), Ber.: 860.41; 1697.81 ($[M+H]^+$), Ber.: 1697.84.

HR-MS (m/z) = 1697.8347 ($[M+H]^+$), Ber.: 1697.8346; 1698.8369 ($[M+H]^+$), Ber.: 1698.8380; 1699.8469 ($[M+H]^+$), Ber.: 1699.8413.

400 MHz- 1H -NMR (D_2O ; 1H - 1H -COSY): δ (ppm): 4.67 (m, 1H, 1x α -CH Ser₁ (im Lösemittelsignal)); 4.59-4.35 (m, 7H, α -CH Asp (4.52), 2x α -CH Ser_{3u,4} (4.39), 1x α -CH Ser₂, 1x α -CH Ala (4.50), α -CH Val (4.43), α -CH Arg (4.36)); 4.33-4.20 (m, 7H, 3x α -CH Thr, 3x α -CH Pro, 1x α -CH Ala (4.23)); 4.19-4.02 (m, 4H, 3x β -CH Thr (4.16), 1x α -CH Ala (4.13)); 3.87 (m, 2H, α -CH₂ Gly); 3.86-3.50 (m, 14H, 3x δ -CH₂ Pro (3.75-3.50), 1x β -CH_AH_B Ser (3.70), 1x β -CH_AH_B Ser (3.59), 1x β -CH₂ Ser₁ (3.65) 2x β -CH₂ Ser_{3u,4} (3.72)); 3.49-3.30 (m, 4H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 3.08 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.88 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.18 (m, 3H, 3x β -CH_AH_B-Pro); 2.03-1.70 (m, 13H, β -CH Val (1.96), 3x β -CH_AH_B Pro (1.81), 3x γ -CH₂ Pro (2.24), CH₃ NHAc (1.93)); 1.56 (m, 2H, β -CH₂ Arg); 1.50-1.37 (m, 6H, γ -CH₂ Arg (1.49), -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O- (1.42)); 1.30 (d, 3H, β -CH₃ Ala, $J = 7.40$ Hz); 1.27 (d, 3H, β -CH₃ Ala, $J = 7.04$ Hz); 1.24 (d, 3H, β -CH₃ Ala, $J = 7.24$ Hz); 1.11-1.07 (m, 9H, 3x γ -CH₃ Thr); 0.83 (d, 6H, 2x γ -CH₃ Val, $J = 6.84$ Hz).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR (D_2O ; BB, HSQC): δ (ppm): 176.17, 174.50, 174.48, 174.34, 174.29, 174.19, 173.67, 173.42, 172.06, 171.97, 171.63, 171.57, 171.51, 171.44, 171.33, 171.27 (19 C, 2x -COOH, 1x C=O NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 4x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 3x Pro, 1x Arg); 156.62 (1C, C=NH Arg); 71.16, 71.04 (2C, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 69.30, 69.18 (2C, 2x β -CH₂ Ser_{1u,2}); 67.03, 66.96 (3C, 3x β -CH Thr); 61.10, 60.96 (5C, 3x α -CH Thr, 2x β -CH₂ Ser_{3u,4}); 59.72 (1C, 1x α -CH Ala); 59.01, 58.90, 58.75 (3C, 3x α -CH Pro); 55.57, 55.15 (2C, 2x α -CH Ser_{3u,4}); 53.35 (1C, α -CH Val); 52.10, 51.80 (2C, 2x α -CH Ser_{1u,2}); 50.15 (2C, α -CH Asp, α -CH Arg); 48.73 (1C, 1x α -CH Ala); 47.94, 47.81, 47.40 (4C, 3x δ -CH₂ Pro, 1x α -CH Ala); 42.36 (1C, α -CH₂ Gly); 40.51 (1C, δ -CH₂ Arg); 34.58 (1C, β -CH₂ Asp); 29.89 (1C, β -CH Val); 29.17, 29.13 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 25.48, 25.26 (2C, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 24.74, 24.67 (3C, 3x γ -CH₂ Pro); 24.11 (1C, β -CH₂ Arg); 22.21 (1C, γ -CH₂ Arg); 21.55 (1C, CH₃ NHAc); 18.71, 18.64, 18.36 (3C, 3x γ -CH₃ Thr); 17.57 (2C, 2x γ -CH₃ Val); 16.16, 15.38, 15.29 (3C, 3x β -CH₃ Ala).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl-*O*-allyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*^γ-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-*O*-allyl-L-seryl-L-prolyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (136)**

(Ac-Val-Thr(*t*Bu)-Ser(α -GalAc₃NAc)-Ser(All)-Ala-Pro-Asp(*Ot*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-Ser(All)-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-OH)

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 490 mg (0.25 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Für den Einbau der Glycosylaminosäure **22** wird die automatisierte Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 222 mg (0.338 mmol) Fmoc-Ser(α -GalAc₃NAc)-OH **22**, 134 mg (0.353 mmol) HATU, 48 mg (0.353 mmol) HOAt, 121 μ L (91 mg, 0.705 mmol) DIPEA in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt und 6 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung werden die überschüssigen Reagenzien abfiltriert, und das Harz wird mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen und anschließend mit Capping-Reagenz versetzt. Die Anknüpfung der verbleibenden Aminosäuren erfolgt wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll. Nach der letzten Kupplung wird die aminoterminal Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on entfernt und der freie Aminoterminus wird mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Ausbeute: 587 mg (90 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -37.58^\circ$ (*c* = 0.70, MeOH); *R*_t = 15.38 min (Säule B, Gradient: 40 % D nach 100 % D).

C₁₂₁H₁₉₅N₂₁O₃₉S MW: 2600.03 EM: 2598.3642

ESI-MS (*m/z*) = 1322.70 ([*M*+2Na]²⁺/2), Ber.: 1322.67; 2622.41 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2622.36.

HR-MS (*m/z*) = 2621.3577 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2621.3540; 2622.3572 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2622.3573; 2623.3640 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2623.3607.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 8.33-8.18 (m, 3H, NH Arg, NH Asp 1x NH Ala); 8.05-7.80 (m, 7H, 4x NH Ser, NH Gly, 1x NH Thr, 1x NH Val); 7.70-7.10 (m, 5H, 2x NH Thr, 2x NH Ala, NHAc); 6.38 (sb, 1H, NH-Arg); 5.85-5.76 (m, 2H, 2x -O-CH₂-CH=CH_AH_B (5.24, 5.20), 2x -O-CH₂-CH=CH_AH_B (5.12, 5.09)); 4.96 (dd, 1H, H₄-Gal, *J* = 3.00 Hz, *J* = 11.50 Hz);

4.85 (d, 1H, H1-Gal, $J = 3.47$ Hz); 4.68 (m, 1H, 1x α -CH Ser); 4.63 (m, 1H, 1x α -CH Ser); 4.56 (m, 1H, α -CH Asp); 4.51-4.42 (m, 3H, α -CH Arg (4.48), 1x α -CH Ala, 1x α -CH Ser); 4.37 (m, 1H, α -CH Ser); 4.34-4.13 (m, 10H, H2-, H5-Gal, 3x α -CH Pro, 2x α -CH Ala, 3x α -CH Thr, α -CH Val); 4.02 (m, 1H, H6a-Gal); 3.98-3.85 (m, 8H, H6b-Gal (3.92), 3x β -CH Thr, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 3.71 (m, 2H, α -CH₂ Gly); 3.63-3.43 (m, 14H, 2x β -CH_AH_B Ser (3.48), 2x β -CH_AH_B Ser (3.42), 2x β -CH_AH_B Ser (3.59), 2x β -CH_AH_B Ser (3.51), 3x δ -CH_AH_B Pro (3.60), 3x δ -CH_AH_B Pro (3.49)); 3.01 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.70 (m, 1H, β -CH_AH_B Asp); 2.57 (m, 2H, CH₂-4-Pmc); 2.49-2.40 (m, 7H, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, β -CH_AH_B Asp (2.43)); 2.10-1.70 (m, 40H, 3x β -CH_AH_B Pro (1.98), 3x β -CH_AH_B Pro (1.81), 3x γ -CH_AH_B Pro (1.91), 3x γ -CH_AH_B Pro (1.82), β -CH_AH_B Arg (1.74), β -CH Val (2.01), 3x CH₃ OAc (2.08, 1.95, 1.85), 2x CH₃ NHAc (1.87, 1.80), CH₃-8-Pmc (2.01), 2x CH₃-2-Pmc, CH₂-3-Pmc (1.75)); 1.64 (m, 1H, β -CH_AH_B Arg); 1.42 (m, 2H, γ -CH₂ Arg); 1.34 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.27 (d, 3H, β -CH₃ Ala, $J = 6.98$ Hz); 1.24-1.04 (m, 42H, 12x CH₃ *t*Bu-Ether, 2x β -CH₃ Ala (1.17)); 1.00 (m, 6H, 2x γ -CH₃ Thr); 0.94 (d, 3H, γ -CH₃ Thr, $J = 6.21$ Hz); 0.83 (m, 6H, 2x γ -CH₃ Val).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, HSQC): δ (ppm): 173.54, 172.03, 171.45, 171.01, 170.93, 170.25, 169.90, 169.77, 169.57, 169.45, 169.30, 169.25, 169.08, 168.78, 168.66, 168.60, 168.25 (23C, 1x C=O *t*Bu-Ester, 1x -COOH, 1x C=O GalNHAc, 3x C=O OAc, 1x C=O NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 4x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 3x Pro, 1x Arg); 155.84 (1C, C=NH Arg); 152.24 (1C, C8a-Pmc); 134.79 (2C, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 134.43 (2C, C5-Pmc, C7-Pmc); 133.98 (1C, C6-Pmc); 122.54 (1C, 4a-Pmc); 117.61 (1C, C8-Pmc); 116.58, 116.53 (2C, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 97.56 (1C, C1-Gal); 80.11 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 73.80, 73.68, 73.53, 73.33, 73.02 (5C, 4x C_{quart.}-*t*Bu-Ether, C2-Pmc); 71.14, 71.01 (2C, 2x -O-CH₂-CH=CH₂); 69.48, 69.01 (2C, 2x β -CH₂ Ser); 67.96 (1C, C4-Gal); 67.67, 66.96, 66.84, 66.75, 66.15 (5C, C5-, C3-Gal, 3x β -CH Thr); 61.60, 61.38 (3C, C6-Gal, 2x β -CH₂ Ser); 59.57, 59.07, 58.89, 57.90, 57.25, 57.18, 56.75 (8C, 2x α -CH Ala, 3x α -CH Pro, 3x α -CH Thr, α -CH Val); 52.95 (1C, 1x α -CH Ser); 52.73 (1C, α -CH Arg); 50.44, 51.79 (2C, 2x α -CH Ser); 48.82 (1C, α -CH Asp); 47.82, 47.48, 46.50, 46.39, 46.35, 46.17 (6C, 3x δ -CH₂ Pro, 1x α -CH Ser, C2-Gal, 1x α -CH Ala); 41.70 (1C, 1x α -CH₂ Gly); 40.19 (1C, δ -CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 36.60 (1C, β -CH₂ Asp); 32.06 (1C, CH₂-3-Pmc); 29.83, 28.98, 28.91, 28.77 (7C, 3x β -CH₂ Pro, β -CH₂ Arg, 2x CH₃-2-Pmc, β -CH Val); 27.94, 27.91, 27.79, 27.53, 27.00, 26.31 (15C, 12x CH₃ *t*Bu-Ether, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 24.56, 24.51, 24.18 (4C, γ -CH₂ Arg, 3x γ -CH₂ Pro); 22.48, 22.25 (2C, 2x CH₃ NHAc); 20.67, 20.38, 20.34, 19.14, 18.93,

18.73, 18.08, 17.88, 17.85, 17.56 (11C, CH₂-4-Pmc, 3x CH₃ OAc, 3x γ-CH₃ Thr, 2x γ-CH₃ Val, CH₃-5-, CH₃-7-Pmc); 16.99, 16.55 (3C, 3x β-CH₃ Ala); 11.82 (1C, CH₃-8-Pmc).

***N*²-(*N*-Acetyl-L-valyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl)-[C¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyll-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-6,7-didehydro-4,9-dioxa-dodecan-1,12-dioyl-L-prolyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (137)**

Das Glycopeptid **136** (50 mg, 0.0192 mmol) wird in 7 mL entgastem absol. Dichlormethan gelöst (2.75 mM). Dann gibt man 20 mol% (3 mg) Grubbs Katalysator der 2. Generation (Benzyliden[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinyliden]dichloro-(tricyclohexylphosphin)ruthenium) unter Argon hinzu und erwärmt die Lösung unter Argon 11 h unter Rückfluss. Danach gibt man nochmals diegleiche Menge an Katalysator hinzu und erwärmt die Lösung unter Argon weitere 13 h unter Rückfluss. Anschließend entfernt man das Lösemittel i. Vak. und reinigt die Verbindung durch präparative HPLC.

Ausbeute: 23 mg (47 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{20} = -21.02^\circ$ (*c* = 0.70, MeOH); *R*_t = 12.66 min (Säule B, Gradient: 50 % D nach 100 % D in 20 min), *R*_t = 24.55-27.05 min (Säule E, Gradient: 50 % D nach 100 % D in 60 min, 211 nm).

C₁₁₉H₁₉₁N₂₁O₃₉S

MW: 2571.97

EM: 2570.3329

ESI-MS (*m/z*) = 1297.70 ([*M*+*H*+Na]²⁺/2), Ber.: 1297.67; 1308.70 ([*M*+2Na]²⁺/2), Ber.: 1308.66; 2572.38 ([*M*+*H*]⁺), Ber.: 2572.34; 2594.37 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2594.33.

HR-MS (*m/z*) = 2593.3276 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2593.3227; 2594.3235 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2594.3260; 2595.3315 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 2595.3294.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 8.45 (m, 1H, NH Asp); 8.33-8.11 (m, 2H, NH Arg, 1x NH Ala); 8.08-7.77 (m, 6H, 4x NH Ser, NH Gly, 1x NH Ala); 7.70-7.52 (m, 2H, 2x NH Thr); 7.42-6.94 (m, 3H, NH GalNAc, NH Val, 1x NH Ala); 6.43 (s_b, 1H, NH-Arg); 5.69 (m, 2H, -O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-); 5.26 (m, 1H, H3-Gal); 4.96 (m, 1H, H4-Gal); 4.85 (m, 1H, H1-Gal); 4.72 (m, 1H, 1x α-CH Ser); 4.64 (m, 1H, 1x α-CH Ser); 4.60-4.34 (m, 5H, 2x α-CH Ser (4.37), 1x α-CH Ala (4.47), α-CH Asp (4.47), α-CH Arg (4.46)); 4.33-4.11 (m, 11H, H2- (4.25), H5-Gal (4.16), 3x α-CH Pro (4.20), 2x α-CH Ala (4.20, 4.25), 3x α-CH Thr (4.26), α-CH Val (4.28)); 4.03 (m, 1H, H6a-Gal); 3.98-3.82 (m, 8H, H6b-Gal (3.93), 3x β-CH Thr (3.94), -O-CH₂-CH=CH-CH₂-O- (3.91));

3.76-3.33 (m, 16H, 2x β -CH_AH_B Ser_{tBu} (3.49), 2x β -CH_AH_B Ser_{tBu} (3.42), 1x β -CH₂ Ser (3.60), α -CH₂ Gly, 1x β -CH₂ Ser (3.50), 3x δ -CH₂ Pro (3.57)); 3.01 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.78 (m, 1H, β -CH_AH_B Asp); 2.56 (m, 2H, CH₂-4-Pmc); 2.50-2.35 (m, 7H, CH₃-5-Pmc, CH₃-7-Pmc, β -CH_AH_B Asp (2.45)); 2.10-1.70 (m, 40H, 3x β -CH_AH_B Pro (1.99), 3x β -CH_AH_B Pro (1.84), 3x γ -CH_AH_B Pro (1.91), 3x γ -CH_AH_B Pro (1.83), β -CH_AH_B Arg (1.75), β -CH Val (1.99), 3x CH₃ OAc (2.08, 1.95, 1.85), 2x CH₃ NHAc (1.86, 1.80), CH₃-8-Pmc (2.01), 2x CH₃-2-Pmc, CH₂-3-Pmc (1.76)); 1.64 (m, 1H, β -CH_AH_B Arg); 1.36 (s, 9H, 3x CH₃ tBu-Ester); 1.34 (m, 2H, γ -CH₂ Arg); 1.26 (d, 3H, β -CH₃ Ala, J = 7.32 Hz); 1.25-1.04 (m, 42H, 12x CH₃ tBu-Ether, 2x β -CH₃ Ala (1.17, 1.15)); 1.05-0.91 (m, 9H, 3x γ -CH₃ Thr); 0.84 (m, 6H, 2x γ -CH₃ Val).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-d₆; BB, HSQC): δ (ppm): 174.10, 172.20, 171.55, 170.47, 170.33, 170.14, 170.02, 169.82, 169.63, 169.35, 169.24 (23C, 1x C=O tBu-Ester, 1x -COOH, 1x C=O GalNHAc, 3x C=O OAc, 1x C=O NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 4x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 3x Pro, 1x Arg); 156.41 (1C, C=NH Arg); 152.78 (1C, C8a-Pmc); 134.99 (2C, C5-Pmc, C7-Pmc); 134.53 (1C, C6-Pmc); 129.33, 128.97 (2C, -O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-); 123.11 (1C, 4a-Pmc); 118.17 (1C, C8-Pmc); 98.10 (1C, C1-Gal); 80.62 (1C, C_{quart.}-tBu-Ester); 74.33, 74.22, 74.04, 73.90, 73.58 (5C, 4x C_{quart.}-tBu-Ether, C2-Pmc); 70.80 (2C, -O-CH₂-CH=CH-CH₂-O-); 70.16, 68.09 (2C, 2x β -CH₂ Ser); 68.38 (1C, C4-Gal); 67.40 (1C, C3-Gal); 67.33 (3C, 3x β -CH Thr); 66.55 (1C, C5-Gal); 62.04 (2C, 2x β -CH₂ Ser_{tBu}); 61.85 (1C, C6-Gal); 59.97 (1C, α -CH Val); 57.72 (3C, 3x α -CH Pro); 57.68 (3C, 3x α -CH Thr); 53.43 (3C, 2x α -CH Ser, α -CH Arg); 52.17 (1C, 1x α -CH Ser); 51.07 (1C, 1x α -CH Ser); 50.36 (1C, 1x α -CH Ala); 48.32 (1C, 1x α -CH Ala); 47.93 (1C, 1x α -CH Ala); 47.04 (3C, 3x δ -CH₂ Pro); 46.98 (1C, C2-Gal); 46.67 (1C, α -CH Asp); 42.30 (1C, 1x α -CH₂ Gly); 40.37 (1C, δ -CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 36.78 (1C, β -CH₂ Asp); 32.58 (1C, CH₂-3-Pmc); 30.40 (3C, 2x CH₃-2-Pmc, β -CH Val); 28.49, 28.46, 28.32, 28.10, 27.54, 26.90, 26.87 (19C, 3x β -CH₂ Pro, β -CH₂ Arg, 12x CH₃ tBu-Ether, 3x CH₃ tBu-Ester); 24.73 (4C, γ -CH₂ Arg, 3x γ -CH₂ Pro); 23.02, 22.80 (2C, 2x CH₃ NHAc); 20.90, 20.95, 21.24 (3C, 3x CH₃ OAc); 19.69, 19.51, 19.30, 18.63 (8C, CH₂-4-Pmc, 3x γ -CH₃ Thr, 2x γ -CH₃ Val, CH₃-5-, CH₃-7-Pmc); 18.40, 18.09, 17.55 (3C, 3x β -CH₃ Ala); 12.38 (1C, CH₃-8-Pmc).

***N*²-(*N*-Acetyl-L-valyl-L-threonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-seryl)-[*C*¹,*N*¹¹-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,11-diamino-4,9-dioxa-dodecan-1,12-diyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (138)**

Man löst 11.7 mg (0.052 mmol) Pd(OAc)₂ und 93 mg (0.036 mmol) Cyclopeptid **137** in 6 mL einer THF/Wasser-Mischung (5:1) und gibt 0.3 mL (220 mg, 1.89 mmol) Triethylsilan, Triethylamin 22 μ L (16 mg, 0.157 mmol) sowie 2 Tropfen Propiolsäuremethylester hinzu. Man rührt 24 h unter Argon bei Raumtemp. wobei man nochmals 0.5 mL (367 mg, 3.15 mmol) Triethylsilan verteilt über 5 h zutropft. Man verdünnt mit 40 mL Wasser und lyophilisiert. Man nimmt das Lyophilisat in 9 mL MeOH auf und filtriert über eine RP-Kieselgel-Kartusche. Man befreit i. Vak. vom Lösemittel und kodestilliert zweimal mit je 20 mL Toluol. Der verbleibende Rückstand wird in Methanol angelöst und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 9 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Thioanisol und Wasser (25:0.9:0.9) 2 h bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Man verdünnt mit 20 mL Toluol, entfernt die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert zweimal mit je 20 mL Toluol. Der Rückstand wird viermal mit je 10 mL Pentan und Diethylether digeriert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 35 mL absol. MeOH gelöst. Man stellt mit 1%iger NaOMe-Lsg. in absol MeOH auf pH-Wert 8.5-9 ein und rührt 10 h bei Raumtemp. unter Argon. Man neutralisiert mit Trifluoressigsäure (5 % in MeOH), verdampft das Lösemittel i. Vak. und reinigt das Rohprodukt mittels präparative RP-HPLC.

Ausbeute: 26 mg (38 % über 3 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -44.80^\circ$ ($c = 0.75$, H₂O); $R_t = 18.13$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 40 % D in 30 min), $R_t = 25.10$ -38.50 min (Säule G, Gradient: 5 % D (20 min isokratisch) nach 40 % D in 65 min).

C₇₉H₁₂₉N₂₁O₃₃

MW: 1900.99

EM: 1899.9062

ESI-MS (m/z) = 1945.04 ($[M+2Na-H]^+$), Ber.: 1944.91; 1967.03 ($[M+3Na-2H]^+$), Ber.: 1966.91; 984.03 ($[M+3Na-H]^{2+}/2$), Ber.: 893.96.

HR-MS (m/z) = 1900.9215 ($[M+H]^+$), Ber.: 1900.9140; 1901.9238 ($[M+H]^+$), Ber.: 1901.9173; 1902.9241 ($[M+H]^+$), Ber.: 1902.9207.

400 MHz-¹H-NMR (D₂O; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 4.76 (m, 1H, H1-Gal (im Lösemittelsignal)); 4.63-4.35 (m, 7H, 2x α -CH Ser (Ether) (4.57, 4.50), α -CH Asp (4.61), α -CH Arg (4.51), 1x α -CH Ala (4.45), 2x α -CH Ser (4.40)); 4.15-3.96 (m, 13H, H2-Gal (4.02), 3x α -CH Pro (4.28), 2x α -CH Ala (4.23, 4.16), 3x α -CH Thr (4.29, 4.24, 4.19), α -CH Val (4.02), 3x β -CH Thr (4.10)); 3.89-3.80 (m, 4H, H5- (3.82), H6a-Gal (3.84),

α -CH₂ Gly (3.86)); 3.79-3.46 (m, 17H, 2x β -CH_AH_B Ser (Ether) (3.64), 2x β -CH_AH_B Ser (Ether) (3.58), 2x β -CH_AH_B Ser (3.76), 2x β -CH_AH_B Ser (3.61), H3-, H4-, H6b-Gal (3.69), 3x δ -CH₂ Pro (3.70-3.45)); 3.42 (m, 4H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 3.09 (m, 2H, δ -CH₂ Arg); 2.84 (m, 2H, β -CH₂ Asp); 2.18 (m, 3H, β -CH_AH_B Pro); 2.02-1.75 (m, 16H, 3x β -CH_AH_B Pro (1.82), 3x γ -CH₂ Pro (1.91), β -CH Val (1.97), 2x CH₃ NHAc (1.92, 1.89)); 1.72 (m, 1H, β -CH_AH_B Arg); 1.64 (m, 1H, β -CH_AH_B Arg); 1.56 (m, 2H, γ -CH₂ Arg); 1.45 (m, 4H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 1.35-1.18 (m, 9H, 3x β -CH₃ Ala); 1.12-1.00 (m, 9H, 3x γ -CH₃ Thr); 0.82 (m, 6H, 2x γ -CH₃ Val).

100.6 MHz-¹³C-NMR (D₂O; BB, HSQC): δ (ppm): 174.80, 174.76, 174.70, 174.43, 174.25, 174.19, 174.12, 171.94, 171.53, 171.34, 171.24 (19C, 2x -COOH, 1x C=O GalNHAc, 1x C=O NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 4x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 3x Pro, 1x Arg); 156.65 (1C, C=NH Arg); 97.86 (1C, C1-Gal); 71.23, 71.19 (3C, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, C3- oder C4-Gal); 68.47, 68.38 (2C, 2x β -CH₂ Ser (Ether)); 67.86 (1C, C5-Gal); 67.03, 66.94 (5C, C4- oder C3, C6-Gal, 3x β -CH Thr); 61.10, 61.00, 60.97, 60.93, 60.19 (5C, 2x β -CH₂ Ser, 3x α -CH Pro); 59.62 (1C, C2-Gal); 58.93, 58.82, 58.79 (3C, 3x α -CH Thr); 55.58, 55.53 (2C, 2x α -CH Ser); 53.41, 53.39 (2C, 2x α -CH Ser (Ether)); 51.17 (1C, α -CH Arg); 50.12 (1C, α -CH Asp); 49.49 (1C, α -CH Val); 49.39, 48.92 (2C, 2x α -CH Ala); 47.97, 47.88, 47.83, 47.69 (4C, 3x δ -CH₂ Pro, 1x α -CH Ala); 42.34 (1C, 1x α -CH₂ Gly); 39.92 (1C, δ -CH₂ Arg); 35.10 (1C, β -CH₂ Asp); 29.91 (1C, β -CH Val); 29.16, 29.22, 29.35 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 27.43 (1C, β -CH₂ Arg); 24.59 (2C, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 23.96, 23.94 (4C, γ -CH₂ Arg, 3x γ -CH₂ Pro); 22.00, 21.53 (2C, 2x CH₃ NHAc); 18.67 (3C, 3x γ -CH₃ Thr); 17.55 (2C, 2x γ -CH₃ Val); 16.18 (3C, 3x β -CH₃ Ala).

***N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-L-allylglycyl-L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*'-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-allylglycyl-L-prolyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin (140)**

(Ac-Val-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-Ser(*t*Bu)-AllGly-Ala-Pro-Asp(*Ot*Bu)-Thr(*t*Bu)-Arg(Pmc)-Pro-Ala-AllGly-Pro-Gly-Ser(*t*Bu)-Thr(*t*Bu)-Ala-OH)

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 196 mg (0.10 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Für den Einbau der Glycosylaminosäure **36** und des Fmoc-(*S*)-Allylglycins **126** wird die automatisierte Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 153 mg (0.13 mmol) Fmoc-Thr(α -Ac₄NeuNAcCOOBn-(2-6)- α -GalAc₂NAc)-OH **36**, 52 mg (0.13 mmol) HATU, 19 mg (0.13 mmol) HOAt, 45 μ l (34 mg, 0.26 mmol) DIPEA in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt bzw. 101 mg (0.30 mmol) Fmoc-(*S*)-Allylglycins **126**, 120 mg (0.30 mmol) HATU, 44 mg (0.30 mmol) HOAt, 103 μ l (78 mg, 0.60 mmol) DIPEA in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt und 6 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung werden die überschüssigen Reagenzien abfiltriert und das Harz wird mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen und anschließend mit Capping-Reagenz versetzt. Die Anknüpfung der restlichen Aminosäuren erfolgt wieder im Synthesizer nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll. Nach der letzten Aminosäurekupplung wird die aminoterminal Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on entfernt, und der freie *N*-Terminus wird mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Ausbeute: 260 mg (85 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{20} = -36.32^\circ$ (*c* = 0.70, MeOH); $R_t = 34.42$ min (Säule B, Gradient: 58 % D nach 64 % D in 40 min).

C₁₄₃H₂₂₀N₂₂O₄₈S

MW: 3047.46

EM: 3045.5171

ESI-MS (*m/z*) = 1535.29 ([*M*+H+Na]²⁺/2), Ber.: 1535.26; 3047.59 ([*M*+H]⁺), Ber.: 3047.53; 3069.57 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 3069.51.

HR-MS (*m/z*) = 3068.5037 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 3068.5069; 3069.5066 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 3069.5102; 3070.5061 ([*M*+Na]⁺), Ber.: 3070.5136.

400 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 8.27 (d, 1H, NH Asp, J = 7.60 Hz); 8.17 (d, 1H, 1x NH Ala, J = 6.33 Hz); 8.12 (m, 1H, NH Gly), 8.07-7.33 (m, 8H, NH Arg, 1x NH Thr, 2x NH Ala, 2x NH AllGly, NH Val, 1x NH Ser); 7.80-7.71 (m, 2H, NH SialNHAc, 1x NH Ser); 7.67 (d, 1H, 1x NH Thr, J = 8.33 Hz); 7.46-7.36 (m, 5H, 5x CH_{arom.}-Bn-Ester); 7.25 (m, 1H, 1x NH Thr, J = 7.86 Hz); 7.16 (d, 1H, NH GalNHAc, J = 9.54 Hz); 6.41 (s_b, 1H, NH-Arg); 5.76 (m, 2H, 2x -CH₂-CH=CH₂); 5.30-5.15 (s, 3H, CH₂-Bn-Ester (5.27), H4-Gal (5.25)); 5.11-4.98 (m, 4H, 2x -CH₂-CH=CH₂); 4.97 (m, 1H, α-CH Thr_{STn}); 4.93 (d, 1H, H1-Gal, J = 3.47 Hz); 4.73 (m, 1H, H4-Sial); 4.59 (m, 1H, α-CH Asp); 4.55-4.03 (m, 20H, β-CH Thr_{STn} (4.23), H5- (4.08), H2-Gal (4.19), H-8 (4.12), H9a-Sial (4.15), 2x α-CH Ser (4.33), H6-Sial (4.25), 1x α-CH Ala (4.44), α-CH Arg (4.48), 2x α-CH Ala (4.27), 3x α-CH Pro (4.33), 2x α-CH AllGly (4.45, 4.35), α-CH Val (4.52), 2x α-CH Thr (4.24)); 4.02-3.85 (m, 6H, H5- (3.92), H9b-Sial (3.99), H3-Gal (3.98), 1x β-CH Thr (3.97), 1x β-CH Thr (3.91), H7-Sial (3.98)); 3.84-3.69 (m, 3H, α-CH₂ Gly (3.76), H6a-Gal (3.74)); 3.68-3.32 (m, 10H, 2x β-CH₂ Ser (3.55-3.36), 3x δ-CH₂ Pro (3.56)); 3.14-2.97 (m, 3H, δ-CH₂ Arg, H6b-Gal (3.09)); 2.72 (dd, 1H, β-CH_AH_B Asp, J = 6.40 Hz, J = 15.70 Hz); 2.60 (m, 2H, CH₂-4-Pmc); 2.56-2.22 (m, 12H, 2x -CH₂-CH=CH₂, β-CH_AH_B Asp (2.46), CH₃-5-Pmc (2.52), CH₃-7-Pmc (2.49), H3_{aq.}-Sial (2.55)); 2.08-1.75 (m, 49H, 3x β-CH_AH_B Pro (2.03), 3x β-CH_AH_B Pro (1.85), 3x γ-CH_AH_B Pro (1.95), 3x γ-CH_AH_B Pro (1.86), β-CH_AH_B Arg (1.81), β-CH Val (1.95), 6x CH₃ OAc (2.05, 2.01, 1.97, 1.95, 1.88, 1.81), 2x CH₃ NHAc (1.88, 1.81), CH₃-8-Pmc (2.04), CH₂-3-Pmc (1.79), 2x CH₃-2-Pmc (1.97), (1.95)); 1.74-1.62 (m, 5H, β-CH_AH_B Arg (1.68), H3_{ax.}-Sial (1.69), CH₃ NHAc (1.67)); 1.45 (m, 2H, γ-CH₂ Arg); 1.31 (d, 3H, β-CH₃ Ala, J = 7.24 Hz); 1.27 (s, 9H, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 1.25-1.07 (m, 45H, 12x CH₃ *t*Bu-Ether, 2x β-CH₃ Ala (1.19, 1.14), γ-CH₃ Thr_{STn} (1.16)); 1.03 (d, 3H, γ-CH₃ Thr, J = 6.43 Hz); 0.97 (d, 3H, γ-CH₃ Thr, J = 6.09 Hz); 0.87 (d, 3H, γ-CH₃ Val, J = 6.80 Hz); 0.84 (d, 3H, γ-CH₃ Val, J = 6.74 Hz).

100.6 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; BB, HSQC, HMBC): δ(ppm): 176.32 (1C, -COOH); 173.66, 171.92, 171.78, 171.60, 171.06, 170.28, 170.02, 169.95, 169.83, 169.77, 169.66, 169.39, 169.17, 169.13, 168.99, 168.92, 168.80 (25C, 1x C=O *t*Bu-Ester, 1x C=O GalNHAc, 1x C=O SialNHAc, 6x C=O OAc, C=O NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 2x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 2x AllGly, 3x Pro, 1x Arg); 166.79 (1C, C1-Sial); 155.95 (1C, C=NH Arg); 152.37 (1C, C8a-Pmc); 135.02, 134.57, 134.19, 134.11, 133.96 (5C, C_{quart.}-Bn-Ester, C5-, C6-Pmc, 2x -CH₂-CH=CH₂); 127.98, 128.49, 128.56 (6C, 5x CH_{arom.}-Bn-Ester, C7-Pmc); 122.68 (1C, 4a-Pmc); 117.73, 117.54, 117.38 (3C, C8-Pmc, 2x -CH₂-CH=CH₂); 98.08 (2C, C1-Gal, C2-Sial); 80.23 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 75.56 (1C, β-CH Thr_{STn}); 73.79, 73.63, 73.45, 73.16,

73.08 (5C, 4x C_{quart}-*t*Bu-Ether, C2-Pmc); 71.81 (1C, C5-Gal); 69.05 (1C, C4-Sial); 68.94 (1C, α -CH Thr_{STn}); 68.64, 67.35, 67.20, 67.16, 67.03, 66.97, 66.87 (8C, C4-Gal, C3-Gal, 2x β -CH Thr, CH₂-Bn-Ester, C6-, C7-, C8-Sial); 62.82 (1C, C6-Gal); 61.92, 61.83, 61.73 (3C, C9-Sial, 2x β -CH₂ Ser); 59.59, 59.24, 59.03 (3C, 3x α -CH Pro); 57.54, 57.37 (2C, 1x α -CH Ser, 1x α -CH Ala); 56.87 (1C, 1x α -CH Ala); 53.04 (2C, 1x α -CH AllGly, 1x α -CH Ser); 51.66 (1C, 1x α -CH AllGly); 49.77 (1C, α -CH Val); 49.18 (1C, α -CH Asp); 47.67 (2C, 2x α -CH Thr); 47.59 (1C, C5-Sial); 46.80, 46.73, 46.48, 46.27 (5C, C2-Gal, 3x δ -CH₂ Pro, α -CH Arg); 41.92 (1C, α -CH₂ Gly); 39.86 (1C, δ -CH₂ Arg (im Lösemittelsignal)); 37.06 (1C, C3-Sial); 36.70 (1C, β -CH₂ Asp); 35.67, 35.61 (2C, 2x -CH₂-CH=CH₂); 32.17 (1C, CH₂-3-Pmc); 30.36 (3C, 2x CH₃-2-Pmc, β -CH Val); 29.20, 29.09, 28.97 (4C, 3x β -CH₂ Pro, β -CH₂ Arg); 28.06, 27.97, 27.89, 27.65, 27.10 (13C, 12x CH₃ *t*Bu-Ether, γ -CH₂ Arg); 26.45 (3C, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 24.36, 24.16 (3C, 3x γ -CH₂ Pro); 22.70, 22.60, 22.36 (3C, 3x CH₃ NHAc); 20.82, 20.67, 20.60, 20.49, 20.28 (7C, CH₂-4-Pmc, 6x CH₃ OAc); 19.28, 19.06, 18.41, 18.20, 18.14, 17.97 (6C, 1x γ -CH₃ Val, 3x γ -CH₃ Thr, CH₃-5-Pmc, 1x β -CH₃ Ala); 17.97 (1C, CH₃-7-Pmc); 17.66 (1C, 1x γ -CH₃ Val); 16.74, 17.11 (2C, 2x β -CH₃ Ala); 11.94 (1C, CH₃-8-Pmc).

***N*²-(*N*-Acetyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl)-[*C*¹,*N*⁷-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-*O*-*tert*-butyl-L-aspartyl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-*N*⁷-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl)-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,7-diamino-4,5-didehydro-octan-1,8-dioyl-L-prolyl-glycyl-*O*-*tert*-butyl-L-seryl-*O*-*tert*-butyl-L-threonyl-L-alanin**
(141)

Die Reaktion erfolgt nach der Arbeitsvorschrift zur Synthese der Verbindung **132**.

Eingesetzte Mengen: Glycopeptid **140**: 50 mg (0.0164 mmol); Grubbs-Katalysator 2. Generation (Benzyliden[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinyliden]dichloro-(tricyclohexylphosphin)ruthenium): 2x 20 mol% (3 mg); 7 mL entgastes absol. Dichlormethan (2.34 mM).

Ausbeute: 19 mg (39 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -21.53^\circ$ (*c* = 0.73, MeOH); *R*_t = 13.60 min (Säule B, Gradient: 50 % D nach 100 % D in 20 min), *R*_t = 32.53-35.30 min (Säule F, Gradient: 50 % D nach 100 % D in 60 min, Fluss: 25 mL, 216 nm).

C₁₄₁H₂₁₆N₂₂O₄₈S

MW: 3019.41 g/mol

EM: 3017.4858

ESI-MS (m/z) = 1510.37 ([M+2H]²⁺/2), Ber.: 1510.25.HR-MS (m/z) = 3040.4836 ([M+Na]⁺), Ber.: 3040.4756; 3041.4812 ([M+Na]⁺), Ber.: 3041.4789; 3042.4678 ([M+Na]⁺), Ber.: 3042.4823.

400 MHz-¹H-NMR (MeOH-d₄; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 7.41-7.37 (m, 5H, 5x CH_{arom.}-Bn-Ester); 5.56 (m, 2H, -CH₂-CH=CH-CH₂-); 5.37-5.17 (m, 5H, CH₂-Bn-Ester (5.25), H1- (5.19), H4-Gal (5.35), H6-Sial (5.34)); 5.10 (m, 1H, α-CH Thr_{STn}); 4.81 (m, 1H, H4-Sial); 4.75-4.24 (m, 19H, 3x α-CH Pro (4.32), 2x α-CH Ala (4.42, 4.19), α-CH Asp (4.52), α-CH Val, 1x α-CH Ala, 2x α-CH Thr (4.38), α-CH Arg (4.84), 2x α-CH AllGly (4.57, 4.52), H9a-Sial (4.27), H2- (4.29), H3-Gal (4.25), β-CH Thr_{STn} (4.39), 2x α-CH Ser (4.51)); 4.20-4.11 (m, 4H, H8-Sial, 2x β-CH Thr (4.15), H5-Gal); 4.10-3.88 (m, 5H, H5- (3.97), H7- (4.00), H9b-Sial (4.03), α-CH₂ Gly); 3.86-3.43 (m, 11H, 2x β-CH₂ Ser, 3x δ-CH₂ Pro, H6a-Gal (3.79)); 3.22-3.06 (m, 3H, δ-CH₂ Arg, H6b-Gal (3.12)); 3.40-2.80 (m, 2H, β-CH₂ Asp); 2.77-2.55 (m, 9H, CH₃-5-Pmc (2.57), CH₃-7-Pmc (2.55), CH₂-4-Pmc (2.67), H3_{aq.}-Sial (2.63)); 2.54-2.18 (m, 7H, 3x β-CH_AH_B Pro, -CH₂-CH=CH-CH₂-); 2.17-1.89 (m, 45H, 3x β-CH_AH_B Pro (2.05), 3x γ-CH₂ Pro (2.14-1.92), β-CH₂ Arg (1.92), β-CH Val (2.08), 6x CH₃ OAc (2.10, 1.98, 1.93), 2x CH₃ NHAc, CH₃-8-Pmc (2.16), 2x CH₃-2-Pmc (2.08)); 1.87-1.79 (m, 5H, CH₂-3-Pmc, CH₃ NHAc); 1.77 (m, 1H, H3_{ax.}-Sial); 1.61 (m, 2H, γ-CH₂ Arg); 1.48-1.12 (m, 63H, 12x CH₃ tBu-Ether, 3x CH₃ tBu-Ester (1.46), 3x β-CH₃ Ala (1.50, 1.46, 1.41), 3x γ-CH₃ Thr (1.31, 1.21, 1.14)); 0.98 (m, 6H, 2x γ-CH₃ Val).

100.6 MHz-¹³C-NMR (MeOH-d₄; BB, DEPT, HSQC, HMBC): δ(ppm): 174.23 (1C, -COOH); 173.52, 173.40, 173.19, 173.00, 172.44, 172.28, 172.17, 171.95, 171.86, 171.75, 171.67, 171.63, 171.37, 171.26 (26C, 1x C=O tBu-Ester, 1x C=O GalNHAc, 1x C=O SialNHAc, 6x C=O OAc, C=O NHAc, 16x C=O Amid: 3x Thr, 2x Ser, 1x Asp, 1x Val, 2x Ala, 1x Gly, 2x AllGly, 3x Pro, 1x Arg); 168.53 (1C, C1-Sial); 158.08 (1C, C=NH Arg); 154.72 (1C, C8a-Pmc); 136.54 (1C, C_{quart.}-Bn-Ester); 136.11 (1C, C5-Pmc); 134.70 (1C, C6-Pmc); 129.92, 129.88, 129.80, 129.78, 129.74 (6C, 5x CH_{arom.}-Bn-Ester, C7-Pmc); 128.48 (2C, -CH₂-CH=CH-CH₂-); 124.95 (1C, 4a-Pmc); 119.39 (1C, C8-Pmc); 99.96, 99.87 (2C, C1-Gal, C2-Sial); 82.74 (1C, C_{quart.}-tBu-Ester); 79.30 (1C, β-CH Thr_{STn}); 75.88, 75.37, 75.05, 74.98, 74.88 (5C, 4x C_{quart.}-tBu-Ether, C2-Pmc); 73.26 (1C, C5-Gal); 73.21 (1C, 2x β-CH Thr); 70.61 (1C, α-CH Thr_{STn}); 70.57 (1C, C4-Sial); 69.41 (1C, C6-Sial); 68.83 (1C, CH₂-Bn-Ester); 68.53 (1C, C4-Gal); 68.08, 67.92 (3C, C3-Gal, C7-, C8-Sial); 65.08 (1C, C6-Gal); 63.35 (1C, C9-Sial); 62.65 (2C, 2x β-CH₂ Ser); 60.24 (4C, α-CH Val, 3x α-CH Pro);

59.43 (2C, 2x α -CH Thr); 55.26 (2C, 2x α -CH Ser); 53.10, 52.31 (2C, 2x α -CH AllGly); 50.51 (1C, α -CH Arg); 49.89 (1C, C5-Sial); 49.38 (3C, 3x α -CH Ala); 48.75 (1C, α -CH Asp); 48.72 (1C, C2-Gal); 48.57 (3C, 3x δ -CH₂ Pro); 43.44 (1C, α -CH₂ Gly); 41.32 (1C, δ -CH₂ Arg); 38.79 (1C, C3-Sial); 37.14 (1C, β -CH₂ Asp); 33.78 (1C, CH₂-3-Pmc); 33.48, 32.89 (2C, -CH₂-CH=CH-CH₂-); 31.64 (3C, 2x CH₃-2-Pmc, β -CH Val); 30.47 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 27.41 (1C, β -CH₂ Arg); 28.95, 28.75, 28.51, 28.36, 27.78, 27.00 (15C, 12x CH₃ *t*Bu-Ether, 3x CH₃ *t*Bu-Ester); 26.15 (4C, γ -CH₂ Arg, 3x γ -CH₂ Pro); 22.96, 22.63, 22.43 (3C, 3x CH₃ NHAc); 22.36 (1C, CH₂-4-Pmc); 21.06, 20.69, 20.65 (6C, 6x CH₃ OAc); 20.91, 19.49, 19.30 (1C, 1x γ -CH₃ Thr); 19.00 (1C, CH₃-5-Pmc); 19.84 (1C, 1x γ -CH₃ Val); 19.49, 19.30 (2C, 2x γ -CH₃ Thr); 18.91 (1C, 1x γ -CH₃ Val); 18.42, 18.08 (2C, 2x β -CH₃ Ala); 17.89 (1C, CH₃-7-Pmc); 17.20 (1C, β -CH₃ Ala); 12.33 (1C, CH₃-8-Pmc).

***N*²-(*N*-Acetyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-(5-acetamido-3,5-didesoxy-D-glycero- α -D-galacto-non-2-ulopyranosyl)-onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl)-[C¹,*N*⁷-cyclo-(L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl)]-2,7-diamino-octan-1,8-dioyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (142)**

Man löst 11.7 mg (0.052 mmol) Palladium(II)acetat in 4 mL entgastem absol. Dichlormethan, gibt 22 μ L (16 mg, 0.16 mmol) Triethylamin und 0.34 mL (0.252 g, 2.17 mmol) Triethylsilan und lässt 10 min bei Raumtemp. unter Argon rühren. Die Suspension wird zu einer Lösung von 64 mg (0.021 mmol) Cyclopeptid **141** in 6 mL entgastem absol. Dichlormethan gegeben und 14 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt. Man verdünnt mit 30 mL Dichlormethan und wäscht die organische Phase zweimal mit je 9 mL ges. NH₄Cl-Lsg. Das Dichlormethan wird i. Vak. abdestilliert. Man nimmt den verbleibenden Rückstand in 10 mL MeOH auf, filtriert über eine RP-Kieselgel-Kartusche und wäscht mit 35 mL MeOH nach. Das MeOH wird i. Vak. verdampft und der Rückstand lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 10 mL einer Mischung aus TFA, Thioanisol und Wasser (25:0.9:0.9) 2 h bei Raumtemp. gerührt. Man verdünnt mit Toluol und befreit die Reaktionsmischung i. Hochvak. von allen flüchtigen Bestandteilen. Nach der zweimaligen Kodestillation mit je 30 mL Toluol digeriert man den Rückstand viermal mit je 7 mL Pentan sowie Diethylether. Der verbleibende Feststoff wird nach Lyophilisieren in 30 mL absol. MeOH gelöst. Mit 1%iger NaOMe-Lsg. in absol. MeOH wird pH-Wert 9 eingestellt und die Reaktionslösung 13 h unter Argon bei Raumtemp. gerührt.

Man neutralisiert mit Essigsäure, entfernt das Lösemittel i. Vak. und lyophilisiert. Der farblose Feststoff wird in 8 mL entgaster Wasser/MeOH-Mischung (6:2) gelöst und mit 35 mg Pd auf Aktivkohle (10 %) versetzt. Man gibt dann in Abständen von 20 min fünfmal je 0.1 mL TES hinzu und lässt 14 h unter Wasserstoffatmosphäre intensiv rühren. Dann versetzt man die Suspension mit 11 mg (0.052 mmol) Pd(OAc)₂ und nochmals mit TES (fünfmal je 0.1 mL in je 25 min). Die Reaktionsmischung wird unter einer Wasserstoffatmosphäre intensiv 15 h rühren. Man verdünnt mit einer Wasser/MeOH-Mischung (1:1), filtriert über eine RP-Kieselgel-Kartusche ab und wäscht mit insgesamt 40 mL einer Wasser/MeOH-Mischung (1:1) und abschließend mit 10 mL einer Wasser/MeOH-Mischung (1:9). Das Methanol wird i. Vak. entfernt und die wässrige Phase lyophilisiert. Man reinigt das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC.

Ausbeute: 20 mg (44 % über 3 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{20} = -58.04^\circ$ (c = 0.50, MeOH/Wasser (1:1)); $R_t = 13.60$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 100 % D in 20 min), $R_t = 15.30$ -17.50 min (Säule G, Gradient: 5 % D (5 min isokratisch) nach 100 % D in 40 min, Fluss: 15 mL, 208 nm).

C₈₈H₁₄₂N₂₂O₃₉

MW: 2132.19 g/mol

EM: 2130.9805

ESI-MS (m/z) = 1121.98 ([M+5Na+3H]²⁺/2), Ber.: 1121.49; 1077.53 ([M+Na+H]²⁺/2), Ber.: 1077.49.

HR-MS (m/z) = 1077.4873 ([M+Na+H]²⁺/2), Ber.: 1077.4891; 1077.9880 ([M+Na+H]²⁺/2), Ber.: 1077.9907; 1078.4917 ([M+Na+H]²⁺/2), Ber.: 1078.4924.

400 MHz-¹H-NMR (D₂O; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 4.84 (d, 1H, H1-Gal, J = 3.86 Hz); 4.52-3.91 (m, 21H, α-CH Arg (4.52), α-CH Asp (4.48), α-CH Thr_{STn} (4.35), 3x α-CH Ala (4.45, 4.26, 4.03), 2x α-CH Ser (4.41, 4.38), 3x α-CH Pro (4.29, 4.43), 2x α-CH Thr (4.26, 3.98), α-CH Val (4.11), 2x β-CH Thr (4.13), β-CH Thr_{STn} (4.17), 2x α-CH AllGly (4.27, 4.14), H5- (3.99), H2-Gal (3.97)); 3.90-3.35 (m, 23H, α-CH₂ Gly (3.88), H6a- (3.82), H6b- (3.53), H3- (3.75), H4-Gal (3.86), 3x δ-CH₂ Pro (3.76, 3.64, 3.42), 2x β-CH₂ Ser (3.71, 3.78), H5- (3.73), H6- (3.75), H9a- (3.74), H9b- (3.52), H8- (3.62), H7- (3.45), H4-Sial (3.59)); 3.08 (m, 2H, δ-CH₂ Arg); 2.89 (m, 1H, β-CH₂ Asp); 2.57 (dd, 1H, H3_{aq}-Sial, J = 4.45 Hz, J = 12.59 Hz); 2.35-2.15 (m, 3H, 3x β-CH_AH_B Pro (2.21, 2.29); 2.00-1.70 (m, 19H, 3x CH₃ NHAc (1.93, 1.91, 1.88), β-CH Val (1.96), 3x γ-CH₂ Pro (1.94, 1.77), 3x β-CH_AH_B Pro (1.81, 1.96)); 1.65-1.35 (m, 13H, H3_{ax}-Sial (1.60), β-CH₂ Arg (1.58), γ-CH₂ Arg (1.55), -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- (1.63), -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- (1.41)); 1.40-1.00 (m, 18H, 3x β-CH₃ Ala (1.31, 1.24), 3x γ-CH₃ Thr, (1.19, 1.10)); 0.90-0.80 (m, 6H, 2x γ-CH₃ Val).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR (D_2O ; BB, HSQC, HMBC): $\delta(\text{ppm})$: 156.56 (1C, C=NH Arg); 99.06 (2C, C1-Gal); 77.22 (1C, β -CH Thr_{STn}); 72.53 (1C, C8-Sial); 71.20 (1C, C6-Sial); 69.81 (1C, C5-Gal); 68.47 (1C, C4-Gal); 68.12, 68.01 (2C, C3-Gal, C7-Sial); 67.78 (1C, C4-Sial); 66.86 (2C, 2x β -CH Thr); 63.71 (1C, C6-Gal); 62.63 (1C, C9-Sial); 61.38, 61.06 (2C, 2x β -CH₂ Ser); 61.16 (1C, 1x α -CH Thr); 60.56, 60.00 (3C, 3x α -CH Pro); 59.54 (1C, α -CH Val); 58.86 (1C, 1x α -CH Thr); 57.00 (1C, α -CH Arg); 55.74, 55.11 (2C, 2x α -CH Ser); 53.38, 52.07 (2C, 2x α -CH AllGly); 51.65 (1C, C5-Sial); 50.13 (1C, α -CH Asp); 49.96 (1C, α -CH Thr_{STn}); 49.74 (1C, 1x α -CH Ala); 49.53 (1C, C2-Gal); 48.64, 47.69 (2C, 2x α -CH Ala); 47.29, 47.73, 47.81 (3C, 3x δ -CH₂ Pro); 42.26 (1C, α -CH₂ Gly); 40.31 (1C, δ -CH₂ Arg); 39.61 (1C, C3-Sial); 34.19 (1C, β -CH₂ Asp); 31.53 (1C, 1x β -CH₂ Pro); 30.74 (2C, -CH₂-CH₂-CH₂-); 29.83 (1C, β -CH Val); 29.24 (1C, β -CH₂ Arg); 29.04 (2C, 2x β -CH₂ Pro); 25.30 (2C, -CH₂-CH₂-CH₂-); 24.63 (2C, 2x γ -CH₂ Pro); 23.98 (1C, γ -CH₂ Arg); 22.40 (1C, 1x γ -CH₂ Pro); 22.09, 21.90, 21.52 (3C, 3x CH₃ NHAc); 18.64, 18.14 (3C, 3x γ -CH₃ Thr); 18.10 (2C, 2x γ -CH₃ Val); 16.08, 16.02, 14.74 (3C, 3x β -CH₃ Ala).

5.10 Versuche zu Kapitel 3.6.1

2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranose^[377, 378] (144)

In einer Natriummethanolat-Lösung (11.5 g (500 mmol) Natrium in 500 mL absol. Methanol) suspendiert man 108 g (500 mmol) D-Glucosaminhydrochlorid **133**. Man schüttelt 5 Minuten und filtriert das ausgefallene Natriumchlorid schnell ab. Zum Filtrat tropft man unter kräftigem Rühren 47.2 mL (51.0 g, 500 mmol) Acetanhydrid und rührt die Lösung nach Beendigung der Zugabe 3 h. Man lässt die Suspension 15 h bei 5 °C stehen. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit 100 mL eiskaltem Ethanol und 100 mL eiskaltem Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 95 g (86 %); farblose Kristalle; Schmp.: 197-200 °C, Schmp.(Lit.^[378]): 200-204 °C; $[\alpha]_D^{25} = +37.7^\circ$ (c = 1.00, H₂O), $[\alpha]_D^{22}$ (Lit.^[378]) = +40.5° (c = 1.00 in H₂O); R_f = 0.64 (MeOH).

C₈H₁₅NO₆

MW: 221.21

EM: 221.0899.

2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid^[377, 379] (145)

Man versetzt 10.0 g (45.2 mmol) 2-Acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranose **144** unter Rühren mit 30 mL (422 mol) Acetylchlorid. Die Mischung wird unter Argon 15 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend destilliert man überschüssiges Acetylchlorid i. Vak. ab und nimmt den braunen Rückstand in 100 mL Dichlormethan auf. Die Lösung wird auf 50 mL Eiswasser gegeben und unter kräftigem Rühren mit 50 mL einer 10%igen NaHCO₃-Lösung versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung gibt man so lange festes NaHCO₃ hinzu, bis ein pH-Wert zwischen 8 und 9 erreicht ist. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. auf ca. 40 mL eingengt. Nach Filtrieren über eine 3-4 cm dicke Schicht Kieselgel mit Dichlormethan als Eluent wird das Dichlormethan i. Vak. entfernt und das resultierende rotbraune Öl durch Zugabe eines Diethylether-Petrolether-Gemisches (1:1) kristallisiert.

Ausbeute: 9.90 g (60 %); farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{25} = +100.2^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{22}(\text{Lit.}^{[379]}) = +110.0$ ($c = 1.04$, CHCl_3); Schmp.: 126°C , Schmp.(Lit.^[379]): $127\text{--}128^\circ\text{C}$; $R_f = 0.46$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3).

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{ClNO}_8$

MW: 365.76

EM: 365.0877.

3-(2'-Acetamido-3',4',6-tri-O-acetyl-2'-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-1-propen^[380, 381] (146)

Man suspendiert 4.50 g (12.30 mmol) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid **145**, 11.86 mL Allyltributylstannan (12.67 g, 38.25 mmol) und AIBN (302 mg, 1.84 mmol) in 25 mL entgastem absol. Toluol. Man entgast die Reaktionsmischung nochmals 10 min und erwärmt unter Argon 15 h unter kräftigem Rühren auf 85°C . Das Toluol entfernt man i. Vak., nimmt den Rückstand in 150 mL Acetonitril auf und wäscht die Acetonitrilphase viermal mit je 50 mL Pentan. Das Acetonitril wird i. Vak. entfernt und das verbleibende Öl durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (12:10) $\rightarrow$ (10:15) gereinigt.

Ausbeute: 2.36 g (52 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +38.2^\circ$ ($c = 1.00$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20}(\text{Lit.}^{[380]}) = +47.0^\circ$ ($c = 1.20$, CHCl_3); $R_f = 0.30$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3).

$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_8$

MW: 371.38

EM: 373.1580.

ESI-MS (m/z) = 372.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), Ber.: 372.2; 394.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 394.2; 765.4 ($[2\text{M}+\text{Na}]^+$), Ber.: 765.3.

300 MHz-¹H-NMR (C_6D_6): $\delta(\text{ppm})$: 5.59 (m, 2H, NH Amid, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.21 (t, 1H, H3-Glu, $J = 6.96$ Hz); 5.09 (t, H4-Glu, $J = 6.63$ Hz); 4.98 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 4.54 (m, 1H, H2-Glu); 4.37 (dd, 1H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B6}$ -Glu, $J = 12.12$ Hz, $J = 6.27$ Hz); 4.32 (m, 1H, H1-Glu); 4.13 (dd, 1H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B6}$ -Glu, $J = 12.12$ Hz, $J = 3.69$ Hz); 2.27 (m, 1H, $-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}-\text{CH}=\text{CH}_2$); 2.06 (m, 1H, $-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}-\text{CH}=\text{CH}_2$); 1.71 (s, 3H, CH_3 NHAc); 1.62 (s, 3H, CH_3 OAc); 1.59 (s, 3H, CH_3 OAc); 1.56 (s, 3H, CH_3 OAc).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl_3 ; BB): $\delta(\text{ppm})$: 170.97, 170.65, 169.66, 169.00 (4C, 3x C=O OAc, 1x C=O NHAc); 133.27 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 117.21 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 70.85 (1C, C5-Glu); 70.58 (1C, C1-Glu); 70.02 (1C, C3-Glu); 67.80 (1C, C4-Glu); 61.56 (1C, C6-Glu); 50.51 (1C, C2-Glu); 32.09 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 23.17 (1C, CH_3 NHAc); 20.82, 20.73, 20.70 (1C, 3x CH_3 OAc).

3-(2'-Acetamido-2'-desoxy-3',6'-di-O-pivaloyl- α -D-glucopyranosyl)-1-propen^[384] (147)

Man löst 1.42 g (3.82 mmol) 3-(2'-Acetamido-3',4',6'-tri-O-acetyl-2'-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-1-propen **146** in 30 mL absol. Methanol und stellt mit einer 1%igen NaOMe-Lsg. in absol. Methanol einen pH-Wert von 9-10 ein. Nach 3 h Rühren neutralisiert man mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst[®] 15, filtriert ab und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird in 19 mL einer Mischung aus absol. Pyridin und absol. Dichlormethan (2:1) aufgenommen und auf -20 °C gekühlt. Dann fügt man portionsweise 939 μ L (7.64 mmol) Pivalinsäurechlorid hinzu. Man lässt sich die Reaktionslösung auf 0 °C erwärmen und rührt bei 4 °C weitere 15 h. Man verdünnt mit 100 mL Dichlormethan, wäscht die organische Phase dreimal mit je 50 mL verd. HCl-Lsg. und zweimal mit je 50 mL ges. NaCl-Lsg. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Dichlormethan i. Vak. verdampft. Man reinigt den Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOH (50:1).

Ausbeute: 1.27 g (80 % über 2 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +13.9^\circ$ (c = 0.50, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20}$ (Lit.^[384]) = +16.6° (c = 0.50 in CHCl₃); R_f = 0.09 (CH₂Cl₂/EtOH 50:1).

C₂₁H₃₅NO₇ MW: 413.51 EM: 413.2414.

ESI-MS (m/z) = 414.3 ([M+H]⁺), Ber.: 414.3; 426.3 ([M+Na]⁺), Ber.: 426.3; 452.3 ([M+K]⁺), Ber.: 452.3; 827.6 ([2M+H]⁺), Ber.: 827.5; 849.6 ([2M+Na]⁺), Ber.: 849.5.

Ber.: C 61.00 H 8.53 N 3.39

Gef.: C 61.06 H 8.47 N 3.15

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm): 6.05 (d, 1H, NH Amid, J = 8.10 Hz); 5.74 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.27-5.05 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 5.00 (t, 1H, H₃-Glu, J = 8.25 Hz); 4.47 (dd, 1H, CH_AH_B6-Glu, J = 12.12 Hz, J = 5.88 Hz); 4.24-4.11 (m, 3H, H₁-, H₂-, CH_AH_B6-Glu); 3.74 (m, 1H, H₅-Glu); 3.51 (m, 1H, H₄-Glu); 3.08 (s_b, 1H, -OH); 2.41 (m, 1H, -CH_AH_B-CH=CH₂); 2.28 (m, 1H, -CH_AH_B-CH=CH₂); 1.91 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.20 (s, 9H, 3x CH₃ Piv); 1.19 (s, 9H, 3x CH₃ Piv).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB): δ (ppm): 179.73, 179.25 (2C, C=O Piv-Ester); 169.90 (1C, C=O NHAc); 134.09 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 117.42 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 72.37, 72.22, 71.83 (3C, C₅-, C₁-, C₃-Glu); 68.49 (1C, C₄-Glu); 62.86 (1C, C₆-Glu); 51.17 (1C, C₂-Glu); 39.02, 38.90 (2C, 2x C_{quart}-Piv); 31.50 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 27.17, 27.02 (6C, 6x CH₃ Piv); 23.14 (1C, CH₃ NHAc).

3-(2'-Acetamido-2'-desoxy-4',6'-di-O-pivaloyl- α -D-galactopyranosyl)-1-propen^[384] (148)

In einer 2:1-Mischung aus absol. Pyridin und absol. Dichlormethan (8 mL) löst man 500 mg (1.21 mmol) 3-(2'-Acetamido-2'-desoxy-3',6'-di-O-pivaloyl- α -D-glucopyranosyl)-1-propen **147** und gibt dazu portionsweise 651 μ L (3.885 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid hinzu, bis laut dünnstschichtchromatographischer Analyse vollständiger Umsatz vorliegt. Dann gibt man 1.193 mL (66.13 mmol) Wasser hinzu und rührt 17 h bei Raumtemp. Die Reaktionsmischung wird mit 90 mL Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je 40 mL 1 M KHSO₄-Lsg. gewaschen. Man trocknet die organische Phase über MgSO₄ und befreit i. Vak. vom Lösemittel. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOH (50:1) $\rightarrow$ (50:0.3) gereinigt.

Ausbeute: 392 mg (78 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = +49.7^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20}$ (Lit.^[384]) = +50.1° (c = 1.00 in CHCl₃); R_f = 0.35 (CH₂Cl₂/EtOH 50:3).

C₂₁H₃₅NO₇ MW: 413.51 EM: 413.2414.

ESI-MS (m/z) = 414.2 ([M+H]⁺), Ber.: 414.2; 436.2 ([M+Na]⁺), Ber.: 436.2; 849.4 ([2M+Na]⁺), Ber.: 849.5.

Ber.: C 61.00 H 8.53 N 3.39

Gef.: C 61.12 H 8.48 N 3.15

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃, ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 5.97 (d, 1H, NHAc, J = 7.80 Hz); 5.77 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.16-5.05 (m, 3H, -CH₂-CH=CH₂, H₄-Gal); 4.64 (m_b, 1H, CH_AH_B6-Gal); 4.38 (m, 1H, H1-Gal); 4.22-4.11 (m, 2H, H2-, H5-Gal); 4.04 (dd, 2H, CH_AH_B6-, H3-Gal, J = 3.72 Hz, J = 12.12 Hz); 3.31 (s, 1H, -OH); 2.33 (m, 1H, -CH_AH_B-CH=CH₂); 2.20 (m, 1H, -CH_AH_B-CH=CH₂); 2.02 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.25 (s, 9H, 3x CH₃ Piv); 1.19 (s, 9H, 3x CH₃ Piv).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, HSQC, HMBC): δ (ppm): 178.24 (1C, C=O Piv-Ester an C6); (1C, C=O Piv-Ester an C4); 170.91 (1C, C=O NHAc); 133.89 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 117.51 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 70.71 (1C, C5-Gal); 68.52 (1C, C4-Gal); 68.04 (1C, C1-Gal (aus HSQC)); 67.79 (1C, C3-Gal); 60.74 (1C, C6-Gal); 52.08 (1C, C2-Gal); 39.12, 38.73 (2C, 2x C_{quart}-Piv); 33.16 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 27.14 (6C, 6x CH₃ Piv); 23.28 (1C, CH₃ NHAc).

3-(2'-Acetamido-2'-desoxy-3',4',6'-tri-O-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-1-propen (149)

Man löst 50 mg (0.121 mmol) 3-(2'-Acetamido-2'-desoxy-4',6'-di-O-pivaloyl- α -D-galactopyranosyl)-1-propen **148** in 10 mL absol. Methanol, stellt mit 1%iger Natriummethanolat-Lsg. einen pH-Wert von 10 ein und lässt 16 h unter Argon rühren. Man neutralisiert mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst[®] 15, filtriert ab und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Den Rückstand löst man in 5 mL einer Acetanhydrid/Pyridin-Mischung (2:1) und rührt 10 h bei Raumtemp unter Argon. Danach entfernt man die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak., kodestilliert zweimal mit je 10 mL Toluol und nimmt in 20 mL Dichlormethan auf. Man wäscht dreimal mit je 8 mL 1 M KHSO₄-Lsg. und zweimal mit je 8 mL ges. NaHCO₃-Lsg. Nach dem Trocknen über MgSO₄ verdampft man das Lösemittel i. Vakuum. Man reinigt das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 19.0 cm, Durchmesser = 1.5 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Ethylacetat (1:2).

Ausbeute: 38 mg (85 % über 2 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +83^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃), $[\alpha]_D^{20}$ (Lit.^[380]) = $+81^\circ$ (c = 1.00 in CHCl₃); R_f = 0.18 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2).

C₁₇H₂₅NO₈ MW: 371.38 EM: 371.1580.

400 MHz-¹H-NMR (MeOH-d₄; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 5.78 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂); 5.40 (t, 1H, H₄-Gal, J = 2.82 Hz); 5.16-5.06 (m, 3H, -CH₂-CH=CH₂, H₃-Gal (5.14)); 4.42 (m, 1H, H₂-Gal); 4.22-4.15 (m, 3H, H₁- (4.16), H₅- (4.20), CH_AH_B6-Gal (4.21)); 3.74 (dd, 1H, CH_AH_B6-Gal, J = 4.48 Hz, J = 10.16 Hz); 2.54 (m, 1H, -CH_AH_B-CH=CH₂); 2.24 (m, 1H, -CH_AH_B-CH=CH₂); 2.11 (s, 3H, CH₃ NHAc); 2.02 (s, 3H, 3x CH₃ OAc); 2.01 (s, 3H, 3x CH₃ OAc); 1.96 (s, 3H, 3x CH₃ OAc).

100.6 MHz-¹³C-NMR (MeOH-d₄; BB, HSQC): δ (ppm): 172.12, 170.85, 170.56, 170.32 (4C, 3x C=O OAc, 1x C=O NHAc); 134.07 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 116.22 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 72.24 (1C, C5-Gal); 68.07 (1C, C3-Gal); 68.01 (1C, C1-Gal); 67.10 (1C, C4-Gal); 61.30 (1C, C6-Gal); 47.50 (1C, C2-Gal (im Lösemittelsignal)); 30.45 (1C, -CH₂-CH=CH₂); 21.04 (1C, CH₃ NHAc); 19.32, 19.25, 19.14 (3C, 3x CH₃ OAc).

5.11 Versuche zu Kapitel 3.6.2

N-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*L*-serin-*tert*-butylester^[120, 404] (151) (Boc-Ser-OtBu)

Die Reaktion wurde gemäß der Vorschrift zur Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester **16** durchgeführt.

Eingesetzte Mengen: Boc-Ser-OH **150**: 12.00 g (58.5 mmol); *tert*-Butanol: 18.79 g (253.5 mmol); *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC): 40.17 g (194.7 mmol); Kupfer(I)chlorid: 563 mg (5.69 mmol).

Ausbeute: 12.14 g (79 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = -19.8^\circ$ ($c = 2.00$, EtOH), $[\alpha]_D^{20}$ (Lit.^[412]) = -25.0° ($c = 2.00$, EtOH); $R_f = 0.08$ (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1).

$C_{12}H_{23}NO_5$ MW: 261.32 EM: 261.1576.

Ber.: C 55.16 H 8.87 N 5.36

Gef.: C 55.12 H 8.71 N 5.37

300 MHz-¹H-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm): 5.41 (s_b , 1H, NH Urethan); 4.22 (s_b , 1H, α -CH Ser); 3.91 (d, 2H, β -CH₂ Ser, $J = 3.69$ Hz); 1.46 (s, 9H, 3 x CH₃ *t*Bu-Ester oder CH₃ Boc); 1.42 (s, 9H, 3 x CH₃ *t*Bu-Ester oder CH₃ Boc).

75.5 MHz-¹³C-NMR ($CDCl_3$; BB): δ (ppm): 169.81 (1C, C=O *t*Bu-Ester); 155.84 (1C, C=O Urethan); 82.48 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 80.04 (1C, C_{quart.}-Boc); 63.88 (1C, β -CH₂ Ser); 56.33 (1C, α -CH Ser); 28.52, 28.27, 27.95, 27.68 (6C, 3x CH₃ *t*Bu-Ester, 3x CH₃ Boc).

2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino-acrylsäure-*tert*-butylester (152) (Boc- Δ Ala-OtBu)

In 100 mL absol. Dichlormethan werden 5.00 g (19.13 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*L*-serin-*tert*-butylester **151** gelöst und mit 3.61 mL (25.72 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C tropft man 1.99 mL (25.72 mmol) Methansulfonsäurechlorid zu und rührt 5 h unter Argon bei Raumtemp. Man verdünnt mit 100 mL Ethylacetat und wäscht die organische Phase zweimal mit je 100 mL 1 M KHSO₄-Lsg., einmal mit 100 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 100 mL ges. NaCl-Lsg. Man trocknet über MgSO₄ und verdampft das Lösemittel i. Vak. Der Rückstand wird in 70 mL Dichlormethan mit 3.50 mL (3.57 g, 23.43 mmol)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7en (DBU) versetzt. Man rührt 3 h bei Raumtemp. Die Reaktionsmischung wird mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, zweimal mit je 100 mL 1 M KHSO_4 -Lsg. und einmal mit 100 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Man trocknet die organischen Phasen über MgSO_4 und entfernt das Lösemittel i. Vak. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Dichlormethan (9:1) $\rightarrow$ (1:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.28 g (92 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f(\text{Mesylat}) = 0.47$ (Cyclohexan/Ethylacetat 4:2), $R_f = 0.38$ (Cyclohexan/Ethylacetat 50:2).

$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ MW: 243.30 EM: 243.1471.

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$: 7.01 (s, 1H, NH Urethan); 6.04 (s, 1H, $=\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$); 5.61 (d, 1H, $=\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$, $J = 1.50$ Hz); 1.49 (s, 9H, 3 x CH_3 *t*Bu-Ester oder 3x CH_3 Boc); 1.45 (s, 9H, 3x CH_3 *t*Bu-Ester oder 3x CH_3 Boc).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3 ; BB): $\delta(\text{ppm})$: 163.03 (1C, C=O *t*Bu-Ester); 152.60 (1C, C=O Urethan); 132.43 (1C, C=CH₂); 103.94 (1C, C=CH₂); 82.54 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 80.40 (1C, C_{quart.}-Boc); 28.22, 27.89 (6C, 3x CH_3 *t*Bu-Ester, 3x CH_3 Boc).

2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino-3-brom-acrylsäure-*tert*-butylester^[386] (153)

Man gibt *N*-Bromsuccinimid (1.56 g, 8.79 mmol) zu einer Lösung von 2.00 g (8.22 mmol) 2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino-acrylsäure-*tert*-butylester **152** in 30 mL Dichlormethan. Nach 17 h entfernt man das Lösemittel i. Vak. und nimmt den Rückstand in 50 mL heißem *n*-Hexan auf. Man filtriert von ausgefallenem Succinimid ab und verdampft das *n*-Hexan i. Vakuum. Das zurückbleibende gelbe Öl wird in 40 mL Dichlormethan mit 2.32 mL (1.68 g, 16.61 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wird 3 h bei Raumtemp. gerührt und mit 60 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wird dreimal mit je 50 mL Wasser und einmal mit 60 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO_4 verdampft man das Lösemittel i. Vak. und reinigt die Verbindung durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 3.6 cm) im Laufmittelgemisch Cyclohexan/Dichlormethan (3:5) $\rightarrow$ (1:5).

Ausbeute: 2.08 g (78 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.19$ (Cyclohexan/Dichlormethan 1:5); $R_f(\text{Bromoiminoester}) = 0.59$ (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1).

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{BrNO}_4$ MW: 322.20 EM: 321.0576.

ESI-MS (m/z) = 344.1 ($[M+Na]^+$) (50 %), Ber.: 344.1; 346.1 ($[M+Na]^+$) (50 %), Ber.: 346.1; 665.13 ($[2M+Na]^+$) (25 %), Ber.: 665.1; 667.1 ($[2M+Na]^+$) (50 %), Ber.: 667.1; 669.1 ($[2M+Na]^+$) (25 %), Ber.: 669.1.

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm): 6.78 (s, 1H, CH); 6.08 (s, 1H, NH Urethan); 1.48 (s, 9H, 3 x CH_3 *t*Bu-Ester oder 3 x CH_3 Boc); 1.46 (s, 9H, 3 x CH_3 *t*Bu-Ester oder 3 x CH_3 Boc).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($CDCl_3$; BB, HMBC): δ (ppm): 161.17 (1C, C=O *t*Bu-Ester); 151.78 (1C, C=O Urethan); 133.78 (1C, C=CH₂); 108.39 (1C, C=CH₂); 82.81 (1C, C_{quart.}-*t*Bu-Ester); 81.34 (1C, C_{quart.}-Boc); 28.09, 27.89 (6C, 3x CH_3 *t*Bu-Ester, 3x CH_3 Boc).

(2*R,S*)-8-Acetamido-7,11-anhydro-10,12-di-*O*-pivaloyl-2,3,4,5,6-penta-desoxy-2-(*tert*-butyloxycarbonylamino)-D-threo-D-galacto-dodecansäure-*tert*-butylester (155)

Man löst unter Argon 150 mg (0.363 mmol) 3-(2'-Acetamido-2'-desoxy-4',6'-di-*O*-pivaloyl- α -D-galactopyranosyl)-1-propen **148** in 2.25 mL absol. THF und kühlt auf 0 °C ab. Dann tropft man 1.45 mL (0.725 mmol) einer 0.5 M 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (9-BBN)-Lsg. in THF zu. Man lässt auf Raumtemp. erwärmen und rührt 2 h unter Argon (DC-Kontrolle). Man verdünnt mit 0.625 mL entgastem DMF und 0.244 mL entgaster 3 M K₃PO₄-Lsg. Dann gibt man 122 mg (0.379 mmol) 2-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino-3-brom-acrylsäure-*tert*-butylester **153** sowie 15 mg (5 mol%) [1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen]-palladium(II)-chlorid-Methylenchlorid-Komplex ([PdCl₂(dppf)Cl₂(CH₂Cl₂))] hinzu und lässt 22 h unter Argon bei Raumtemp. rühren. Danach neutralisiert man mit Essigsäure, konzentriert i. Hochvak. und löst den Rückstand mit 20 mL Dichlormethan. Die organische Phase wird dreimal mit je 8 mL 2 M Zitronensäure-Lsg. gewaschen. Dann trocknet man die organische Phase über MgSO₄ und verdampft das Lösemittel i. Vakuum. Der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/Ethylacetat/EtOH (50:7:7) gereinigt.

Nach dem Verdampfen des Eluats i. Vak. und Trocknen i. Hochvak. löst man den verbleibenden Feststoffes (ca. 160 mg), der noch ca. 15 % bororganische Verunreinigungen enthält, in 14 mL Methanol und entgast die Lösung. Dann gibt man 139 mg (0.145 mmol) Wilkinson-Katalysator ([RhCl(PPh₃)₃]) hinzu und entgast nochmals durch zehnminütiges Durchleiten eines Argonstromes. Im Falle des Pearlman-Katalysators (Pd(OH)₂/C (10 %)) entgast man das Lösemittel Ethylacetat mit einem äquimolaren Zusatz an HOAc und der Substanz und gibt dann 60 mg Katalysator hinzu. Im Anschluss wird nochmals entgast.

Man tauscht dann die Argon-Atmosphäre gegen Wasserstoff aus (H₂-Ballon) aus und leitet 4 Tage einen leichten Wasserstoffstrom durch die Reaktionslösung. Man verdampft das Lösemittel i. Vak. bzw. im Falle des Pearlman's-Katalysator filtriert man über eine dünne Schicht Kieselgel ab und entfernt im Anschluss das Lösemittel i. Vak. Das Rohprodukt wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/Ethylacetat/EtOH (50:7:7).

Ausbeute: 110 mg (46 % über 3 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = +40.26^\circ$ (c = 1.00, MeOH); $R_f = 0.23$ (CH₂Cl₂/EtOH 50:2), $R_t = 17.04$ min (Säule B, Gradient: 65 % B nach 70 % B in 30 min), $R_t = 50.51$ -51.63 min (Säule F, Gradient: 40 % B nach 65 % B in 90 min, Fluss: 25 mL/min, 216 nm).

C₃₃H₅₈N₂O₁₁ MW: 658.82 EM: 658.4041.

ESI-MS (m/z) = 659.3 ([M+H]⁺), Ber.: 659.4; 681.2 ([M+Na]⁺), Ber.: 681.4; 697.1 ([M+K]⁺), Ber.: 697.44.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 5.93 (d, 1H, NHAc, J = 5.55 Hz); 5.14 (m, 1H, H4-Gal); 5.08 (t, 1H, NH Urethan, J = 6.15 Hz); 4.57 (m_b, 1H, CH_AH_B6-Gal); 4.25 (m, 1H, H1-Gal); 4.20-3.96 (m, 5H, α-CH (4.15), H2- (4.17), H5- (4.08), CH_AH_B6- (4.04), H3-Gal (3.99)); 3.08 (m, 1H, -OH); 2.02 (s, 3H, CH₃ NHAc); 1.68 (m, 1H, β-CH_AH_B); 1.61-1.24 (m, 25H, β-CH_AH_B (1.58), γ-CH₂ (1.34), δ-CH₂ (1.35), ε-CH_AH_B (1.54), ε-CH_AH_B (1.33), 3x CH₃ Boc, 3x CH₃-tBu-Ester (1.46, 1.44)); 1.25 (s, 9H, 3x CH₃ Piv); 1.19 (s, 9H, 3x CH₃ Piv).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, HSQC, HMBC): δ(ppm): 178.14, 178.12 (2C, C=O Piv); 171.95 (1C, C=O tBu-Ester); 170.95 (1C, C=O NHAc); 155.42 (1C, C=O Urethan); 81.76 (1C, C_{quart.}-tBu-Ester); 79.59 (1C, C_{quart.}-Boc); 70.09 (1C, C5-Gal); 69.00 (1C, C1-Gal (aus HSQC)); 68.72 (1C, C4-Gal); 67.90 (1C, C3-Gal); 61.00 (1C, C6-Gal); 53.72 (1C, α-CH); 52.09 (1C, C2-Gal); 39.14, 38.72 (2C, 2x C_{quart.}-Piv); 32.87 (1C, β-CH₂); 28.34 (3C, 3x CH₃ tBu-Ester); 28.01 (3C, 3x CH₃ Boc); 27.17 (6C, 6x CH₃ Piv); 25.32, 25.06 (3C, γ-CH₂, δ-CH₂, ε-CH₂); 23.30 (1C, CH₃ NHAc).

(2*R,S*)-8-Acetamido-7,11-anhydro-9,10,12-tri-*O*-acetyl-2,3,4,5,6-pentadesoxy-2-((9*H*-fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamino)-*D*-threo-*D*-galacto-dodecansäure (157)

Man löst 150 mg (0.228 mmol) (2*R,S*)-8-Acetamido-7,11-anhydro-10,12-di-*O*-pivaloyl-2,3,4,5,6-pentadesoxy-2-(*tert*-butyloxycarbonylamino)-*D*-threo-*D*-galacto-dodecansäure-*tert*-butylester **155** in 35 mL absol. MeOH und stellt mit einer 5%igen methanolischen NaOMe-Lsg. einen pH-Wert von 10 ein. Man rührt die Reaktionslösung 16 h bei Raumtemp. unter Argon, neutralisiert mit saurem Ionenaustauscher Amberlyst[®], filtriert ab und wäscht den Filterkuchen mit 80 mL MeOH. Man befreit die Mischung i. Vak. vom Lösemittel, löst den Rückstand in 30 mL Pyridin/Acetanhydrid (2:1) und rührt 14 h bei Raumtemp. unter Argon. Das Pyridin/Acetanhydrid-Gemisch wird i. Hochvak. entfernt. Man kodestilliert einmal mit 60 mL Toluol, nimmt das verbleibende Öl in 50 mL Dichlormethan auf und wäscht mit 10 mL 1 M KHSO₄-Lsg. und mit 10 mL ges. NaHCO₃-Lsg. Das Lösemittel wird i. Vak. verdampft und der Rückstand mit 20 mL TFA und 0.7 mL Wasser 2 h bei Raumtemp. gerührt. Im Anschluss verdünnt man mit 30 mL Toluol und befreit die Reaktionslösung i. Hochvak. von den flüchtigen Bestandteilen. Nach dreimaliger Kodestillation mit je 35 mL Toluol lyophilisiert man. Das Lyophilisat wird in 5 mL einer Dioxan/Wasser-Mischung (1:3) gelöst, mit 59 mg (0.706 mmol) NaHCO₃ sowie mit 135 mg (0.400 mmol) Fmoc-OSu, gelöst in 4 mL Dioxan, versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 18 h wird vom Dioxan befreit und lyophilisiert. Man verteilt das Lyophilisat zwischen 10 mL 1 M KHSO₄-Lsg. und 20 mL Dichlormethan und extrahiert die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL Dichlormethan und dreimal mit je 10 mL Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingedampft. Man reinigt das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 26.0 cm, Durchmesser = 2.0 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:0.5:0.5) → (50:3:0.5).

Ausbeute: 69 mg (44 % über 4 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{20} = +45.18^\circ$ (*c* = 0.68, MeOH); *R_f* = 0.32 (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc (50:0.5:0.5)).

C₃₅H₄₂N₂O₁₂ MW: 682.71 EM: 682.2738.

ESI-MS (*m/z*) = 721.4 ([*M*+*K*]⁺), Ber.: 721.3; 705.1 ([*M*+*Na*]⁺), Ber.: 705.3.

400 MHz-¹H-NMR (CDCl₃; ¹H-¹H-COSY): δ(ppm): 7.83 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, *J* = 7.35 Hz); 7.72 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.46-7.41 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc); 7.38-7.32 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc); 5.39 (m, 1H, H4-Gal); 5.15 (m, 1H, H3-Gal); 4.46 (m, 1H, H2-Gal); 4.39 (m, 2H, CH₂-Fmoc); 4.29-4.07 (m, 6H, CH_AH_B6- (4.22), H1- (4.13), H5- (4.17), CH_AH_B6-Gal (4.09),

α -CH (4.16), H9-Fmoc (4.23)); 2.13 (s, 3H, CH₃ OAc); 2.07-1.85 (m, 10H, CH₃ NHAc, 2x CH₃ OAc, β -CH_AH_B (1.87)); 1.84-1.24 (m, 7H, β -CH_AH_B (1.72), γ -CH₂, δ -CH₂, ϵ -CH₂).

100.6 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃; BB, HSQC): δ (ppm): 176.02, 173.53, 172.30, 172.02, 171.80 (5C, 3x C=O OAc, 1x C=O NHAc, -COOH); 156.68 (1C, C=O Urethan); 145.44, 145.18 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 142.61 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 128.84, 128.80 (2C, C3-, C6-Fmoc); 128.20, 128.17 (2C, C2-, C7-Fmoc); 126.30 (2C, C1-, C8-Fmoc); 120.96 (2C, C4-, C5-Fmoc); 74.06 (1C, C1-Gal); 69.58 (1C, C3-Gal); 68.59 (1C, C4-Gal); 67.95 (1C, CH₂-Fmoc); 62.84 (1C, C6-Gal); 55.05 (1C, α -CH); 52.17 (1C, C5-Gal); 48.82 (1C, C2-Gal (im Lösemittelsignal)); 47.95 (1C, C9-Fmoc (im Lösemittelsignal)); 32.60 (1C, β -CH₂); 26.57, 26.39, 26.03 (3C, γ -CH₂, δ -CH₂, ϵ -CH₂); 22.48 (1C, CH₃ NHAc); 20.74, 20.65, 20.56 (3C, 3x CH₃ OAc).

5.12 Versuche zu Kapitel 3.6.3

(*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-9-amino-4,7-dioxa-nonansäure (159)

(FmocNH(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂COOH)

Man löst 4.00 g (17.15 mmol) 9-Amino-4,7-dioxa-nonansäure-*tert*-butylester **107** in 75 mL einer Dioxan/Wasser-Mischung und versetzt mit 1.45 g (17.20 mmol) NaHCO₃ und 6.65 g (19.72 mmol) Fmoc-OSu. Man lässt 16 h rühren und entfernt die Lösemittel i. Vak. Man nimmt das verbleibende Öl in 150 mL Dichlormethan auf. Die organische Phase wird zweimal mit je 100 mL Wasser und einmal mit 100 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und wird über MgSO₄ getrocknet. Man reinigt nach Eindampfen i. Vak. den Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) Cyclohexan/Ethylacetat (7:1) → Ethylacetat. Man löst 5.53 g der erhaltenen Verbindung in 50 mL TFA und 2 mL Wasser und lässt 1 h bei Raumtemp. rühren. Man entfernt die flüchtigen Bestandteile i. Hochvak. und kodestilliert dreimal mit je 100 mL Toluol. Der bräunliche Rückstand wird an Kieselgel (Säulendimensionen: Länge = 30.0 cm, Durchmesser = 5.5 cm) im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH (30:30:0.4) gereinigt.

Ausbeute: 4.51 g (66 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_f (Ester) = 0.20 (CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH 50:5:0.5), R_f (-COOH) = 0.06 (CH₂Cl₂/EtOAc/AcOH 50:5:0.5).

C₂₂H₂₅NO₆ MW: 399.44 EM: 399.1682.

ESI-MS (m/z) = 400.2 ($[M+H]^+$), Ber.: 400.2; 422.2 ($[M+Na]^+$), Ber.: 422.2; 438.2 ($[M+K]^+$), Ber.: 438.2; 821.4 ($[2M+Na]^+$), Ber.: 821.3.

Ber.: C 66.15 H 6.31 N 3.51

Gef.: C 66.08 H 6.41 N 3.50

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ (ppm): 7.65 (d, 2H, d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $J = 7.27$ Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.37 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, $J = 7.35$ Hz); 5.40 (s_b, 1H, NH Urethan); 4.42 (m, 2H, CH₂-Fmoc); 4.20 (m, 1H, H9-Fmoc); 3.74 (t, 2H, -CH₂-CH₂-COOH, $J = 5.88$ Hz); 3.75-3.30 (m, 8H, 2x -CH₂O-, -NH-CH₂-CH₂-); 2.60 (t, 2H, -CH₂-COOH, $J = 6.24$ Hz).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($CDCl_3$; BB): δ (ppm): 175.59 (1C, -COOH); 156.60 (1C, C=O Urethan); 143.96 (2C, C8a-, C9a-Fmoc); 141.28 (2C, C4a-, C4b-Fmoc); 127.65 (2C, C3-, C6-Fmoc); 127.04 (2C, C2-, C7-Fmoc); 125.08 (2C, C1-, C8-Fmoc); 119.94 (2C, C4-, C5-Fmoc); 70.32, 70.04 (3C, 3x -CH₂O-); 66.68 (1C, CH₂-Fmoc); 66.32 (1C, -CH₂-CH₂-COOH); 47.21 (1C, C9-Fmoc); 40.88 (1C, -NH-CH₂-); 34.71 (1C, -CH₂-COOH).

***N*-Acetyl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl-L-isoleucylamido-4,7-dioxa-nonanylamido-N-glycyl-L-valyl-L-threonyl-*N*²-(8-acetamido-7,11-anhydro-2,3,4,5,6-pentadesoxy-2-amino-D-threo-D-galacto-dodecanoyl)-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (160)**

Die automatisierte Glycopeptid-Festphasensynthese wird mit 196 mg (0.1 mmol) Fmoc-L-Ala-HMPB-BHA-Harz **86** (Beladung: 0.51 mmol/g) nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll durchgeführt. Für den Einbau der Glycosylaminosäure **157** wird die automatisierte Synthese nach erfolgter Fmoc-Abspaltung gestoppt und das Harz mit einer extern angesetzten Lösung aus 89 mg (0.13 mmol) Glycosylaminosäure **157**, 49 mg (0.13 mmol) HATU, 18 mg (0.13 mmol) HOAt, 45 μ l (34 mg, 0.26 mmol) DIPEA in 2 mL *N*-Methylpyrrolidin-2-on versetzt und 6 h geschüttelt. Nach Beendigung der Kupplung werden die überschüssigen Reagenzien abfiltriert und das Harz wird mit *N*-Methylpyrrolidin-2-on gewaschen und anschließend mit Capping-Reagenz versetzt. Die Anknüpfung der verbleibenden Aminosäuren erfolgt wieder nach dem allgemeinen Kupplungsprotokoll.

Nach der letzten Kupplung wird die aminoterminal Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidin-2-on entfernt und der freie Aminoterminus wird mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Abspaltung des Glycopeptids vom Harz findet gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift statt.

Zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen löst man das Glycopeptid in 25 mL einer Trifluoressigsäure/Anisol/Wasser-Mischung (25:0.9:0.9) und rührt 2 h bei Raumtemperatur. Danach verdünnt man mit 20 mL Toluol und entfernt die Lösemittel i. Vakuum. Es wird anschließend dreimal mit je 15 mL Toluol kodestilliert. Man digeriert den zurückbleibenden Rückstand dreimal mit je 10 mL *n*-Pentan und viermal mit je 12 mL Diethylether. Die Hälfte der Menge des farblosen, amorphen Rohproduktes wird in 25 mL absol. MeOH aufgenommen und mit einer 1%igen NaOMe-Lsg. in absol. MeOH auf pH = 9 eingestellt. Man rührt die Reaktionslösung 12 h bei Raumtemp. unter Argon. Dann neutralisiert man mit Trifluoressigsäure (5 % in MeOH) und entfernt das Lösemittel i. Vak. Der resultierende Feststoff wird durch präparativer RP-HPLC gereinigt.

Ausbeute: 14 mg (9 % auf halben Ansatz bezogen, über 57 Stufen); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{23} = -74.47^\circ$ ($c = 0.40$, H₂O); $R_t = 12.17$ min (Säule C, Gradient: 5 % D nach 100 % D in 20 min), $R_t = 37.60$ -43.06 min (Säule G, Gradient: 5 % D (25 min isokratisch) nach 100 % D in 65 min).

C₁₄₆H₂₂₉N₃₃O₄₈

MW: 3214.57 g/mol

EM: 3212.6493

ESI-MS (m/z) = 1086.93 ($[M+2Na+H]^3+/3$), Ber.: 1086.88; 1618.89 ($[M+Na+H]^{2+}/2$), Ber.: 1618.83.

HR-MS (m/z) = 1607.8297 ($[M+2H]^{2+}/2$), Ber.: 1607.8341; 1608.3311 ($[M+2H]^{2+}/2$), Ber.: 1608.3358; 1607.3330 ($[M+2H]^{2+}/2$), Ber.: 1607.3325.

400 MHz-¹H-NMR (D₂O; ¹H-¹H-COSY): δ (ppm): 7.15-7.05 (m, 5H, CH_{arom.}-Phe); 6.94 (d, 2H, δ -CH1-, δ -CH2-Tyr, $J = 7.80$ Hz); 6.89 (d, 2H, δ -CH1-, δ -CH2-Tyr, $J = 8.60$ Hz); 6.64 (d, 4H, 2x ϵ -CH1-, 2x ϵ -CH2-Tyr, $J = 8.40$ Hz); 4.67 (m, 1H, α -CH Asp (im Lösemittelsignal)); 4.62 (m, 1H, α -CH Lys); (m, 1H, α -CH Arg); 4.50-4.15 (m, 18H, 3x α -CH Ala (4.45, 4.23), 3x α -CH Ser (4.35, 4.25), α -CH_{Tn} (4.18), 4x α -CH Pro (4.29), 4x α -CH Thr (4.25, 4.20), 2x α -CH Tyr und α -CH Phe (4.48-4.40)); 4.13-3.90 (m, 10H, 2x α -CH Val (4.05), 4x β -CH Thr (4.13, 4.08, 4.01), H1- (3.92), H2-Gal (4.06), 2x α -CH Ile (4.11, 3.98)); 3.89-3.35 (m, 31H, H3- (3.74), H4- (3.82), H5- (3.60), -CH₂6-Gal (3.59), 2x α -CH₂ Gly (3.86), 4x δ -CH_AH_B Pro (3.72), 4x δ -CH_AH_B Pro (3.50), 3x β -CH₂ Ser (3.74), -O-CH₂-CH₂-CONH- (3.66), -CONH-CH₂-CH₂-O- (3.47), -O-CH₂-CH₂O- (3.53)); 3.31 (m, 1H, -CONH-CH_AH_B-CH₂-O-); 3.22 (m, 1H, -CONH-CH_AH_B-CH₂-O-); 3.08 (m, 2H, δ -CH₂ Arg);

2.96 (m, β -CH_AH_B Asp); 2.90-2.63 (m, 9H, 2x β -CH₂ Tyr, β -CH₂ Phe, ϵ -CH₂ Lys (2.80), β -CH_AH_B Asp (2.78)); 2.76 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CONH-); 2.47 (t, 2H, -CH₂-CONH); 2.25-2.05 (m, 4H, 4x β -CH_AH_B Pro); 2.01-1.71 (m, 20H, 2x CH₃ NHAc (1.89, 1.95), 2x β -CH Val (1.95), 4x γ -CH₂ Pro (1.88), 4x β -CH_AH_B Pro (1.79)); 1.70-1.58 (m, 6H, 2x β -CH Ile, β -CH₂ Arg (1.63), β -CH₂ Lys); 1.57-1.40 (m, 9H, γ -CH₂ Arg (1.55), 2x γ -CH₂ Ile (1.51), δ -CH₂ Lys (1.56), β -CH₂Tn (1.56)); 1.35-1.09 (m, 17H, 3x β -CH₃ Ala (1.29, 1.23), γ -CH₂ Lys (1.14), γ -CH₂Tn, δ -CH₂Tn, ϵ -CH₂Tn (1.29)); 1.10-1.04 (m, 12H, 4x γ -CH₃ Thr); 0.82-0.61 (m, 24H, 4x γ -CH₃ Val (0.81), 2x γ -CH₃ Ile (0.77, 0.67), 2x δ -CH₃ Ile (0.70)).

100.6 MHz-¹³C-NMR (D₂O; BB, HSQC): δ (ppm): 130.44 (4C, 2x C2-, 2x C6-Tyr); 129.31, 128.59 (4C, 2x CH_{ortho}-, 2x CH_{meta}-Phe); 127.13 (1C, CH_{para}-Phe); 115.28 (4C, 2x C3-, 2x C5-Tyr); 73.24 (1C, C1-Gal); 71.29 (1C, C5-Gal); 69.34 (2C, -O-CH₂-CH₂O-); 68.69 (1C, -CONH-CH₂-CH₂-); 68.35 (1C, C4-Gal); 67.36 (C3-Gal); 66.93 (4C, 4x β -CH Thr); 66.41 (1C, -CH₂-CH₂-CONH-); 61.04 (1C, C6-Gal); 60.96 (3C, 3x β -CH₂ Ser); 60.38 (4C, 4x α -CH Pro); 59.32 (2C, α -CH Val, 1x α -CH Ile); 58.85 (4C, 4x α -CH Thr); 58.10 (1C, 1x α -CH Ile); 55.35, 55.10, 54.90 (6C, α -CH Phe, 3x α -CH Ser, 2x α -CH Ser); 53.22 (1C, α -CH_{Tn}); 52.35 (1C, α -CH Asp); 51.01 (1C, α -CH Arg); 50.06 (1C, α -CH Lys); 49.76 (1C, C2-Gal); 48.89 (1C, 1x α -CH Ala); 47.61 (3C, 3x δ -CH₂ Pro); 48.89 (2C, 2x α -CH Ala); 42.27 (2C, 2x α -CH₂ Gly); 40.40 (1C, δ -CH₂ Arg); 39.08 (1C, ϵ -CH₂ Lys); 38.73 (1C, -NH-CH₂-CH₂-O); 36.69 (1C, β -CH₂ Asp); 35.15, 36.38 (3C, β -CH₂ Phe, 2x β -CH₂ Tyr); 35.97 (2C, 2x β -CH Ile); 35.62 (1C, -CH₂-CONH); 30.29 (1C, β -CH₂Tn); 30.06 (2C, 2x β -CH Val); 29.39 (1C, δ -CH₂ Lys); 29.20 (3C, 3x β -CH₂ Pro); 27.40 (1C, β -CH₂ Arg); 26.11 (2C, 2x γ -CH₂ Ile); 24.49 (4C, 4x γ -CH₂ Pro); 24.31 (3C, γ -CH₂Tn, δ -CH₂Tn, ϵ -CH₂Tn); 23.90 (1C, γ -CH₂ Arg); 21.92, 21.41 (2C, 2x CH₃ NHAc); 18.69 (4C, 4x γ -CH₃ Thr); 18.63 (1C, γ -CH₂ Lys); 17.98 (4C, 4x γ -CH₃ Val); 16.11, 15.17 (3C, 3x β -CH₃ Ala); 14.54 (2C, 2x γ -CH₃ Ile); 10.03 (2C, 2x δ -CH₃ Ile).

6. Literaturverzeichnis

- [1] C. R. Parish, *Immunol. Cell. Biol.* **2003**, *81*, 106-113.
- [2] A. Perez-Diez, F. M. Marincola, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 230-240.
- [3] S. A. Rosenberg, J. C. Yang, N. P. Restifo, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 909-915.
- [4] Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289-294.
- [5] T. F. Greten, E. M. Jaffee, *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1047-1060.
- [6] A. Paschen, S. Eichmüller, D. Schadendorf, *Cancer Immunol. Immunother.* **2004**, *53*, 196-203.
- [7] R. Offringa, S. H. van der Burg, F. Ossendorp, R. E. Toes, C. J. Melief, *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*, 576-582.
- [8] F. K. Stevenson, *FASEB J.* **1991**, *5*, 2250-2257.
- [9] K. N. Srinivasan, V. Brusic, T. J. August, *Drug Dev. Res.* **2004**, *62*, 383-392.
- [10] K. L. Knutson, M. L. Disis, *Cancer Immunol. Immunother.* **2005**, *54*, 721-728.
- [11] W. Zauner, K. Lingnau, F. Mattner, A. Von Gabain, M. Buschle, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 581-595.
- [12] C. J. Melief, R. Offringa, R. E. Toes, W. M. Kast, *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, *8*, 651-657.
- [13] K.-H. Wiesmüller, B. Fleckenstein, G. Jung, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 571-579.
- [14] G. Parmiani, C. Castelli, P. Dalerba, R. Mortarini, L. Rivoltini, M. Marincola Francesco, A. Anichini, *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 805-818.
- [15] W. B. Coley, *Am. J. Med. Sci.* **1893**, *105*, 487-511.
- [16] H. Veelken, *Der Internist* **2001**, *42*, 874-883.
- [17] A. R. Robins, R. C. Rees, *Cancer Immunology*, Vol. 30, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, **2001**.
- [18] G. Stuhler, P. Walden, *Cancer Immune Therapy*, 1 ed., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2002**.
- [19] T. Renno, S. Lebecque, N. Renard, S. Saeland, A. Vicari, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 1296-1310.
- [20] M. L. Disis, K. H. Grabstein, P. R. Sleath, M. A. Cheever, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1289-1297.
- [21] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [22] P. Roussel, G. Lamblin, *Glycoproteins and Disease*, Vol. 30, Elsevier, Amsterdam, **1996**.
- [23] P. L. Nguyen, G. A. Niehans, D. L. Cherwitz, Y. S. Kim, S. B. Ho, *Tumour Biol.* **1996**, *17*, 176-192.
- [24] J. Dekker, J. W. A. Rossen, H. A. Buller, A. W. C. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 126-131.
- [25] O. J. Finn, K. R. Jerome, R. A. Henderson, G. Pecher, N. Domenech, J. Magarian-Blander, S. M. Barratt-Boyes, *Immunol. Rev.* **1995**, *145*, 61-89.
- [26] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- [27] S. J. Gendler, J. M. Burchell, T. Duhig, D. Lampion, R. White, M. Parker, J. Taylor-Papadimitriou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6060-6064.
- [28] K. Engelmann, S. E. Baldus, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27764-27769.
- [29] S. Müller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A. M. Lawson, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24780-24793.
- [30] J. Julian, D. D. Carson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 1183-1190.
- [31] F. Levitin, O. Stern, M. Weiss, C. Gil-Henn, R. Ziv, Z. Prokocimer, N. I. Smorodinsky, D. B. Rubinstein, D. H. Wreschner, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33374-33386.
- [32] T. Palmi-Pallag, N. Khodabukus, L. Kinarsky, S.-H. Leir, S. Sherman, M. A. Hollingsworth, A. Harris, *FEBS J.* **2005**, *272*, 2901-2911.
- [33] S. Zrihan-Licht, A. Baruch, O. Elroy-Stein, I. Keydar, D. H. Wreschner, *FEBS Lett.* **1994**, *356*, 130-136.
- [34] M. Yamamoto, A. Bharti, Y. Li, D. Kufe, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12492-12494.
- [35] Y. Li, A. Bharti, D. Chen, J. Gong, D. Kufe, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 7216-7224.
- [36] M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45-60.
- [37] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 1072-1076.
- [38] R. A. Graham, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, *Cancer Immunol. Immunother.* **1996**, *42*, 71-80.
- [39] R. Lev, *Lab. Invest.* **1965**, *14*, 2080-2100.
- [40] P. B. Hukill, R. A. Vidone, *Lab. Invest.* **1965**, *14*, 1624-1635.
- [41] A. P. Spicer, G. J. Rowse, T. K. Lidner, S. J. Gendler, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30093-30101.
- [42] M. A. McGuckin, M. D. Walsh, B. G. Hohn, B. G. Ward, R. G. Wright, *Hum. Pathol.* **1995**, *26*, 432-439.
- [43] R. S. Bresalier, Y. Niv, J. C. Byrd, Q. Y. Duh, N. W. Toribara, R. W. Rockwell, R. Dahiya, Y. S. Kim, *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 1037-1045.
- [44] H. Kobayashi, T. Terao, Y. Kawashima, *J. Clin. Oncol.* **1992**, *10*, 95-101.

- [45] S. Nakamori, D. M. Ota, K. R. Cleary, K. Shirotani, T. Irimura, *Gastroenterology* **1994**, *106*, 353-361.
- [46] M. J. L. Ligtenberg, F. Buijs, H. L. Vos, J. Hilken, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2318-2324.
- [47] J. Wesseling, S. W. van der Valk, H. L. Vos, A. Sonnenberg, J. Hilken, *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 255-265.
- [48] S. Zotter, P. C. Hageman, A. Lossnitzer, J. van den Tweel, J. Hilken, W. J. Mooi, J. Hilgers, *Int. J. Cancer* **1988**, *3*, 38-44.
- [49] S. E. Baldus, K. Engelmann, F.-G. Hanisch, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2004**, *41*, 189-231.
- [50] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Bruchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607-617.
- [51] M. A. Baker, A. Kanani, I. Brockhausen, H. Schachter, A. Hindenburg, R. N. Taub, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 2763-2766.
- [52] T. Toyokuni, A. K. Singhal, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 231-242.
- [53] F. J. Irazoqui, P. H. Lopez, M. A. Vides, G. A. Nores, *Glycobiology* **2000**, *10*, 781-787.
- [54] T. Kjeldsen, H. Clausen, S. Hirohashi, T. Ogawa, H. Iijima, S. Hakomori, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2214-2220.
- [55] T. F. Orntoft, N. Harving, N. C. Langkilde, *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 666-672.
- [56] C. Petrarca, A. Ruggetti, H. Rahimi, F. D'Agostini, V. Turchi, C. Apollonj Ghetti, G. Scambia, L. Frati, M. Nuti, *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 2155-2163.
- [57] S. Adluri, T. Gilewski, S. Zhang, V. Ramnath, G. Ragupathi, P. Livingston, *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1806-1812.
- [58] S. von Mensdorff-Pouilly, M. M. Gourevitch, P. Kenemans, A. A. Verstraeten, S. V. Litvinov, G. J. van Kamp, S. Meijer, J. Vermorken, J. Hilgers, *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 1325-1331.
- [59] N. Domenech, R. A. Henderson, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4766-4774.
- [60] J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Millis, D. Lamport, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476-5482.
- [61] K.-Y. Tsang, C. Palena, J. Gulley, P. Arlen, J. Schlom, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 2139-2149.
- [62] L. H. Regimbald, L. M. Pilarski, B. M. Longenecker, M. A. Reddish, G. Zimmermann, J. C. Hugh, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4244-4249.
- [63] C. M. Bohm, M. C. Mulder, R. Zennadi, M. Notter, A. Schmitt-Graeff, O. J. Finn, J. Taylor-Papadimitriou, H. Stein, H. Clausen, E. O. Riecken, C. Hanski, *Scand. J. Immunol.* **1997**, *46*, 27-34.
- [64] D. Nath, A. Hartnell, L. Happerfield, D. W. Miles, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, P. R. Crocker, *Immunology* **1999**, *98*, 213-219.
- [65] K. Zhang, R. Sikut, G. C. Hansson, *Cell. Immunol.* **1997**, *176*, 158-165.
- [66] D. L. Barnd, M. S. Lan, R. S. Metzgar, O. J. Finn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7159-7163.
- [67] C. G. Ioannides, R. S. Freedman, C. D. Platsoucas, S. Rashed, Y. P. Kim, *J. Immunol.* **1991**, *146*, 1700-1707.
- [68] C. G. Ioannides, B. Fisk, K. R. Jerome, T. Irimura, J. T. Wharton, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 3693-3703.
- [69] K. R. Jerome, N. Domenech, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 1654-1662.
- [70] V. Apostolopoulos, B. E. Loveland, G. A. Pietersz, I. F. C. McKenzie, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 5089-5094.
- [71] K. R. Jerome, D. L. Barnd, K. M. Bendt, C. M. Boyer, J. Taylor-Papadimitriou, I. F. McKenzie, R. C. Bast, Jr., O. J. Finn, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2908-2916.
- [72] Y. Kotera, J. D. Fontenot, G. Pecher, R. S. Metzgar, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 2856-2860.
- [73] Y. Hinoda, N. Nakagawa, H. Nakamura, Y. Makiguchi, F. Itoh, M. Adachi, T. Yabana, K. Imai, A. Yachi, *Immunol. Lett.* **1993**, *35*, 163-168.
- [74] S. Von Mensdorff-Pouilly, A. A. Verstraeten, P. Kenemans, F. G. M. Snijdwint, A. Kok, G. J. Van Kamp, M. A. Paul, P. J. Van Diest, S. Meijer, J. Hilgers, *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 574-583.
- [75] J. Taylor-Papadimitriou, M. Burchell Joy, T. Plunkett, R. Graham, I. Correa, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 209-221.
- [76] D. W. Miles, J. Taylor-Papadimitriou, *Expert Opin. Invest. Drugs* **1998**, *7*, 1865-1877.
- [77] J. He, D. Shen, A. O'Donnell Michael, R. Chang Helena, *Int. J. Oncol.* **2002**, *20*, 1305-1311.
- [78] R. A. Graham, J. M. Burchell, P. Beverley, J. Taylor-Papadimitriou, *Int. J. Cancer* **1996**, *65*, 664-670.
- [79] S. Koido, M. Kashiwaba, D. Chen, S. Gendler, D. Kufe, J. Gong, *J. Immunol.* **2000**, *165*, 5713-5719.
- [80] G. Pecher, O. J. Finn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1699-1704.
- [81] A. J. Pantuck, A. van Ophoven, B. J. Gitlitz, C.-L. Tso, B. Acres, P. Squiban, M. E. Ross, A. S. Beldegrun, R. A. Figlin, *J. Immunother.* **2004**, *27*, 240-253.
- [82] J. Akagi, J. W. Hodge, J. P. McLaughlin, L. Gritz, G. Mazzara, D. Kufe, J. Schlom, J. A. Kantor, *J. Immunother.* **1997**, *20*, 38-47.
- [83] J. M. Balloul, R. B. Acres, M. Geist, K. Dott, L. Stefani, D. Schmitt, R. Drillien, D. Spehner, I. McKenzie, P. X. Xing, *Cell. Mol. Biol.* **1994**, *40 Suppl 1*, 49-59.

- [84] M. Hareuveni, C. Gautier, M. P. Kieny, D. Wreschner, P. Chambon, R. Lathe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9498-9502.
- [85] R. A. Graham, L. S. Stewart, N. P. Peat, P. Beverley, J. Taylor-Papadimitriou, *Tumor Targeting* **1995**, *1*, 211-221.
- [86] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1986**, *98*, 354-355.
- [87] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 836-863.
- [88] T. Toyokuni, S. Hakomori, A. K. Singhal, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1119-1132.
- [89] Y. Pan, P. Chefalo, N. Nagy, C. Harding, Z. Guo, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 875-883.
- [90] S. J. Danishefsky, V. Behar, J. T. Randolph, K. O. Lloyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5701-5711.
- [91] P. W. Glunz, S. Hintermann, L. J. Williams, J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, V. Kudryashov, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7273-7279.
- [92] K. Kitamura, E. Stockert, P. Garin-Chesa, S. Welt, K. O. Lloyd, K. L. Armour, T. P. Wallace, W. J. Harris, F. J. Carr, L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12957-12961.
- [93] V. Kudryashov, P. W. Glunz, L. J. Williams, S. Hintermann, S. J. Danishefsky, K. O. Lloyd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3264-3269.
- [94] G. D. MacLean, M. A. Reddish, R. R. Koganty, B. M. Longenecker, *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* **1996**, *19*, 59-68.
- [95] L. A. Holmberg, D. V. Oparin, T. Gooley, K. Lilleby, W. Bensinger, M. A. Reddish, G. D. MacLean, B. M. Longenecker, B. M. Sandmaier, *Bone Marrow Transplant.* **2000**, *25*, 1233-1241.
- [96] J. S. Goydos, E. Elder, T. L. Whiteside, O. J. Finn, M. T. Lotze, *J. Surg. Res.* **1996**, *63*, 298-304.
- [97] S. M. Barratt-Boyes, A. Vlad, O. J. Finn, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1918-1924.
- [98] T. Gilewski, S. Adluri, G. Ragupathi, S. Zhang, T.-J. Yao, K. Panageas, M. Moynahan, A. Houghton, L. Norton, P. O. Livingston, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1693-1701.
- [99] M. A. Reddish, G. D. Maclean, R. R. Koganty, J. Kan-Mitchell, V. Jones, M. S. Mitchell, B. M. Longenecker, *Int. J. Cancer* **1998**, *76*, 817-823.
- [100] E. Andersson, P. Henderikx, E. Krambovitis, H. R. Hoogenboom, C. A. Borrebaeck, *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, *47*, 249-256.
- [101] D. Avichezer, J. Taylor-Papadimitriou, R. Arnon, *Cancer Biochem. Biophys.* **1998**, *16*, 113-128.
- [102] K. D. Newman, D. L. Sosnowski, G. S. Kwon, J. Samuel, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1421-1427.
- [103] P. Mukherjee, S. Madsen Cathy, R. Ginardi Amelia, L. Tinder Teresa, F. Jacobs, J. Parker, B. Agrawal, B. M. Longenecker, J. Gendler Sandra, *J. Immunother.* **2003**, *26*, 47-62.
- [104] V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, P. X. Xing, C. J. Lees, M. Michael, J. Bishop, I. F. McKenzie, *Cancer Lett.* **1995**, *90*, 21-26.
- [105] V. Apostolopoulos, V. Karanikas, J. S. Haurum, I. F. C. McKenzie, *J. Immunol.* **1997**, *159*, 5211-5218.
- [106] V. Karanikas, L. A. Hwang, J. Pearson, C. S. Ong, V. Apostolopoulos, H. Vaughan, P. X. Xing, G. Jamieson, G. Pietersz, B. Tait, R. Broadbent, G. Thynne, I. F. McKenzie, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2783-2792.
- [107] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 366-369.
- [108] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7630-7635.
- [109] I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1999**, *1473*, 67-95.
- [110] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355-364.
- [111] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 618-621.
- [112] B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777-8778.
- [113] 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.
- [114] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [115] H. Kunz, "Preparative Carbohydrate Chemistry", Ed.: S. Hanessian, Marcel Dekker, New York **1997**.
- [116] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.
- [117] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [118] E. Daebritz, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1966**, *78*, 483-490.
- [119] E. Vowinkel, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16-22.
- [120] G. Braum, *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **1991**.
- [121] W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957-981.
- [122] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473-1482.
- [123] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 985-993.
- [124] G. Zemplen, A. Kuntz, *Chem. Ber.* **1923**, *56B*, 1705-1710.
- [125] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 197-204.

- [126] M. Inoue, H. Ogawa, K. Nakanishi, O. Tanizawa, K. Karino, J. Endo, *Obstet. Gynecol.* **1990**, 75, 1032-1036.
- [127] I. Takahashi, Y. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Kakeji, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Sugimachi, *Cancer* **1993**, 72, 1836-1840.
- [128] R. Soares, A. Marinho, F. C. Schmitt, *Pathol. Res. Pract.* **1996**, 192, 1181-1186.
- [129] S. Zhang, H. S. Zhang, C. Cordon-Cardo, V. E. Reuter, A. K. Singhal, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, 73, 50-56.
- [130] J. L. Werther, S. Rivera-MacMurray, H. Bruckner, M. Tatematsu, S. H. Itzkowitz, *Br. J. Cancer* **1994**, 69, 613-616.
- [131] H. Loenn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 115-116.
- [132] O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, 7, 501-506.
- [133] A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1991**, 212, 277-281.
- [134] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694-696.
- [135] I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. du Penhoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 23-41.
- [136] A. J. Ratcliffe, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 747-750.
- [137] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4539-4565.
- [138] M. M. Sim, H. Kondo, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2260-2267.
- [139] T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 16-25.
- [140] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 35-42.
- [141] A. Marra, F. Gauffeny, P. Sinay, *Tetrahedron* **1991**, 47, 5149-5160.
- [142] S. Keil, *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **2000**.
- [143] B. Liebe, *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **1997**.
- [144] H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohru, H. Meguro, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6317-6320.
- [145] H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, 125, 47-64.
- [146] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5229-5232.
- [147] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5233-5236.
- [148] G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198-1206.
- [149] G. F. Springer, W. A. Fry, P. R. Desai, R. A. Semerdjian, H. Tegtmeyer, C. G. Neybert, E. F. Scanlon, *Cancer Detect. Prev.* **1985**, 8, 95-100.
- [150] F. J. Irazoqui, G. A. Nores, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, 3, 433-443.
- [151] I. Takanami, *Oncol. Rep.* **1999**, 6, 341-344.
- [152] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, C. Fernandez, M. Diani, D. Verbel, S. Danishefsky, P. Livingston, H. I. Scher, *Cancer Immunol. Immunother.* **2005**, 54, 694-702.
- [153] G. Grundler, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1985**, 135, 203-218.
- [154] K. Baumann, *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **2002**.
- [155] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *"Immunologie"*, 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg **2002**.
- [156] R. W. Chesnut, H. M. Grey, *Adv. Immunol.* **1986**, 39, 51-94.
- [157] R. J. Noelle, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, *Immunol. Today* **1992**, 13, 431-433.
- [158] D. C. Parker, *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, 11, 331-360.
- [159] G. R. Crabtree, N. A. Clipstone, *Ann. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 1045-1083.
- [160] A. Weiss, D. R. Littman, *Cell* **1994**, 76, 263-274.
- [161] V. M. Sanders, *J. Immunol.* **1986**, 137, 2395.
- [162] W. F. Goebel, O. T. Avery, *J. Exp. Med.* **1929**, 50, 521.
- [163] R. Schneerson, O. Barrera, A. Sutton, J. B. Robbins, *J. Exp. Med.* **1980**, 152, 361.
- [164] M. H. V. van Regenmortel, J. P. Briand, S. Muller, S. Plaué, *Synthetic Polypeptides as Antigens, Vol. 19*, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, **1988**.
- [165] M. Delgado, K. J. Lee, L. Altobelli, III, C. Spanka, P. Wentworth, Jr., K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4946-4947.
- [166] G. Thoma, J. L. Magnani, R. Oehrlein, B. Ernst, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7414-7415.
- [167] D. N. Posnett, H. McGrath, J. P. Tam, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1719-1725.
- [168] L. Moroder, G. Huebener, M. Gemeiner, *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1996**, 18, 907-969.
- [169] K. D. Janda, J. A. Ashley, T. M. Jones, D. A. McLeod, D. M. Schloeder, M. I. Weinhouse, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8886-8888.
- [170] M. E. Schott, K. A. Frazier, D. K. Pollock, K. M. Verbanac, *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 153-165.
- [171] D. H. Rich, P. D. Gesellchen, A. Tong, A. Cheung, C. K. Buckner, *J. Med. Chem.* **1975**, 18, 1004-1010.
- [172] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579-601.
- [173] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 727-736.
- [174] W.-C. Lee, K. H. Lee, *Anal. Biochem.* **2004**, 324, 1-10.

- [175] F. Lottspeich, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2476-2492.
- [176] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4686-4687.
- [177] D. S. Y. Yeo, R. Srinivasan, G. Y. J. Chen, S. Q. Yao, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4664-4672.
- [178] K.-y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, 6, 782-799.
- [179] W. N. Vreeland, A. E. Barron, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 87-94.
- [180] G. T. Hermanson, *"Bioconjugate Techniques"*, 1. Aufl. Academic Press, San Diego **1996**.
- [181] J. C. Sheehan, S. L. Ledis, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 875-879.
- [182] Z. I. Cabantchik, A. Rothstein, *J. Membr. Biol.* **1972**, 10, 311-330.
- [183] A. Ruoho, P. A. Bartlett, A. Dutton, S. J. Singer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 63, 417-423.
- [184] C. D. Demoliou, R. M. Epand, *Biochemistry* **1980**, 19, 4539-4546.
- [185] S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 101, 395-399.
- [186] K. Ballmer-Hofer, V. Schlup, P. Burn, M. M. Burger, *Anal. Biochem.* **1982**, 126, 246-250.
- [187] S. M. Chamow, T. P. Kogan, D. H. Peers, R. C. Hastings, R. A. Byrn, A. Ashkenazi, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 15916-15922.
- [188] O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 531-541.
- [189] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glösenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1215-1221.
- [190] J. R. Allen, J. G. Allen, X.-F. Zhang, L. J. Williams, A. Zatorski, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1366-1375.
- [191] R. Breinbauer, M. Koehn, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1147-1149.
- [192] G. Lewis Warren, G. Green Luke, F. Grynszpan, Z. Radic, R. Carlier Paul, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1053-1057.
- [193] V. Rostovtsev Vsevolod, G. Green Luke, V. Fokin Valery, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [194] H. Dibowski, F. P. Schmidtchen, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 476-478.
- [195] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007-2010.
- [196] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2001**, 3, 9-12.
- [197] M. Koehn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 3106-3116.
- [198] V. Pozsgay, N. E. Vieira, A. Yergey, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3191-3194.
- [199] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3517-3524.
- [200] T. Posner, *Chem. Ber.* **1905**, 38, 646-657.
- [201] M. P. Bertrand, C. Ferreri, *"Sulfur-Centered Radicals" in: "Radicals in Organic Synthesis", Vol. 2, Ed.: P. Renaud, M. P. Sibi, 1. Aufl. Wiley-VCH Verlag, Weinheim/New York 2001, 485-504.*
- [202] K. Griesbaum, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1970**, 9, 273-287.
- [203] Y. Kita, M. Matsugi, *"Radical Chain Reactions" in: "Radicals in Organic Synthesis", Vol. 1, Ed.: P. Renaud, M. P. Sibi, 1. Aufl. Wiley-VCH Verlag, Weinheim/New York 2001, 1-10.*
- [204] Y. S. Klausner, M. Bodansky, *Synthesis* **1972**, 453-463.
- [205] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
- [206] W. Koenig, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
- [207] C. J. Easton, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 53-82.
- [208] Z. Lidert, S. Gronowitz, *Synthesis* **1980**, 322-324.
- [209] C. Wyss, R. Batra, C. Lehmann, S. Sauer, B. Giese, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2529-2531.
- [210] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 98-101.
- [211] Y. Kiso, Y. Kai, H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.* **1973**, 21, 2507-2510.
- [212] K. Yorimitsu, K. Wakabayashi, H. Shinokubo, K. Oshima, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 519.
- [213] T. Nauser, C. Schoeneich, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2042-2043.
- [214] Q. B. Broxterman, B. Kaptein, J. Kamphuis, H. E. Schoemaker, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6286-6294.
- [215] P. Sieber, B. Riniker, *Pept.: Chem. Biol., Proc. Am. Pept. Symp. 10th 1988*, 270-272.
- [216] B. Riniker, P. Sieber, *"Problems and Progress in the Synthesis of Histidine-Containing Peptides", 1. Aufl., in: "Peptides" Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York 1988, 65-74.*
- [217] H. Nambu, K. Hata, M. Matsugi, Y. Kita, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 719-727.
- [218] S. Hanessian, R. Masse, *Carbohydr. Res.* **1977**, 54, 142-144.
- [219] V. N. R. Pillai, *Synthesis* **1980**, 1, 1-26.
- [220] C. Schotten, *Chem. Ber.* **1884**, 17, 2544.
- [221] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 1.
- [222] E. P. Diammandis, T. K. Christopoulos, *Clin. Chem.* **1991**, 35, 625.
- [223] S. Bhuniya, S. M. Park, B. H. Kim, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1741-1744.
- [224] Y. L. Janin, *Amino acids* **2003**, 25, 1-40.
- [225] N. Sewald, H. D. Jakubke, *"Peptides: Chemistry and Biology", 1. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim 2002.*
- [226] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [227] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1985**, 97, 801-812.

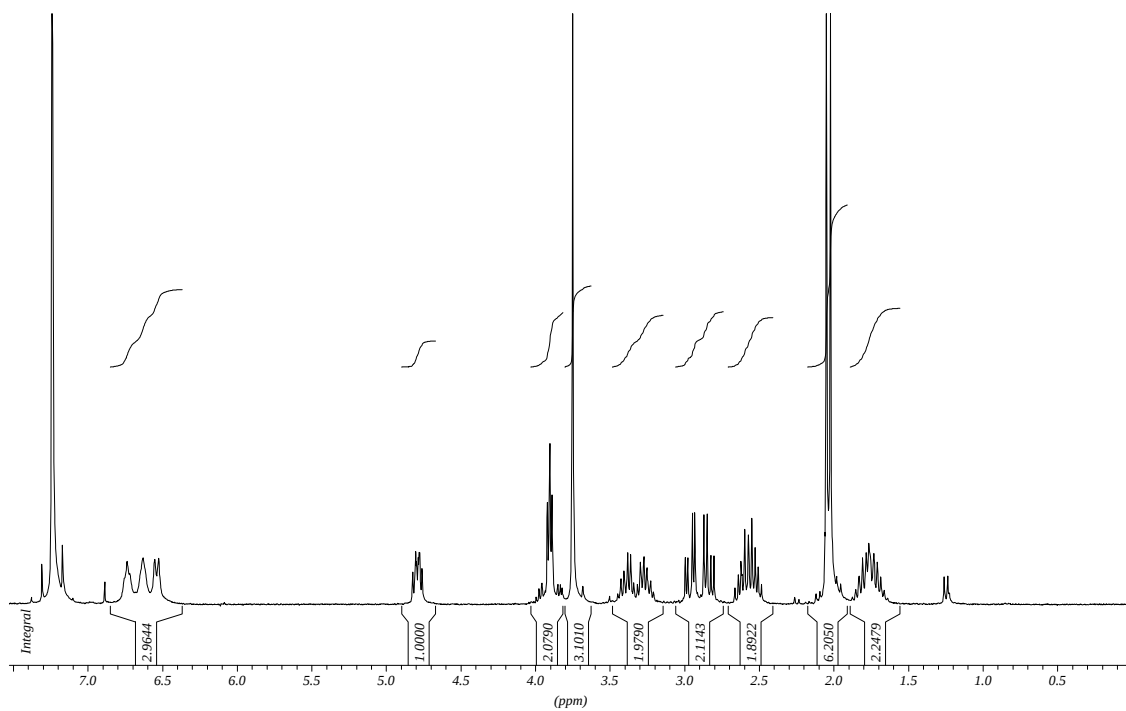
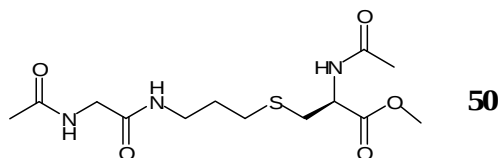
- [228] E. Bayer, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1991**, *103*, 117-133 (See also *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, 1930(1992), 1113-1929).
- [229] H. Benz, *Synthesis* **1994**, 337-358.
- [230] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- [231] E. Bayer, W. Rapp, *Chemistry of Peptides and Proteins* **1986**, *3*, 3-8.
- [232] P. M. S. Hilaire, M. Meldal, "Combinatorial Chemistry", Ed.: G. Jung, 1. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim **1999**.
- [233] M. Meldal, F.-I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1849-1850.
- [234] J. C. Spetzler, V. Westphal, J. R. Winther, M. Meldal, *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 128-137.
- [235] M. Meldal, I. Svendsen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 1591-1596.
- [236] M. Meldal, I. Svendsen, K. Breddam, F.-I. Auzanneau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3314-3318.
- [237] R. Warras, "Combinatorial Chemistry", Ed.: G. Jung, 1. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim **1999**.
- [238] J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6442-6455.
- [239] W. F. Heath, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *28*, 498-507.
- [240] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 538-546.
- [241] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [242] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005-4008.
- [243] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 513-520.
- [244] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295-1300.
- [245] M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 317-321.
- [246] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 803-805.
- [247] H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1988**, *100*, 732-734.
- [248] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 610-611.
- [249] F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 355-359.
- [250] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, Bienert, Michael, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.
- [251] H. Wenschuh, M. Beyermann, R. Winter, M. Bienert, D. Ionescu, L. A. Carpino, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5483-5486.
- [252] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [253] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [254] B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219-1222.
- [255] 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.
- [256] L. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [257] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269-1272.
- [258] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 441-445.
- [259] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [260] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 587-589.
- [261] B. Riniker, A. Floersheimer, H. Fretz, P. Sieber, B. Kamber, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9307-9320.
- [262] M. Rothe, J. Mazanek, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 293.
- [263] M. Rothe, J. Mazanek, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 439-459.
- [264] Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thornqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689-9692.
- [265] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.
- [266] R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353-6370.
- [267] R. Ramage, J. Green, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2287-2290.
- [268] J. Green, O. M. Ogunjobi, R. Ramage, A. S. J. Stewart, S. McCurdy, R. Noble, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4341-4344.
- [269] E. Atherton, R. C. Sheppard, J. D. Wade, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 1060-1062.
- [270] C. G. Fields, G. B. Fields, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6661-6664.
- [271] L. P. Egan, *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 261-273.
- [272] K. Wakabayashi, W. Pigman, *Carbohydr. Res.* **1974**, *35*, 3-14.
- [273] P. Sjoelin, M. Elofsson, J. Kihlberg, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 560-565.
- [274] G. W. Anderson, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3359-3363.
- [275] H. C. Beyerman, O. J. Heiszwolf, *J. Chem. Soc.* **1963**, 755-756.
- [276] Novabiochem®, *Solid Phase Peptides Synthesis Handbook 2004/5*.

- [277] D. I. Spencer, S. Missailidis, G. Denton, A. Murray, K. Brady, C. I. Matteis, M. S. Searle, S. J. B. Tendler, M. R. Price, *Biospectroscopy* **1999**, 5, 79.
- [278] R. S. Coleman, J. A. Shah, *Synthesis* **1999**, 1399-1400.
- [279] M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1932**, 65B, 1192-1201.
- [280] P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3059-3065.
- [281] I. M. Klotz, R. E. Heiney, *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 96, 605-612.
- [282] J. D. Park, D. H. Kim, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 911-918.
- [283] S. Nozaki, *Chem. Lett.* **1997**, 1-2.
- [284] M. Adamczyk, A. Buko, Y.-Y. Chen, J. R. Fishpaugh, J. C. Gebler, D. D. Johnson, *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 631-635.
- [285] M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, P. Roepstorff, *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, 593-601.
- [286] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350-356.
- [287] A. Mollick Joseph, F. S. Hodi, J. Soiffer Robert, M. Nadler Lee, G. Dranoff, *Cancer immunity [electronic resource] : a journal of the Academy of Cancer Immunology* **2003**, 3, 3.
- [288] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, 53, 5386-5394.
- [289] J. D. Fontenot, S. V. S. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, 13, 245-260.
- [290] J. D. Fontenot, O. J. Finn, N. Dales, P. C. Andrews, R. C. Montelaro, *Peptide Research* **1993**, 6, 330-336.
- [291] J. S. Grinstead, R. R. Koganty, M. J. Krantz, B. M. Longenecker, A. P. Campbell, *Biochemistry* **2002**, 41, 9946-9961.
- [292] S. Dziadek, *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **2005**.
- [293] A. Renard, M. Mueller, R. Zurbriggen, G. Pluschke, J. A. Robinson, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3638-3646.
- [294] N. Schmiedeberg, M. Schmitt, C. Roelz, V. Truffault, M. Sukopp, M. Buergle, O. G. Wilhelm, W. Schmalix, V. Magdolen, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4984-4994.
- [295] V. J. Hruby, F. Al-Obeidi, W. Kazmierski, *Biochem. J.* **1990**, 268, 249-262.
- [296] C. Gilon, D. Halle, M. Chorev, Z. Selinger, G. Byk, *Biopolymers* **1991**, 31, 745-750.
- [297] J. T. Lundquist, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3219-3221.
- [298] H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 3281-3284.
- [299] S. J. Miller, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5855-5856.
- [300] S. J. Miller, H. E. Blackwell, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9606-9614.
- [301] T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12364-12365.
- [302] J. F. Reichwein, B. Wels, J. A. W. Kruijtz, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 3684-3687.
- [303] J. F. Reichwein, C. Versluis, R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6187-6195.
- [304] A. Boruah, I. N. Rao, J. P. Nandy, S. K. Kumar, A. C. Kunwar, J. Iqbal, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5006-5008.
- [305] J. L. Stymiest, B. F. Mitchell, S. Wong, J. C. Vederas, *Org. Lett.* **2003**, 5, 47-49.
- [306] M. P. Glenn, L. K. Pattenden, R. C. Reid, D. P. Tyssen, J. D. A. Tyndall, C. J. Birch, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 371-381.
- [307] U. Schoellkopf, W. Hartwig, K. H. Pospischil, H. Kehne, *Synthesis* **1981**, 966-969.
- [308] D. Seebach, S. G. Mueller, U. Gysel, J. Zimmermann, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 1303-1318.
- [309] D. Seebach, A. Fadel, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 1243-1250.
- [310] P. J. Sinclair, D. Zhai, J. Reibenspies, R. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 1103-1104.
- [311] L. Claisen, *Chem. Ber.* **1912**, 45, 3157-3166.
- [312] A. M. M. Castro, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2939-3002.
- [313] U. Kazmaier, S. Maier, *Org. Lett.* **1999**, 1, 1763-1766.
- [314] U. Kazmaier, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6667-6670.
- [315] R. E. Ireland, R. H. Mueller, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 5897-5898.
- [316] P. A. Bartlett, J. F. Barstow, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 3933-3941.
- [317] A. Golebiowski, U. Jacobsson, J. Jurczak, *Tetrahedron* **1987**, 43, 3063-3066.
- [318] S. Kim, J. I. Lee, Y. C. Kim, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 560-565.
- [319] B. Schrick, K. Thirring, H. Berner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 387-390.
- [320] J. L. Herisson, Y. Chauvin, *Makromolekulare Chemie* **1971**, 141, 161-176.
- [321] C. P. Casey, T. J. Burkhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 7808.
- [322] T. J. Katz, J. McGinnis, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1592-1594.
- [323] R. H. Grubbs, P. L. Burk, D. D. Carr, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3265-3267.
- [324] R. H. Grubbs, D. D. Carr, C. Hoppin, P. L. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3478-3483.

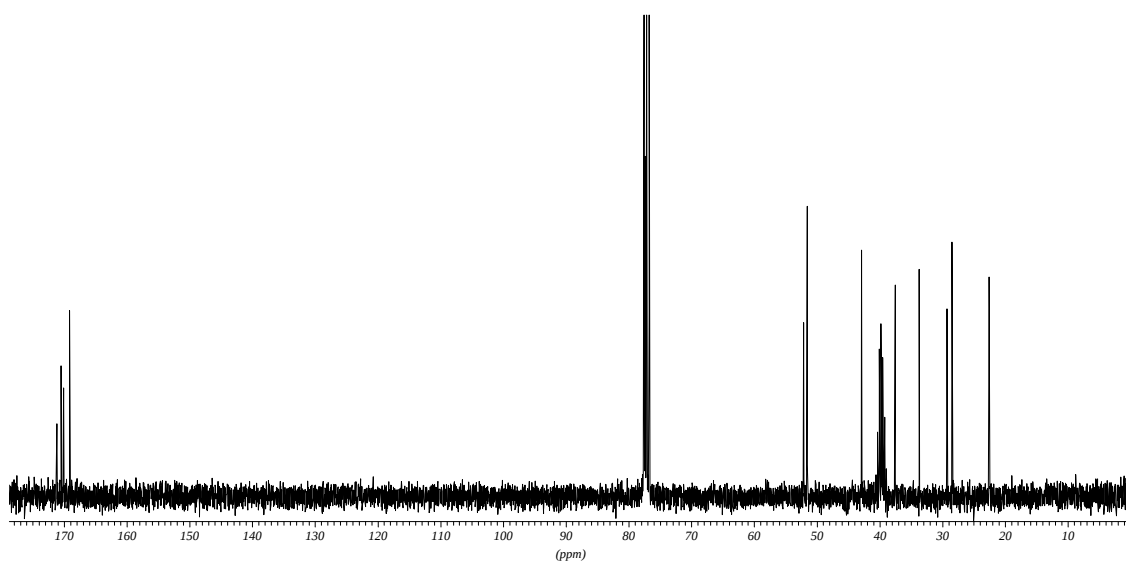
- [325] C. P. C. Bradshaw, E. J. Howman, L. Turner, *J. Catal.* **1967**, 7, 269-276.
- [326] G. S. Lewandos, R. Pettit, *Tetrahedron Lett.* **1971**, 789-793.
- [327] R. H. Grubbs, T. K. Brunck, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 2538-2540.
- [328] P. E. Romero, W. E. Piers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5032-5033.
- [329] T. J. Katz, J. McGinnis, C. Altus, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 606-608.
- [330] J. McGinnis, T. J. Katz, S. Hurwitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 605-606.
- [331] T. J. Katz, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 3010-3019.
- [332] N. Calderon, H. Y. Chen, K. W. Scott, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 3327.
- [333] W. L. Truett, D. R. Johnson, I. M. Robinson, B. A. Montague, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 2337.
- [334] B. A. Dolgoplosk, K. L. Makovetskii, T. E. I., *Vysokomolekulyarnye Soedineniya, Seriya A* **1971**, 13, 1287-1292.
- [335] M. L. Khidekel, A. D. Shebaldova, I. V. Kalechito, *Russ. Chem. Rev.* **1971**, 40, 669.
- [336] S. T. Nguyen, L. K. Johnson, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3974-3975.
- [337] S. T. Nguyen, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9858-9859.
- [338] W. A. Herrmann, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1290-1309.
- [339] J. Huang, E. D. Stevens, S. P. Nolan, J. L. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2674-2678.
- [340] T. Weskamp, F. J. Kohl, W. Hieringer, D. Gleich, W. A. Herrmann, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2416-2419.
- [341] M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **1999**, 1, 953-956.
- [342] R. R. Schrock, J. S. Murdzek, G. C. Bazan, J. Robbins, M. DiMare, M. O'Regan, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3875-3886.
- [343] A. Fuerstner, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 3012-3043.
- [344] R. H. Grubbs, W. Tumas, *Science* **1989**, 243, 907-915.
- [345] A. Kinoshita, M. Mori, *Synlett* **1994**, 1020-1022.
- [346] A. Fuerstner, P. W. Davies, *Chem. Commun.* **2005**, 2307-2320.
- [347] S. J. Connon, S. Blechert, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 1900-1923.
- [348] K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 4490-4527.
- [349] A. Furstner, F. Jeanjean, P. Razon, C. Wirtz, R. Mynott, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 320-326.
- [350] D. Meng, P. Bertinato, A. Balog, D.-S. Su, T. Kamenecka, E. Sorensen, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10073-10092.
- [351] S. F. Martin, J. M. Humphrey, A. Ali, M. C. Hillier, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 866-867.
- [352] J. M. Tour, J. P. Cooper, S. L. Pendalwar, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3452-3453.
- [353] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
- [354] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1-27.
- [355] Y. J. Kim, A. Varki, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569-576.
- [356] R. P. McEver, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 585-591.
- [357] R. Kannagi, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 577.
- [358] D. Rouzaud, P. Sinay, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 1353-1354.
- [359] M. Carcano, F. Nicotra, L. Panza, G. Russo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 642-643.
- [360] O. Frey, M. Hoffmann, H. Kessler, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **1995**, 107, 2194-2195.
- [361] L. Kröger, D. Henkensmeier, A. Schäfer, J. Thiem, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 73-75.
- [362] J. N. BeMiller, M. P. Yadav, V. N. Kalabokis, R. W. Myers, *Carbohydr. Res.* **1990**, 200, 111-126.
- [363] A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4395-4421.
- [364] Y. Du, R. J. Linhardt, I. R. Vlahov, *Tetrahedron* **1998**, 54, 9913-9959.
- [365] L. Cipolla, L. Lay, F. Nicotra, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6678-.
- [366] N. V. Bovin, S. E. Zurabyan, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1981**, 98, 25-35.
- [367] S. Czernecki, D. Randriamandimby, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7915-7916.
- [368] A. Dondoni, G. Mariotti, A. Marra, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4475-4486.
- [369] L. Grant, Y. Liu, K. E. Walsh, D. S. Walter, T. Gallagher, *Org. Lett.* **2002**, 4, 4623-4625.
- [370] S. Palmier, B. Vauzeilles, J.-M. Beau, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1097-1098.
- [371] D. Urban, T. Skrydstrup, J. M. Beau, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2507-2516.
- [372] C. R. Bertozzi, M. D. Bednarski, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 3109-3112.
- [373] F. Burkhart, H. Kessler, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 255-256.
- [374] G. E. Keck, J. B. Yates, *J. Org. Chem.* **1982**, 104, 5829-.
- [375] G. J. McGarvey, T. E. Benedum, F. W. Schmidtman, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3591-3594.
- [376] C. H. Rohrig, M. Takhi, R. R. Schmidt, *Synlett* **2001**, 1170-1172.
- [377] C. Filser, *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **2005**.
- [378] Y. Inoue, K. Onodera, S. Kitaoka, S. Hirano, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 4722-4724.
- [379] D. Horton, *Org. Synth.* **1966**, 46, 1-5.
- [380] J. Cui, D. Horton, *Carbohydr. Res.* **1998**, 309, 319-330.
- [381] B. A. Roe, C. G. Boojamra, J. L. Griggs, C. R. Bertozzi, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6442-6445.

- [382] G. E. Keck, E. J. Enholm, D. F. Kachensky, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1867-1870.
- [383] T. Yasumori, K. Sato, H. Hashimoto, J. Yoshimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, 57, 2538.
- [384] L. Cipolla, B. La Ferla, L. Lay, F. Peri, F. Nicotra, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 295-303.
- [385] V. R. Bouvet, R. N. Ben, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3619-3622.
- [386] B. Miossec, R. Danion-Bougot, D. Danion, *Synthesis* **1994**, 1171-1174.
- [387] T. J. Nitz, E. M. Holt, B. Rubin, C. H. Stammer, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 2667-2671.
- [388] E. P. Prokof'ev, E. I. Karpeiskaya, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 737-740.
- [389] S. R. Chemler, D. Trauner, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.; Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 4544-4568.
- [390] N. Miyaura, T. Ishiyama, M. Ishikawa, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 6369-6372.
- [391] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- [392] J. E. Marcone, K. G. Moloy, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8527-8528.
- [393] P. N. Collier, A. D. Campbell, I. Patel, R. J. K. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7115-7119.
- [394] M. P. Schutze, C. Leclerc, M. Jolivet, F. Audibert, L. Chedid, *J. Immunol.* **1985**, 135, 2319-2322.
- [395] C. Leclerc, G. Przewlocki, M. P. Schutze, L. Chedid, *Eur. J. Immunol.* **1987**, 17, 269.
- [396] L. Ding, E. N. Lalani, M. Reddish, R. R. Koganty, T. Wong, J. Samuel, M. B. Yacyszyn, A. Meikle, P. Y. S. Fung, J. Taylor-Papadimitriou, B. M. Longenecker, *Cancer Immunol. Immunother.* **1993**, 36, 9-17.
- [397] P. C. Ho, D. A. Mutch, K. D. Winkel, A. J. Saul, G. L. Jones, T. J. Doran, C. M. Rzepczyk, *Eur. J. Immunol.* **1990**, 20, 477-483.
- [398] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.
- [399] D. D. Perrin, W. L. F. Amarego, *"Purification of Laboratory Chemicals"*, 3. Aufl. Pergamon Press, Oxford **1998**.
- [400] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, 13, 129-132.
- [401] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 863-870.
- [402] R. W. Jeanloz, Stoffyn, P. J., in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Ed.: M. L. Wolfrom, Thompson, A.), Academic Press Inc., New York, **1963**, p. 211.
- [403] P. B. W. Kortenaar, B. G. van Dijk, J. M. Peeters, B. J. Raaben, P. J. H. M. Adams, G. I. Tesser, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, 27, 398.
- [404] H. Kunz, in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker, New York, **1997**, p. 265.
- [405] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751-769.
- [406] J. Eberling, P. Braun, D. Kowalczyk, M. Schultz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2638-2646.
- [407] K. Furuhashi, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 255-259.
- [408] C. Brocke, *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **2003**.
- [409] O. Seitz, *Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **1995**.
- [410] S. Wittrock, *Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz* **2002**.
- [411] B. Kaptein, Q. B. Broxterman, H. E. Schoemaker, F. P. J. T. Rutjes, J. J. N. Veerman, J. Kamphuis, C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, *Tetrahedron* **2001**, 57, 6567-6577.
- [412] P. Strazzolini, T. Melloni, A. G. Giumanini, *Tetrahedron* **2001**, 57, 9033-9043.

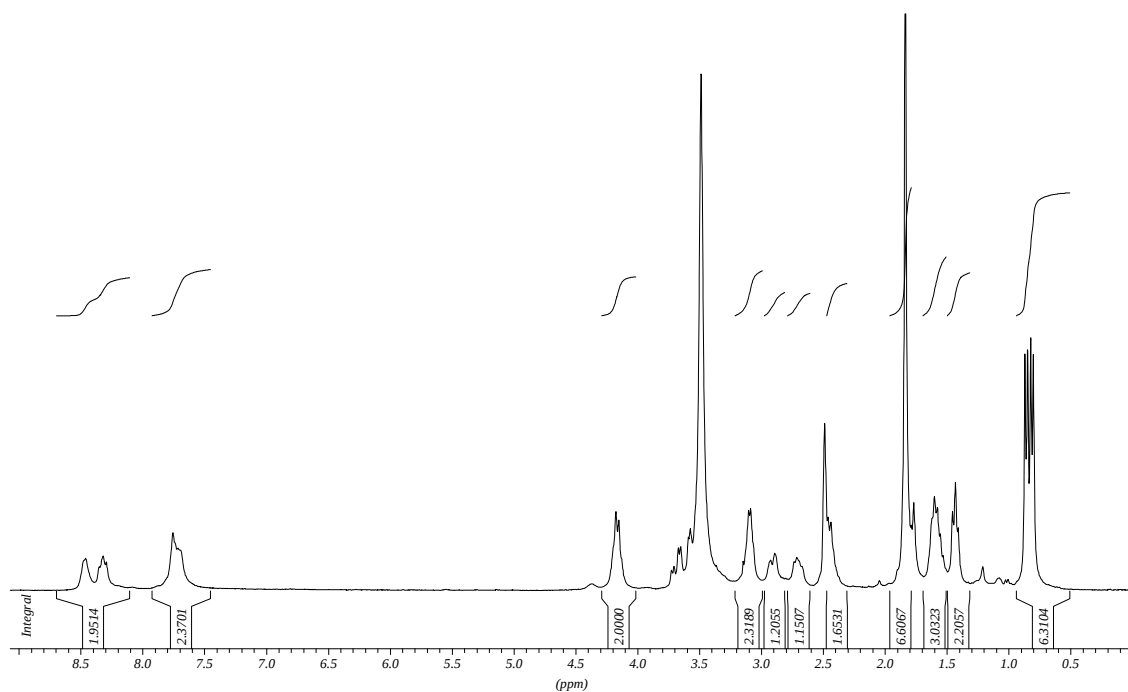
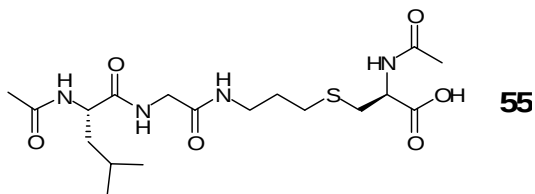
7. Spektrenanhang



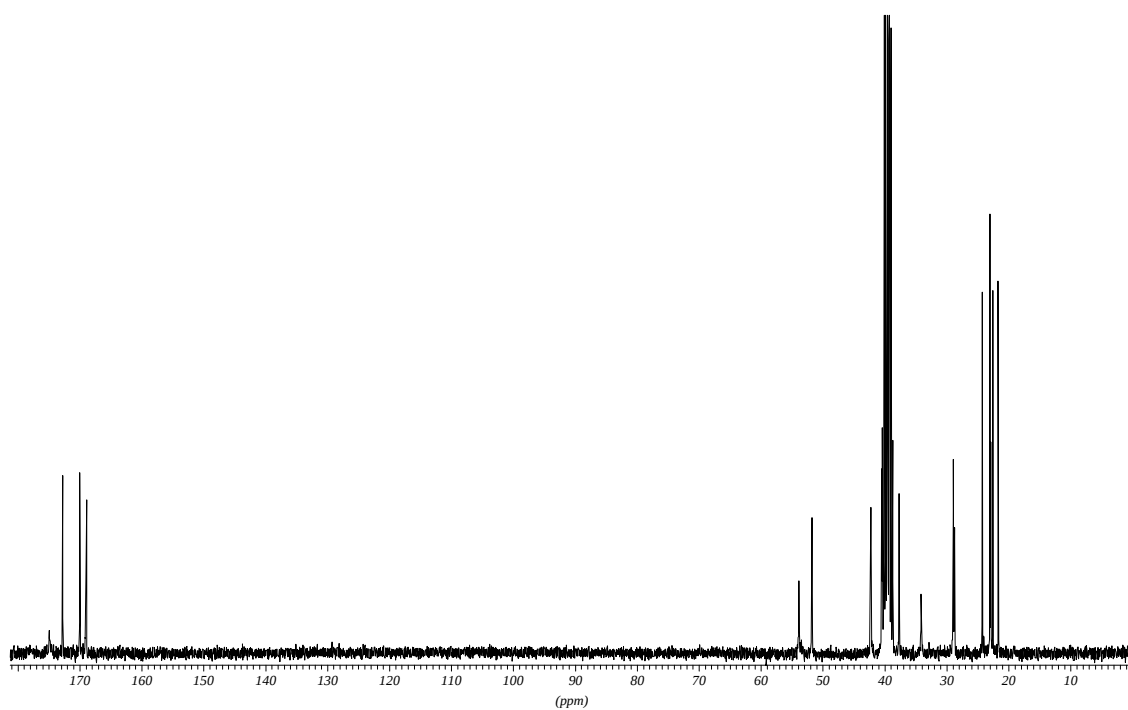
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3)



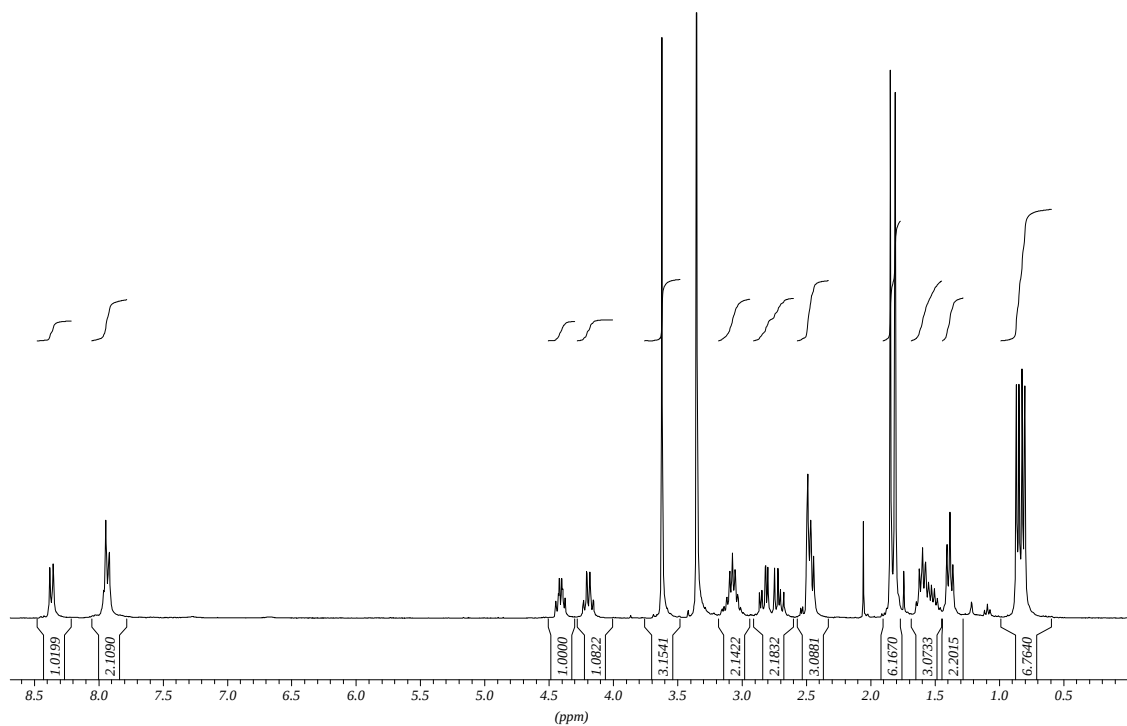
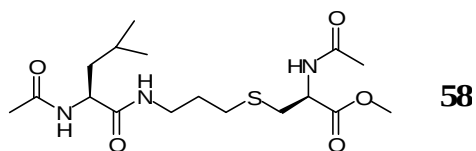
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, CDCl_3 , 20 % DMSO-d_6)



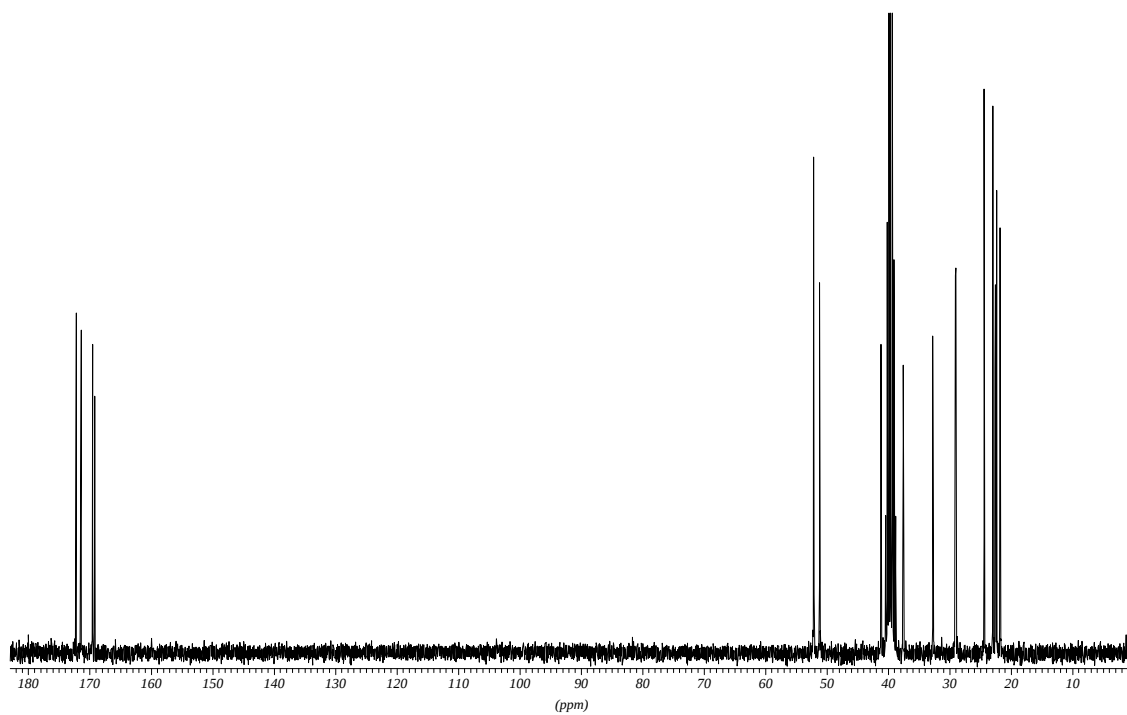
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO- d_6)



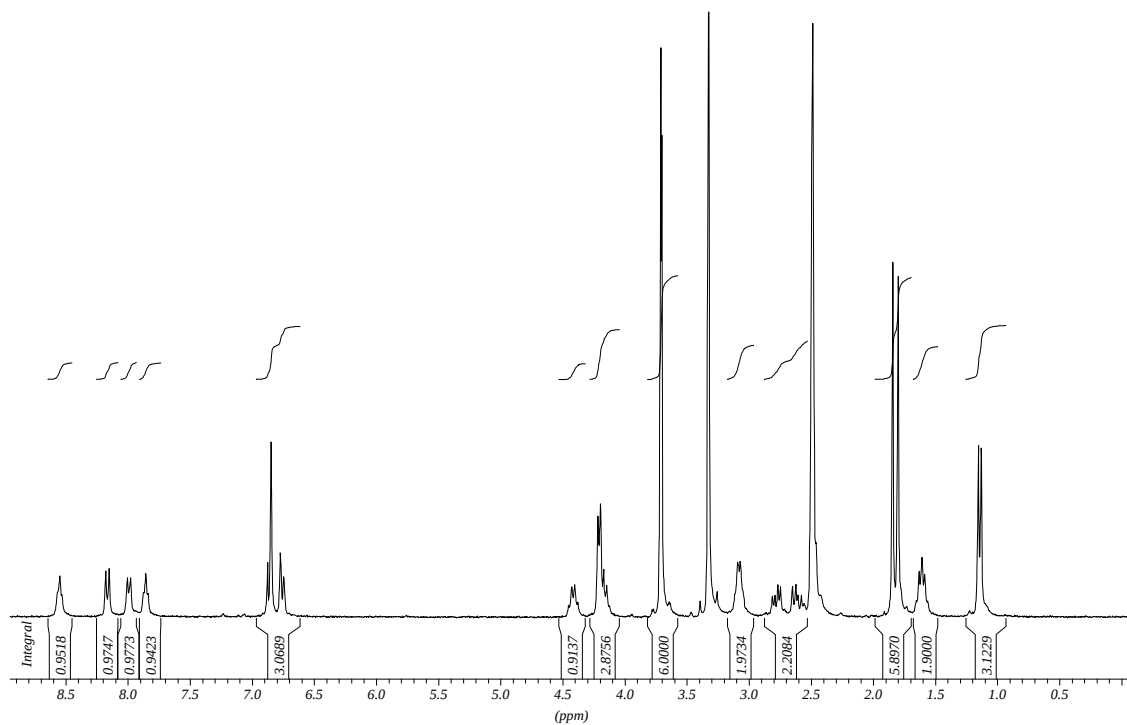
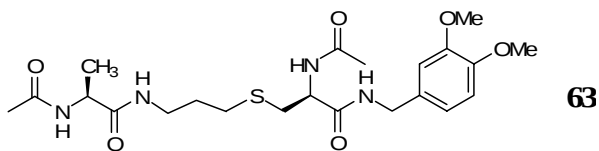
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, DMSO- d_6)



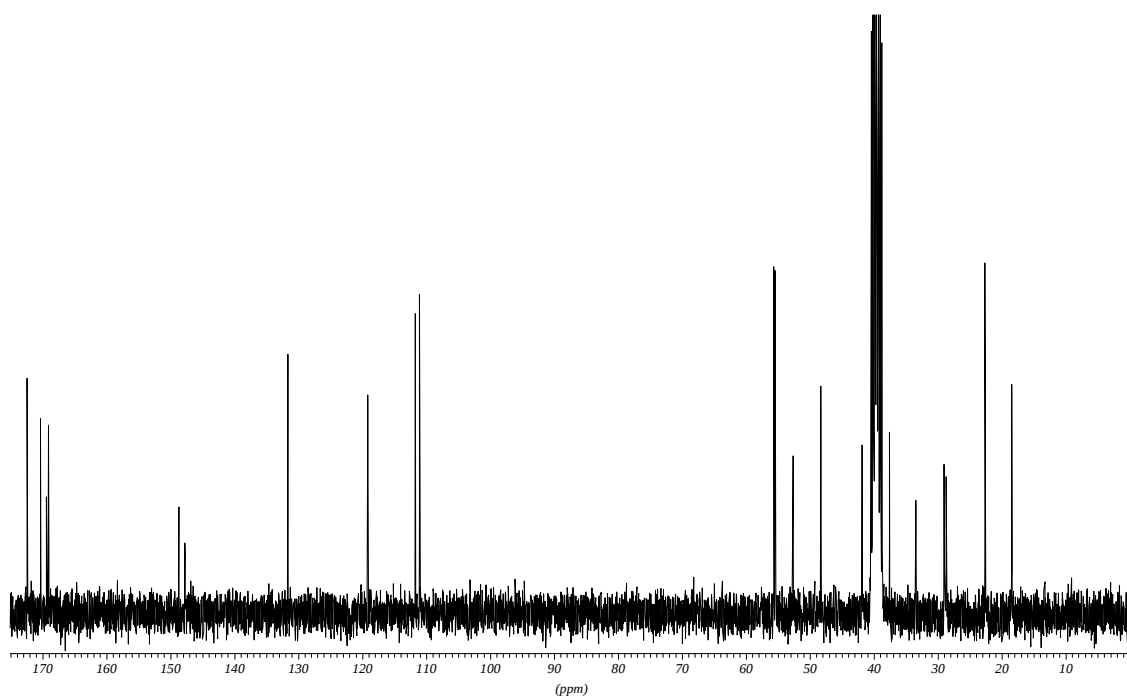
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO- d_6)



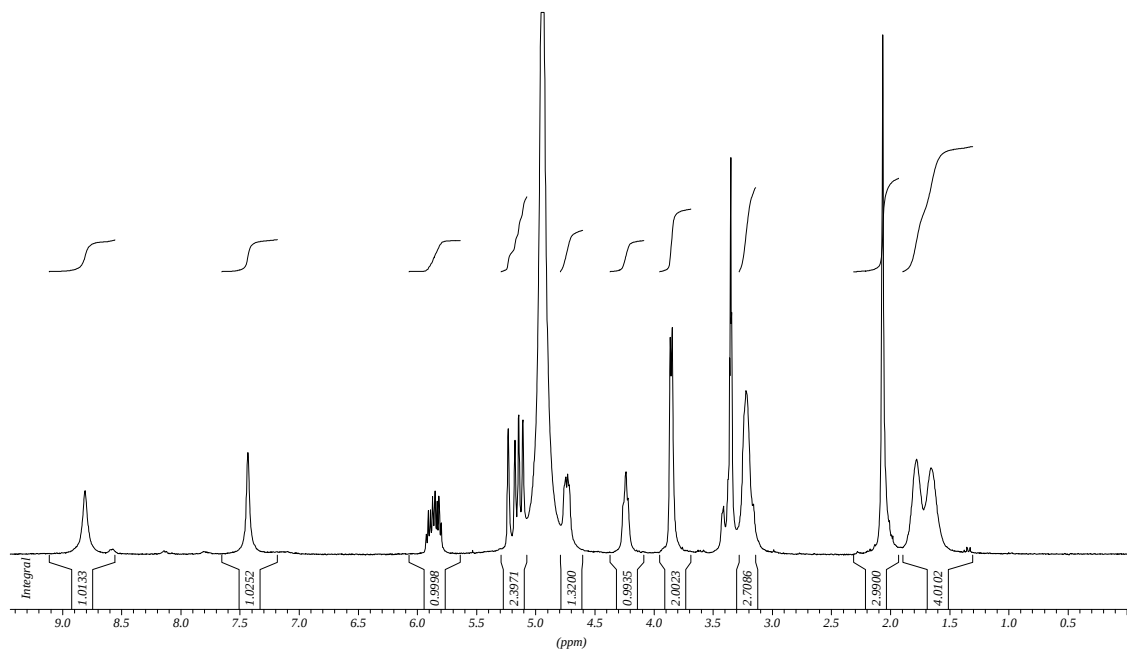
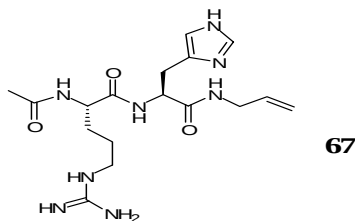
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, DMSO- d_6)



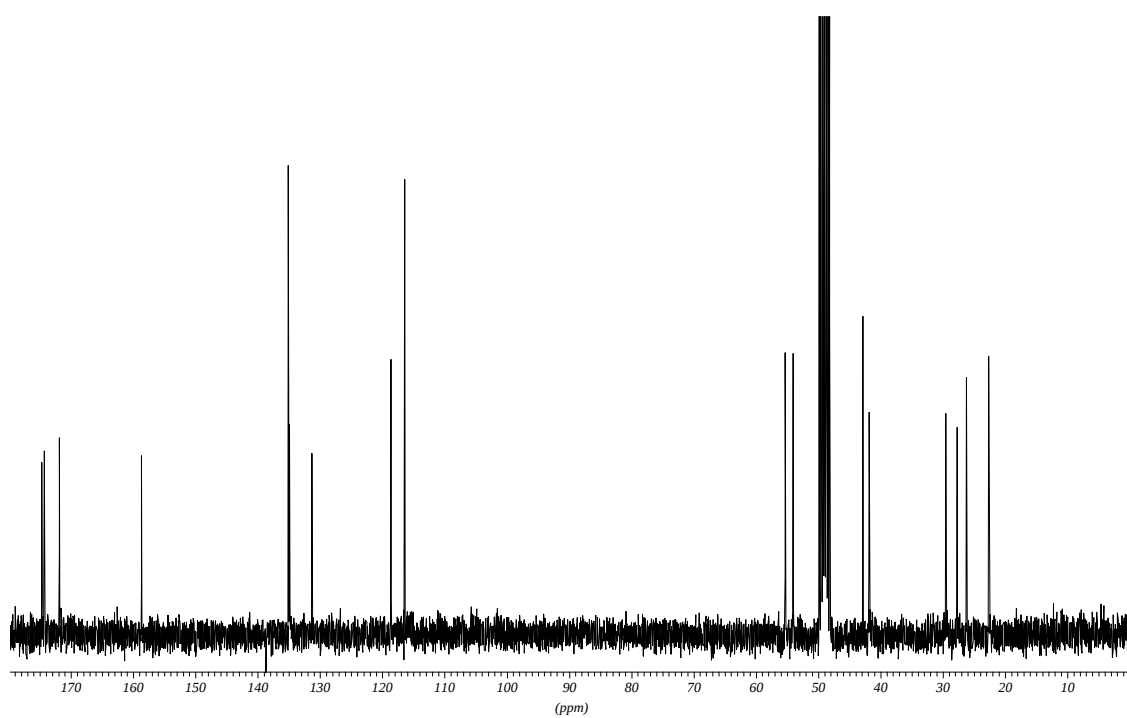
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO- d_6)



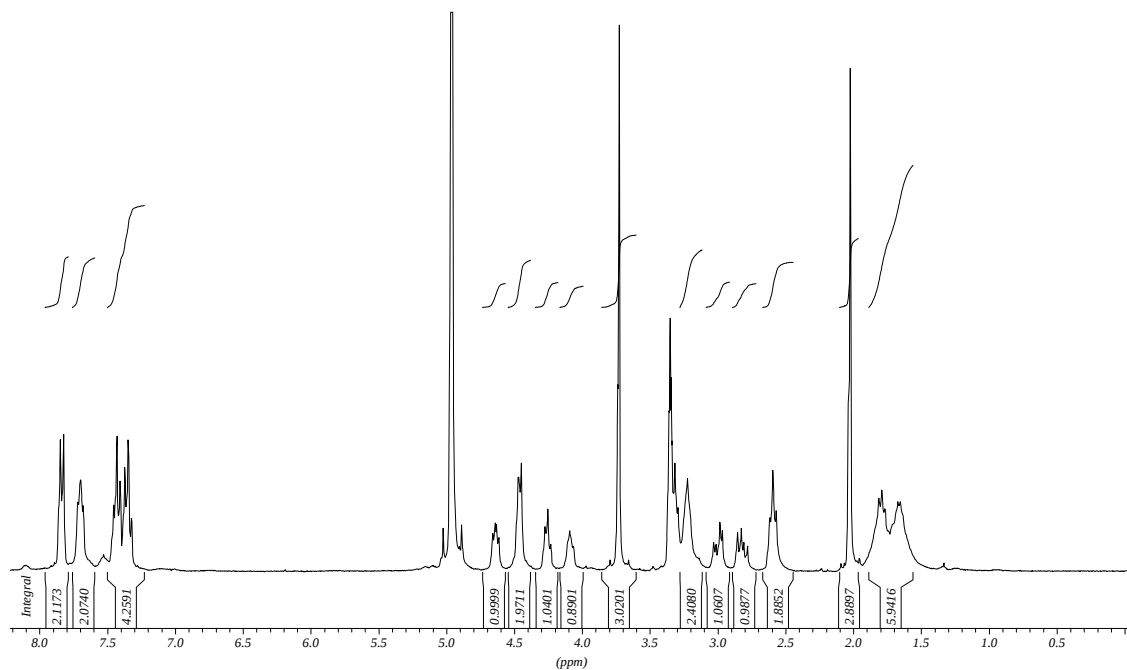
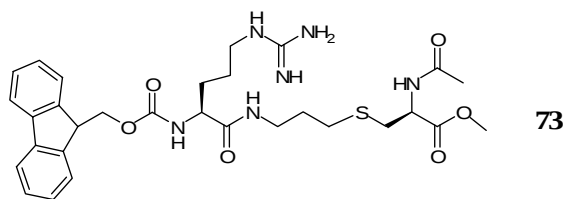
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, DMSO- d_6)



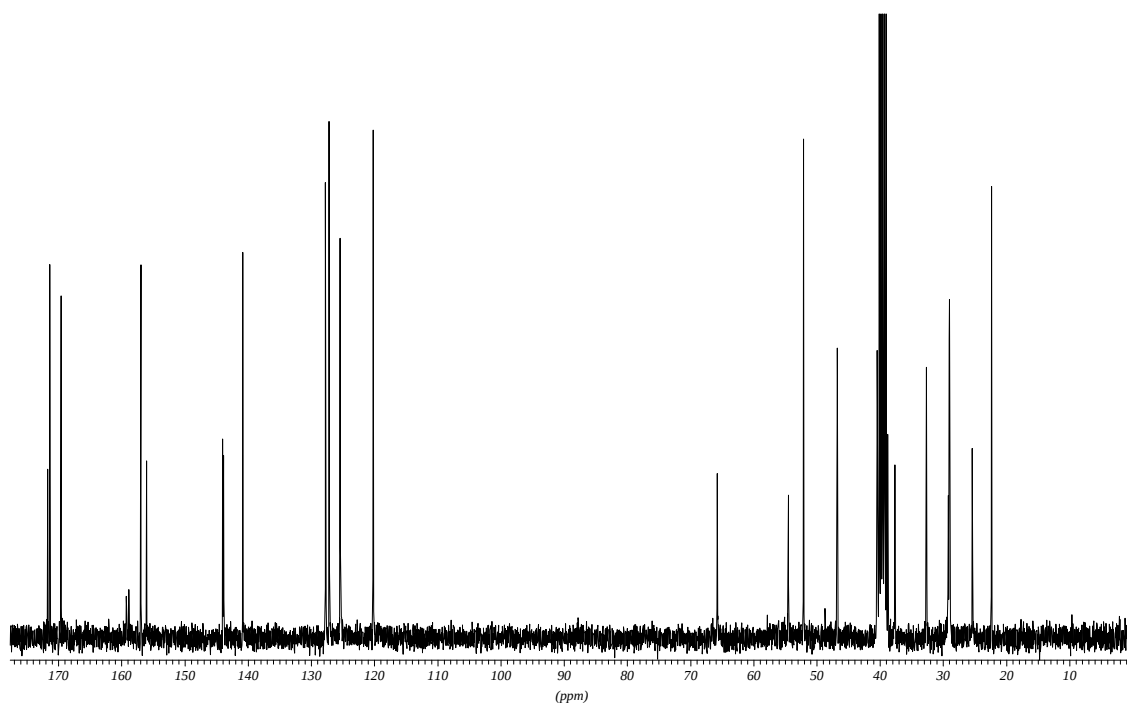
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, MeOH-d_4)



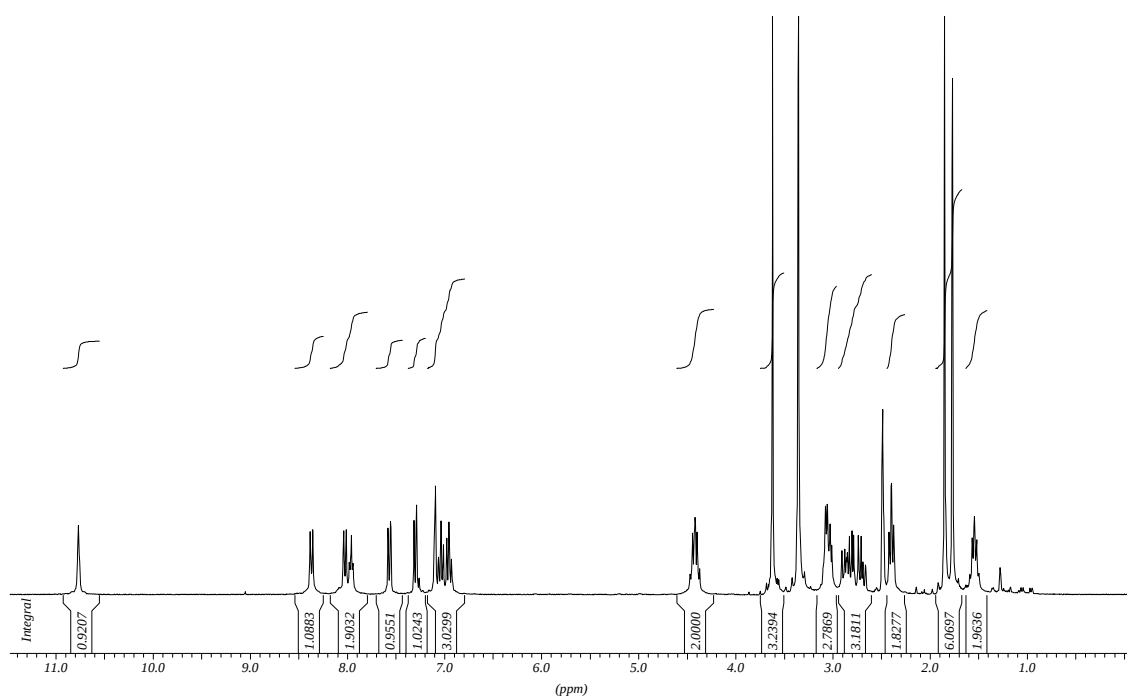
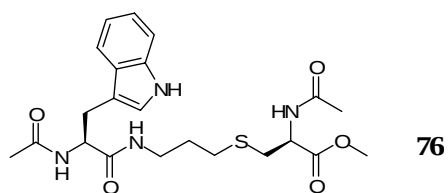
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, MeOH-d_4)



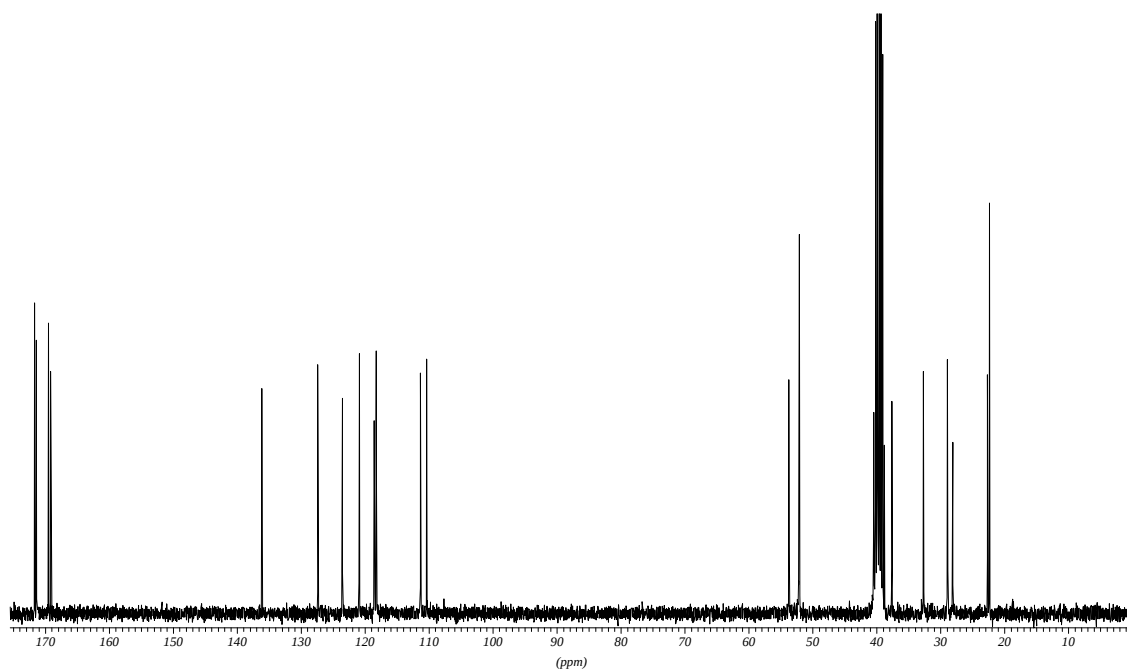
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, MeOH-d₄)



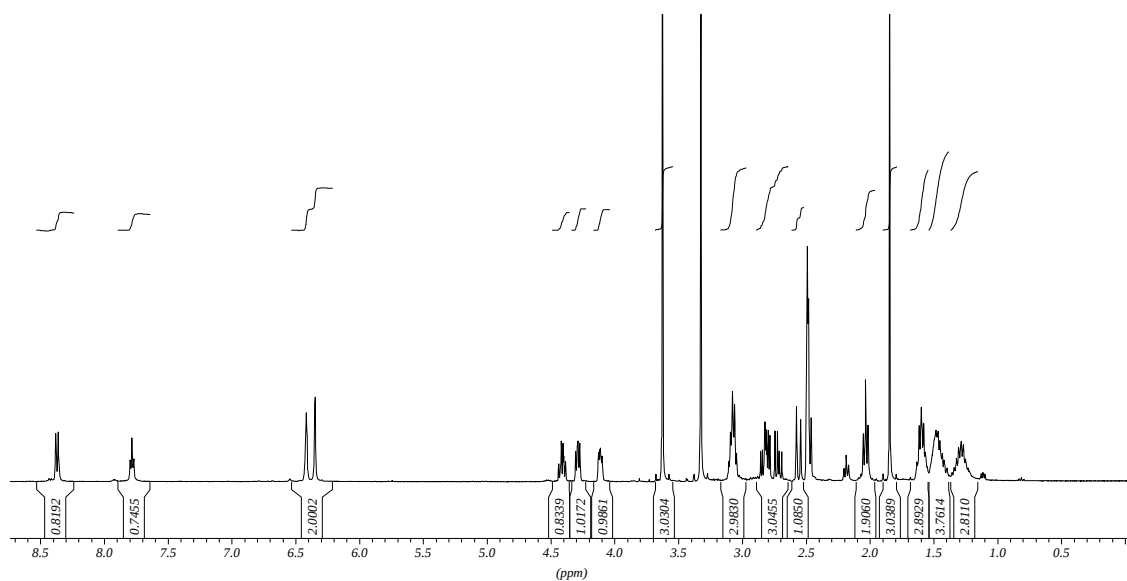
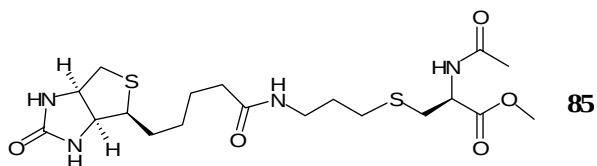
¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, DMSO-d₆)



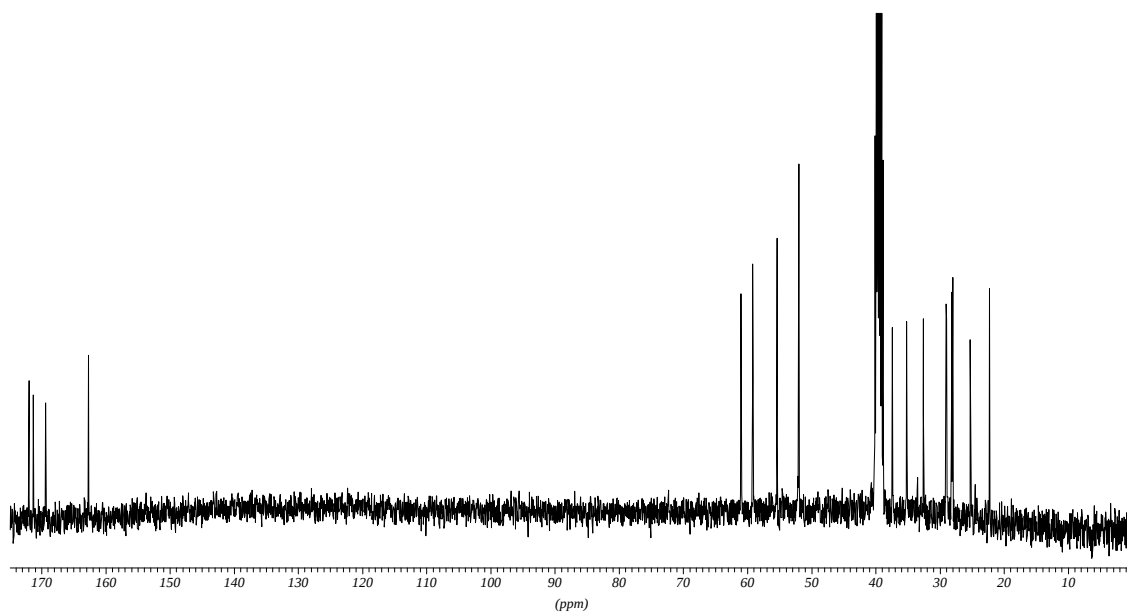
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO- d_6)



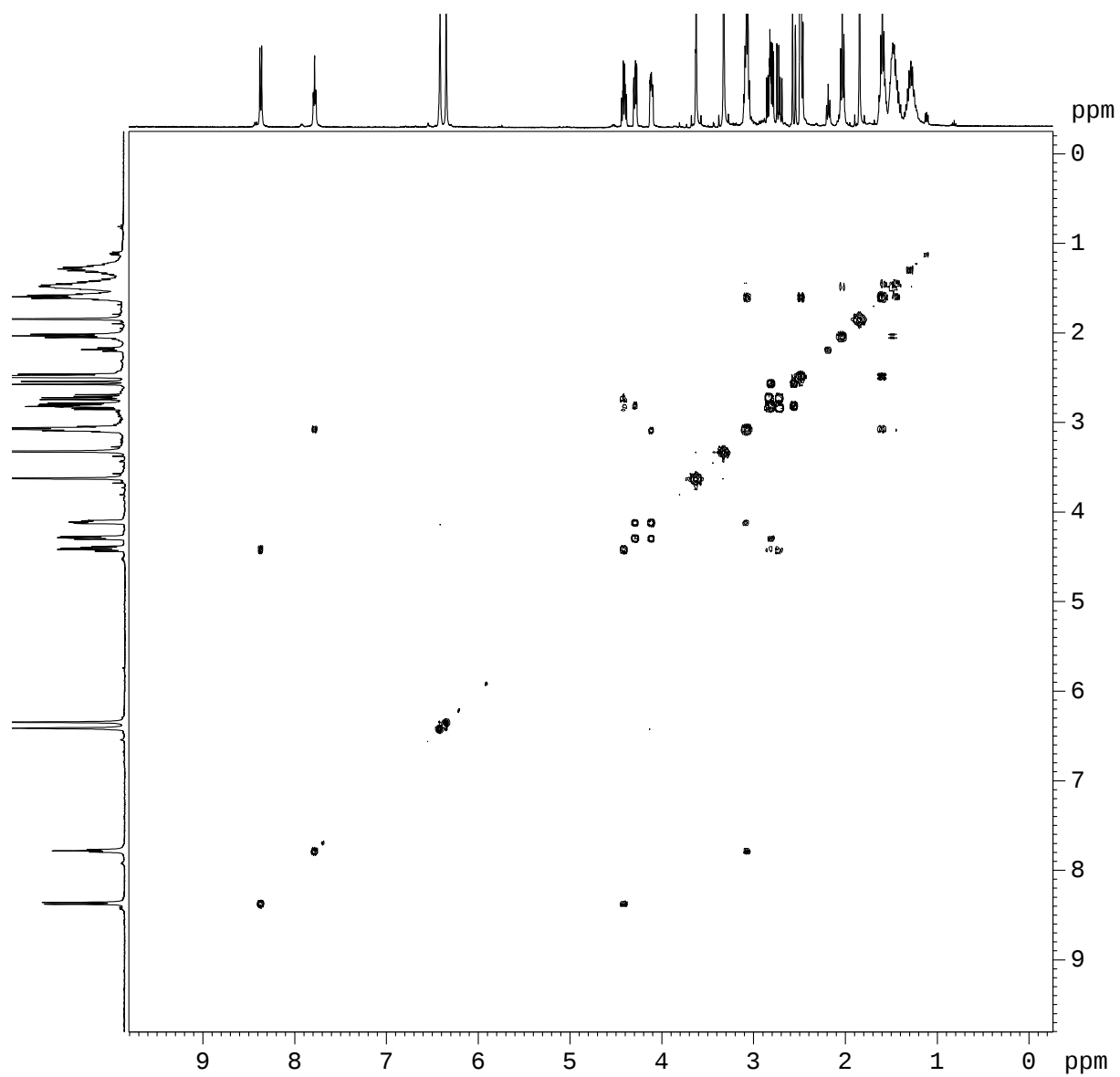
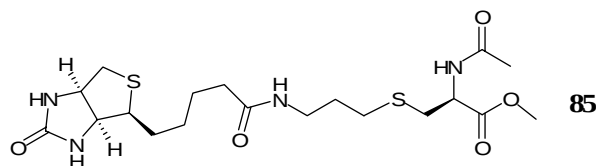
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, DMSO- d_6)



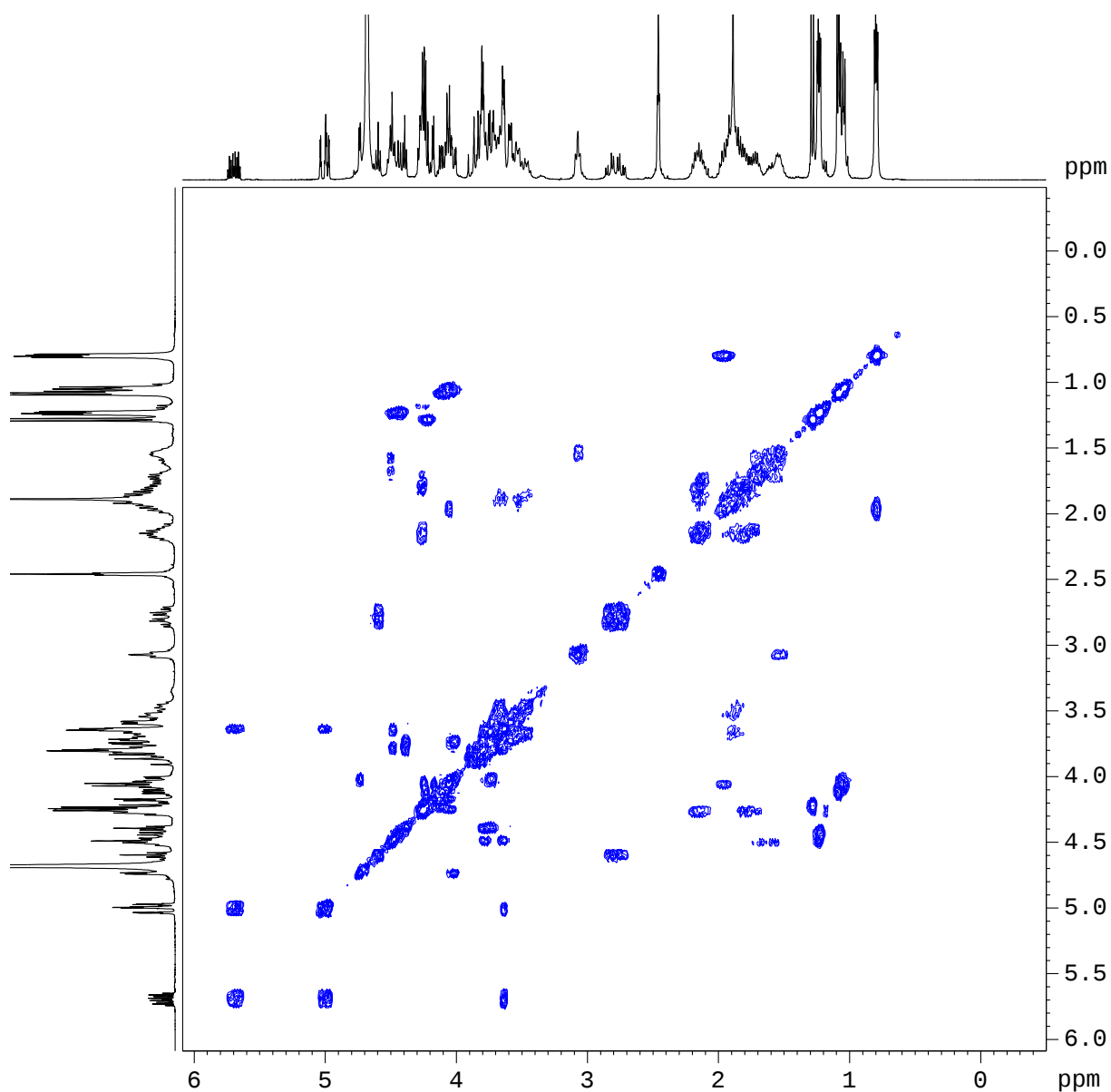
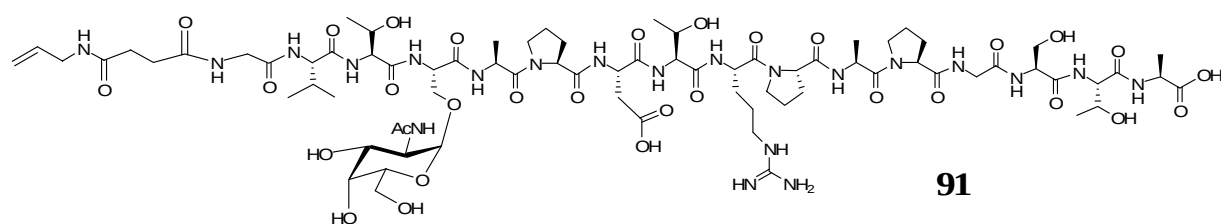
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO- d_6)



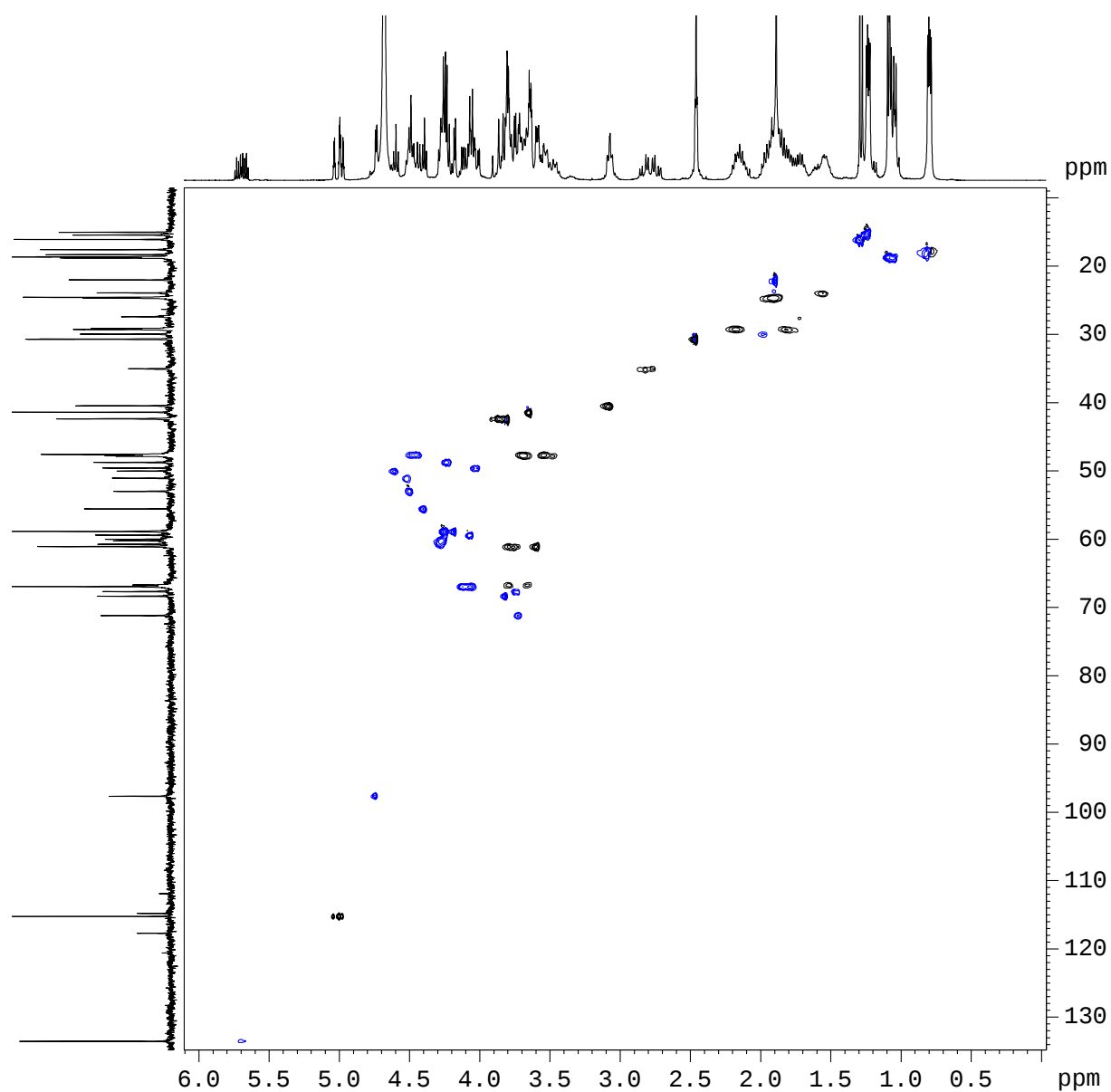
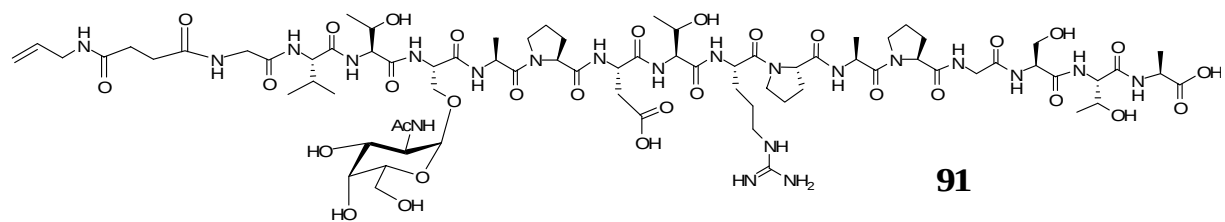
^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, BB, DMSO- d_6)



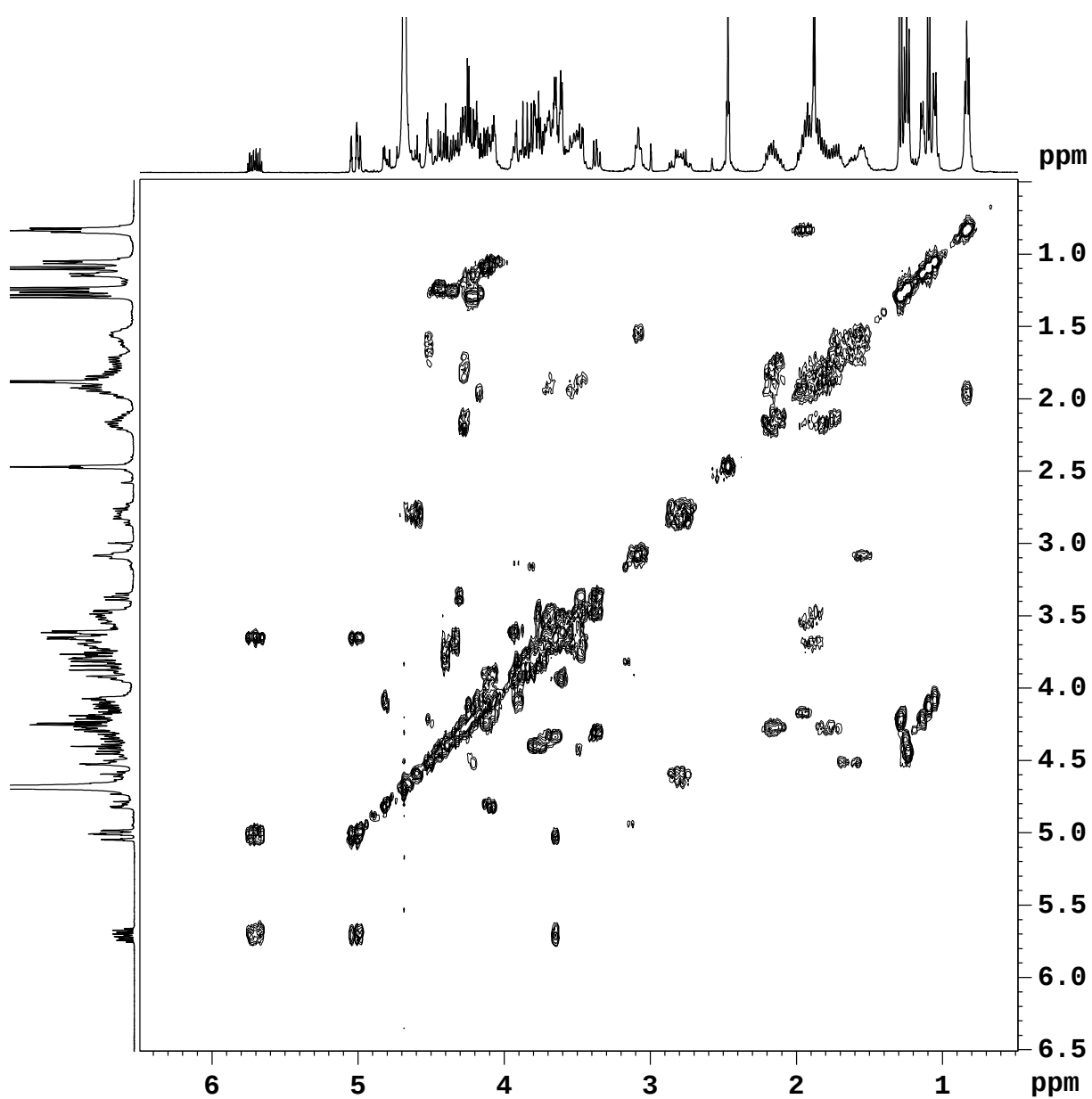
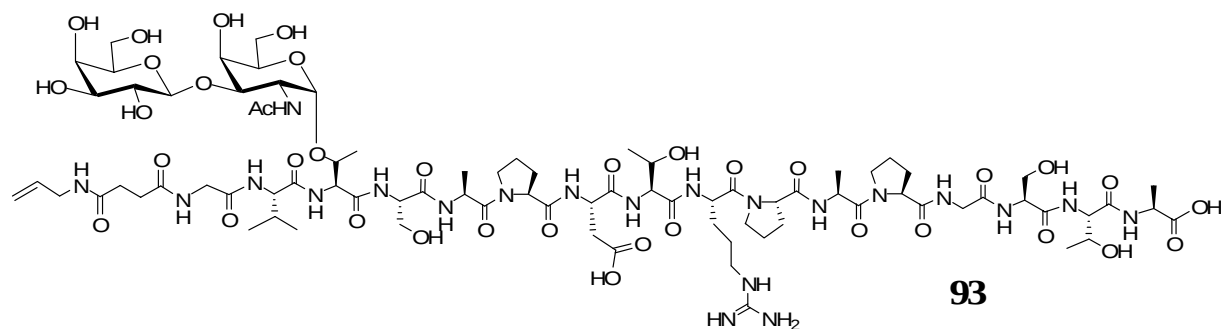
^1H - ^1H -COSY (400 MHz, DMSO- d_6)



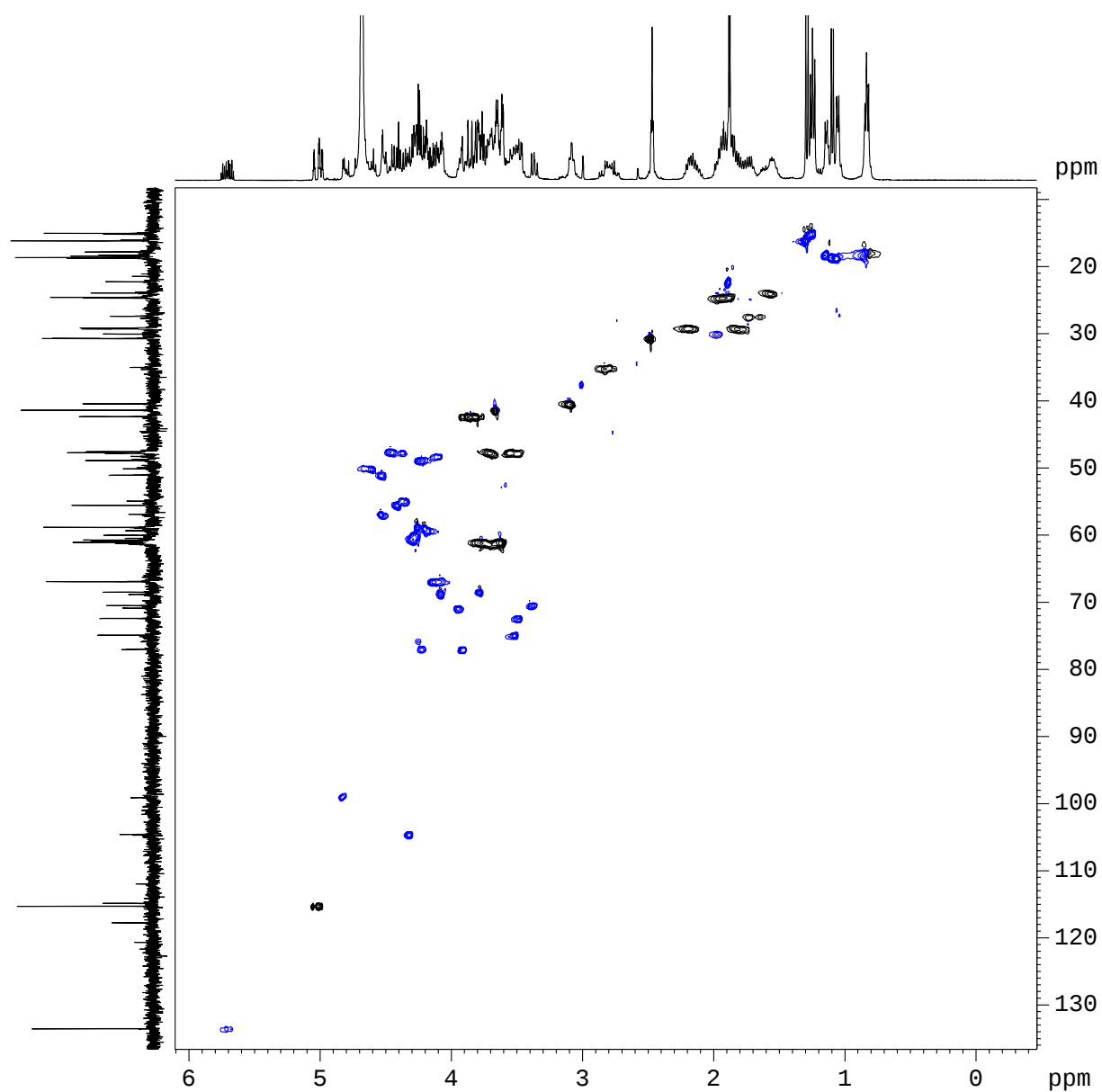
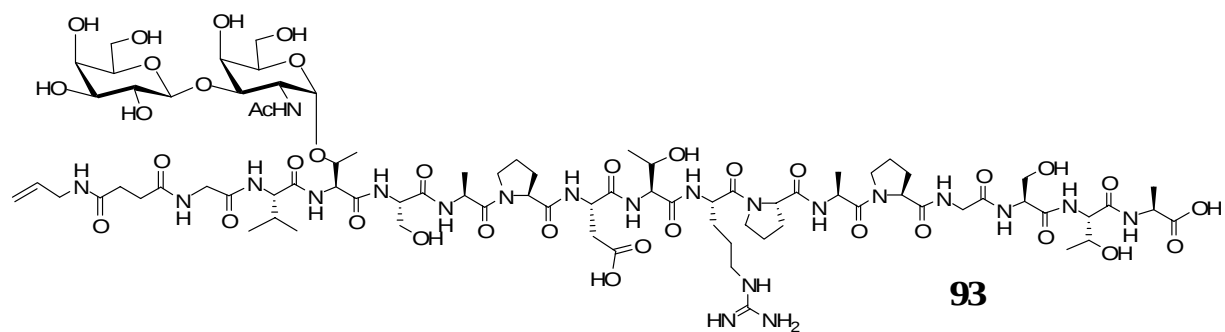
^1H - ^1H -COSY (400 MHz, D_2O)



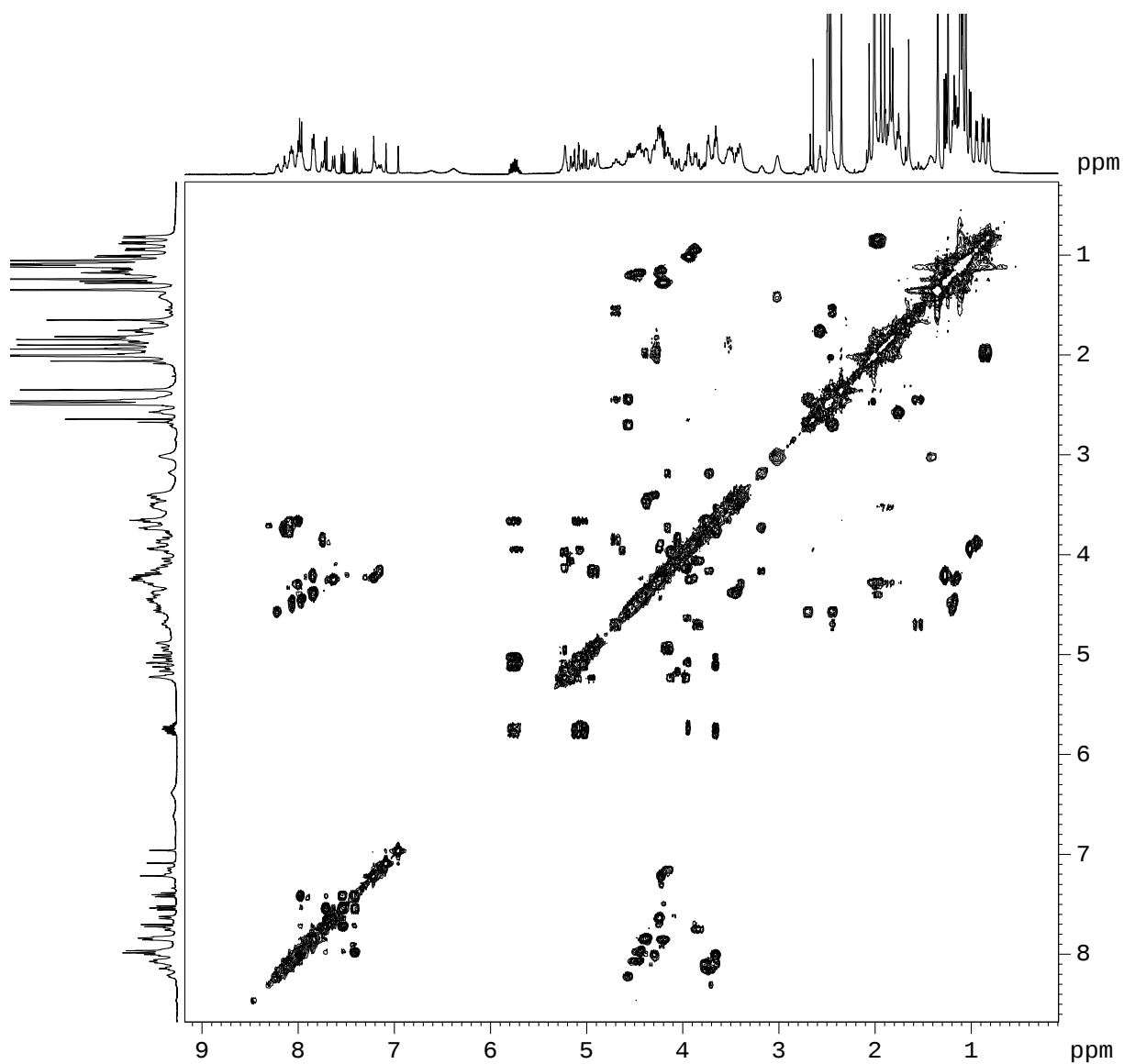
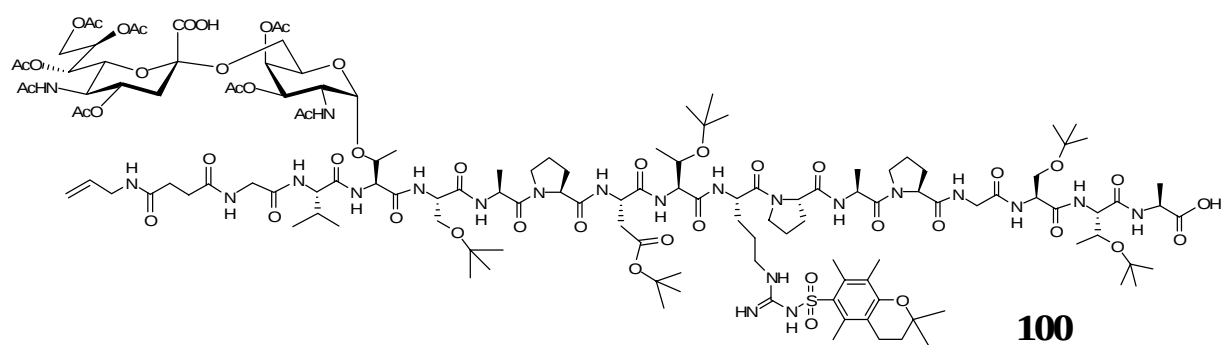
HSQC (100.6 MHz, D₂O)

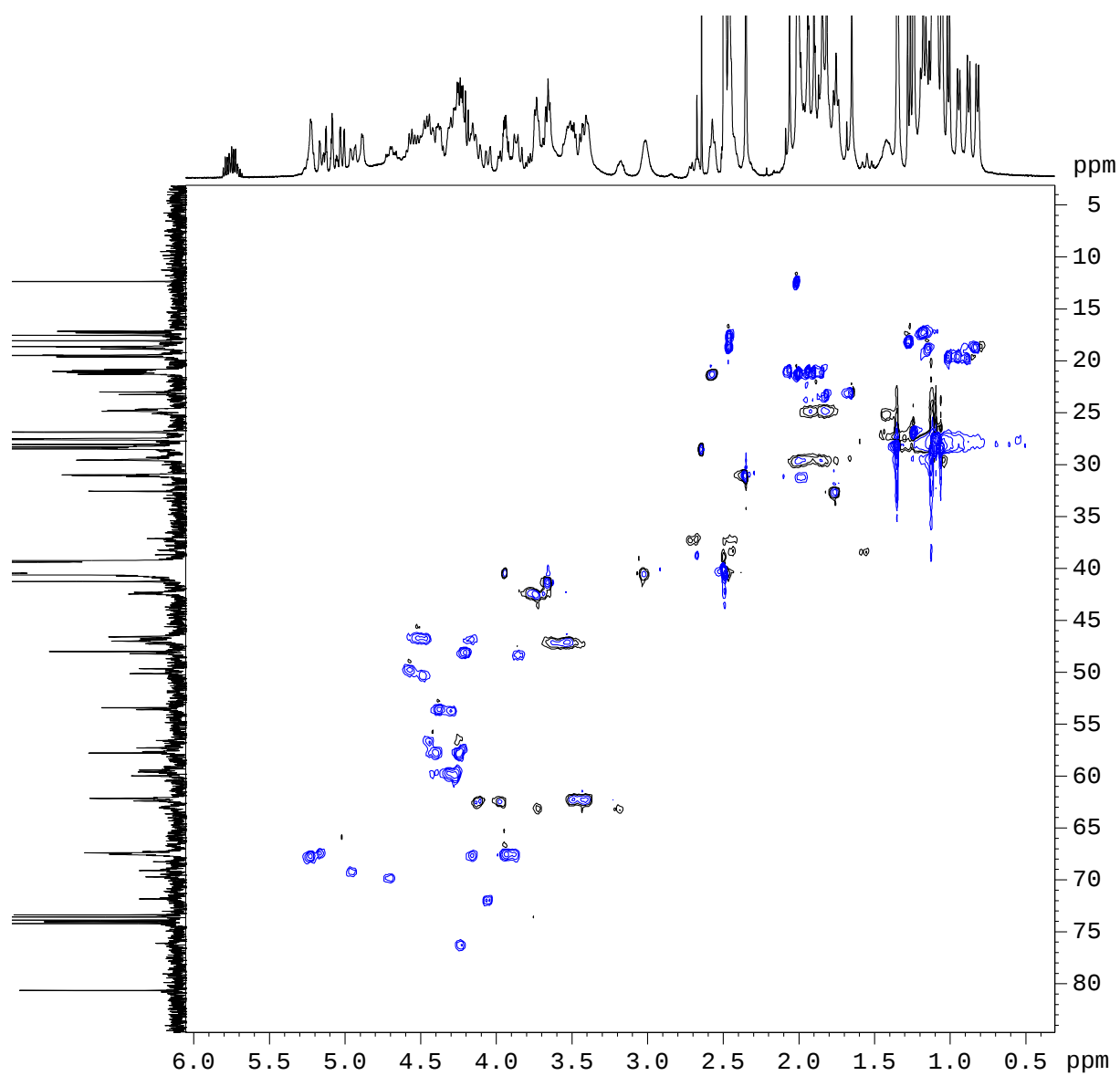
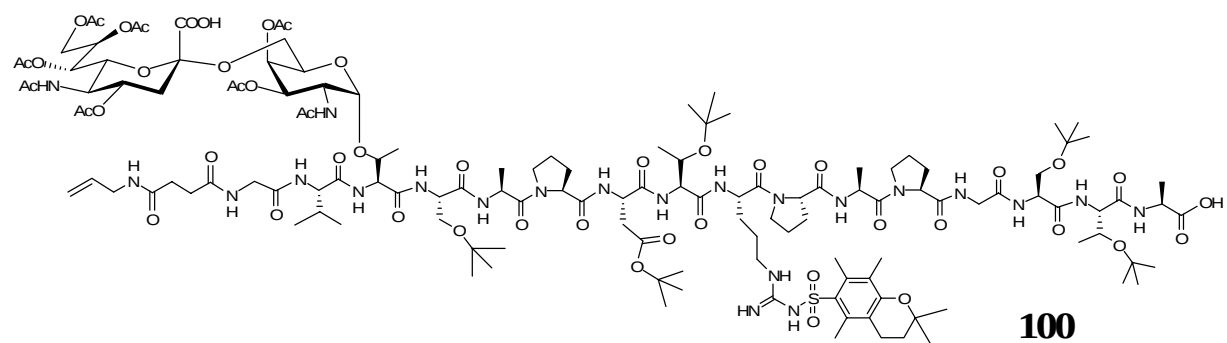


¹H-¹H-COSY (400 MHz, D₂O)

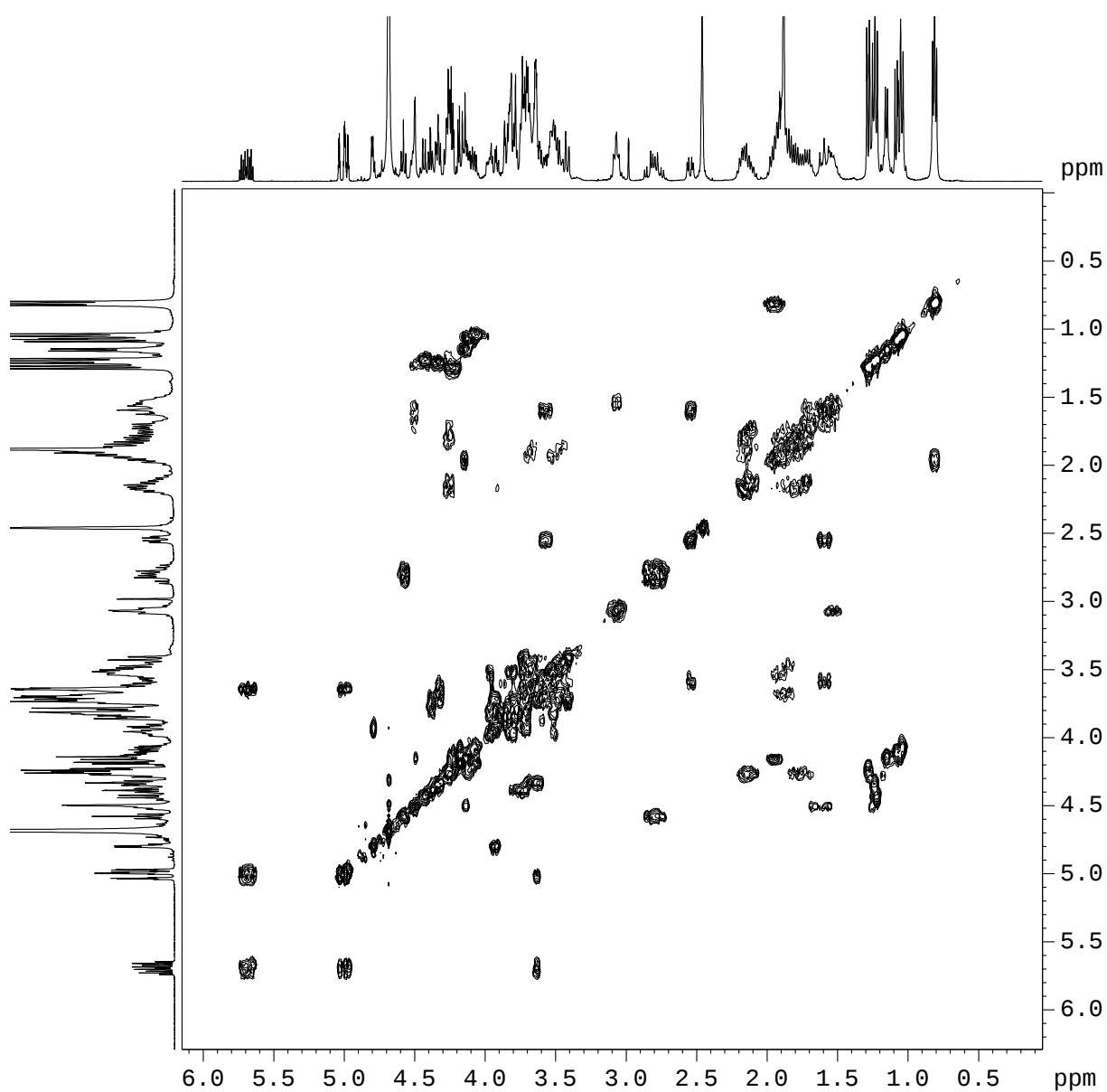
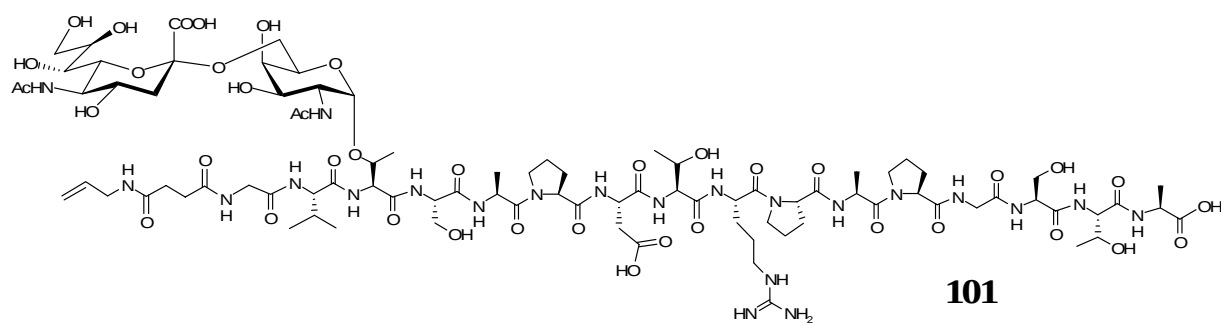


HSQC (100.6 MHz, D₂O)

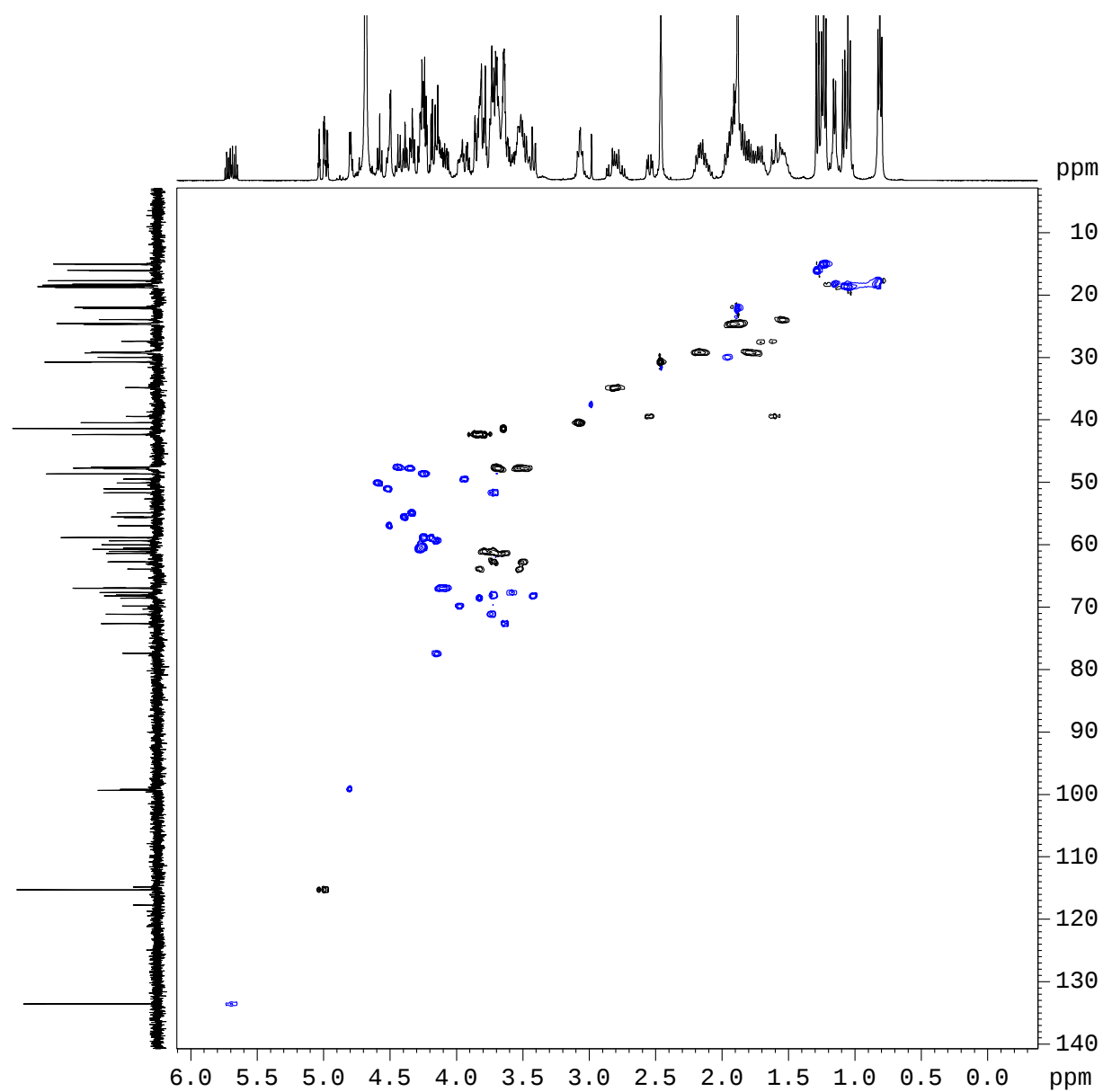
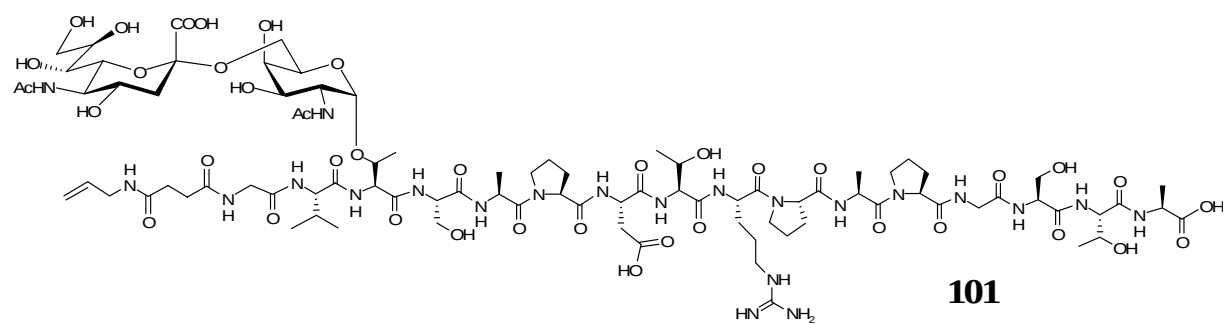
 ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, DMSO- d_6)



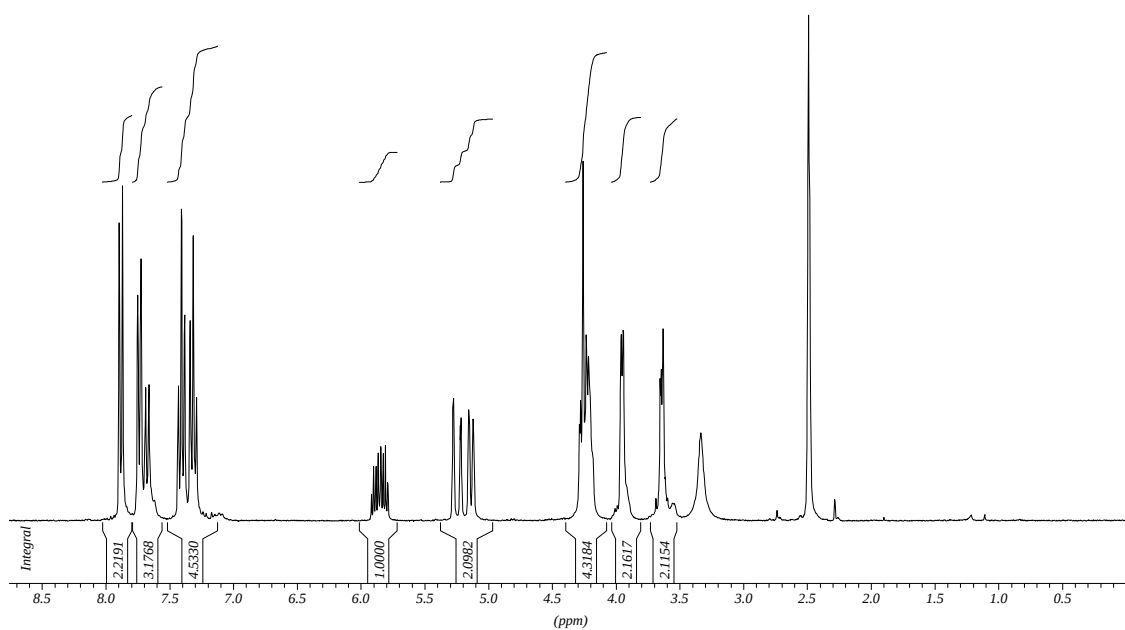
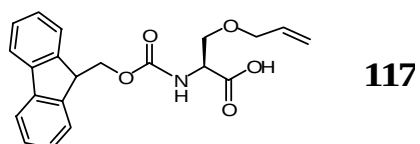
HSQC (100.6 MHz, DMSO-d₆)



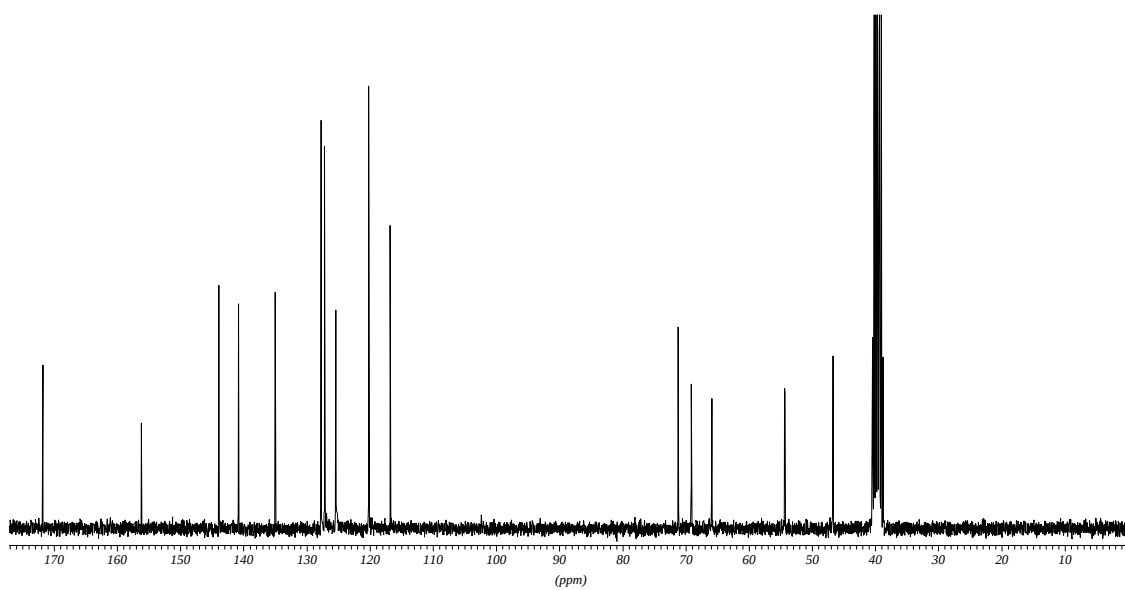
¹H-¹H-COSY (400 MHz, D₂O)



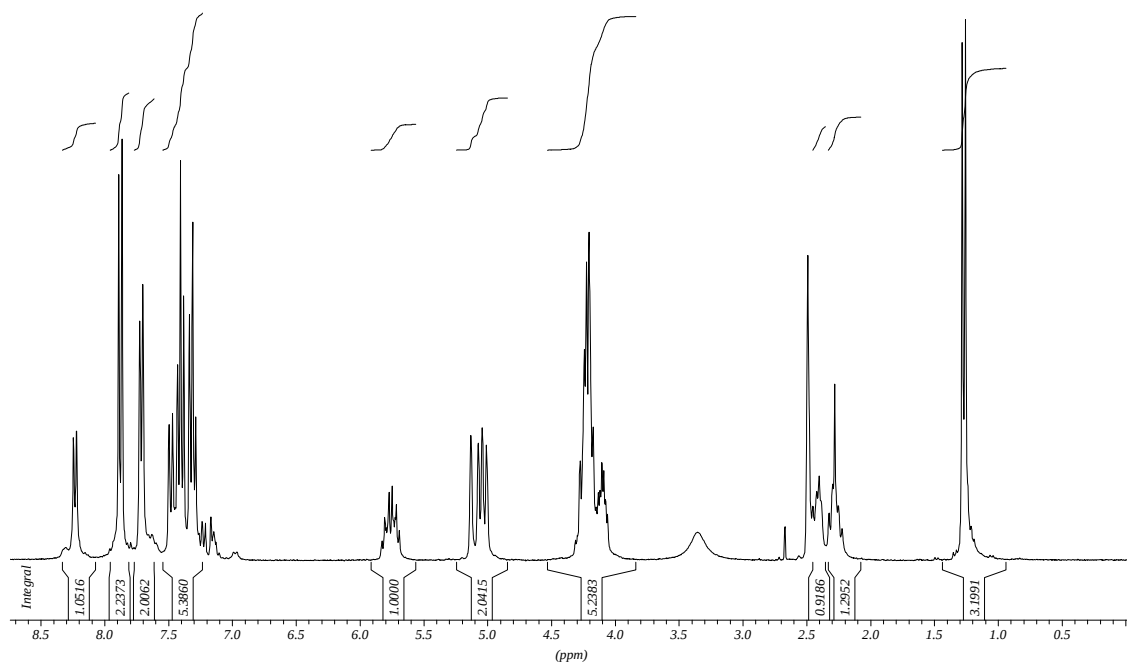
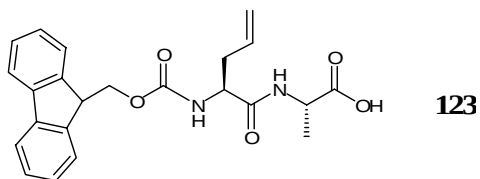
HSQC (100.6 MHz, D₂O)



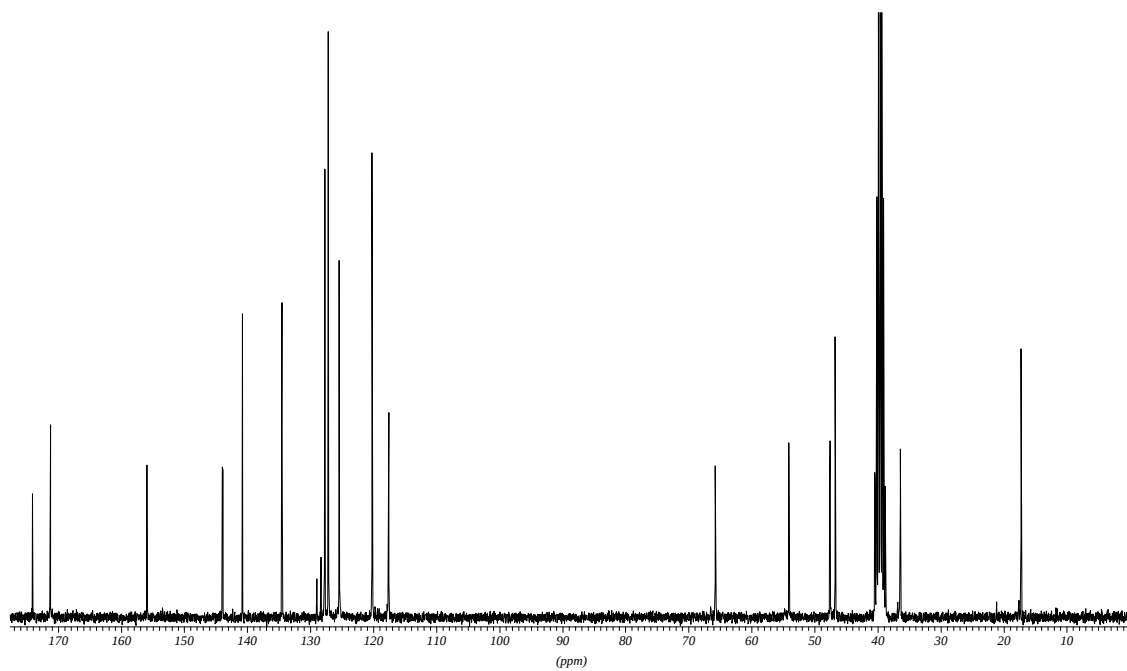
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO- d_6)



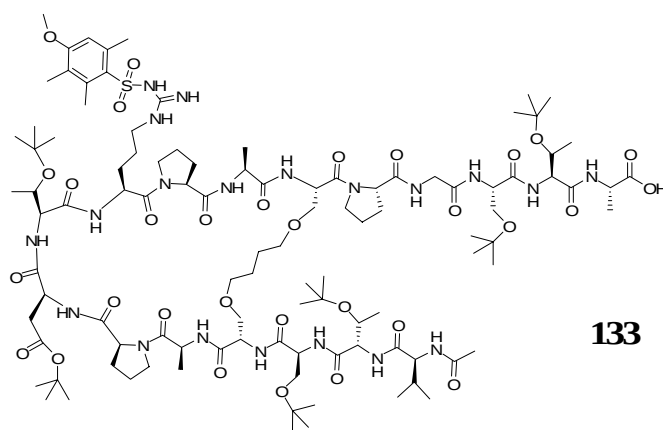
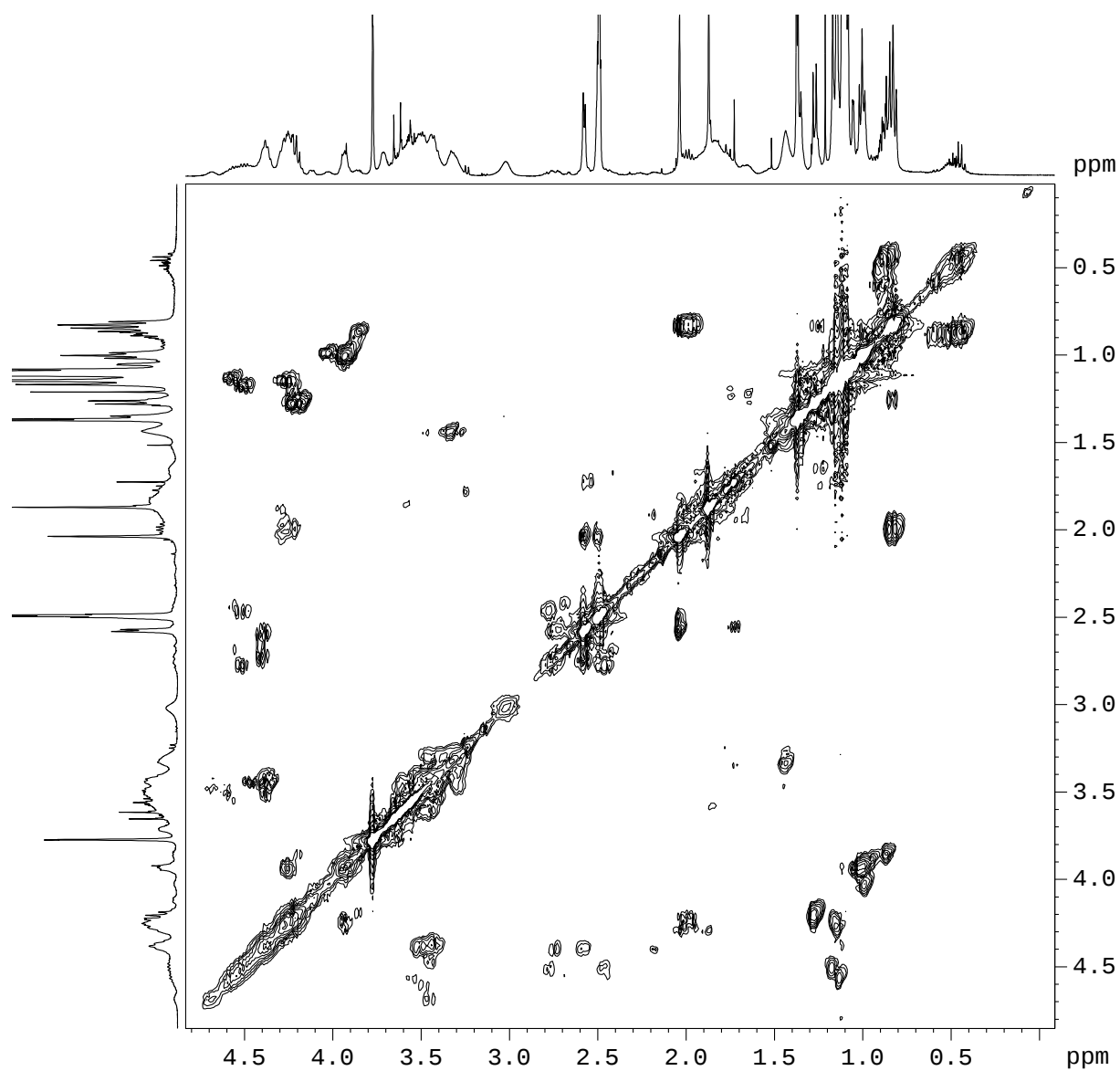
^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, DMSO- d_6)

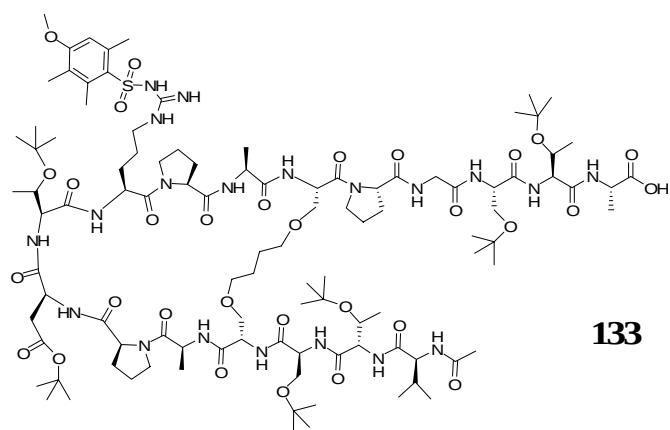
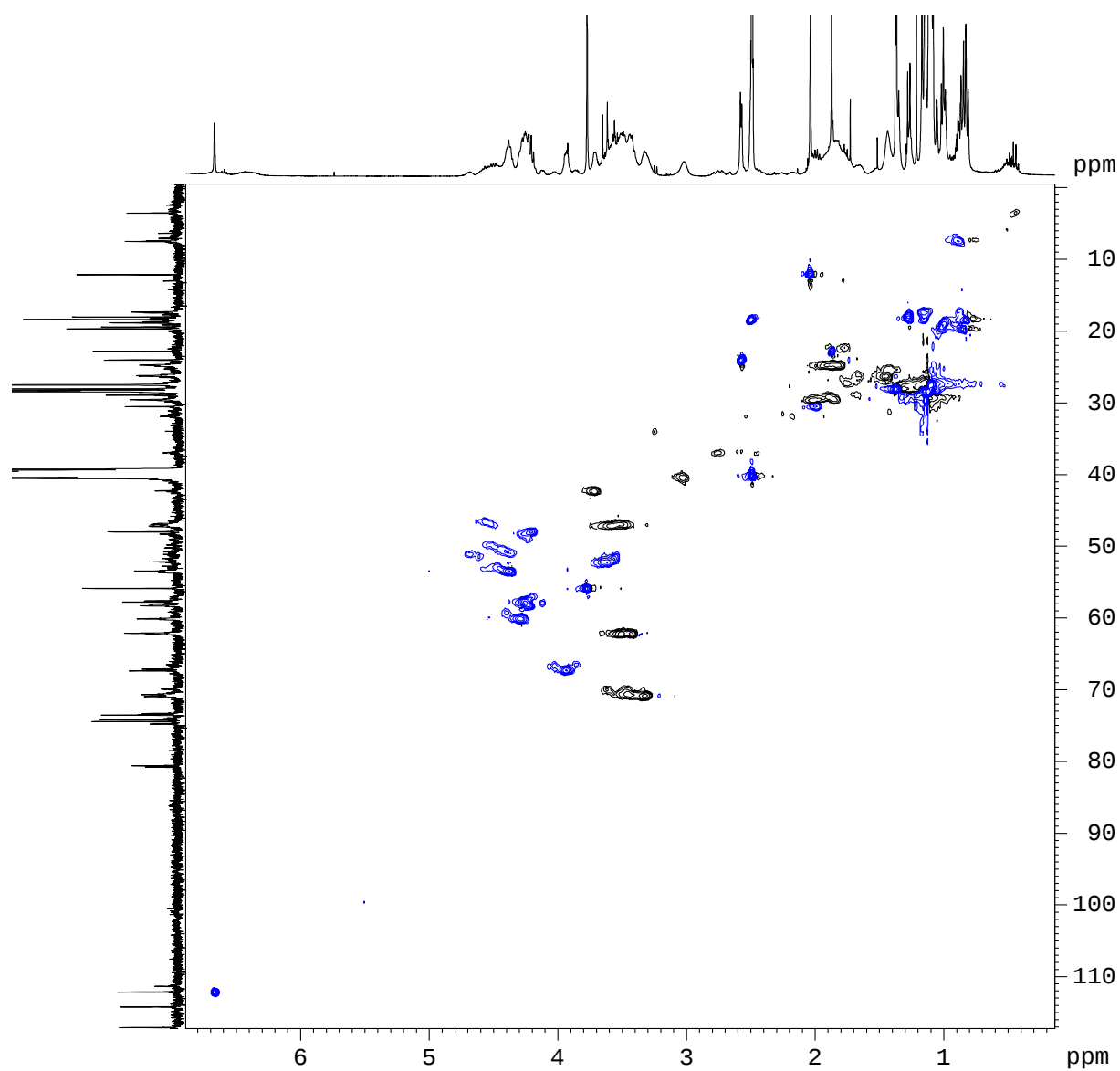


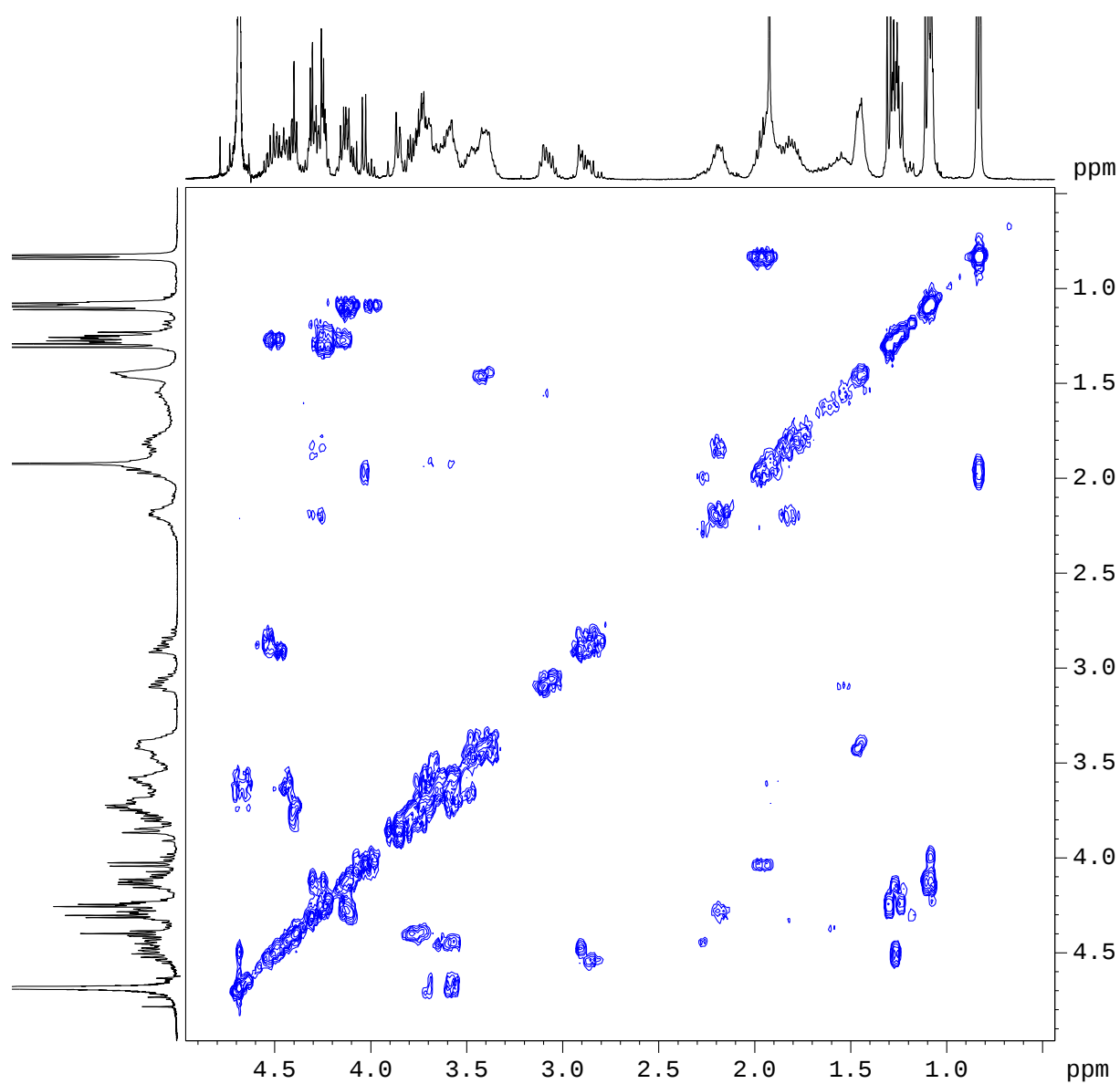
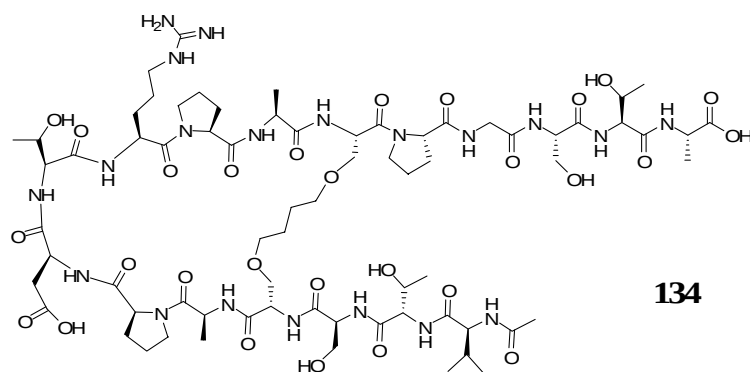
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO- d_6)

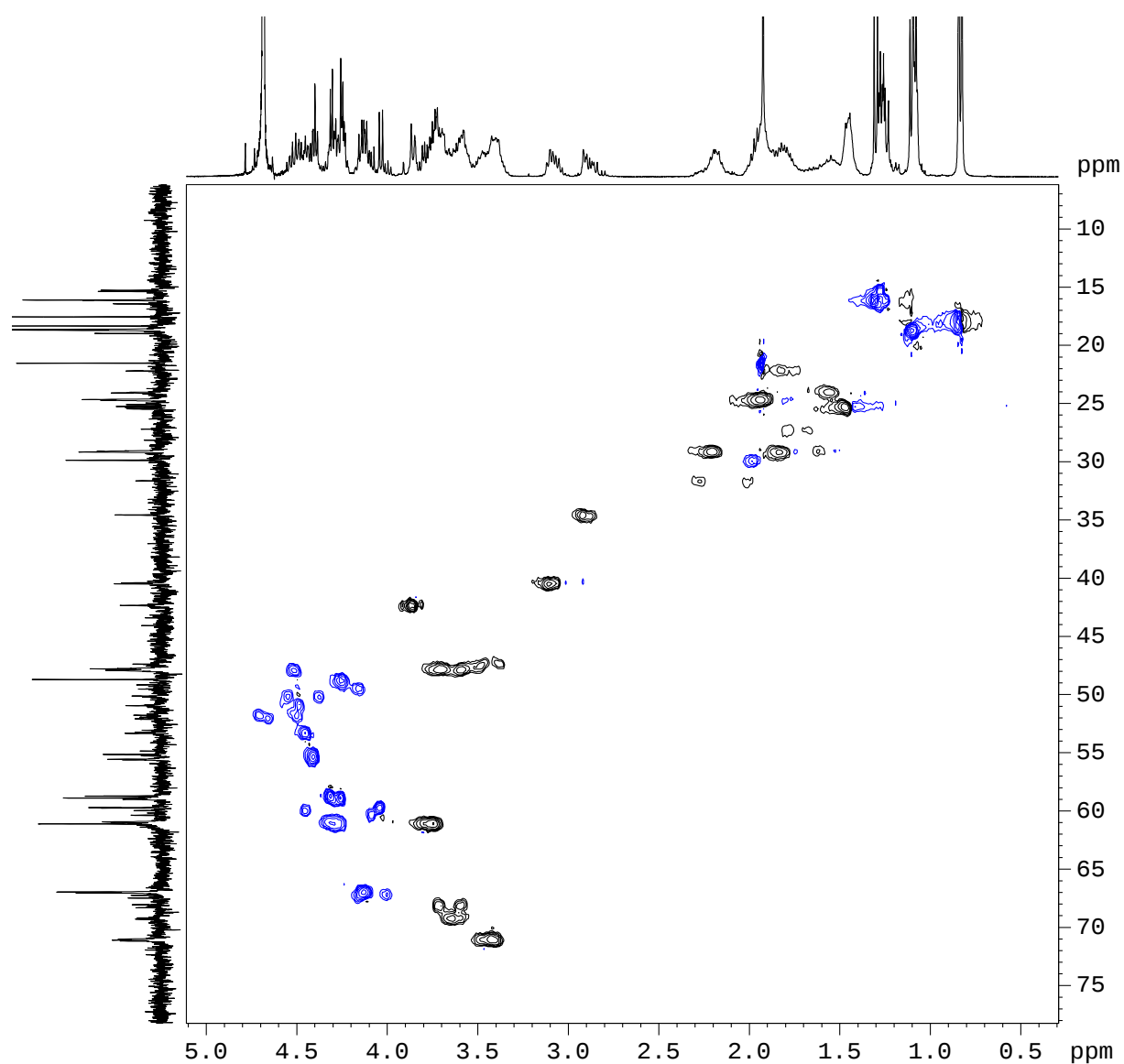
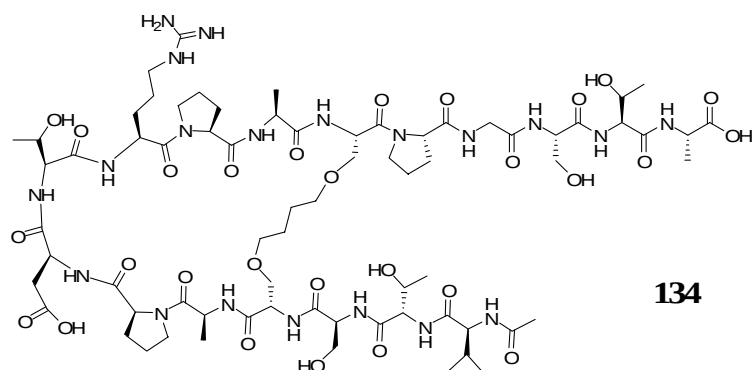


^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, BB, DMSO- d_6)

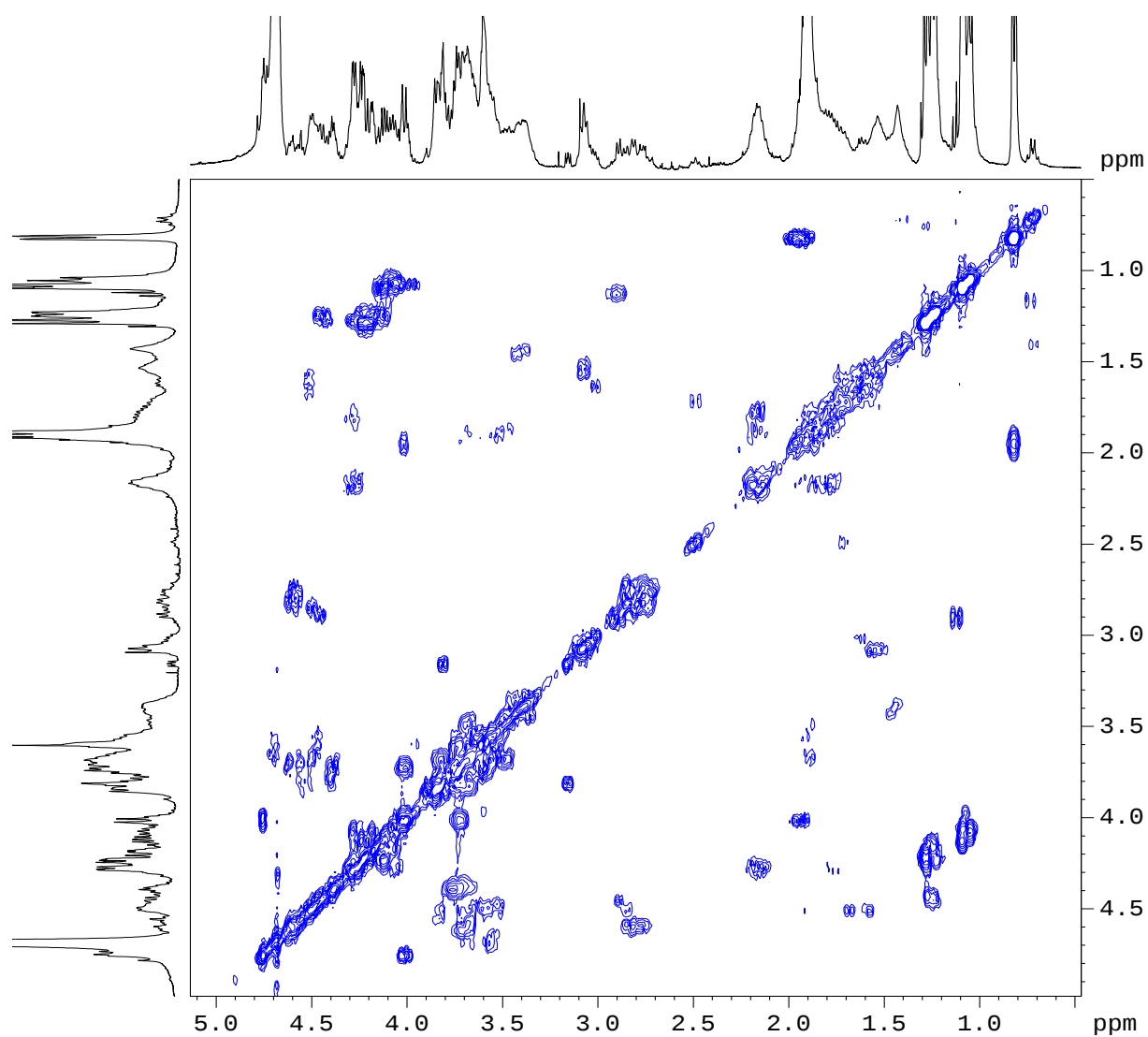
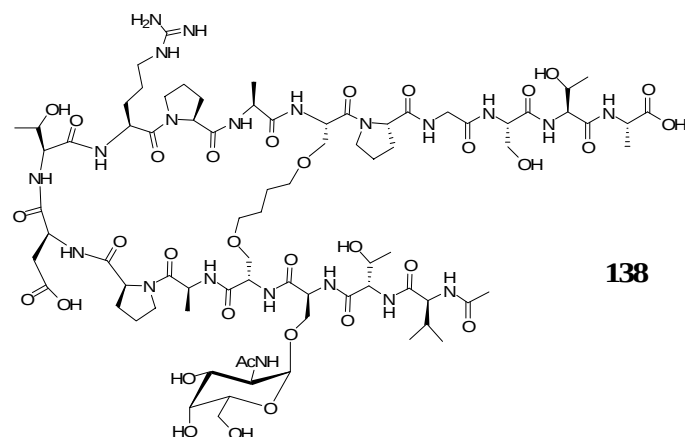
**133** ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, DMSO- d_6)

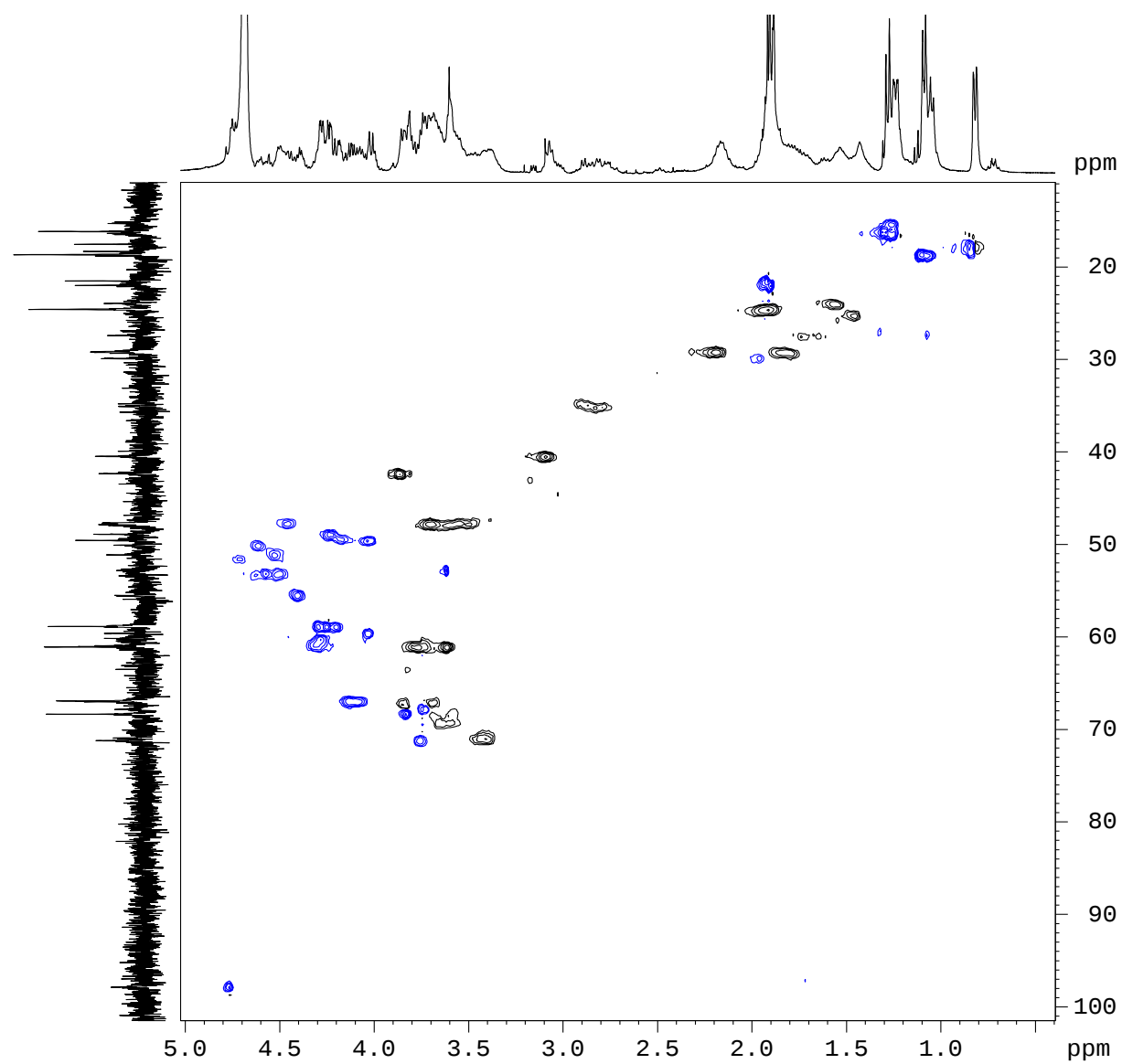
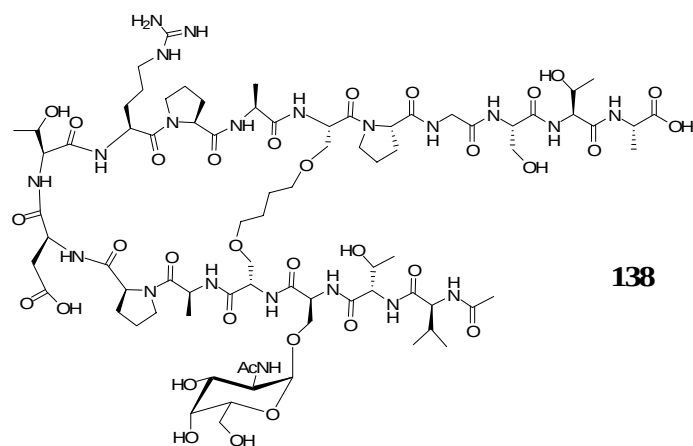
**133**HSQC (100.6 MHz, DMSO-d₆)

 ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, D_2O)

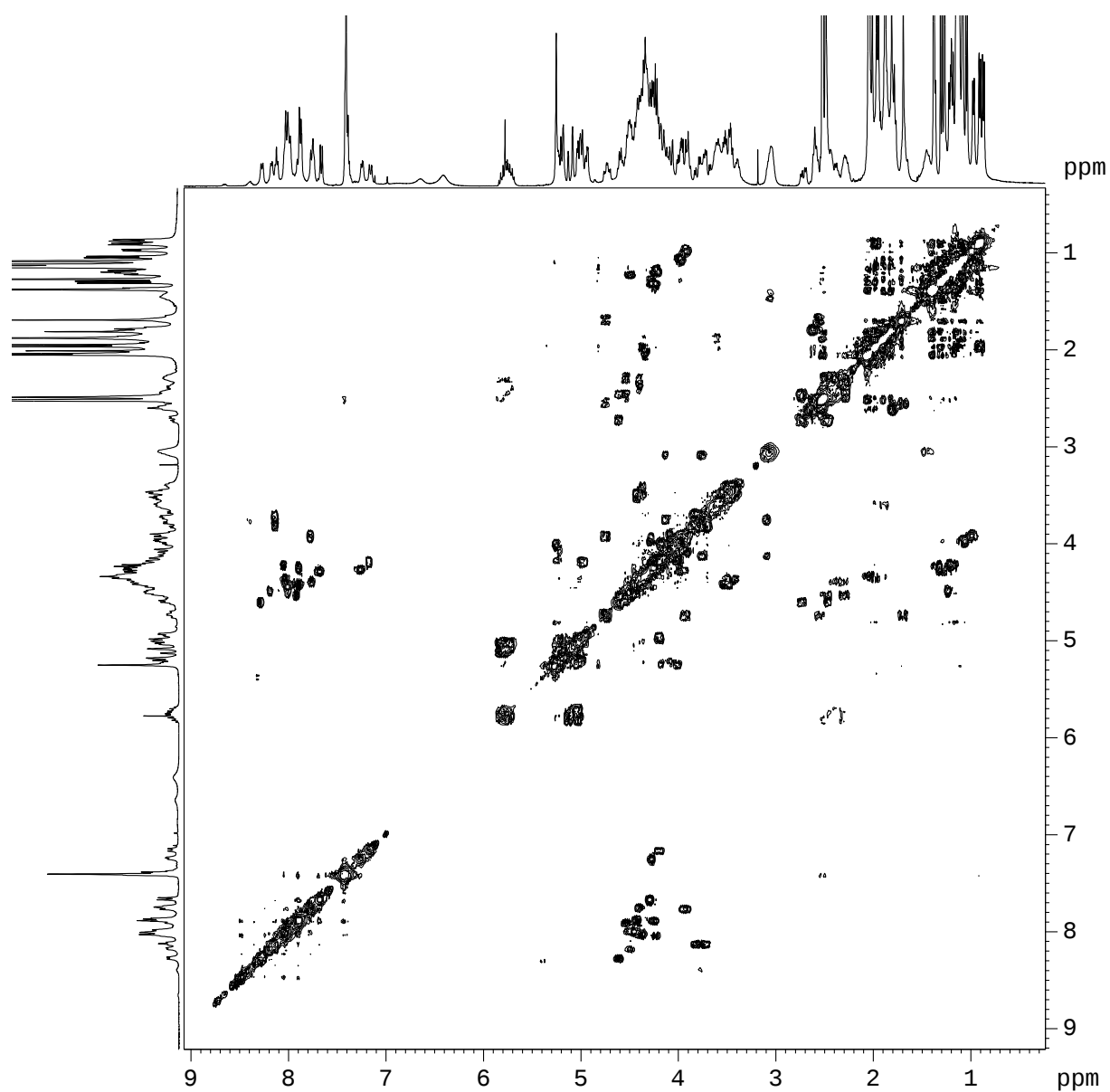
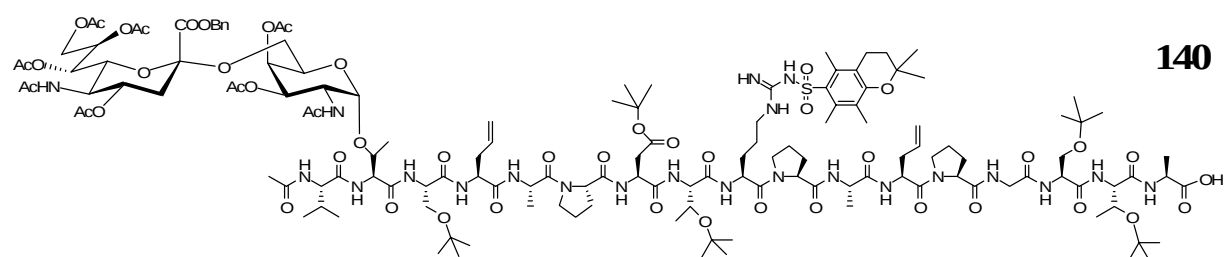


HSQC (100.6 MHz, D₂O)

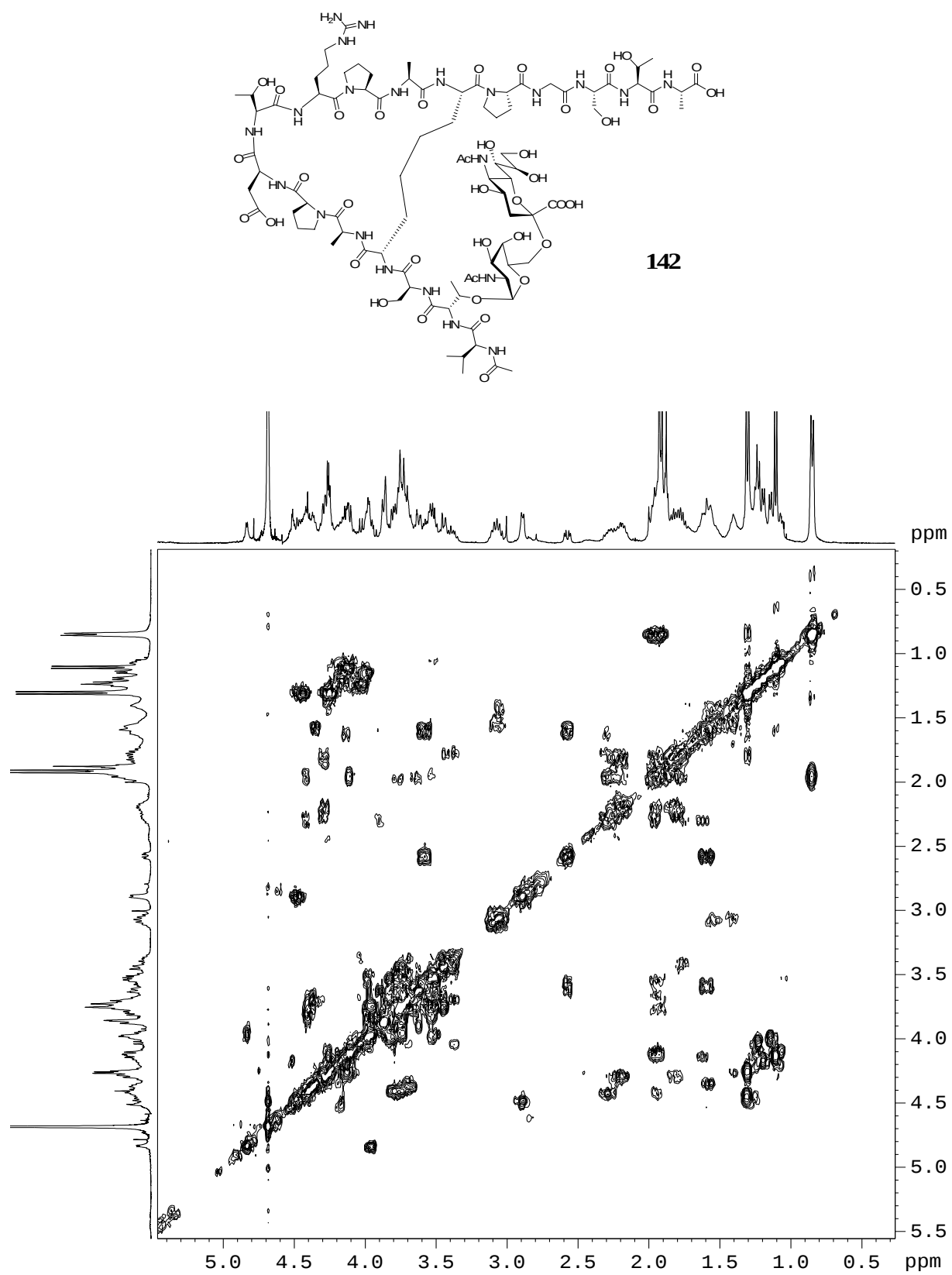
 ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, D_2O)



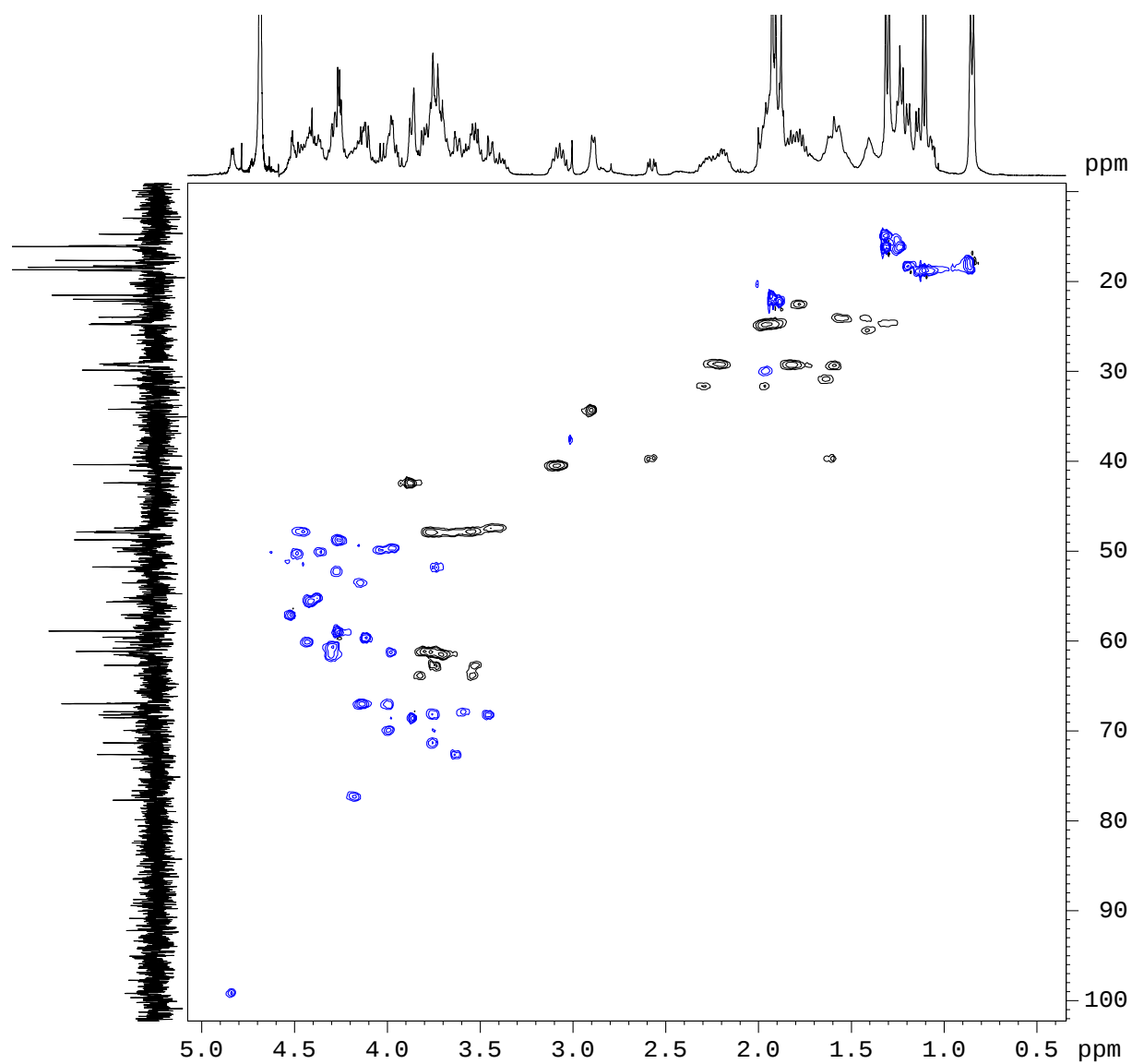
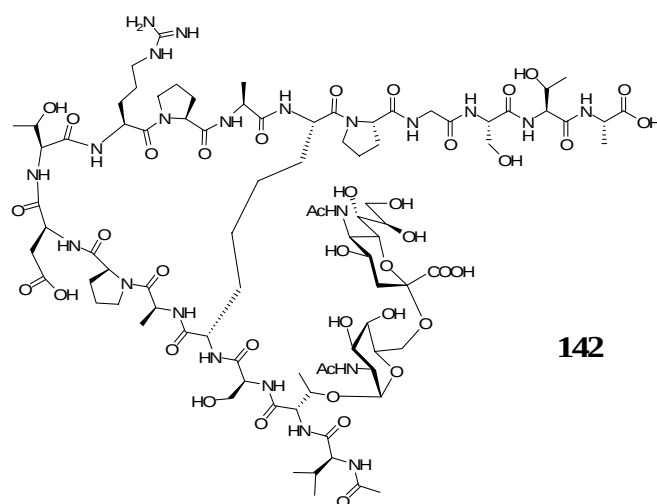
HSQC (100.6 MHz, D₂O)



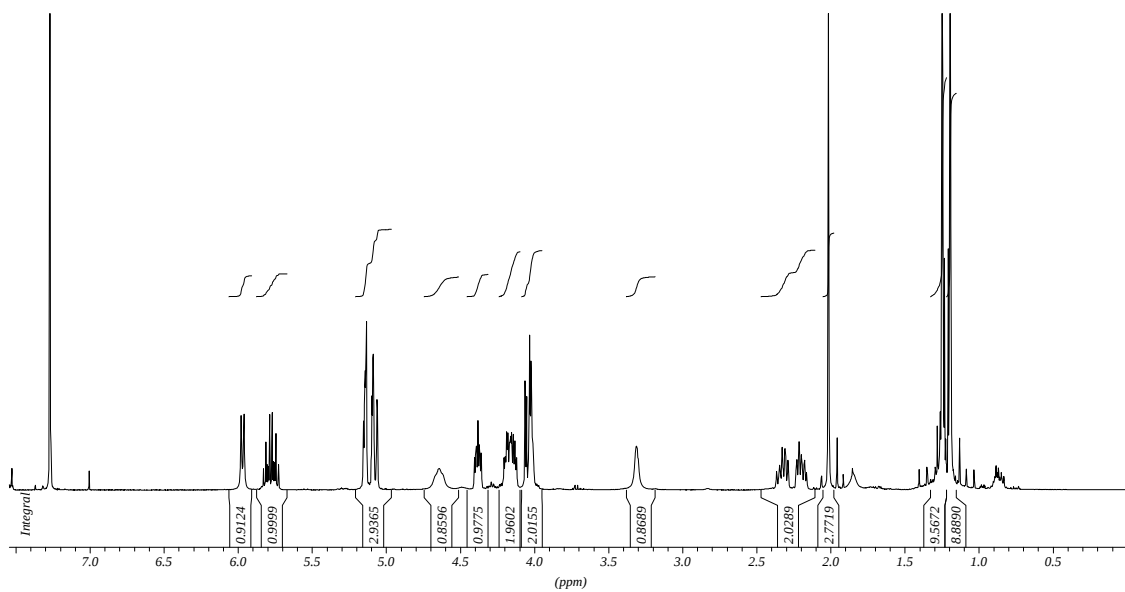
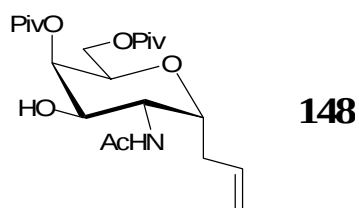
^1H - ^1H -COSY (400 MHz, DMSO- d_6)



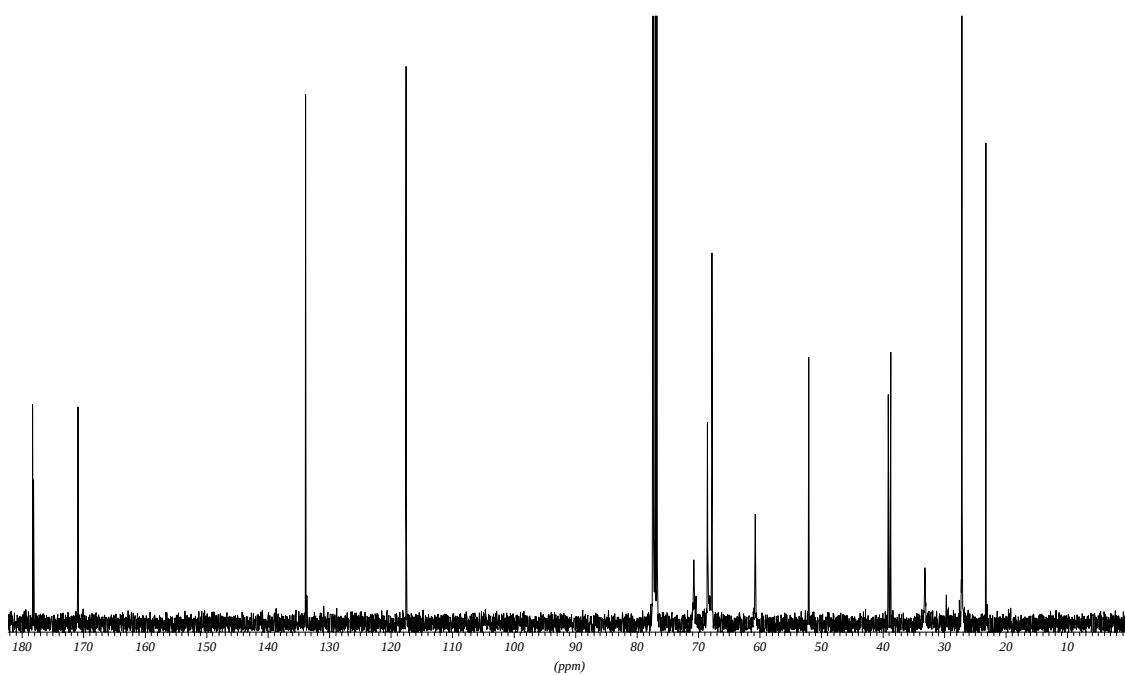
¹H-¹H-COSY (400 MHz, D₂O)



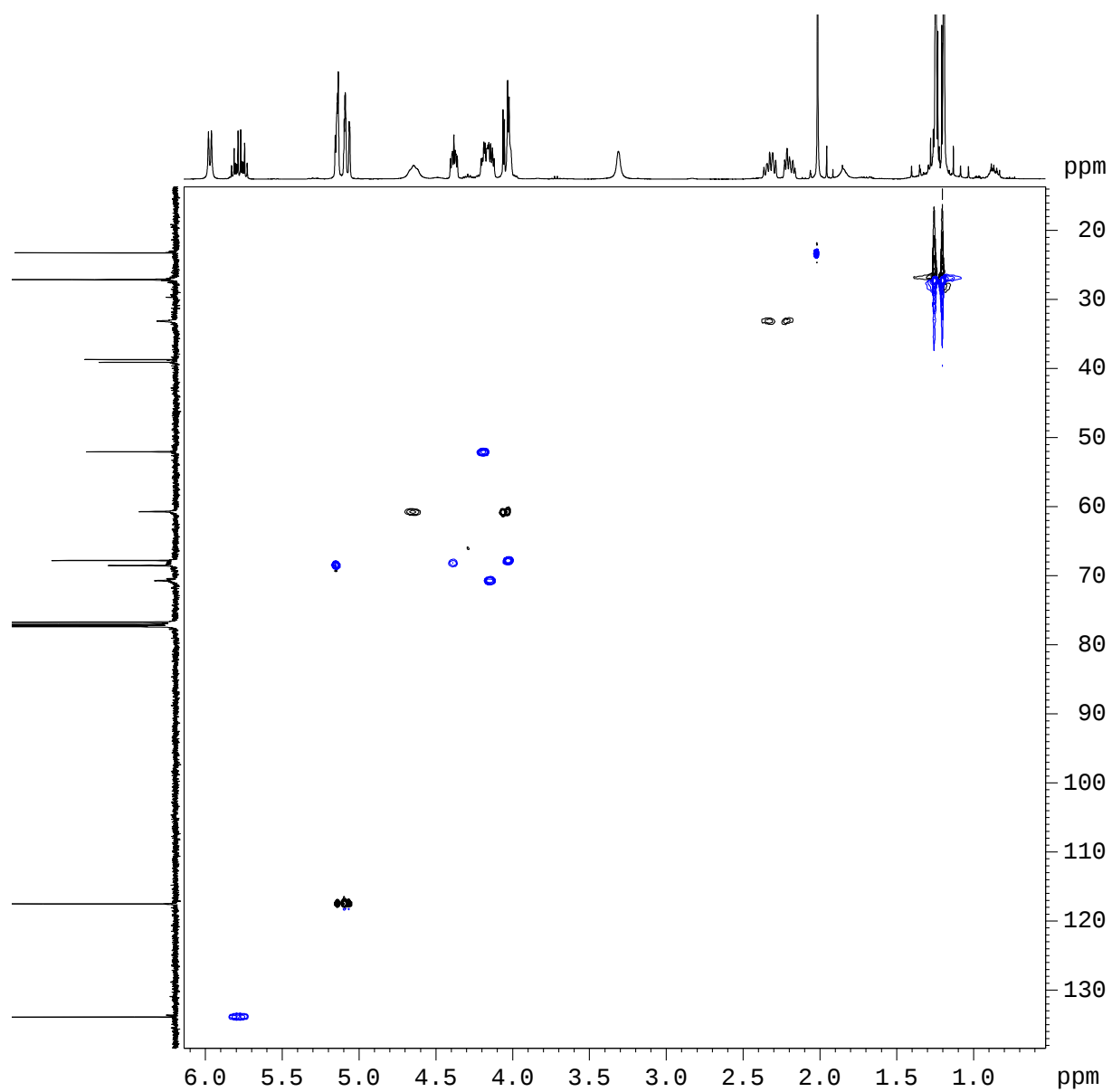
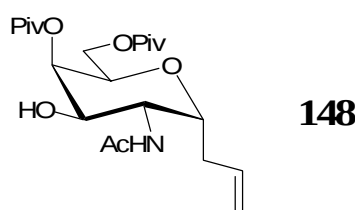
HSQC (100.6 MHz, D₂O)



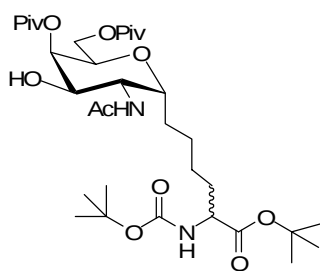
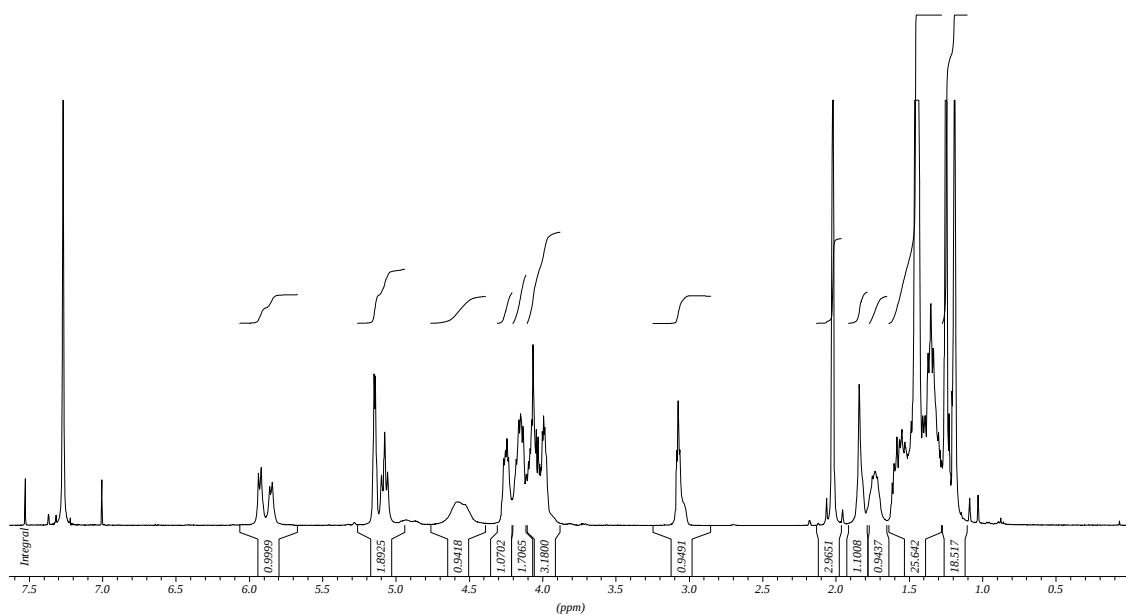
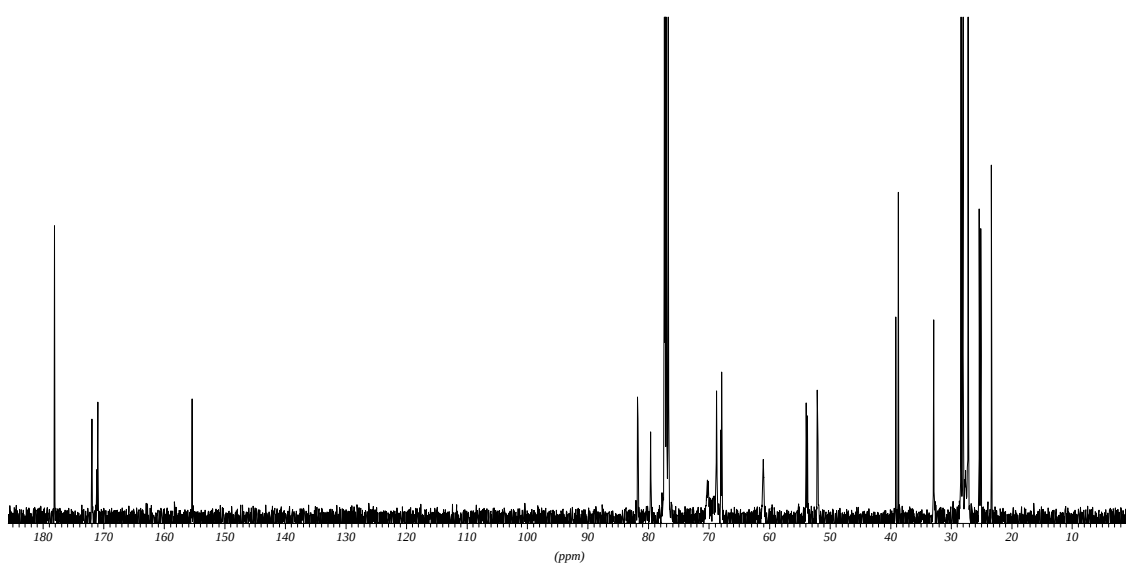
^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)

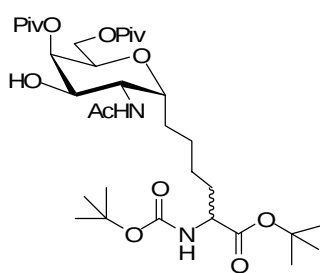


^{13}C -NMR-Spektrum (100.6 MHz, BB, CDCl_3)

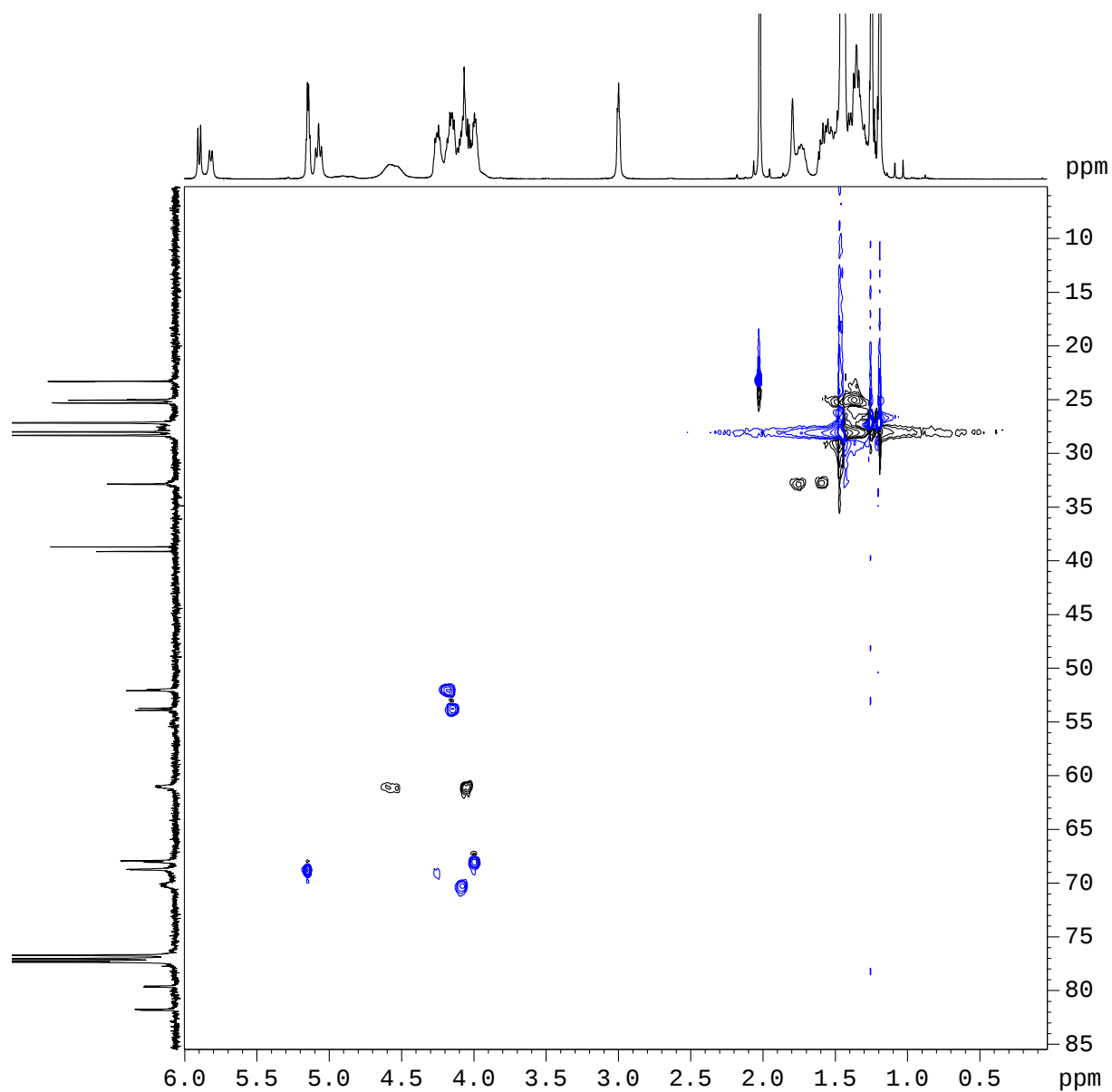


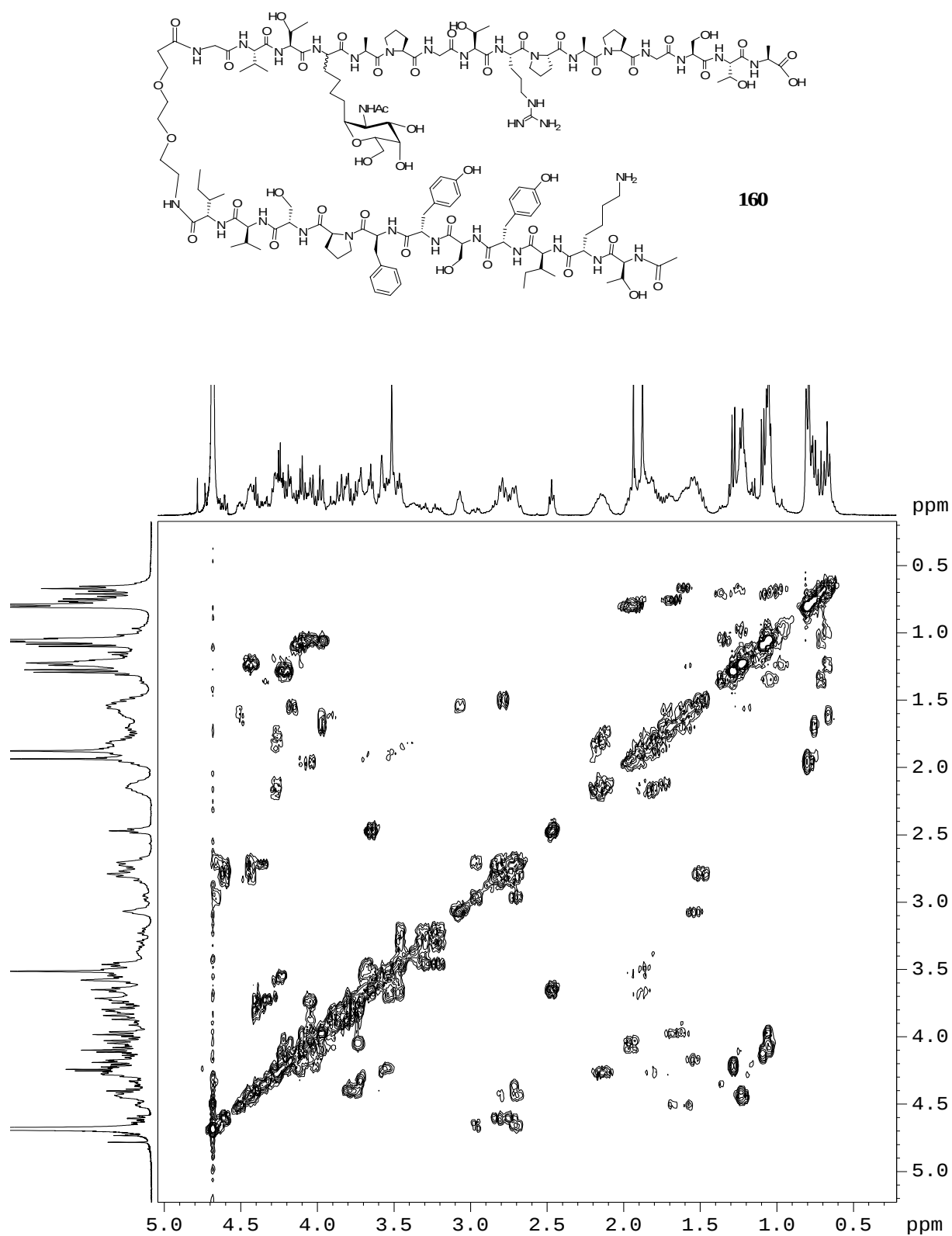
HSQC (100.6 MHz, CDCl₃)

**155**¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃)¹³C-NMR-Spektrum (100.6 MHz, BB, CDCl₃)

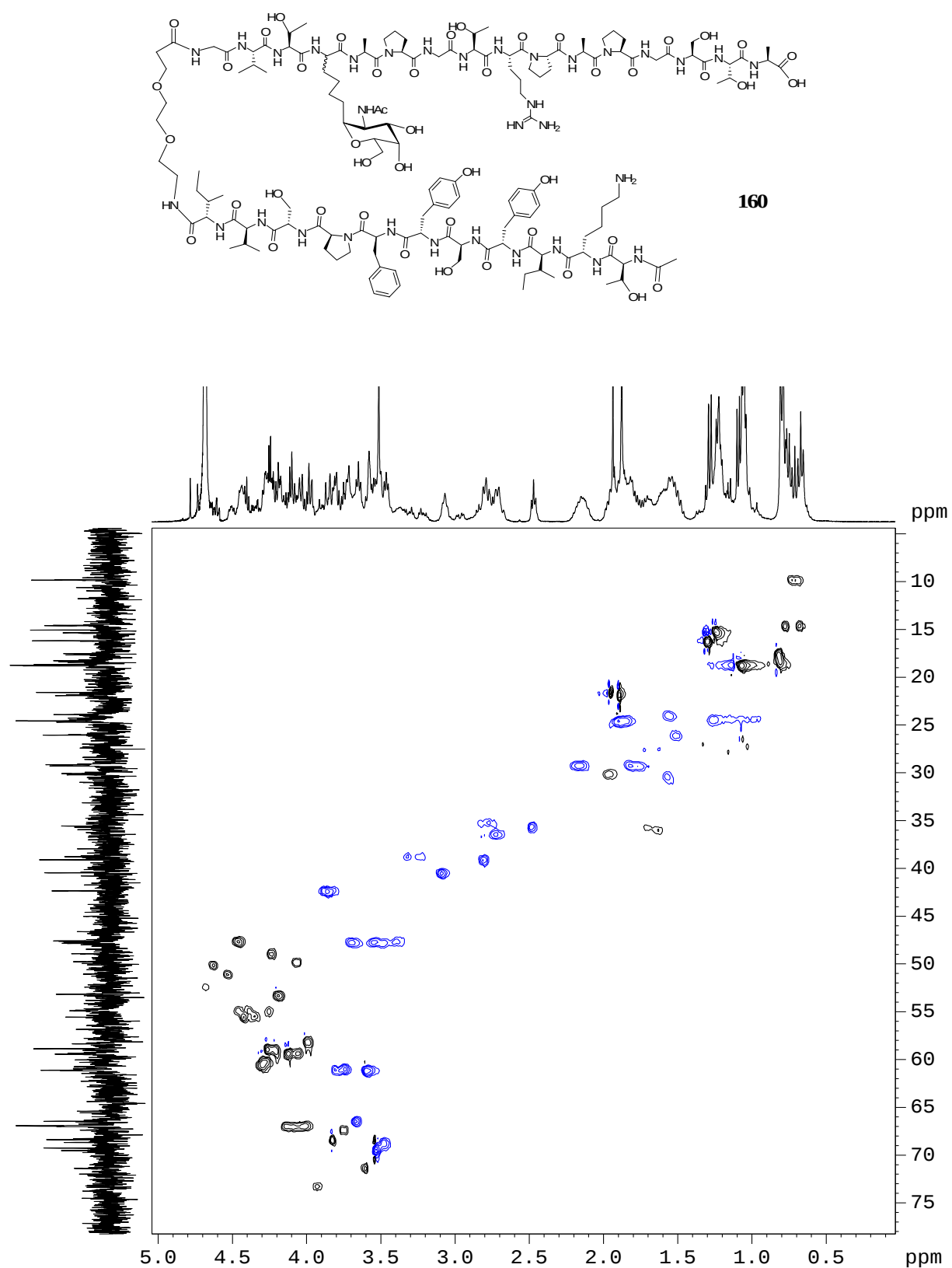


155

HSQC (100.6 MHz, CDCl_3)



^1H - ^1H -COSY (400 MHz, D_2O)

HSQC (100.6 MHz, D_2O)

