

**Synthese potentieller Antitumorvakzine aus
tumorassozierten Glycopeptiden des Mucins MUC1
und Versuche zur Festphasensynthese
von Oligosacchariden**

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

Kai Groh
geboren in Worms

Mainz, Mai 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von August 2003 bis März 2007
am Institut für Organische Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Biologische Bedeutung von Glycokonjugaten	1
1.1.1	Herausforderungen in der Kohlenhydratchemie	2
1.1.2	Synthesestrategien zur festphasengebundenen Oligosaccharidsynthese	3
1.1.2.1	Polymere Träger	3
1.1.2.2	Ankersysteme	3
1.1.2.3	Glycosyldonoren in der Oligosaccharidsynthese	4
1.1.2.4	Schutzgruppen	5
1.1.2.5	Kontrolle des Reaktionsverlaufes bei Festphasenreaktionen	6
1.1.2.6	Kernresonanz in Festkörpern	7
1.2	Anwendung von Glycopeptidkonjugaten in der Krebsimmuntherapie	9
1.2.1	Das epitheliale Glycoprotein MUC1 und Krebs	10
1.2.2	Ansätze zur Immuntherapie	14
2	ZIELSETZUNG	16
2.1	Entwicklung synthetischer Antitumorvakzine	16
2.2	Festphasenoligosaccharidsynthesen	17
3	ALLGEMEINER TEIL	18
3.1	Überblick zur Glycopeptidesynthese	18
3.1.1	Synthese des Sialyl-T _N -Threonin-Bausteins	18
3.1.2	Synthese des Triethylenglycolspacers	29
3.2	Festphasenoligosaccharidsynthese	30
3.2.1	Oligosaccharidsynthesen unter Verwendung des PTMSE-Ankersystems	31
3.2.1.1	Synthese des Phenyltrimethylsilyl-Ankers	32
3.2.1.2	Modellsynthesen am polymeren Träger	33
3.2.1.3	Polymere Träger	36
3.2.1.4	Synthesen am polymeren Träger	37
3.2.2	Optimierung der Festphasenreaktionen	41
3.2.2.1	Bestimmung der freien Aminogruppen am polymeren Träger	41
3.2.2.2	Bestimmung der freien Hydroxylgruppen am polymeren Träger	44
3.2.2.3	Synthese eines modifizierten Kohlenhydratbausteins	48
3.2.2.4	Beladungsoptimierung	51
3.2.2.5	Abspaltung der Lävulinoylschutzgruppe	52
3.2.2.6	Glycosylierung am polymeren Träger	54
3.2.2.7	Synthese reaktiver Glycosylakzeptoren	57
3.2.2.8	Synthese alternativer Ankergruppen	59
3.2.2.9	Glycosylierung der harzgebundenen Monosaccharide	65
3.2.3	Fazit zur Festphasenoligosaccharidsynthese	66

3.3	Glycopeptidsynthese	68
3.3.1.1	Polymere Träger und Ankersysteme	68
3.3.1.2	Schutzgruppen für die <i>N</i> -terminale Aminofunktion	69
3.3.1.3	Knüpfung der Peptidbindung	70
3.3.1.4	Allgemeines Protokoll der automatisierten Festphasensynthese	73
3.3.1.5	Potenzielle Nebenreaktionen der Peptidsynthese	76
3.4	Darstellung immunogener Glycopeptidkonjugate	79
3.4.1	Immunologischer Hintergrund	79
3.4.2	Glycopeptid-Mitogen-Konjugate	81
3.4.2.1	Synthese des Mitogens Pam ₃ Cys-OH	82
3.4.2.2	Synthese von Mitogenkonjugaten	83
3.4.2.3	Synthesestrategie	83
3.4.3	Konjugat aus einem Glycoprotein und einem T-Zell-Epitop	87
3.4.3.1	Synthesestrategie	87
3.4.3.2	Synthese des Heterotopkonjugates	87
4	ZUSAMMENFASSUNG	91
5	EXPERIMENTELLER TEIL	95
5.1	Allgemeines und Messgeräte	95
5.2	Synthese der Festphasenbausteine	100
5.2.1	Synthese des ST _N -Antigens	100
5.2.2	Synthese des Triethylenglycolspacers	112
5.3	Festphasenoligosaccharidsynthesen	116
5.3.1	Synthese des PTMSE-Ankers	116
5.3.2	Modellsynthesen am polymeren Träger	119
5.3.3	Optimierung der Festphasenreaktionen	126
5.4	Festphasenglycopeptidsynthesen	154
5.4.1	Synthesen zu Kapitel 3.4.2	154
5.4.2	Synthesen zu Kapitel 3.4.3	161
6	LITERATURVERZEICHNIS	165
7	SPEKTRENANHANG	173
7.1	Übersicht zum Spektrenanhang	173

Abkürzungsverzeichnis

α	spezifischer Drehwert
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
AgOTf	Silbertrifluormethansulfonat (Silbertriflat)
All	Allyl
Äquiv.	Äquivalente
äq	äquatorial
ax	axial
b	breit
BB	Breitband-Entkopplung
ber.	berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Bzn	Benzyliden
c	Konzentration
$^{\circ}$ Hex	Cyclohexan
COSY	Correlated Spectroscopy
δ	chemische Verschiebung
d	Tag(e), dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie, dendritische Zelle(n)
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
dd	Duplett vom Duplett
ddt	Duplett vom Duplett vom Triplet
dest.	destilliert
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
dt	Dublett von Triplet
DTBP	2,6-Di- <i>tert</i> -butylpyridin
EE	Essigsäureethylester
ESI-MS	Electrospray Ionisation-Massenspektrometrie
Et	Ethyl
Fa.	Firma
FD-MS	Field Desorption-Massenspektrometrie
Fmoc	Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
FmocOSu	<i>N</i> -(Fluoren-9-yl)methoxycarbonyloxy-succinimid
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
gef.	gefunden
gem	geminal
ges.	gesättigt
Glc	D-Glucose
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HMPB	4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutansäure
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-ESI	High Resolution Electrospray Ionisation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IL	Interleukin
i. Feinvak.	im Feinvakuum
<i>i</i> Pr	Isopropyl
i. Vak.	im Vakuum
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
Lev	Lävulinoyl
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
<i>m</i>	meta
M	Molarität
m	Multiplett
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
MAS	Magic Angle Spinning
mbar	Millibar
MBHA	<i>p</i> -Methylbenzhydrylamid
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MeCN	Acetonitril
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Molekularsieb, Massenspektrometrie
NeuNAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>o</i>	ortho
org.	organisch
OTf	Trifluormethansulfonat, Triflat
<i>p</i>	para
p. a.	per analysi
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl
ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
PTMSE	2-Phenyl-2-trimethylsilylethyl
q	Quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
Raumtemp.	Raumtemperatur
R_f	Retentionsfaktor
RP	Reversed Phase
R_t	Retentionszeit
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
Schmp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid

TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
TIS	Triisopropylsilan
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TsOH	4-Toluolsulfonsäure
vic.	vicinal

Verwendete Aminosäuren

A, Ala	Alanin	L, Leu	Leucin
R, Arg	Arginin	P, Pro	Prolin
D, Asp	Asparaginsäure	S, Ser	Serin
F, Phe	Phenylalanin	T, Thr	Threonin
G, Gly	Glycin	V, Val	Valin
I, Ile	Isoleucin	Y, Tyr	Tyrosin
K, Lys	Lysin		

1 Einleitung

1.1 Biologische Bedeutung von Glykokonjugaten

In den vergangenen Jahren wurden Bedeutung und Funktionen von Kohlenhydraten in biologischen Systemen intensiv untersucht. Kohlenhydrate galten lange Zeit vor allem als Komponenten zum Schutz von Proteinen. Heute weiß man, dass diese Klasse von Biomolekülen in vielen physiologischen Prozessen von entscheidender Bedeutung ist.^{1,2,3} Als Komponenten von Glycolipiden sind Saccharide an Erkennungs- und Signaltransduktionsprozessen beteiligt. In Glycoproteinen sind sie nicht nur, die Reinigung erschwerende Substituenten, die zur Untersuchung der Proteinteile abgespalten werden müssen. Vielmehr sind die Kohlenhydrate oft ebenso wichtig wie das Protein selbst und beeinflussen dessen Struktur, Funktion und physikalische Eigenschaften. Das ubiquitäre Vorkommen von Glycoproteinen in der Natur spiegelt deren enorme Bedeutung wider. So sind sie z. B. an mikrobielle Virulenz,⁴ Entzündungen⁵ und Immunantwort^{2,6} bestimmenden Zell-Zell-Kommunikationsprozessen beteiligt. Weiterhin erhöht die Glycosylierung thermische und proteolytische Stabilität von Proteinen und ist ausschlaggebend für deren korrekte Faltung und Expression.⁷

Die Informationsdichte, die Kohlenhydratstrukturen zu tragen in der Lage sind, ist unter den Biomolekülen unerreicht. So kann die Natur präzise zwischen den 1-2, 1-3, 1-4 und 1-6 Verknüpfungen zweier Pyranosen unterscheiden, wohingegen Peptide und Nukleinsäuren mit einem einfacheren linearen Aufbau aufwarten. Addiert man hierzu noch die durch Ringgröße, Stereochemie am anomeren Zentrum und Modifizierung von Untereinheiten eröffneten Variationsmöglichkeiten, so lässt sich leicht die Ausnahmestellung der Oligosaccharide erkennen.⁸

Ein großes Problem der molekularen Glycobiologie ist der Mangel an ausreichenden Mengen reiner, strukturell definierter Glykokonjugate. In der Natur vorkommende Glycoproteine treten in Isoformen auf, d. h. sie besitzen das gleiche Peptidgrundgerüst, unterscheiden sich aber in Art und Ort der Glycosylierung. Diese Mikroheterogenität entsteht, da in der Natur keine Informationsträger existieren, die eine bestimmte

¹ P. Sears, C.-H. Wong, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 223

² A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97

³ T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532

⁴ N. Sharon, H. Lis, *Essays Biochem.* **1995**, *30*, 59

⁵ W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441

⁶ P. M. Rudd, T. Elliot, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370

⁷ A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2357

⁸ R. A. Laine, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759

Kohlenhydratstruktur codieren. Stattdessen konkurrieren unterschiedliche Enzymsätze um die gleichen Substrate, so dass scheinbar zufällig verschiedene Produkte entstehen.¹ Die unterschiedlichen Eigenschaften der Komponenten dieser mikroheterogenen Mischung erschweren die Bestimmung der Funktion einzelner Bestandteile. Es besteht deshalb Bedarf an Methoden zur Gewinnung homogener Glycoproteine. Hierin liegt eine Herausforderung der synthetischen Chemie. Trotz intensiver Untersuchungen auf diesem Gebiet, bleibt die Synthese dieser komplexen Moleküle noch immer sehr zeitaufwendig. Oligonucleotid-⁹ und Peptidsynthesen^{10,11} werden seit vielen Jahren automatisiert in Synthesizern durchgeführt. Es wird in Zukunft von Bedeutung sein, Methoden zu entwickeln, mit deren Hilfe sich Effizienz und Geschwindigkeit von Oligosaccharidsynthesen steigern lassen.

1.1.1 Herausforderungen in der Kohlenhydratchemie

Verglichen mit der Synthese von Proteinen und Nucleinsäuren gestaltet sich die Verknüpfung von Saccharidbausteinen um einiges schwieriger. Die Moleküle sind typischerweise eher verzweigt als linear aufgebaut. Funktionelle Gruppen ähnlicher Reaktivität an jedem Monomer erfordern Konzepte zur effektiven Differenzierung, um Zugang zu einheitlichen Produkten zu erhalten. Darüber hinaus wird bei jeder glycosidischen Verknüpfung ein weiteres Stereozentrum aufgebaut. Aufgrund all dieser Faktoren gibt es bis heute kein allgemein anwendbares Verfahren, das ermöglicht, alle Oligosaccharide oder auch nur die mehr als 15 Mio. möglichen Tetrasaccharide, die aus den neun im menschlichen Organismus vorkommenden Monosacchariden zugänglich sind, zu synthetisieren.¹²

In den letzten Jahrzehnten wurde das Spektrum synthetischer Möglichkeiten kontinuierlich erweitert. Dabei wurden neue Wege zur Synthese von Kohlenhydraten und Glycokonjugaten geschaffen. So wurden Kupplungsmethoden mit besseren Ausbeuten und Selektivitäten sowie neue Schutzgruppenstrategien gefunden.¹³ Die Hoffnung besteht, dass durch die Entwicklung von festphasenunterstützten, automatisierbaren Synthesestrategien der Zeitaufwand weiter verringert und die Reinigung von Zwischenstufen erleichtert werden kann.

⁹ M. H. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281

¹⁰ R. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, 24, 799

¹¹ R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149

¹² P. Sears, C.-H. Wong, *Science* **2001**, 291, 2344

¹³ B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ, *Carbohydrates in Chemistry and Biology* WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2000**

1.1.2 Synthesestrategien zur festphasengebundenen Oligosaccharidsynthese

Merrifields Arbeiten zur Festphasenpeptidsynthese führten zu entscheidenden Fortschritten in der Synthese von Peptiden und Nukleinsäuren.^{10,11} Obwohl schon Anfang der siebziger Jahre die ersten Versuche zur Oligosaccharid-Festphasensynthese unternommen wurden,¹⁴ waren deren Erfolge aufgrund von Kompatibilitätsproblemen zwischen den zur Glycosylierung verwendeten Promotoren und der Matrix bescheiden. Bedingt durch methodische Fortschritte in Lösung durchgeführter Oligosaccharidsynthesen wurde das Interesse an diesen Reaktionen neu geweckt. Im Nachfolgenden soll ein kurzer Überblick über polymere Träger, Ankersysteme, Schutzgruppen und Glycosyldonoren gegeben werden, die Anwendung in festphasengebundenen Synthesen finden.

1.1.2.1 Polymere Träger

Auf Polystyrol basierende Harze sind die wohl am häufigsten verwendeten Trägermaterialien in der Synthese,¹⁵ auch wenn sie nicht notwendiger Weise die besten Charakteristika in Bezug auf Quelleigenschaften und Zugang der Reaktanten zu den reaktiven Positionen besitzen. Vor allem in Kombination mit polaren Lösungsmitteln ist ihre Anwendung eingeschränkt. Die Quelleigenschaften können jedoch durch Anpfropfen von Polyethylenglycolketten an den Polystyrolkern erheblich verbessert werden. Solche Copolymere wie z. B. *TentaGel*[®] (*Rapp Polymere GmbH, Tübingen*) gewähren somit zusätzliche Freiheiten bei der Verwendung von Lösungsmitteln in der Synthese.¹⁶

1.1.2.2 Ankersysteme

An den Anker werden mehrere Anforderungen gestellt. So muss er eine, unter allen verwendeten Reaktionsbedingungen stabile Verknüpfung des Saccharids mit dem Harz gewährleisten, orthogonal zu den temporären Schutzgruppen spaltbar sein und wenn möglich einen reaktivitätsverbessernden Abstand zwischen Harz und Reaktionszentrum schaffen. Der Anker kann somit als trägergebundene Schutzgruppe betrachtet werden. Thioglycosidische Anker bieten eine attraktive Möglichkeit zur Anknüpfung über das anomere Kohlenstoffzentrum. Die thioglycosidische Bindung ist gegenüber vielen Reaktionsbedingungen stabil, lässt sich aber durch Zusatz thiophiler Elektrophile wie NBS in Gegenwart von 2,6-Di-*tert*-butylpyridin (DTBP) leicht spalten.¹⁷ Auch die in der Festphasenpeptidchemie verwendeten säurelabilen Anker finden Einsatz in der Oligosaccharidsynthese. So wurde anhand der Synthese eines Polylactosamins gezeigt,

¹⁴ J. M. Fréchet, C. J. Schuerch, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 492

¹⁵ J. Rademann, A. Geyer, R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1241

¹⁶ E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, *3*, 3

¹⁷ J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem* **1997**, *62*, 3650

dass der *Wang*-Anker unter den mild sauren Glycosylierungsbedingungen stabil ist, im Anschluss jedoch durch TFA gespalten werden kann.¹⁸ Obwohl auf Silylgruppen basierende Anker den Gebrauch von temporären Silylschutzgruppen ausschließen, finden sie dank ihrer selektiven, in hohen Ausbeuten verlaufenden Abspaltung Verwendung. Neben den hier aufgeführten Ankern gibt es noch viele weitere Systeme, die in der Synthese erprobt und der Literatur beschrieben wurden.¹⁹

1.1.2.3 Glycosyldonoren in der Oligosaccharidsynthese

Die meisten Synthesen von Glycosiden basieren auf der Aktivierung einer anomeren Abgangsgruppe des Donors und deren Ersatz durch eine freie Hydroxylgruppe des Akzeptors. Die auf Glycosylhalogenid-Donoren beruhende *Koenigs-Knorr* Methode war eine der ersten Techniken die weitverbreiteten Einsatz fand und noch heute gebräuchlich ist.^{20,21} Seitdem wurden viele neue Abgangsgruppen entwickelt, die Stabilität und Reaktivität des Donors verbessern. Trichloacetimidate,²² zugänglich aus der freien anomeren Hydroxylgruppe des Zuckers durch Umsetzung mit Trichloracetonitril und einer Base, werden häufig verwendet, ebenso wie Glycosylsulfoxide,²³ -phosphite²⁴ und -phosphate,²⁵ sowie Thio-²⁶ und Pentenylglycoside (Abbildung 1.1). Oligosaccharide lassen sich aber auch vom nichtreduzierenden Ende her beginnend aufbauen. Als Bausteine verwendet man hierbei Glycale. Diese werden durch Epoxidierung aktiviert und können dann entweder direkt oder über die intermediäre Bildung eines der oben beschriebenen Donoren mit dem Akzeptor zur Reaktion gebracht werden.²⁷ Ein entscheidender Faktor ist die Kontrolle der anomeren Konfiguration. Da die Reaktionen bereitwillig sowohl über S_N1 - als auch über S_N2 -artige Reaktionsmechanismen ablaufen können, ist nicht selbstverständlich davon auszugehen, dass über die anomere Konfiguration des aktivierten Donors, eine einheitliche Stereochemie des Produktes definiert und erhalten werden kann. Stattdessen beeinflussen weitere Faktoren, wie der anomere Effekt,²⁸ partizipierende

¹⁸ H. Shimizu, Y. Ito, O. Kanie, T. Ogawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 2841

¹⁹ P. H. Seeberger, W.-C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, 24, 799

²⁰ W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 957

²¹ H. Paulson, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 184

²² R. R. Schmidt, W. Kinzey, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 21

²³ R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, 274, 1520

²⁴ T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6123

²⁵ S. Hashimoto, T. Honda, S. Ikegami, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1989**, 11, 685

²⁶ R. J. Ferrier, R. W. Hay, N. Vethaviasar, *Carbohydr. Res.* **1973**, 27, 55

²⁷ S. J. Danishefski, K. F. McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, 260, 1307

²⁸ R. U. Lemieux, K. B. Hendrix, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 4056

Nachbargruppen, Polarität des Lösungsmittels und vieles mehr entscheidend das Diastereomerenverhältnis.

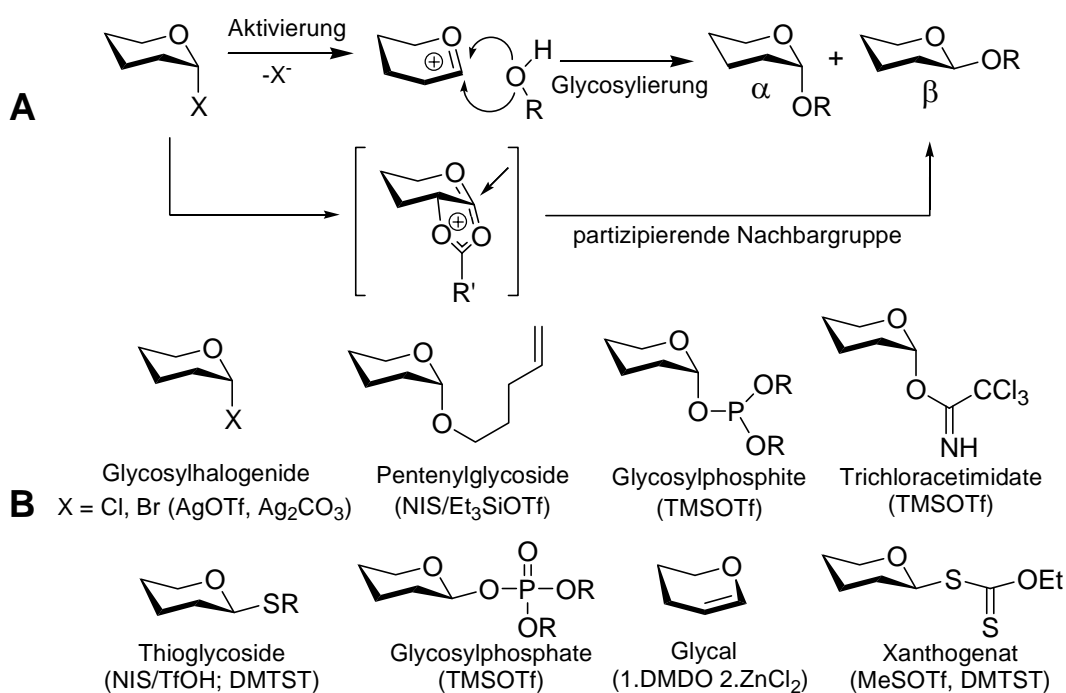
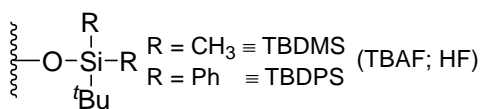
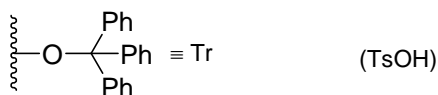
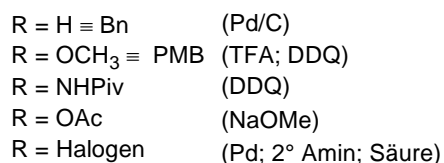
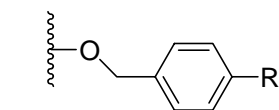
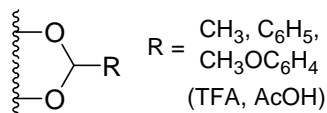
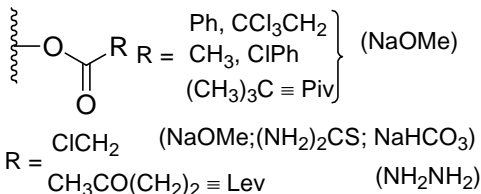
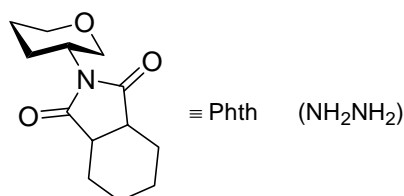
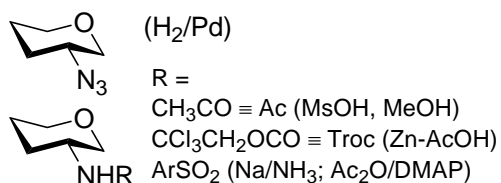


Abbildung 1.1: Mechanismus der Glycosylierung (A) und häufig verwendete Donoren (B)

1.1.2.4 Schutzgruppen

Die Fülle an Hydroxylgruppen in einem Kohlenhydrat verhindert in der Regel eine selektive Reaktion an einer einzelnen Position. Daher ist es notwendig, ein Schutzgruppenmuster an den Monosacchariden aufzubauen, das in Bezug auf Stabilität und orthogonale Spaltbarkeit den Erfordernissen der Synthese gerecht wird. Für komplexe Kohlenhydrate ist demnach eine sorgfältige Planung der Synthese notwendig. Häufig angewendet werden Benzyl- und Silylether so wie säure- oder basenempfindliche Schutzgruppen. Aufgrund der außerordentlichen Komplexität möglicher Kohlenhydratstrukturen gibt es kein universell anwendbares Konzept, so dass die Schutzgruppenstrategie auf jede Syntheseroute individuell abgestimmt werden muss.²⁹ Ein Überblick über gängige Schutzgruppen ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

²⁹ S. H. Khan, R. A. O'Neil, *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis* **1996**, Harwood Academics, Amsterdam

Ether**Acetale****Ester****Schutzgruppen für Amine****Abbildung 1.2:** Häufig verwendete Schutzgruppen und ihre Abspaltungsbedingungen**1.1.2.5 Kontrolle des Reaktionsverlaufes bei Festphasenreaktionen**

Werden Reaktionen in Lösungen durchgeführt, sind viele analytische Techniken zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes verfügbar, einschließlich der einfach durchzuführenden und aussagekräftigen Dünnschichtchromatographie, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Die Untersuchung und Weiterentwicklung festphasengebundener Reaktionen wird durch das Fehlen schneller und aussagekräftiger, nichtdestruktiver Methoden zur Reaktionskontrolle stark eingeschränkt. Im Zusammenhang mit Festphasenreaktionen angewandte Analysemethoden sind IR-, Raman-Spektroskopie,³⁰ ¹H-MAS-NMR-Spektroskopie,³¹ Elementaranalyse, Titration reaktiver Gruppen, Photometrie und gravimetrische Analysen. Auch kann durch die Entnahme einer Teilmenge des Harzes, Abspaltung und anschließender Analyse des Produktes mit Standardmethoden wie Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie der Reaktionsverlauf verfolgt werden. Für die Anwendung der Analysemethoden bestehen jedoch spezielle Einschränkungen.

³⁰ (a) G. Hummel, O. Hindsgaul, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1782, (b) B. Yan, H. Yan, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 78

³¹ O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1253

- *IR-spektroskopische Untersuchungen* sind vor allem dann hilfreich, wenn Gruppen mit charakteristischen, möglichst intensiven Schwingungsbanden, die sich nicht mit anderen im Molekül oder Träger vorkommenden Banden überschneiden, angeknüpft oder abgespalten werden.
- Da viele Reaktionen wie z. B. Schutzgruppenmanipulation nur geringe Massen- und Zusammensetzungsveränderungen des Gesamtkonstruktes aus Molekül und polymerem Träger bewirken, sind *Elementar-* und *gravimetrische Analysen* mit hohen relativen Fehlern belastet, was quantitative Aussagen zum Reaktionsverlauf erschwert. Eine Ausnahme besteht im Fall der Elementaranalyse, wenn nachweisbare Elemente wie z. B. Schwefel oder Halogene neu eingeführt oder komplett aus der Gesamtstruktur entfernt werden.
- Der *Titration* sind die verschiedenen funktionellen Gruppen unterschiedlich gut zugänglich. Einfach durchführbar ist sie für NH₂-, COOH-, HOAr- und HS-Gruppen; die in der Kohlenhydratchemie häufig interessierenden Hydroxylgruppen sind hingegen schwer quantitativ nachweisbar.
- *Photometrische Analysemethoden* basieren meist auf der Abspaltung einer UV-aktiven Gruppe, und deren quantitativem Nachweis in der Abspaltlösung. Dies erfordert entweder das Freisetzen einer solchen Verbindung im Zusammenhang mit dem Reaktionsverlauf oder deren vorherige Einführung zum Zweck der Reaktionskontrolle.
- Die *Dünnschichtchromatographie* ist eine effiziente Methode zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes. Für Reaktionsoptimierungen benötigte quantitative Aussagen sind hierdurch jedoch nur bedingt zu gewinnen. Eine weitere Einschränkung resultiert aus der direkten Verwendung der Abspaltlösung als Tüpfelprobe, so dass die in der Lösung vorhandenen Abspaltreagenzien die chromatographische Auftrennung negativ beeinflussen. Eine Aufarbeitung der Submilligrammmengen stellt einen oft unverhältnismäßigen Arbeitsaufwand dar.

Eine breit anwendbare, sehr aussagekräftige Methode ist durch die ¹H-MAS-NMR-Spektrometrie gegeben. Diese Technik erlaubt es, gut aufgelöste NMR-Spektren festphasengebundener Verbindungen zu erhalten. Die Grundzüge dieser Methode sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

1.1.2.6 Kernresonanz in Festkörpern

Die Hauptschwierigkeit bei der Anwendung der NMR-Spektroskopie auf Festkörper ist die schlechte Auflösung. Zusätzlich muss in Pulsexperimenten mit erheblich längeren Pausen zwischen den Pulsen gearbeitet werden, als dies in Lösung erforderlich ist, da die

eingeschränkte Rotation der Moleküle längere Spin-Gitter-Relaxationszeiten zur Folge hat. Dies führt zu einem erhöhten Zeitbedarf bei der Durchführung der Analyse.

Für die durch große Linienbreite bedingte geringe Auflösung in Festkörperspektren sind zwei Beiträge verantwortlich. Der erste ist die direkte Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Kernspins. So verursacht das magnetische Moment jedes Kerns mit einer Kernspinquantenzahl $I \neq 0$ im Abstand R ein lokales Magnetfeld

$$B_{\text{lokal}} = \frac{g_I \mu_N m_I \mu_0}{4\pi R^3} (1-3\cos^2\theta)$$

Im Gegensatz zu Lösungen wird dieses Feld in Festkörpern aufgrund eingeschränkter Rotation nicht zu null gemittelt. Unterschiedliche Kerne in der Probe spüren somit verschiedene lokale Felder. Die Dipol-Dipol-Felder liegen typischerweise in der Größenordnung von einigen 10^{-3} T und verursachen folglich Linienbreiten von ungefähr 1000 Hz. Ein zweiter Grund für die beobachteten Linienbreiten ist die Anisotropie der chemischen Verschiebung. Durch das angelegte Feld werden in der Probe elektrische Ströme induziert, die ebenfalls das lokale Feld beeinflussen. Die Stärke des induzierten Feldes ist abhängig von der relativen Orientierung des Moleküls zur Richtung des Magnetfeldes. In Lösung wird aufgrund der schnellen Rotation der Moleküle nur das mittlere Feld aller möglichen Orientierungen beobachtet. In Festkörpern beobachtet man wegen der eingeschränkten Beweglichkeit Anisotropie. Kerne in Molekülen, die verschieden zum äußeren Feld ausgerichtet sind, zeigen unterschiedliche Resonanzfrequenzen. Auch die Anisotropie hängt, wie schon die Dipol-Dipol-Wechselwirkung, durch einen Term der Form $(1-3\cos^2\theta)$ vom Winkel zwischen der Hauptachse des Moleküls und der Richtung des Feldes ab. Dementsprechend besitzen die beide Störgrößen bei einem Winkel $\theta = 54.74^\circ$ relativ zum Magnetfeld den Wert null. Diesen Winkel bezeichnet man als „magischen Winkel“. In der Praxis lässt man die Probe mit hoher Frequenz in einem Winkel von 54.74° relativ zum angelegten Feld rotieren. Die Anisotropie und alle Dipol-Dipol-Wechselwirkungen werden dabei auf den Wert gemittelt, den sie bei diesem Winkel besitzen, also zu null. Mit der Magic-Angle-Spinning-NMR-Methode lassen sich somit gut aufgelöste Spektren der am polymeren Träger gebundenen Verbindungen erhalten, zumal die Beweglichkeit am gequollenen Harz, im Gegensatz zum Festkörper zwar eingeschränkt, aber nicht komplett unterbunden ist. Dies gilt vor allem für TentaGel-Harze. Um die im Verhältnis zur Probe sehr intensiven Signale des polymeren Trägers zu unterdrücken, werden sowohl Presaturation- als auch Watergate-Pulssequenzen verwendet.

Das grundsätzliche Ziel ist, festphasengebundene Methoden zu entwickeln, die einen schnellen und einfachen Zugang zu den für biologische Untersuchungen notwendigen Kohlenhydratstrukturen schaffen, wie sie unter anderem zu der im folgenden beschriebenen Krebsimmuntherapie benötigt werden.

1.2 Anwendung von Glycopeptidkonjugaten in der Krebsimmuntherapie³²⁻³⁷

Krebs ist eine Krankheit die sich durch unkontrollierte Zellteilung und Streuung der entarteten Zellen im Organismus auszeichnet. Sie kann Menschen jeden Alters treffen und stellt eine der Haupttodesursachen in entwickelten Gesellschaften dar. Zur Heilung ist es notwendig, alle malignen Zellen aus dem Organismus zu entfernen. Dies stellt trotz großer Forschungsbemühungen und intensiver Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten noch häufig ein ungelöstes Problem dar. Mit den in der Medizin verwendeten Standardtherapien - chirurgische Entfernung von Tumoren, Bestrahlung und Chemotherapie - kann vielen betroffenen Menschen geholfen werden. Jedoch haben diese Therapien zwei gravierende Mängel. Aufgrund ungenügender Selektivität der Behandlung kommt es zur Zerstörung gesunden Gewebes mit den damit einhergehenden Nebenwirkungen. Auch ist es nicht immer möglich, alle Krebszellen zu zerstören, vor allem dann, wenn sich bereits Tumorzellen aus dem Zellverband gelöst und Metastasen in anderem Körpergewebe gebildet haben. Ein attraktiver Ansatz, um diese mit den Standardtherapien einhergehenden Probleme zu lösen, besteht darin, die außerordentliche Spezifität des menschlichen Immunsystems für die Bekämpfung von Tumorzellen nutzbar zu machen. Im Gegensatz zu Bakterien, Viren und sonstigen Pathogenen handelt es sich bei Krebs um mutiertes, körpereigenes Gewebe, gegenüber dem das Immunsystem notwendigerweise Toleranz aufweist. Damit das Immunsystem trotzdem zur Zerstörung von Tumorzellen zum Einsatz kommen kann, muss es sich deren Veränderungen gegenüber gesundem Gewebe zunutze machen. Eine Reihe von Molekülstrukturen wie z. B. die Proteine P15, MAGE, HSP70 und das im weiteren ausführlich beschriebene MUC1 konnten identifiziert werden, die zwar nicht ausschließlich, jedoch signifikant erhöht auf der Oberfläche von Tumorzellen

³² J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, 305, 200

³³ S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 882

³⁴ J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, I. M. Belyakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, J. C. Morris, *J. Clin. Invest.* **2004**, 113, 1515

³⁵ I. Espinoza-Delgado, *Oncologist* **2002**, 7(3), 20

³⁶ E. Jager, D. Jager, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, 106, 817

³⁷ P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, 19, 1305

vorkommen, und diese somit von gesundem Gewebe abgrenzen.^{38,39,40} Viele maligne Zellen weisen außerdem, bedingt durch veränderte Enzymaktivitäten im Golgi-Apparat, Variationen des Glycosylierungsmuster der Oberflächenproteine auf.^{41,42} Für die Entwicklung eines Antitumorvazins ist es wichtig, die hochspezifische Reaktion des Immunsystems auf Krebszellen zu fokussieren, ohne dabei gesunde Zellen durch Autoimmunreaktionen in Mitleidenschaft zu ziehen. Aufgrund immunsuppressiver Mechanismen ist der Wirtsorganismus häufig selbst nicht in der Lage, derartige veränderte Strukturen zu erkennen und anzugreifen. Die Aufgabe der Immuntherapie besteht also darin, diese Toleranz des Immunsystems gegenüber den oben beschriebenen tumorassoziierten Antigenen zu brechen.

1.2.1 Das epitheliale Glycoprotein MUC1 und Krebs

Die Mucine^{43,44} bilden eine Familie hochmolekularer Glycoproteine, die von Epithelzellen exprimiert werden und sich durch einen sehr hohen Kohlenhydratanteil auszeichnen. Ursprünglich wurde der Name für im Mucinsekret von Epithelzellen vorkommende Glycoproteine eingeführt. Mittlerweile werden jedoch unter dem Namen Mucine neben den sekretierten auch lösliche und membrangebundene Formen zusammengefasst. Bis heute wurden 20 Mucingene (*MUC*) identifiziert. Aufgrund mangelnder Sequenzhomologie und vielfach noch nicht eindeutig bekannter physiologischer Funktion ist die Zugehörigkeit zu der Familie in einigen Fällen jedoch umstritten.^{45,46} Sekretorische Mucine bilden ein viskoses, über intermolekulare Disulfidbrücken verknüpft oligomeres Mucinsekret, das dem Schutz der Epithelzellen des respiratorischen, gastrointestinalen und des Urogenitaltraktes dient. Membrangebundene Mucine sind über eine hydrophobe Domäne in der Lipiddoppelschicht verankert. Aufgrund ihrer Lage an der Grenzfläche zwischen Epithelzellen und deren extrazellulären Umgebung fällt ihnen eine wichtige Vermittlerrolle zu. Sie schützen als Teil der Glycocalyx die darunter liegenden Zellen vor Dehydratisierung, Infektionen, physikalischen und chemischen Einwirkungen, steuern über ihre komplexen Strukturen die Materialpassage und sind des Weiteren an Zelladhäsions-

³⁸ Eine regelmässig aktualisierte Liste identifizierter, tumorassoziiertes Antigen findet sich auf der Homepage des Istituto Nazionale Tumori unter "www.istitutotumori.mi.it"

³⁹ T. Renno, S. Lebecque, N. Renard, S. Saeland, A. Vicari, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 1296

⁴⁰ M. L. Disis, K. H. Grabstein, P. R. Sleath, M. A. Cheever, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1289

⁴¹ I. Brockhausen, *Bba-Gen Subjects* **1999**, *1473*, 67

⁴² S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836

⁴³ J. R. Gum Jr., *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 795

⁴⁴ I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 214

⁴⁵ A. P. Singh, S. C. Chauhan, S. Bafna, S. L. Johansson, L. M. Smith, N. Moniaux, M.-F. Lin, S. K. Batra, *Prostate* **2006**, *66(4)*, 421

⁴⁶ J. Dekker, J. W. A. Rossen, H. A. Buller, A. W. C. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 126

und Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Obgleich sich die verschiedenen Mucine in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden, gibt es Gemeinsamkeiten im Aufbau. Die Proteinkernstruktur setzt sich aus einer variablen Zahl repetitiver Sequenzeinheiten, den *tandem repeats*, zusammen. Diese Abschnitte werden auch als Mucindomäne oder PTS-Region bezeichnet und sind reich an Prolin, Threonin und Serin. In diesen Regionen sind die *O*-Glycanseitenketten konzentriert, die 50 bis 90 Gewichtsprozent des Glycoproteins ausmachen.

Das MUC1^{47,48,49} weist im Gegensatz zu anderen Glycoproteinen dieser Familie keine gewebsspezifische Verteilung auf, sondern kommt ubiquitär auf Epithelzellen vor. Es besteht aus einem als VNTR (variable number of tandem repeats) Domäne bezeichnetem Zentrum das von kurzen *N*- und *C*-terminalen Domänen flankiert wird. Die Anzahl an *tandem repeats* im VNTR-Bereich unterliegt einem genetischen Polymorphismus und schwankt je nach Individuum zwischen 20 und 125. Jede dieser Wiederholungseinheiten ist aus 20 Aminosäuren aufgebaut und beinhaltet fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen.

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

Abbildung 1.3: Aminosäuresequenz der Wiederholungseinheit des MUC1

Durch den hohen Anteil an helixbrechendem Prolin, der Vielzahl komplexer Kohlenhydratseitenketten und der durch deprotoniert vorliegende Sialinsäuren verursachte elektrostatischen Abstoßung nimmt MUC1 eine gestreckte Konformation ein, die weit über die etwa 10 nm weit reichende Glycocalyx in das Lumen hineinragt (200-500 nm).⁵⁰ Das membranassoziierte MUC1 wird als kontinuierlicher Peptidstrang exprimiert. Zwischen der VNTR-Region und der Transmembrandomäne befindet sich eine proteolytische Spaltungsstelle, an welcher das Peptid im Rahmen der posttranslationalen Prozessierung gespalten wird. Der extrazelluläre Teil des Proteins bleibt anschließend über nichtkovalente Bindungen mit der, in der Membran verankerten, *C*-terminalen Domäne verbunden. In den verschiedenen Kompartimenten des Golgi-Apparates werden die komplexen Kohlenhydratseitenketten aufgebaut.

⁴⁷ S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. M. Burchell, L. Pemberton, E. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15286

⁴⁸ F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, 10, 439

⁴⁹ J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 301

⁵⁰ J. Hilkens, M. J. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, 17, 359

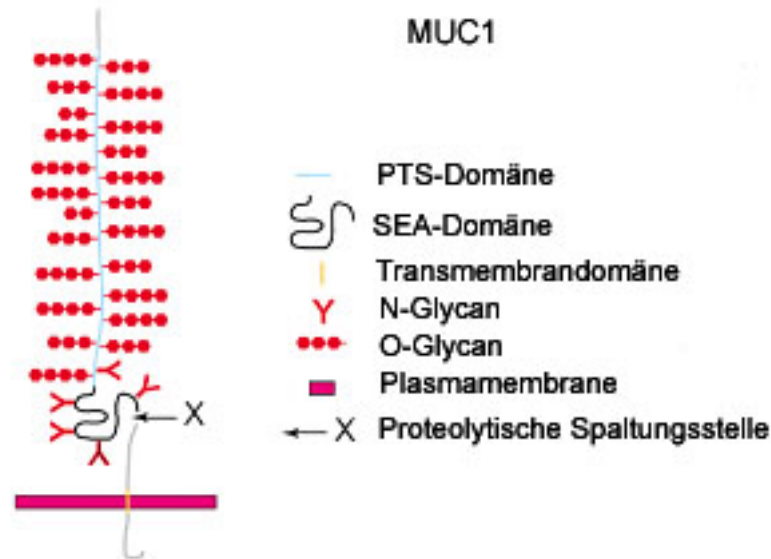


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des Glycoproteins MUC1

Die in gesunden Zellen dominierenden komplexen *N*-Acetyllactosamin-Ketten werden ausgehend von der *Core2*-Struktur durch ein Zusammenspiel verschiedener Glycosyltransferasen gebildet. Im *trans*-Golgi wird das Kettenwachstum dann vor allem durch Anknüpfen von Sialinsäure terminiert. Die so entstehenden Oligosaccharidstrukturen sind in der Lage, das Peptidrückgrad weitgehend zu verhüllen.⁴⁸ In epithelialen Tumorzellen kommt es zu mehreren Veränderungen. Im Gegensatz zu gesunden Zellen ist eine drastisch erhöhte MUC1-Expression zu beobachten. Des Weiteren geht die Polarisation der Zelle verloren, so dass MUC1 nicht mehr ausschließlich an der apicalen Seite lokalisiert, sondern über die gesamte Zelloberfläche verteilt ist.⁵¹ Man nimmt an, dass dadurch die Zell-Zell-Adhäsion destabilisiert und die Tendenz zur Abspaltung aus dem Zellverband erhöht wird.⁵² Darüber hinaus ändert sich, bedingt durch eine veränderte Enzymaktivität im Golgi-Apparat, das Glycosylierungsmuster der Oberflächenproteine.^{49,53} In vielen malignen Zellen ist die Aktivität der β 1,6-*N*-Acetylglucosylamintransferase C2GnT-1 deutlich vermindert, was zu einer Verringerung der im Normalzustand dominierenden, auf *Core2* basierenden Oligosaccharidstrukturen führt.⁵⁴ Sialyltransferasen zeigen dagegen häufig eine erhöhte Aktivität. Dies führt, aufgrund vorzeitiger Terminierung des Kettenwachstums, zu den für Tumorzellen typischen verkürzten Kohlenhydratstrukturen, wie z. B. dem Sialyl- T_N -Antigen (ST_N) durch Sialylierung des

⁵¹ S. Zotter, P. C. Hageman, A. Lossnitzer, J. van den Tweel, J. Hilkens, W. J. Mooi, J. Hilgers, *Int. J. Cancer* **1988**, 3, 38

⁵² M. J. L. Ligtenberg, F. Buijs, H. L. Vos, J. Hilkens, *Cancer Res.* **1992**, 52, 2318

⁵³ I. Brockhausen, J. M. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607

⁵⁴ I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconj. J.* **1998**, 15, 595

T_N-Antigens⁵⁵ oder den beiden regioisomeren α(2,3)-Sialyl-T- bzw. α(2,6)-Sialyl-T-Antigenen aus der Core 1-Struktur.⁵⁶

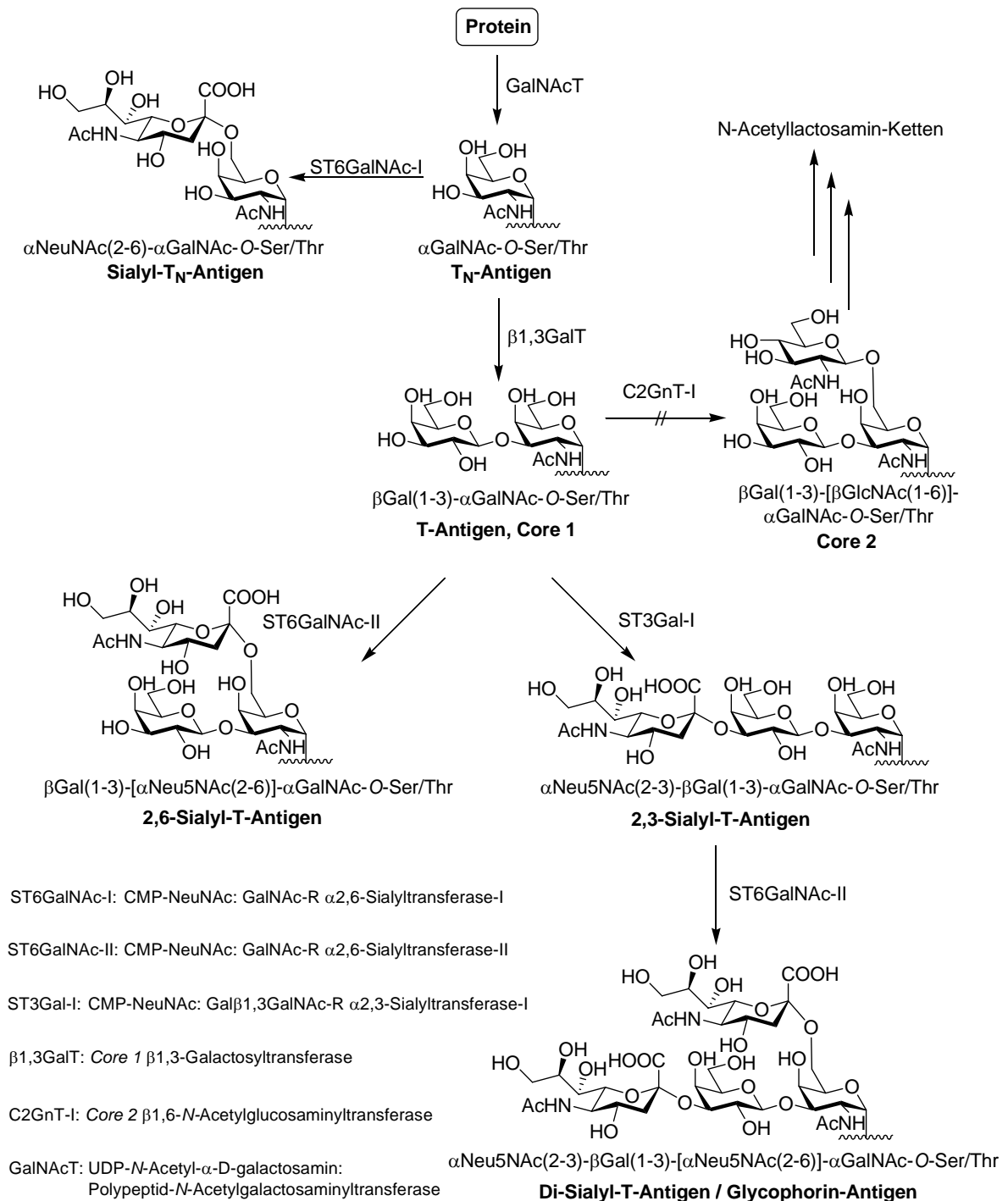


Abbildung 1.5: Tumorassoziierte O-Glycosylierung des MUC1

⁵⁵ Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. Itzkowitz, T. Tsuda, S. I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1213

⁵⁶ F.-G. Hanisch, T. R. E. Stadie, F. Deutzmann, J. Peter-Katalinic, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 318

Die verkürzten Oligosaccharidketten stellen nicht nur selbst immunogene Strukturen dar, sondern führen zudem zu einer Freilegung von in gesunden Zellen abgeschirmten Sequenzen des Proteingerüsts, die dadurch ebenfalls zu Angriffspunkten für das Immunsystem werden.

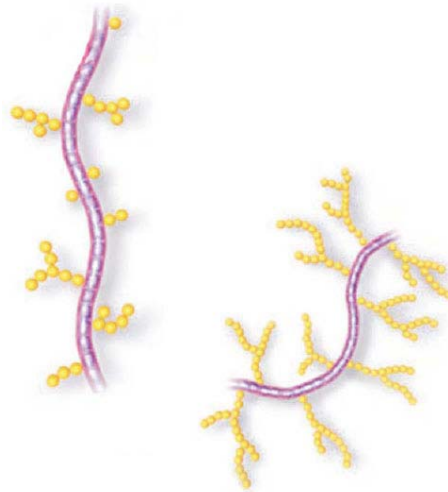


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der MUC1-Struktur in malignen und gesunden Zellen

1.2.2 Ansätze zur Immuntherapie

Tumorzellen sind in aller Regel weniger immunogen als körperfremde Pathogene. Es gibt aber eindeutige Hinweise, dass das Immunsystem trotzdem in der Lage ist diese zu erkennen und zu zerstören.⁵⁷ So kann sich Krebs in immunkompetenten Wirten spontan zurückentwickeln, wohingegen Individuen mit geschwächtem Immunsystem eine erhöhte Krebsinzidenz aufweisen. Des Weiteren kann in experimentellen Tiermodellen eine Immunität gegen Krebs erzeugt werden.⁵⁸ Interessant ist auch die oft zu beobachtende Anhäufungen von Zellen des Immunsystems am Tumor,⁵⁹ sowie die Antikörperbildung gegen veränderte MUC1-Glycopeptidstrukturen von Tumorzellen.⁶⁰

Im Laufe ihrer Entwicklung finden Tumorzellen jedoch zahlreiche Wege der Immunantwort auszuweichen,⁶¹ wie z. B. der räumliche Ausschluss von Immunzellen sowie eine reduzierte Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen

⁵⁷ V. Shankaran, H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Nature* **2001**, 410, 1107

⁵⁸ G. P. Dunn, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, 22, 329

⁵⁹ L. Zhang et al., *N. Eng. J. Med.* **2003**, 203, 348

⁶⁰ J. Taylor-Papadimitriou, M. Burchell Joy, T. Plunkett, R. Graham, I. Correa, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, 7, 209

⁶¹ F. M. Marincola, E. M. Jaffee, D. J. Hicklin, S. Ferrone, *Adv. Immunol.* **2000**, 74, 181

Proteinen.⁶² Auch gibt es Tumore, die Proteine wie das *Interleukin IL-10* oder den *vascular endothelial growth factor (VEGF)* sezernieren, um die Aktivierung und Differenzierung von Dendritischen Zellen (DC) zu stören.⁶³ Selbst wenn die Immunantwort bereits ausgelöst ist, können Zellen der Eliminierung entkommen, indem sie das angegriffene Antigen verlieren oder tumorreaktive T-Zellen anergisieren.^{64,65} Darüber hinaus gibt es noch viele weitere Möglichkeiten, derer sich maligne Zellen bedienen, um dem Immunsystem zu entweichen, mit der Konsequenz, dass sich unter dem Selektionsdruck vor allem schwach immunogene oder immunresistente Krebszellen entwickeln.^{32,58}

Das Ziel der Immuntherapie ist die Entwicklung von Methoden, zur gezielten Verstärkung der Immunantwort unter Überwindung der oben beschriebenen Ausweichstrategien, ohne dabei Autoimmunreaktionen auszulösen. Das angeborene Immunsystem kann zum Beispiel durch Verabreichung von stimulatorischen Adjuvantien direkt in einen festen Tumor, oder durch systemische Gabe von IL-12 oder TNF α aktiviert werden.^{66,67} Von zytotoxischen T-Zellen vermittelte zelluläre Immunität kann durch Antigenpräsentation in einem der Aktivierung zuträglichen Umfeld z. B. durch *ex vivo* modifizierte DCs oder Impfung mit inaktivierten Tumorzellen zusammen mit Adjuvantien erreicht werden.⁶⁸ Das Auslösen einer humoralen Antwort ist ebenfalls durch Impfung mit einem tumorassoziierten Antigen in Kombination mit Adjuvantien oder durch dessen Konjugation mit einem Antigen zur Stimulation von T-Helferzellen möglich.

Das spezifisch auf Tumorzellen auftretende, charakteristisch veränderte Glycoprotein-antigen MUC1 hat sich hierbei als vielversprechender Startpunkt zur Entwicklung weiterer selektiver Immuntherapien gezeigt. So konnte z. B. durch Immunisierung von Mäusen mit einem Konjugat aus einem synthetischen MUC1-Epitop und Ovalbumin eine starke humorale Immunantwort ausgelöst werden.⁶⁹ Im Weiteren ist zu untersuchen, welche MUC1-Epitope in Kombination mit unterschiedlichen kostimulatorischen Faktoren, die besten Ergebnisse in Bezug auf Tumorselektivität, Antikörperaffinität und Zuverlässigkeit im Ansprechen der Individuen auf die Immunisierung liefern.

⁶² V. Groh, J. Wu, C. Yee, T. Spies, *Nature* **2002**, 419, 734

⁶³ D. I. Gabrilovich et al., *Nature Med.* **1996**, 2, 1096

⁶⁴ E. Y. Woo et al., *J. Immunol.* **2002**, 168, 4272

⁶⁵ V. H. Engelhard, T. N. Bullock, T. A. Colella, S. L. Sheasley, D. W. Mullins, *Immunol. Rev.* **2002**, 188, 136

⁶⁶ K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, 21, 335

⁶⁷ S. E. Street et al., *J. Exp. Med.* **2004**, 199, 879

⁶⁸ D. Jager, C. Taverna, A. Zippelius, A. Knuth, *Cancer Immunol. Immunother.* **2004**, 53, 144

⁶⁹ S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630

2 Zielsetzung

2.1 Entwicklung synthetischer Antitumorvakzine

Das Glycoprotein MUC1 ist in epithelialen Tumorzellen stark überexprimiert und weist aufgrund der veränderten Enzymaktivität in malignen Zellen ein modifiziertes Glycosylierungsmuster auf. Partialstrukturen solcher tumorassoziierter Glycoproteine stellen vielversprechende Ausgangssubstanzen für die Krebsimmuntherapie dar. Man erhofft sich, durch Vakzinierung mit diesen Strukturen, eine spezifische Immunantwort gegen die Krebszelllinien auslösen zu können. Diese relativ kleinen Moleküle allein sind jedoch meist nicht in der Lage eine ausreichend intensive Immunantwort auszulösen. Zur Aktivierung naiver B-Zellen wird zusätzlich zur Bindung des spezifischen Antigens an den B-Zell-Rezeptor noch die Stimulation durch aktivierte T-Helfer-Zellen benötigt. Die Partialstruktur tumorassoziierter Glycoproteine kann zwar von spezifischen B-Lymphocyten erkannt werden, enthält aber in der Regel kein T-Zell-Epitop, so dass die Aktivierung durch T_H -Zellen unterbleibt. Es ist daher nötig, diese Moleküle durch Modifikation immunogener zu gestalten, um eine ausreichend starke Immunantwort zu erzielen.

Als Zielsequenz dient eine aus 16 Aminosäuren bestehende Partialstruktur der Konsensussequenz der *tandem repeats* des MUC1, die das Peptidepitop PDTRP als immundominante Domäne enthält. Das in der Einleitung beschriebene tumorassozierte Kohlenhydratantigen Sialyl- T_N soll hierbei mit dem, die immunodominante Domäne flankierenden, Threonin verknüpft werden.

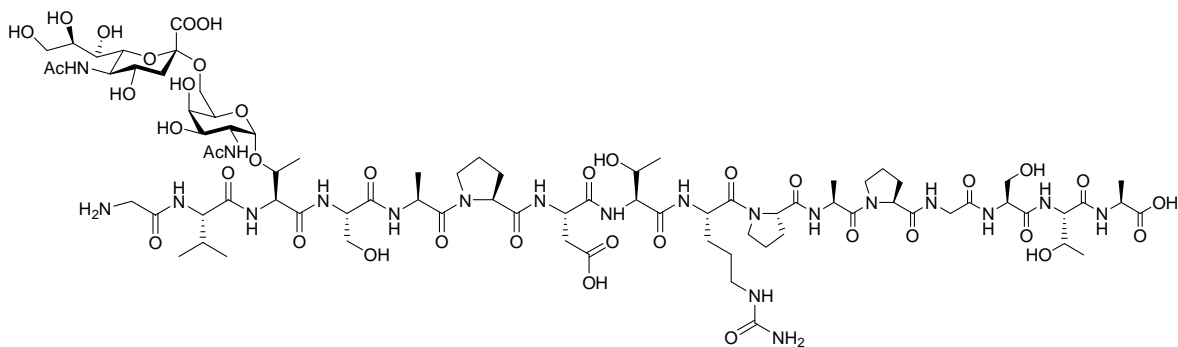


Abbildung 2.1: Zielsequenz aus der extrazellulären Wiederholungseinheit des MUC1

Zur Weiterentwicklung der Glycopeptidstruktur in ein mögliches Antitumorvakzin, soll diese über einen nicht immunogenen Spacer mit einem universellen T-Helferzellepitop bzw. mit einem Mitogen verknüpft werden.

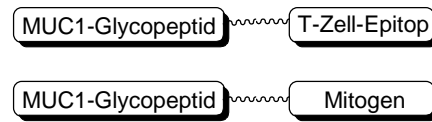


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Mitogen- und T-Zell-Epitopkonjugate

Die Wirksamkeit der so gewonnen Konjugate soll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Schmitt am Institut für Immunologie der Universität Mainz in Immunisierungsexperimenten mit Mäusen erprobt werden.

2.2 Festphasenoligosaccharidsynthesen

Wegen ihrer Bedeutung in biologischen Systemen ist die Synthese von strukturell definierten Kohlenhydraten eine wichtige Aufgabe der organischen Synthese. Dank der heute bekannten Schutzgruppentechniken und Glycosylierungsmethoden ist eine Vielzahl an Kohlenhydraten synthetisch herstellbar. Die Synthese von komplexen Strukturen, wie z. B. der in der Einleitung beschriebenen tumorassoziierten Kohlenhydratantigene, ist jedoch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Um diesen zu reduzieren, wäre es wünschenswert, auf leicht automatisierbare Strategien zurückgreifen zu können, wie dies zur Darstellung von Oligopeptiden und Oligonucleotiden möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollen Ankersysteme, Schutzgruppenmanipulationen und Glycosylierungsmethoden untersucht und optimiert werden, um Techniken zu finden, die sich in besonderer Form für Synthesen am polymeren Träger eignen. Das Ziel ist es standardisierte Bausteine zu entwickeln, die sich analog den geschützten, kommerziell erhältlichen Aminosäurebausteinen in festphasengebundenen Oligosaccharidsynthesen einsetzen lassen. Erste Modellsynthesen sollen dazu am PTMSE-Anker⁷⁰ durchgeführt werden, da dieser sich besonders leicht durch einen fluoridinduzierten Eliminierungsmechanismus spalten lässt. Darüber hinaus sollen Methoden gefunden werden, den Reaktionsverlauf festphasengebundener Synthesen quantitativ zu verfolgen, um Versuchsreihen zur Optimierung von Reaktionen besser auswerten zu können.

⁷⁰ M. Wagner, H. Kunz, *Deutsche Patentanmeldung 10116252.9, 2001*

3 Allgemeiner Teil

3.1 Überblick zur Glycopeptidesynthese

Exakt definierte Glycopeptidstrukturen sind aufgrund der unumgänglichen Mikroheterogenität natürlicher Quellen nicht in ausreichenden Mengen durch biotechnologische Methoden erhältlich. Zugang zu definierten Molekülen liefert die chemische Synthese. Diese erlaubt darüber hinaus gezielte Modifizierungen der Strukturen, wie sie zur Erhöhung der Immunogenität und zur Entwicklung spezifischer Impfstoffkonjugate notwendig sind. Beim Aufbau von Glycopeptidstrukturen ist eine sorgfältige Syntheseplanung notwendig. Ein besonderes Augenmerk muss hierbei auf die Orthogonalität des Schutzgruppenmusters sowie den eingeschränkten pH-Bereich gelegt werden, in dem Glycopeptide stabil sind. Im Basischen kann das Molekül durch β -Eliminierungen der glycosylierten Aminosäurebausteine zerstört werden. Unter sauren Bedingungen erweisen sich die acetalischen Glycosidbindungen als instabil. Weiterhin sind die Aminosäuren im Peptid sowohl unter stark sauren als auch unter basischen Bedingungen nicht konfigurationsstabil. Sämtliche in dieser Arbeit ins Auge gefassten Zielstrukturen sollen durch automatisierte Synthesen an einer festen Matrix aufgebaut werden. Die Grundlage hierfür bildet das von *Merrifield* entwickelte Konzept der sequentiellen Festphasenpeptidsynthese,^{10,71} hier im speziellen gemäß der Fmoc-Strategie.^{72,73} Im Gegensatz zur Proteinbiosynthese wird das Peptid bei diesem Verfahren vom C- zum N-Terminus hin aufgebaut.

Als tumorassoziiertes Antigen wird der mit Threonin verknüpfte ST_N-Baustein verwendet. Dieser weist zusammen mit dem $\alpha(2,3)$ -ST-Baustein die größte Tumorspezifität auf und ist daher von besonderem Interesse für die Entwicklung von Antitumorvakzinen.

3.1.1 Synthese des Sialyl-T_N-Threonin-Bausteins

Die Synthese des Bausteins erfolgt nach einer von *B. Liebe*^{74,75} ausgearbeiteten Synthesestrategie. Hierbei wird zuerst das *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugat dargestellt, welches anschließend durch Anknüpfung der Sialinsäure zum ST_N-Baustein

⁷¹ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161

⁷² C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246

⁷³ J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35

⁷⁴ B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 618

⁷⁵ B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777

umgesetzt wird. Den für die Anknüpfung des ersten Kohlenhydratbausteins an die Aminosäure benötigten Galactosyldonor erhält man in vier Stufen ausgehend von D-Galactose **1**. Diese wird in Acetanhydrid unter dem Einfluss katalytischer Mengen Perchlorsäure peracetyliert und anschließend mit aus PBr_3 und Wasser *in situ* erzeugtem HBr in das anomere Bromid **2** überführt. Durch aktivierten Zinkstaub wird das Bromid zum 3,4,6-Triacetylgalactal **3** reduziert.

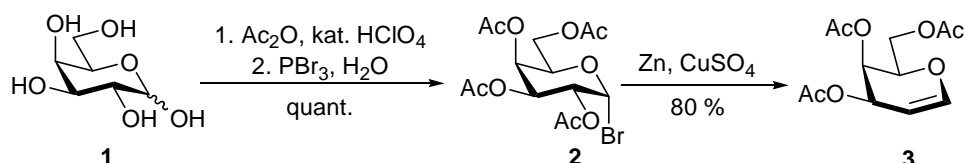


Abb. 3.1: Galactalsynthese

Bei der später beabsichtigten Galactosylierung soll eine α -glycosidische Bindung aufgebaut werden. Somit darf sich die *N*-Acetylaminofunktion auf der Stufe der Glycosylierung noch nicht in 2-Position befinden, da diese als partizipierende Nachbargruppe zur Ausbildung der β -Konfiguration führen würde. Stattdessen wird eine Azidofunktion nach dem Azidonitratisierungsverfahren von *Lemieux* eingeführt,⁷⁶ welche sich später durch Reduktion leicht in die gewünschte Aminogruppe überführen lässt. Durch Umsetzen des Galactals **3** mit Cerammoniumnitrat und Natriumazid gelingt das stereoselektive Einführen der Azidfunktion in 2-Position unter gleichzeitiger Addition der Nitratgruppe am anomeren Zentrum. Hierbei wird ein Gemisch aus α - und β -konfiguriertem 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactosylnitrat **4** erhalten.

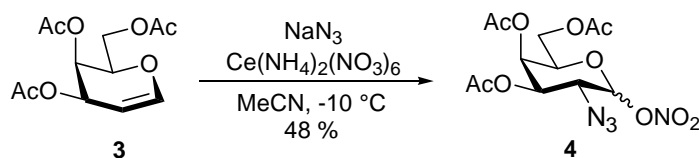


Abb. 3.2: Azidonitratisierung

Nach dem von *Lemieux* vorgeschlagenen Mechanismus wird ein radikalischer Reaktionsverlauf angenommen. Cer(IV) abstrahiert zunächst ein Elektron des Azidanions und wird dabei selbst zum Cer(III) reduziert. Das entstehende Azidradikal greift elektrophil von der sterisch günstigeren Seite die elektronenreiche Doppelbindung an. Das intermediär entstehende Radikal **5** wird von einem weiteren Äquivalent Cer(IV) regioselektiv zum durch die freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffs stabilisierten

⁷⁶ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244

Oxocarbeniumion **6** oxidiert. Durch den nucleophilen Angriff des Nitrat-Anions erhält man das anomere Gemisch des 2-Azido-2-desoxy-galactosylnitrats **4**.

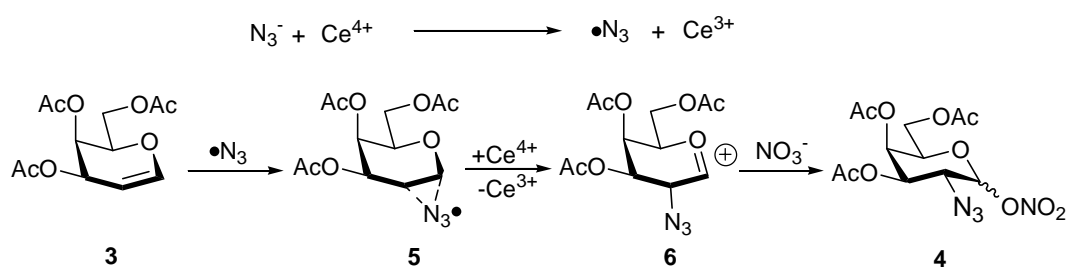


Abb. 3.3: Vorgeschlagener Mechanismus der Azidonitratisierung nach *Lemieux*

Die Umwandlung in einen geeigneten Donor gelingt durch Umsetzung des Anomerengemisches **4** mit wasserfreiem Lithiumbromid in Acetonitril.⁷⁷ Aufgrund der hohen Elektronegativität von Brom wird bei der Substitution des Nitrats durch Bromid fast ausschließlich das α -Anomer **7** gebildet.

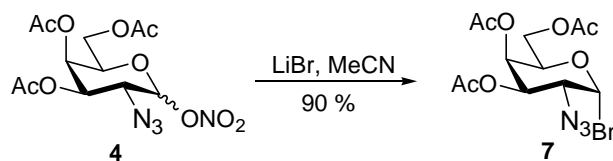


Abb. 3.4: Synthese von Galactosylbromids **7**

Das erhaltene α -Galactosylbromid wird ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Glycosylierungsreaktion eingesetzt. Als Akzeptor dient *N*- und *C*-terminal geschütztes *L*-Threonin. Da die spätere Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie erfolgt, wird die Fmoc-Schutzgruppe direkt zum Blockieren der Aminofunktion verwendet. Durch Umsetzung von *L*-Threonin **8** mit *N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)succinimid (FmocOSu) gelingt dies in nahezu quantitativer Ausbeute.⁷⁸ Die Carboxylfunktion wird anschließend als *tert*-Butylester geschützt.^{79,80} Dazu wird aus *tert*-Butanol und Dicyclohexylcarbodiimid unter dem Einfluss katalytischer Mengen Kupfer(I)-chlorid zunächst der *O-tert*-Butyl-*N,N'*-dicyclohexyl-isoharnstoff **10** gebildet,⁸¹ welcher anschließend mit Fmoc-Thr-OH **9** umgesetzt wird. Durch Protonierung des Isoharnstoffs

⁷⁷ J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129

⁷⁸ A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976

⁷⁹ H. Kunz in *Preparative Carbohydrate Chemistry*; (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker: New York, **1997**, p 265.

⁸⁰ E. Vowinkel, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16

⁸¹ E. Schmidt, F. Moosmüller, *Liebigs Ann. Chem.* **1955**, *597*(3), 235

wird intermediär ein *tert*-Butylcarbeniumion erzeugt, welches entweder mit dem Carboxylat-Anion zum gewünschten Threonin-*tert*-butylester **11** reagiert oder sich durch Abspaltung eines Protons zum Isobuten stabilisiert. Aufgrund der Bildung von Isobuten in der Nebenreaktion muss ein Überschuss an *tert*-Butanol verwendet werden. Dies hat zur Folge, dass neben der Esterbildung auch die unerwünschte Alkylierung der β -Hydroxylfunktion stattfinden kann. Zur rechtzeitigen Beendigung der Reaktion ist daher eine genaue Kontrolle des Reaktionsverlaufes mittels Dünnschichtchromatographie erforderlich.

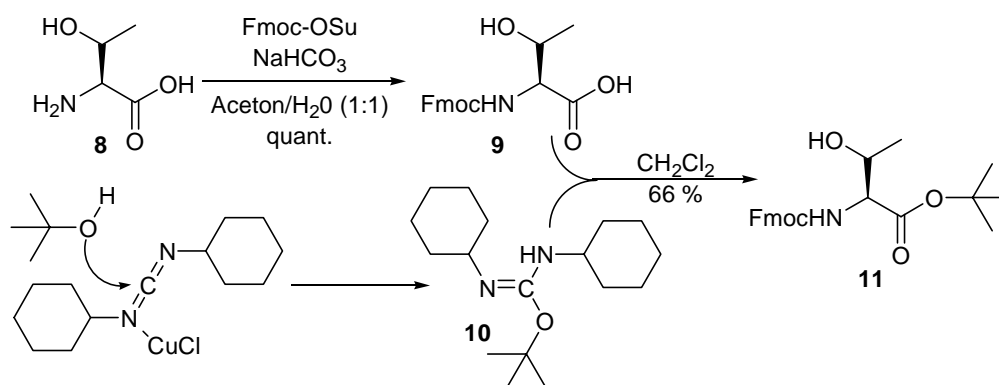


Abb. 3.5: Synthese des Galactosylakzeptors Fmoc-Thr-OtBu **11**

Die Glycosylierung zum Galactosamin-Threonin-Konjugat erfolgt nach einer von *Paulsen*⁸² eingeführten Variante der *Koenigs-Knorr*-Glycosylierung. Das 2-Azido-2-desoxy- α -galactosylbromid **7** wird hierbei in einer Mischung aus Toluol und Dichlormethan (1:1) durch Silber(I)carbonat und wasserfreies Silber(I)perchlorat aktiviert und mit Fmoc-Thr-OtBu **11** in hoher Stereoselektivität und guter Ausbeute zum Galactosid **12** umgesetzt.

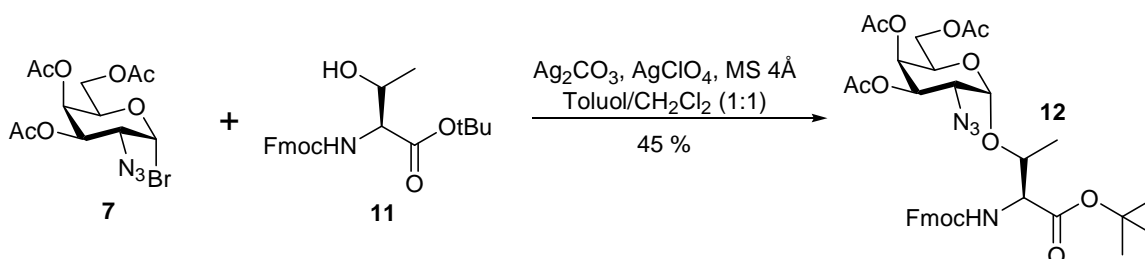


Abb. 3.6: Glycosylierung nach *Koenigs-Knorr*

⁸² H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89

Da die Azidofunktion keinen Nachbargruppeneffekt ausübt, wird aufgrund des anomeren Effektes bevorzugt das α -Anomer gebildet. Die α -Selektivität der Reaktion wird durch Zusatz von Silberperchlorat verstärkt, da dieses Salz in Toluol gut löslich ist und somit die Reaktion von der sterisch anspruchsvollen Oberfläche des schwerlöslichen Silbercarbonats in Lösung verlagert. Dies macht die ansonsten schwerzugängliche α -Position für den Akzeptor **11** leichter im Sinne einer S_N1 -Reaktion zugänglich. Das in geringen Mengen gebildete β -Anomer kann auf dieser Stufe säulenchromatographisch nicht vollständig vom Produkt abgetrennt werden. In der folgenden Reaktion muss daher das Anomerengemisch eingesetzt werden. Durch Reduktion mit Zink und anschließender Acetylierung in einem Gemisch aus THF, Acetanhydrid und Essigsäure wird die Azidfunktion in die Acetamidogruppe überführt.⁸³ Das erhaltene Acetamid **13** lässt sich infolge der geänderten Polarität auf dieser Stufe von den durch das β -Anomer bedingten Verunreinigungen trennen.

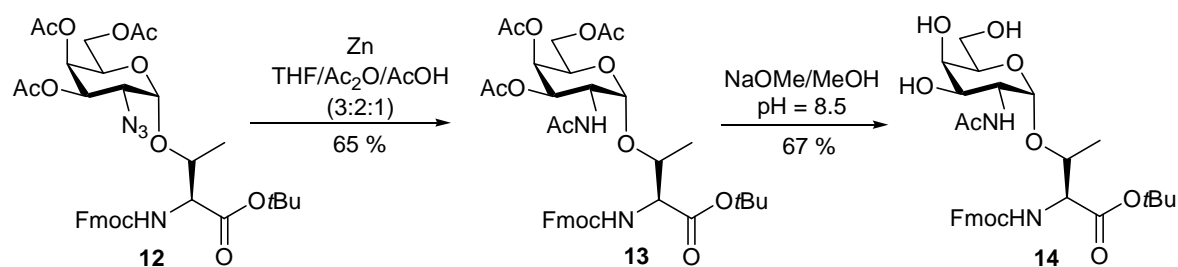


Abb. 3.7: Reduktive *N*-Acetylierung und anschließende Deacetylierung nach *Zemplén*

Durch eine Umesterung nach *Zemplén*⁸⁴ in absolutem Methanol unter Verwendung katalytischer Mengen Natriummethanolat werden die *O*-Acetylschutzgruppen entfernt. Dabei muss der pH-Wert möglichst exakt auf 8.5 eingestellt werden,⁷⁴ da die Reaktion bei niedrigeren Werten nicht abläuft. Bei höheren pH-Werten tritt dagegen in signifikantem Ausmaß die Abspaltung der ebenfalls basenlabilen Fmoc-Gruppe ein. Eine vollständige Selektivität wird selbst bei genauer Kontrolle nicht erreicht, so dass neben dem in 67%iger Ausbeute zugänglichen Produkt **14** noch gewisse Mengen an Fmoc-Abspaltungsprodukt gebildet werden. Die Ausbeute lässt sich daher nach der von *S. Wittrock*⁸⁵ vorgeschlagenen Methode – Umsetzung des Rohproduktes mit je 0.4 Äquivalenten an Fmoc-OSu und Diisopropylethylamin (DIPEA) – um bis zu 20 % steigern.

⁸³ E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985

⁸⁴ G. Zemplén, A. Kuntz, *Chem. Ber.* **1923**, 56, 1705

⁸⁵ S. Wittrock, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz **2006**

Um zum ST_N -Baustein zu gelangen, muss die *N*-Acetylneuraminsäure stereo- und regioselektiv in 6-Position des T_N -Antigens **14** eingeführt werden. Sialylierungsreaktionen bereiten aus mehreren Gründen präparative Schwierigkeiten. Zum einen ist das anomere Zentrum der Sialinsäure dem Akzeptor aus sterischen Gründen schlechter zugänglich als das Reaktionszentrum von Aldosen. Des Weiteren destabilisiert die elektronenziehende Carboxylfunktion in unmittelbarer Nachbarschaft des anomeren Zentrums das intermediär entstehende Oxocarbeniumion **16**, so dass dieses verstärkt zur Abspaltung eines Protons in 3-Position unter Bildung des Sialinsäureglycals **17** neigt. Diese Nebenreaktion wird bei Sialylierungsreaktionen oft in beträchtlichem Ausmaß beobachtet und hat zur Folge, dass der teure Sialinsäuredonor im deutlichen Überschuss eingesetzt werden muss. Auch die stereochemische Kontrolle der Reaktion gestaltet sich schwierig. Die gewünschte α -glycosidische Bindung natürlicher Sialoside ist aufgrund des anomeren Effektes thermodynamisch benachteiligt. Darüber hinaus steht in der benachbarten 3-Position kein Substituent zur Verfügung, der den Verlauf der Sialylierung zum gewünschten Anomer hin steuern könnte.

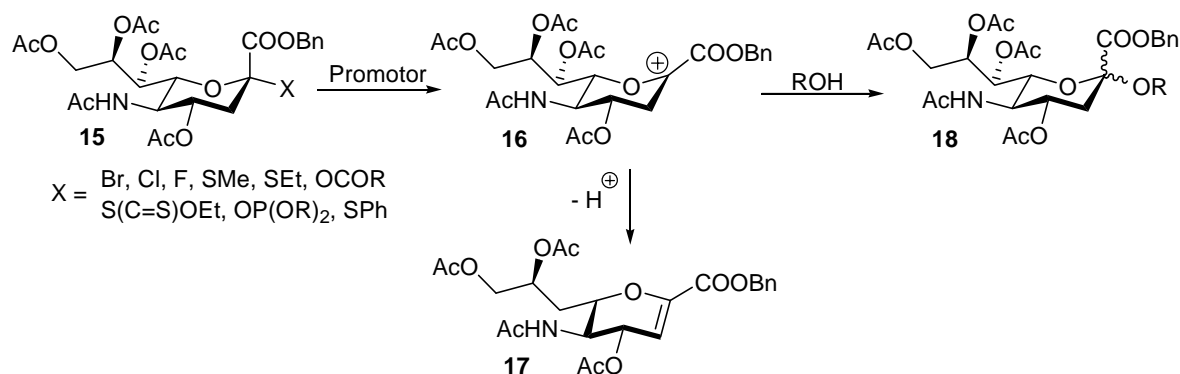


Abb. 3.8: Allgemeiner Mechanismus zur Sialylierung und Glycalbildung

Zur chemischen Sialylierung wurden mehrere Neuraminsäuredonoren entwickelt. In dieser Arbeit wird das von *Marra* und *Sinay* eingeführte Ethylxanthogenat als Donor verwendet, welches ausgehend von der *N*-Acetyl-D-neuraminsäure **19** in vier Stufen zugänglich ist.⁸⁶ Im ersten Schritt werden die Hydroxylfunktionen mit Acetanhydrid in Pyridin vollständig acetyliert.

⁸⁶ A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35

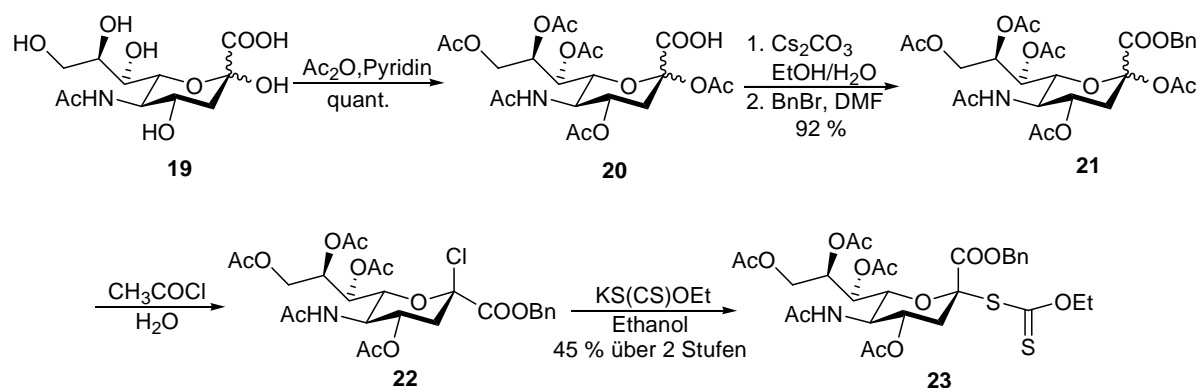


Abb. 3.9: Synthese des Sialinsäuredonors **23**

Das erhaltene Anomerengemisch **20** wird durch Neutralisation mit Cäsiumcarbonat in das Cäsiumsalz überführt, welches nucleophil am anschließend zugesetzten Benzylbromid unter Ausbildung des Benzylesters **21**, angreift. Durch Umsetzen mit aus Acetylchlorid und Wasser *in situ* entwickeltem Chlorwasserstoff erhält man das anomere Chlorid **22**, das ohne weitere Reinigung mit Kaliumxanthogenat stereoselektiv zum α -konfigurierten Sialinsäuredonor **23** reagiert.

Die Aktivierung des Sialinsäurexanthogenates erfolgt durch äquimolare Mengen eines thiophilen Promotors, wie Methylsulfonyltriflat (MeSOTf),⁸⁷ Phenylsulfonyltriflat (PhSOTf),⁸⁸ Dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflat (DMTST)^{89,90} oder *N*-Iodsuccinimid^{91,92,93}. Zur Synthese des Sialyl- T_N -Antigens wird das Xanthogenat **23** mit Methylsulfonyltriflat aktiviert. Dieser Promotor lässt sich *in situ* aus Silbertriflat und Methylsulfonylbromid, welches selbst durch Umsatz äquimolarer Mengen von Brom und Dimethyldisulfid gewonnen wird, erzeugen. Durch nucleophilen Angriff des Carbonylschwefels des Xanthogenates am Methylsulfonyltriflat unter Ausbildung einer Disulfidbindung **24** wird die Aktivierung des Donors eingeleitet. Diese formale Oxidation erhöht die nucleofuge Abspaltungstendenz des Xanthogenats. Der stereochemische Verlauf der folgenden Sialylierung lässt sich durch geeignete Wahl des Lösungsmittel und der Temperatur beeinflussen.^{94,95,96} Werden Nitrile als Lösungsmittel verwendet, so kann die

⁸⁷ F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C13

⁸⁸ V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1702

⁸⁹ P. Fugedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, 149, C9

⁹⁰ A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1990**, 195, 303

⁹¹ P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 4313

⁹² G. H. Veeneman, S. H. Van Leeuwen, J. H. Van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1331

⁹³ U. Greilich, R. Brescello, K. H. Jung, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 663

⁹⁴ H. Loenn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 115

⁹⁵ R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694

⁹⁶ I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. du Penhoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 2

Nitrilgruppe die intermediäre Ausbildung des Oxocarbeniumions durch Koordination unterstützen. Hierbei kann sowohl das axiale **25** als auch das äquatoriale Nitriliumkation **26** gebildet werden, die beide miteinander im Gleichgewicht stehen. Bei tiefer Temperatur bildet sich kinetisch kontrolliert bevorzugt das axiale Nitriliumkation. An diesem β -Nitriliumion kann der Angriff des Akzeptors nur von der äquatorialen Seite her erfolgen, so dass stereoselektiv das α -Sialosid gebildet wird. Glycosylierungen in der Kälte liefern in einer kinetisch kontrollierten Reaktion überwiegend die gewünschte α -Konfiguration am anomeren Zentrum. Im Gegensatz dazu überwiegt bei höheren Temperaturen die Bildung des β -Sialosids.

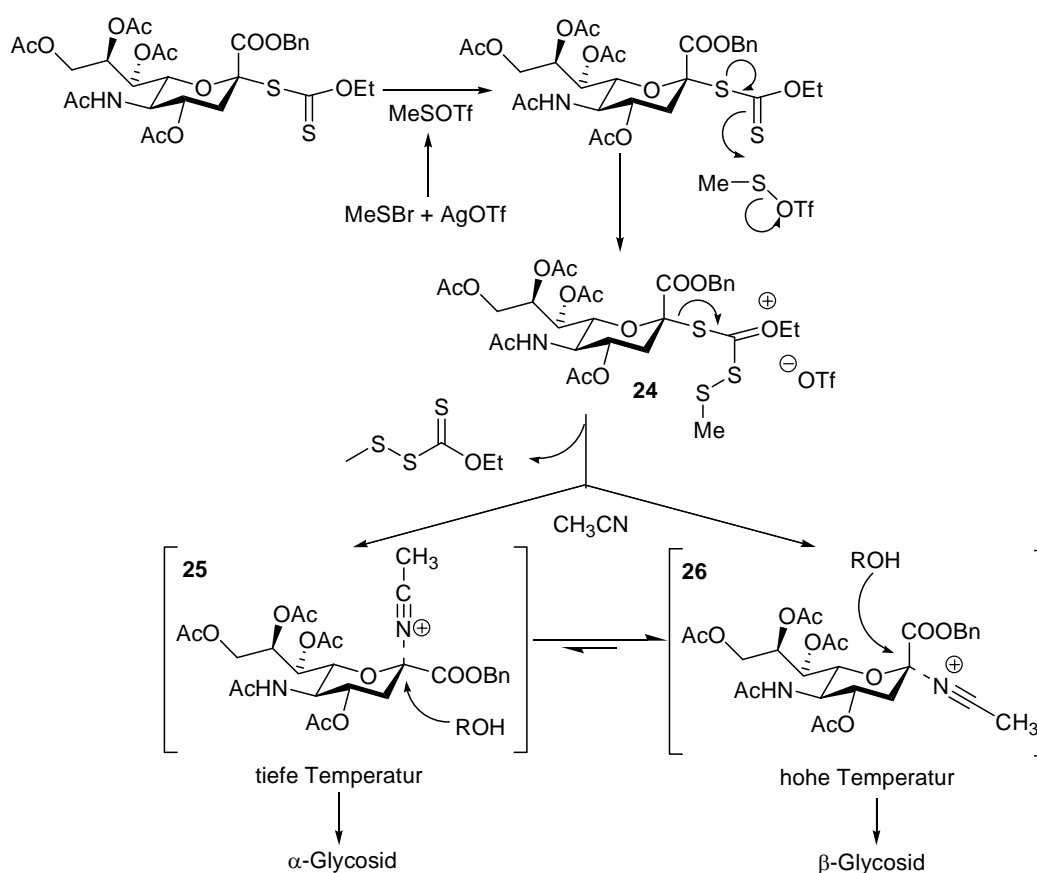


Abb. 3.10: Aktivierung des Sialinsäurexanthogenates und stereochemische Kontrolle der Sialylierung durch Temperatur und Lösungsmiteleinflüsse

Die α -Sialylierung des T_N-Threonin-Konjugates **14** an der Hydroxylgruppe in Position 6 erfolgt unter Verwendung eines 2.5fachen Überschusses des Neuraminsäuredonors **23** bei $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Mischung aus Acetonitril und Dichlormethan im Verhältnis 2:1. Dichlormethan verhindert hierbei das Einfrieren der Lösungsmittel. Ein Schutz der Hydroxylgruppen in den Positionen 3 und 4 ist nicht nötig, da aufgrund der geringeren

sterischen Hinderung ausschließlich die 6-Hydroxyfunktion als Akzeptor reagiert. Unter Ausnutzung des Nitrileffektes wird regio- und stereoselektiv das Sialyl-T_N-Threonin-Konjugat **27** erhalten.

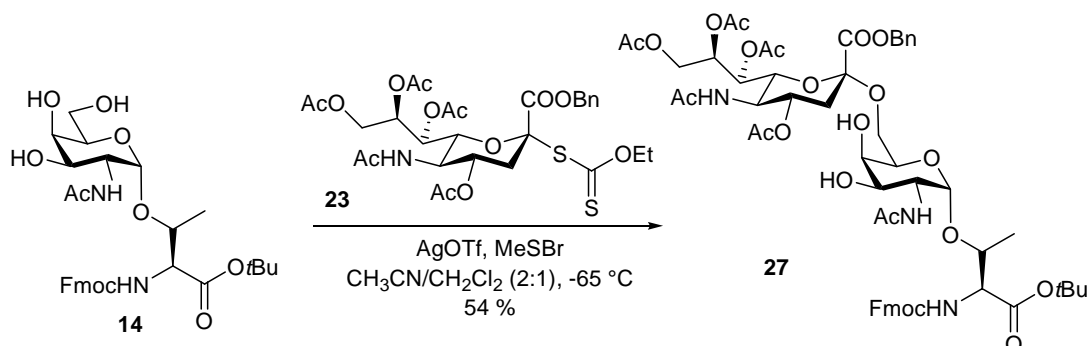


Abb. 3.11: Darstellung des Sialyl-T_N-Threonin-Konjugates **27** durch Sialylierung des T_N-Antigens

Die Bestimmung der anomeren Konfiguration erfolgt mittels NMR-spektroskopischer Analyse. Die üblicherweise verwendete Methode zur Zuweisung der Konfiguration von Pyranosiden, durch Bestimmung der Kopplungskonstanten $^3J_{H-1,H-2}$ sowie $^1J_{H-1,C-1}$ ist im Falle der Sialinsäure nicht anwendbar, da das anomeren Zentrum kein Proton besitzt. Für die Zuordnung der Konfiguration wurden durch Vergleich spektroskopischer Daten verschiedener α - und β -verknüpfter Sialinsäurederivate empirische Regeln aufgestellt,^{97,98,99} die im Wesentlichen auf Differenzen der chemischen Verschiebung bzw. der Kopplungskonstanten basieren:

- 1) $\delta(\alpha\text{-H3}_{\text{eq}}) > \delta(\beta\text{-H3}_{\text{eq}})$
- 2) $\delta(\text{H-4}\alpha) < \delta(\text{H-4}\beta)$
- 3) $\Delta(\delta_{\alpha}[\text{H9a} - \text{H9b}]) < \Delta(\delta_{\beta}[\text{H9a} - \text{H9b}])$
- 4) $J_{\text{H-7}\alpha,\text{H-8}\alpha} < J_{\text{H-7}\beta,\text{H-8}\beta}$

Diese empirisch ermittelten Regeln werden in folgenden detailliert dargestellt. Aufgrund der Abhängigkeit dieser Regeln von mehreren, teils unbekanntem Faktoren, sind sie eher als Anhaltspunkte für die Unterscheidung der Anomere denn als strenger Beweis zu betrachten:

⁹⁷ H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, 125, 47

⁹⁸ K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5229

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

- 1) Die Differenz der chemischen Verschiebung des äquatorialen Protons in Position 3 zwischen den beiden Anomeren beträgt etwa 0.3 ppm ($\delta_\alpha = 2.72\text{--}2.67$; $\delta_\beta = 2.40\text{--}2.25$) Diese Regel ist vor allem zur Bestimmung der Konfiguration ungeschützter Verbindungen hilfreich, gilt jedoch nicht im Fall *O*-acetylierter Verbindungen.¹⁰⁰
- 2) Die chemische Verschiebung des H-4 Protons der α -konfigurierten Verbindung liegt bei höherem Feld ($\delta_\alpha = 3.6\text{--}3.8$) als die des entsprechenden β -Anomers ($\delta_\beta = 3.9\text{--}4.2$), wobei sich diese Werte durch Schutzgruppen an den Hydroxylfunktionen, unter Beibehaltung des Verhältnisses, erheblich zu tieferem Feld verschieben können.¹⁰¹
- 3) Die Differenz der chemischen Verschiebungen der beiden geminalen Protonen an C-9 ist im Fall des α -Anomers mit 0.5 ppm kleiner als im Fall des β -Anomers mit ungefähr 1.0 ppm.¹⁰²
- 4) Die $^3J_{\text{H-7,H-8}}$ -Kopplung des β -Anomers ist mit Werten von 6.2 bis 8.5 Hz erheblich größer als die im α -Anomer (1.5 bis 2.6 Hz), was auf eine Konfigurationsänderung in der Seitenkette hindeutet.¹⁰³

Die zu Verbindung **27** ermittelten NMR-Daten weisen in Bezug auf *Regel 3* mit $\Delta(\delta[\text{H9a-H9b}]) = 0.3$ ppm und in Bezug auf *Regel 4* mit einer $^3J_{\text{H-7,H-8}}$ -Kopplung von 2.4 Hz auf das Vorliegen der gewünschten α -Konfiguration hin. *Regel 1* und *Regel 2* sind aufgrund des Schutzgruppenmusters an der Sialinsäure nicht eindeutig anwendbar. Ein Vergleich der chemischen Verschiebung von H-3_{eq} ($\delta = 2.60$) und H-4 ($\delta = 4.83$) mit denen literaturbekannter peracetylierter α -Sialoside¹⁰² belegt jedoch ebenfalls das Vorliegen der α -Konfiguration. Eine greifbarere Bestimmung der anomeren Konfiguration kann durch zweidimensionale NMR-Experimente erhalten werden, die die C,H-Kopplungen über zwei oder mehr Bindungen abbilden. So zeigen Sialinsäuren mit axialer Carbonsäurefunktion eine größere $J_{\text{C1,H3ax}}$ -Kopplung (5.8-7.5 Hz) als die entsprechenden Derivate mit äquatorialständiger Carbonsäurefunktion (1.0-1.7 Hz). Darüberhinaus werden $J_{\text{C2,H3ax}}$ -Kopplungskonstanten von ungefähr 8.0 Hz für das β -Anomer und von ca. 4.0 Hz für das α -Anomer gemessen. In Abb. 3.12 ist ein Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des Sialyl-T_N-Derivats **27** dargestellt, der die Kopplungen des äquatorialen und des axialen Protons am C3-Atom der Neuraminsäure zu den

¹⁰⁰ U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 4637

¹⁰¹ H. van Halbeek, L. Dorland, J. F. G. Vliegthart, R. Pfeil, R. Schauer, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 122, 305

¹⁰² K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 637

¹⁰³ R. Christian, G. Schulz, *Carbohydr. Res.* **1987**, 162, 1

Kohlenstoffatomen C-1 und C-2 zeigt. Im Falle des α -Anomers nehmen das axiale Proton an C3 und das Kohlenstoffatom C1 einen Winkel von 180° ein, was gemäß der Karplus-Beziehung^{104,105} zu einer großen Kopplungskonstanten führt. Dementsprechend ist im HMBC-Spektrum ein intensives Korrelationssignal zwischen $H_{3_{ax}}$ und C1 zu beobachten. Im Falle des β -Anomers hingegen bestünde zwischen $H_{3_{ax}}$ und C1 lediglich eine schwache axial-äquatoriale Kopplung, die zu keinem Signal im HMBC-Spektrum führen würde. Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Ergebnisse kann somit sicher von dem Vorliegen der gewünschten α -Konfiguration ausgegangen werden.

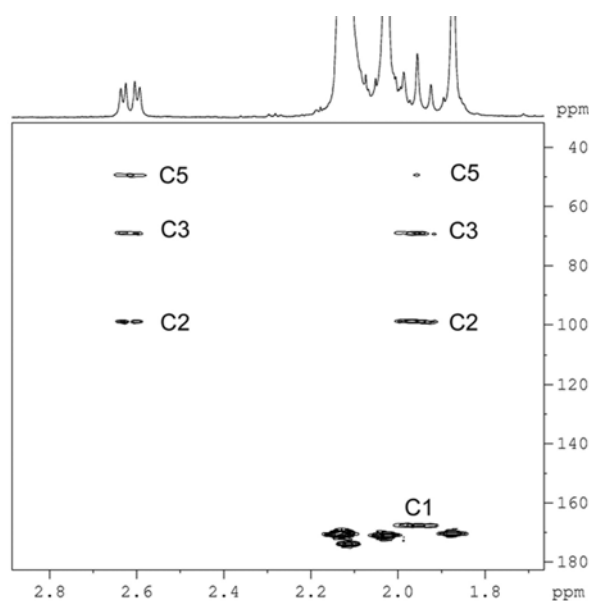


Abb. 3.12: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des α -Anomers **27**

Zur Fertigstellung des für die Festphasenglycopeptidsynthese benötigten Aminosäurebausteins werden die beiden noch freien Hydroxylgruppen des Sialyl- T_N -Derivats **27** mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert. Anschließend wird der *tert*-Butylester mit TFA gespalten. Um durch das entstehende *tert*-Butylcarbeniumion verursachte Nebenreaktionen zu vermeiden, wird die Reaktionsmischung mit dem als Kationenscavenger fungierenden elektronenreichen Aromaten Anisol versetzt. Der Sialyl- T_N -Baustein **29** wird in 77%iger Ausbeute über die beiden letzten Stufen erhalten.

¹⁰⁴ M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870

¹⁰⁵ M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11

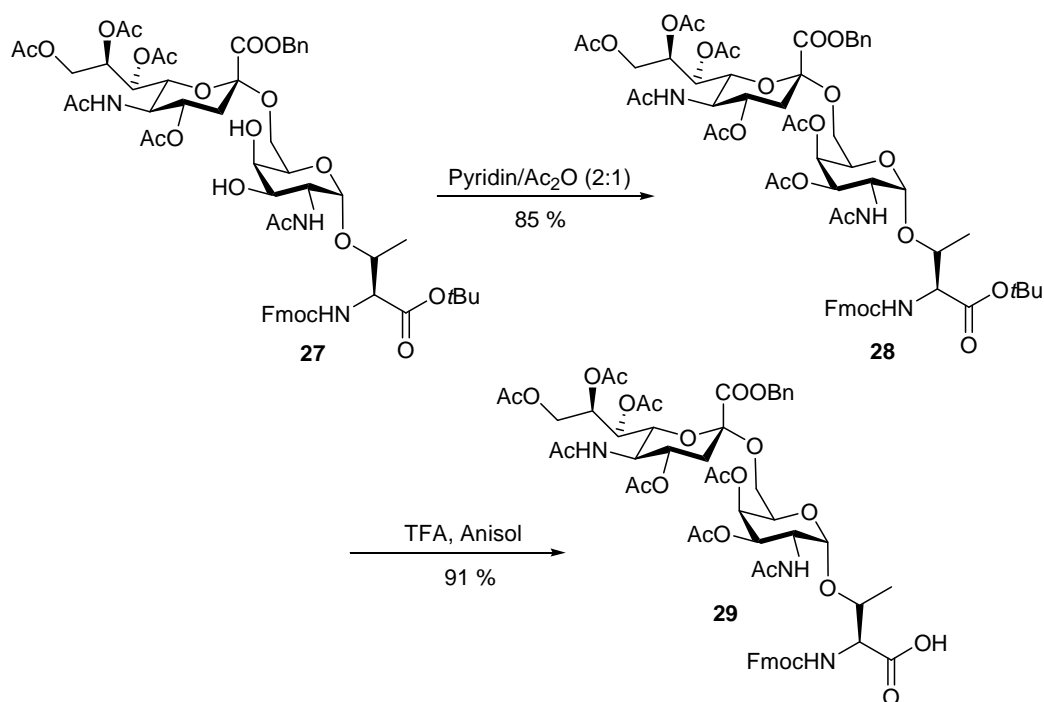


Abb. 3.13: Synthese des Sialyl-T_N-Bausteins für die Glycopeptidfestphasensynthese

3.1.2 Synthese des Triethylenglycolspacers

Um eine gegenseitige konformationelle Beeinflussung zwischen Glycopeptid und dem T-Zell-Epitop bzw. dem Mitogen zu verhindern, soll im synthetischen Vakzinkonjugat eine räumliche Distanz zwischen den beiden Epitopen geschaffen werden. Dies soll durch den wasserlöslichen, nicht immunogenen heterobifunktionalisierten *N*-Fmoc-Amino-PEG₃-Carbonsäure-Spacers **35** verwirklicht werden. Die Synthese erfolgt nach einer von *S. Keil* ausgearbeiteten Strategie,^{106,107,108} wobei zunächst Triethylenglycol **30** unter dem Einfluss katalytischer Mengen des Natriumtriethylenglycolates, in einer Hetero-Michael-Addition mit Acrylsäure-*tert*-butylester zum 12-Hydroxy-4,7,10-trioxododecansäure-*tert*-butylester **31** umgesetzt wird. Die nucleofuge Abspaltungstendenz der freien Hydroxylfunktion von **31** wird durch Funktionalisierung mit Mesylchlorid erhöht, um sie in der folgenden Substitution gegen Azid zu ersetzen.

¹⁰⁶ S. Keil, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**

¹⁰⁷ O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813

¹⁰⁸ O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901

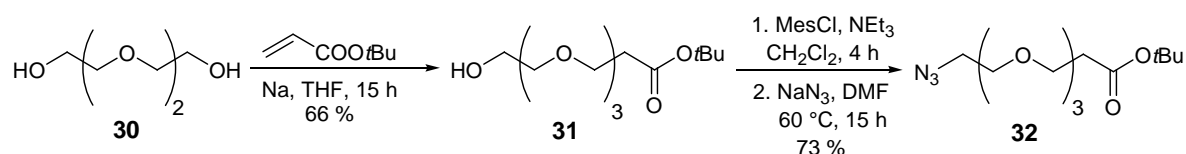


Abb. 3.14: Synthese des azidofunktionalisierten Triethylglycolspacers **32**

Die Reduktion des Azido-Derivates **32** mit Wasserstoff an Raney-Nickel in Isopropanol ergibt das freie Amin, welches durch Umsetzung mit Fmoc-OSu in einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) in den *N*-Fmoc-Amino-PEG₃-*tert*-butylester **34** überführt wird.

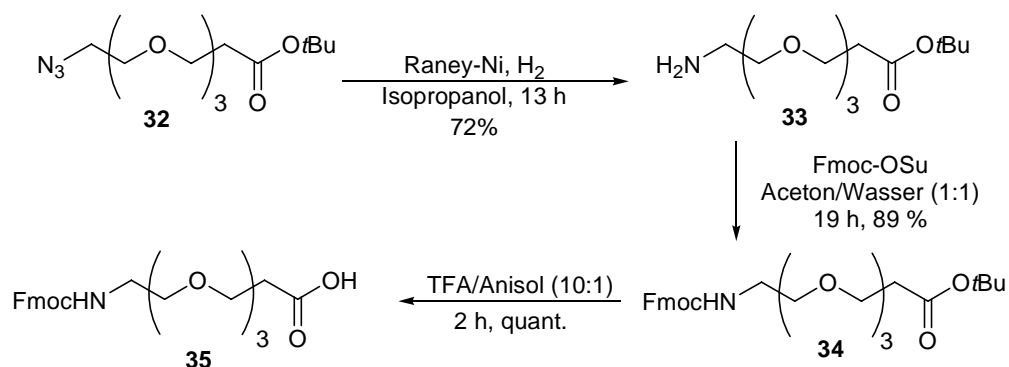


Abb. 3.15: Synthese des Triethylglycolspacers **35**

Im letzten Schritt wird der *tert*-Butylester durch Behandlung mit einem Gemisch aus Trifluoressigsäure und Anisol (10:1) gespalten. Man erhält den Fmoc-geschützten Triethylglycolspacer **35**, der in Analogie zu den Aminosäuren in Festphasenpeptidsynthesen gemäß der Fmoc-Strategie eingesetzt werden kann.

3.2 Festphasenoligosaccharidsynthese

Um den mit der Synthese der Saccharidbausteine verbundenen Zeitaufwand zu reduzieren, wäre es wünschenswert, auf leicht automatisierbare Strategien zurückgreifen zu können, wie dies zur Darstellung von Oligopeptiden und Oligonucleotiden heute schon möglich ist. Eine festphasenunterstützte, generell anwendbare Methode sollte mehrere Vorteile gegenüber Verfahren in Lösung mit sich bringen. So könnte die Synthese automatisiert und schnell in Synthesizern, analog den in der Peptidsynthese eingesetzten Geräten, durchgeführt werden. Durch einen Überschuss an eingesetzten Bausteinen und Reagenzien könnten in kürzeren Reaktionszeiten höhere Umsätze erzielt werden; Reinigungsprozeduren würden zudem vereinfacht. Durch Optimierung von

Schutzgruppenmanipulationen und Glycosylierungsreaktionen sollen Saccharidbausteine gefunden werden, die sich in besonderer Form zur Anwendung am polymeren Träger eignen, um diese Bausteine zu standardisieren und kommerziell zugänglich zu machen.

3.2.1 Oligosaccharidsynthesen unter Verwendung des PTMSE-Ankersystems

Zur Untersuchung der Kompatibilität von in homogener Phase angewandten Bedingungen mit der Festphasensynthese, sollen zunächst Synthesen einfacher Modellschubstanzen an dem fluoridlabilen Phenyltrimethylsilylethyl-Anker durchgeführt werden.¹⁰⁹ Hierzu wird der 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)ethyl]-phenoxyessigsäureallylester dargestellt und mit dem ersten Kohlenhydratbaustein verknüpft. Im Weiteren wird die Allylschutzgruppe der Carboxylfunktion gespalten, und der glycosylierte Anker an einen aminofunktionalisierten polymeren Träger gebunden. Der PTMSE-Anker wird verwendet, da er sich besonders leicht durch einen fluoridinduzierten Eliminierungsmechanismus spalten lässt. Diese leichtere Spaltbarkeit im Vergleich zu anderen fluoridlabilen 2-Silylethylschutzgruppen¹¹⁰ liegt in der benzylicben Position der C-Si- σ -Bindung begründet. Die dadurch mögliche Delokalisierung der Bindungselektronen in das LUMO des Aromaten erhöht die Empfindlichkeit des Siliziums gegenüber einem nucleophilen Angriff des Fluoridanions. Die so induzierte β -Eliminierung liefert neben Trimethylsiliziumfluorid und harzgebundenem Styrol die Saccharidstruktur **39**, welche sich bei Bedarf in lediglich einer weiteren Stufe durch Behandlung mit Trichloracetonitril unter Basenkatalyse in einen Trichloracetimidat-Donor umwandeln lässt.

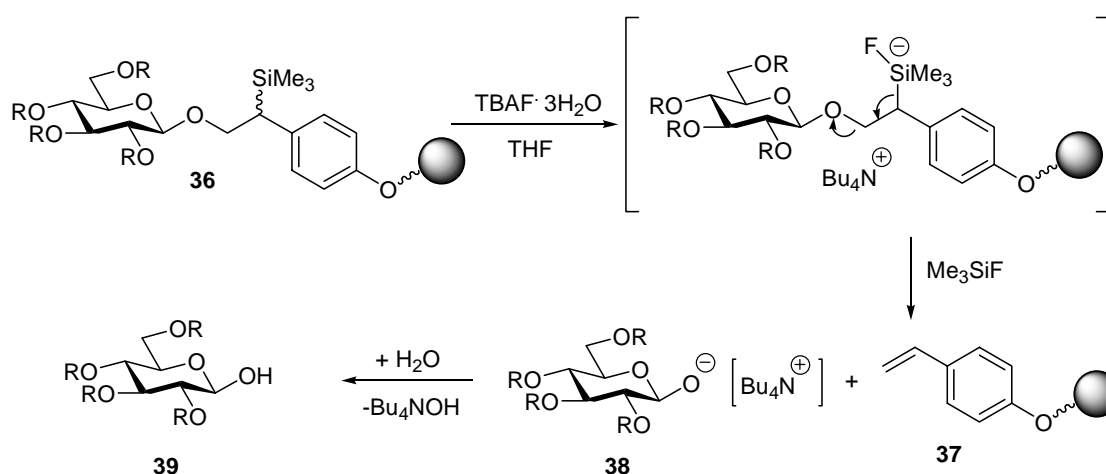


Abb. 3.16: Mechanismus der fluoridinduzierten Spaltung des PTMSE-Ankers

¹⁰⁹ (a) M. Wagner, H. Kunz, *Z. Naturforsch.* **2002**, 57b, 928 (b) M. Wagner, H. Kunz, *Synlett* **2000**, 400

¹¹⁰ W. Bernhard, I. Flemming, *J. Organomet. Chem.* **1984**, 271, 281

In Saccharidsynthesen ist die Kohlenhydratstruktur über eine halbacetalische Hydroxylgruppe mit dem PTMSE-Anker verknüpft und nicht wie die Startaminosäure in Peptidsynthesen über eine Carboxylfunktion. Da das acetalische Anion **38** aufgrund der niedrigeren Acidität der konjugierten Säure eine erheblich schlechtere Abgangsgruppe darstellt als ein Carboxylat, müssen bei der Abspaltung harschere Bedingungen angewandt werden. So findet bei den in der Peptidsynthese verwendeten neutralen Bedingungen mit Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat auch nach drei Tagen noch keine Eliminierung statt. In Dichlormethan wird die Integrität der Hydrathülle des Fluorids nicht beeinträchtigt und somit dessen Basizität auf niedrigem Niveau belassen. Will man die acetalische Bindung spalten, muss die Hydrathülle des Fluorids durch Verwendung eines polarerer Lösungsmittels wie Tetrahydrofurans aufgelöst werden. Dadurch wird das Fluoridanion zu einem starken Nucleophil und zu einem effektiveren Reagenz für den Angriff am Silizium. Führt man die Reaktion dementsprechend in Tetrahydrofuran durch, ist die Abspaltung schon nach fünf Minuten bei Raumtemperatur vollständig. Dieser Reaktivitätsgewinn wird jedoch mit einer erhöhten Basizität des Reaktionsmediums erkauft, was bei der Syntheseplanung zu berücksichtigen ist.

3.2.1.1 Synthese des Phenyltrimethylsilyl-Ankers

Die Darstellung des Phenyltrimethylsilylankers¹¹¹ erfolgt ausgehend von Trimethylvinylsilan, welches mit *m*-Chlorperbenzoesäure zu racemischem Trimethylsilyloxiran **42** epoxidiert wird.¹¹² Das Oxiran wird anschließend mit Lithium-bis-(*p*-ethoxyethoxyphenyl)cuprat **41** umgesetzt, welches selbst wiederum durch Lithiierung des kommerziell erhältlichen 1-(4-Bromophenoxy)-1-ethoxyethan **40** und anschließende Transmetallierung mit CuI zugänglich ist. Die nucleophile Öffnung des Epoxidringes zu [2-(*p*-Ethoxyethyl)-oxyphenyl-2-trimethylsilyl]ethanol **43** erfolgt hoch regioselektiv durch Angriff auf das sterisch am stärksten gehinderte, aber gleichzeitig auch elektrophilere Kohlenstoffatom.

¹¹¹ (a) M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 315 (b) M. Wagner, S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 6018.

¹¹² (a) J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2615 (b) J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Organomet. Chem.* **1988**, *341*, 293 (c) N. E. Schore, M. C. Croudace, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5356.

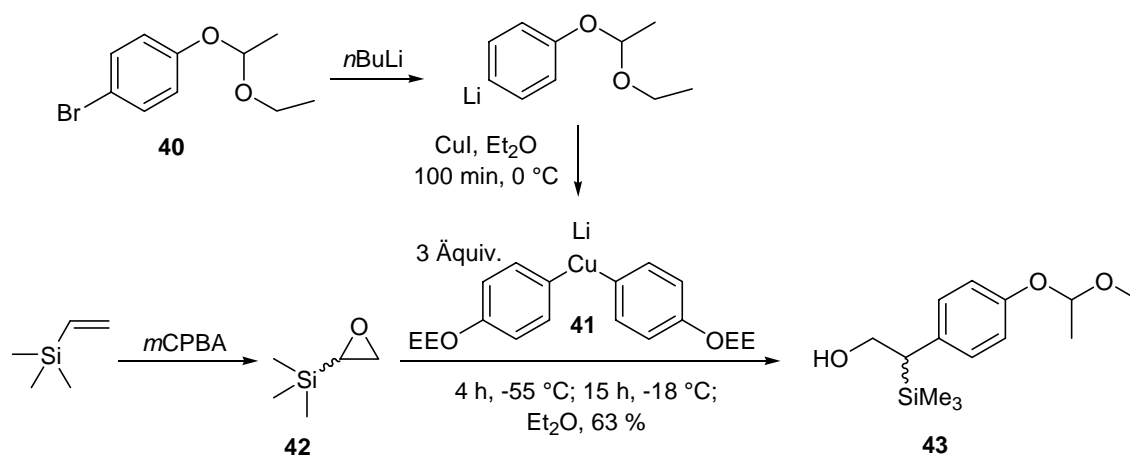


Abb. 3.17: Epoxidierung und nucleophile Ringöffnung

Durch Behandlung mit Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) in Methanol wird die säurelabile, acetalische Ethoxyethyl-Schutzgruppe gespalten,¹¹³ wobei das Diol **44** in 72%iger Ausbeute erhalten wird. Die Anbindung an das aminofunktionalisierte Harz soll über eine Amidbindung erfolgen. Demzufolge muss der Anker mit einer Carbonsäureeinheit funktionalisiert werden. Dies geschieht durch Umsetzung des Diols mit Chloressigsäureallylester. Durch Verwendung von Kaliumcarbonat als Base lässt sich regioselektiv die acidere, phenolische Hydroxylfunktion deprotonieren. Diese reagiert dann mit dem unter den verwendeten *Finkelstein*-Bedingungen *in situ* aus dem entsprechenden Chlorderivat gebildete Iodessigsäureallylester im Sinne einer *Williamson*'schen Ethersynthese zum gewünschten Produkt **45**. Die hier noch als Allylester geschützte Carbonsäurefunktion kann nach Glycosylierung des Ankers mit dem ersten Kohlenhydratbaustein, zur Anbindung an das Harz selektiv deblockiert werden.

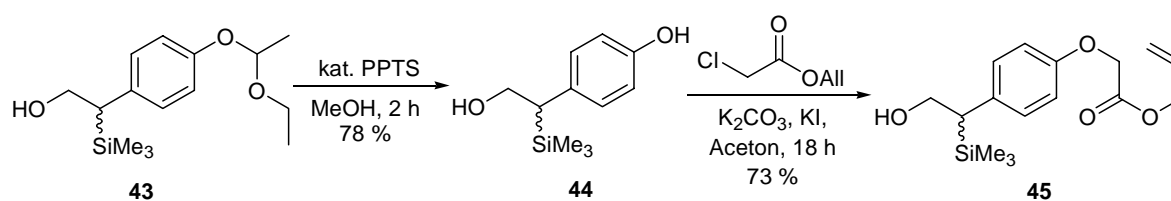


Abb. 3.18: Synthese des PTMSE-Ankers **45**

3.2.1.2 Modellsynthesen am polymeren Träger

Als erste Modellstrukturen sollen β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Oligoglucopyranosylverbindungen am PTMSE-Anker aufgebaut werden. Dazu wird die freie Hydroxylgruppe des Ankers mit

¹¹³ M. Miyashita, A. Yoshikoshi, P. A. Grieco, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3772

einem geeigneten Donor glycosyliert. Die Glycosylierung nach dem von Schmidt¹¹⁴ ausgearbeiteten Verfahren unter Verwendung von Trichloracetimidaten hat sich hierbei als günstig erwiesen.¹¹⁵ Ausgehend von D-Glucose erfolgt die Synthese des Donors in drei Stufen. Die Ausgangsverbindung **46** wird mit Acetanhydrid unter Einwirkung katalytischer Mengen Perchlorsäure zur peracetylierten Glucose **47** umgesetzt. Die anomere Acetylgruppe wird durch selektive Aminolyse mit Ethylendiamin in Essigsäure gespalten und anschließend durch basenkatalysierte Addition an Trichloacetonitril in das Trichloracetimidat **48** überführt. Unter Verwendung der starken Base DBU ist eine schnelle Gleichgewichtseinstellung möglich, so dass aufgrund des anomeren Effektes hierbei fast ausschließlich das α -konfigurierte Produkt erhalten wird.

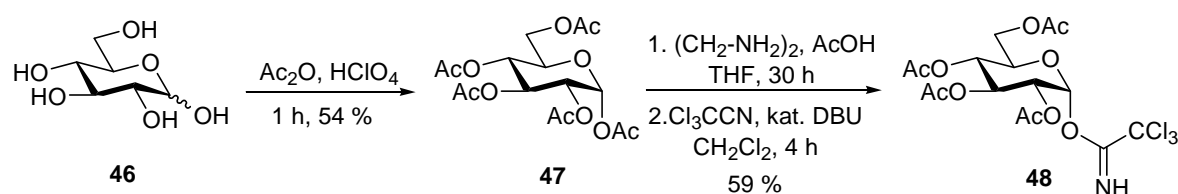


Abb. 3.19: Synthese des α -D-Glucopyranosyltrichloracetimidates **48**

Die Glycosylierung zur Anbindung des Bausteins an den Anker wird bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ in Dichlormethan durchgeführt. Hierbei wird ein 1.5facher Überschuss des Trichloracetimidates **48** mit dem Akzeptor **45** unter Verwendung von 0.01 Äquivalenten Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) als Promotor umgesetzt. Das gewünschte Produkt **49** wird in 71%iger Ausbeute erhalten.

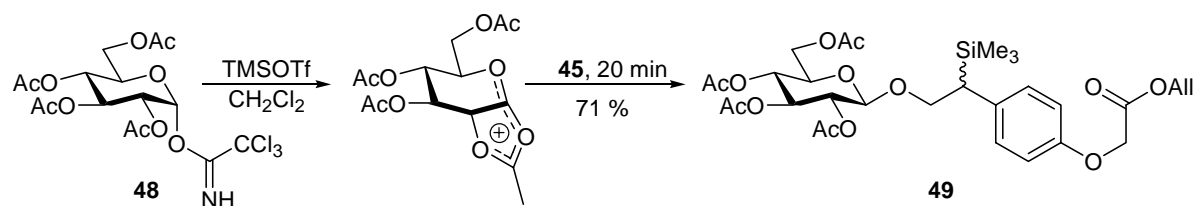


Abb. 3.20: Glycosylierung des PTMSE-Ankers

Die hier angegebenen Bedingungen müssen streng eingehalten werden, da es bei deren Variation zu dramatischen Ausbeuteminderungen kommen kann. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der PTMSE-Anker **45** als β -Hydroxysilan sowohl unter sauren als auch unter basischen Bedingungen zur *Peterson-Olefinierung* neigt. Die sauer katalysierte

¹¹⁴ (a) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213 (b) R. R. Schmidt, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 1257

(c) E. Eichler, H. J. Jennings, M. Gilbert, D. M. Whitefield, *Carbohydr. Res.* **1999**, 319, 1

¹¹⁵ K. Groh, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**

Reaktion verläuft als bimolekulare *anti*-Eliminierung, die basenvermittelte Reaktion verläuft vermutlich über einen viergliedrigen Heterocyclus als Zwischenstufe mit anschließender *syn*-Eliminierung durch eine [2+2]-Cycloreversion.

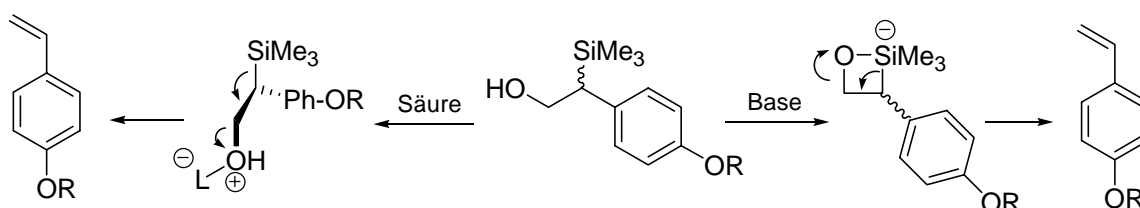


Abb. 3.21: Mechanismen der sauer und basisch katalysierten *Peterson*-Olefinierung

Verwendet man mehr als die 0.01 Äquivalente an Lewis-Säure, so kann es unter den Glycosylierungsbedingungen schon in erheblichem Ausmaß zur Zersetzung des Ankers kommen. Des Weiteren ist die Verwendung von Molekularsieb nicht kompatibel mit den geringen Mengen an verwendetem Promotor, da innerhalb des Zeolithes fest lokalisierte basische und saure Zentren vorhanden sind. Die basischen Positionen können Addukte mit dem Lewis-sauren Promotor bilden und so dessen Konzentration und Verfügbarkeit in nicht vorhersehbarer Weise herabsetzen. Ohne Molekularsieb ist sorgfältiges Absolutieren der Lösungsmittel und Arbeiten unter Feuchtigkeitsausschluss besonders wichtig. Die unter basischen Bedingungen durchgeführten Glycosylierungsreaktionen nach *Koenigs-Knorr*^{21,116} mit Silbercarbonat bzw. nach *Helferich*¹¹⁷ mit Quecksilber(II)cyanid erwiesen sich als ungeeignet, da schon das schwach basische Cyanidanion die basenvermittelte *Peterson*-Olefinierung zu induzieren vermag.

Im letzten Schritt vor der Anbindung an das Harz wird der Allylester durch einen Palladium-katalysierten Transfer des Allylrestes auf das im 1.2fachen Überschuss eingesetzte Natriumsalz der *p*-Toluolsulfinsäure gespalten,¹¹⁸ so dass die zur Anbindung benötigte Carbonsäurefunktion erhalten wird.

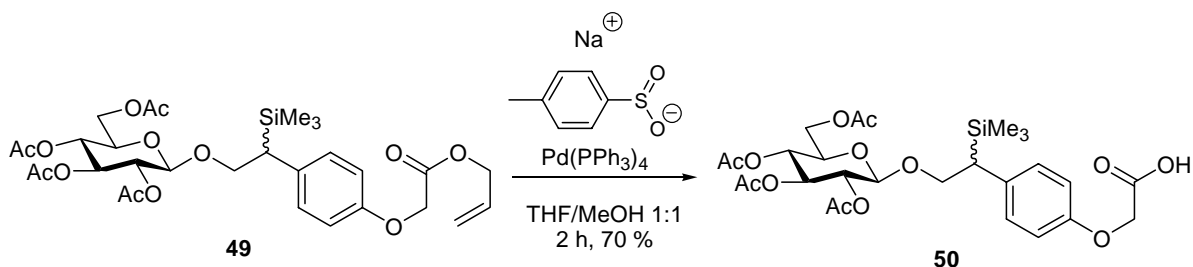


Abb. 3.22: Spaltung des Allylesters

¹¹⁶ W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 957

¹¹⁷ B. Helferich, K. Weiss, *Chem. Ber.* **1956**, 89, 314

¹¹⁸ (a) H. Waldmann, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1985**;
(b) M. Honda, H. Morita, I. Nagakura, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8932

3.2.1.3 Polymere Träger

Vor der Anbindung an das Harz muss ein für die durchzuführenden Reaktionen geeignetes Trägermaterial gewählt werden. Gebräuchlich sind sowohl einfache mit Divinylbenzol quervernetzte Polystyrolharze als auch das zusammen mit polaren Lösungsmitteln einsetzbare TentaGel®-Harz.¹⁶ Quervernetztes Polystyrol ist preisgünstig und kann unter vielen Reaktionsbedingungen verwendet werden. Um Zugang zu den Reaktionszentren zu gewährleisten, muss das Harz jedoch in den verwendeten Lösungsmitteln ausreichend quellen.

LM \ Harz	Polystyrol 1 % DVB	TentaGelS 0.25-0.3 mmol/g
Wasser	0	3,6
MeOH	1,6	3,6
EtOH	1,68	2,9
CH ₂ Cl ₂	8,3	6,3
Toluol	8,5	4,8
DMF	5,6	4,7
MeCN	3,2	4,2
THF	8,8	5
Dioxan	7,8	5,4
Ether	4	1,9

Tabelle 3.1: Quellvolumen (ml/g) von Polystyrol- (Trockenvolumen 1.6 ml/g) und TentaGel-Harz (Trockenvolumen 1.7 ml/g)¹¹⁹

Polystyrol quillt sehr gut in unpolaren Lösungsmitteln, der Einsatz zusammen mit polareren Solventien ist hingegen eingeschränkt. Die Quelleigenschaften in polaren Lösungsmitteln können jedoch durch Anpfropfen von Polyethylenglykolketten an den Polystyrolkern erheblich verbessert werden. Solche Copolymere wie z. B. *TentaGel* (*Rapp Polymere GmbH, Tübingen*) gewähren somit zusätzliche Freiheiten in der Synthese. Besonders bei der Methodenentwicklung erscheint dies hilfreich, da so eine Übertragung der in der homogenen Phase angewandten Bedingungen auf die Festphasensynthese häufiger möglich ist. Aus diesem Grund wurde ein aminofunktionalisiertes TentaGel-Harz als polymerer Träger für die Modellsynthese der β -(1→4)-verknüpften Oligoglucoopyranosylverbindungen gewählt.

¹¹⁹ <http://www.rapp-polymere.com/>

3.2.1.4 Synthesen am polymeren Träger

Der mit dem ersten Kohlenhydratbaustein beladene Anker **50** wird über eine Amidbindung mit dem aminofunktionalisierten TentaGel-Harz (*NovaSyn TG amino resin*, Novabiochem, 90 μm beads, 0.24 mmol/g) in einer Ansatzgröße von 0.75 mmol verknüpft. Als Kupplungsreagenzien werden TBTU und HOBT unter Zusatz von zwei Äquivalenten *N*-Methylmorpholin als Base verwendet. Die Kupplung erfolgt durch 20stündiges Schütteln in einem *Merrifield*-Festphasenreaktor in einem Gemisch aus DMF und Dichlormethan. Die Verwendung von 15 bis 20 ml Lösungsmittel pro Gramm an eingesetztem Harz hat sich als günstig erwiesen und soll auch im Weiteren Anwendung finden. Der Nachweis der Kupplung erfolgt IR-spektroskopisch anhand der C=O-Valenzschwingungsbande der Acetylschutzgruppen bei 1757 cm^{-1} . Unumgesetzte Aminogruppen des polymeren Trägers werden durch Behandlung mit Pyridin und Acetanhydrid im Verhältnis 2:1 acetyliert. Im nächsten Schritt wird der Kohlenhydratbaustein **51** deacetyliert. Dazu wird das Harz in 60 ml Methanol vorgequollen und anschließend mit einer 0.05 M Lösung von Natriummethanolat in Methanol auf einen pH-Wert zwischen 9 und 9.5 eingestellt. Nach dreistündigem Schütteln wird mehrmals abwechselnd mit Methanol und Dichlormethan gewaschen.

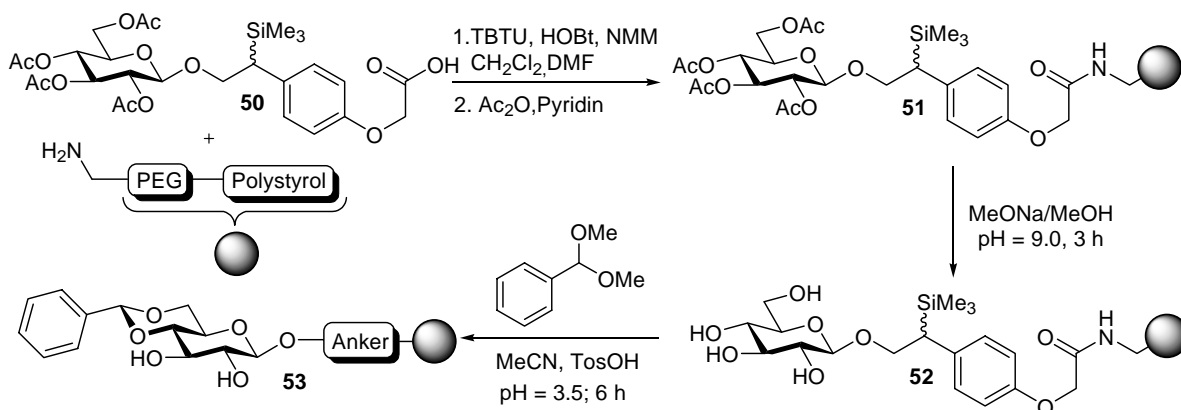


Abb. 3.23: Beladung des polymeren Trägers und nachfolgende Schutzgruppenmanipulationen

Im IR-Spektrum ist das komplette Verschwinden der Carbonylbande bei 1757 cm^{-1} zu beobachten.

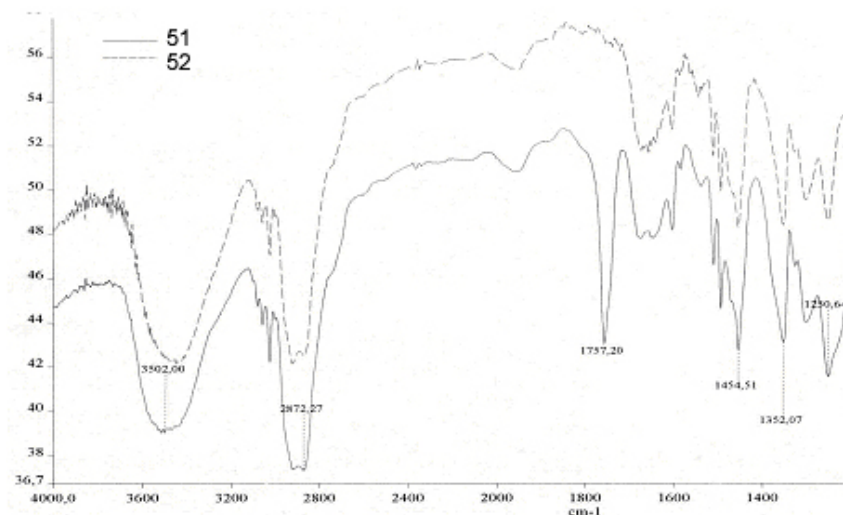


Abb. 3.24: IR-Spektren der Verbindungen **51** und **52**

Um zum gewünschten Baustein mit lediglich einer freien Hydroxylgruppe in 4-Position zu gelangen, werden zunächst die Hydroxylfunktionen in 4- und 6-Position als Benzylidenacetal blockiert. Dazu wird das Harz in Acetonitril vorgequollen, mit Benzaldehyddimethylacetal versetzt und durch Zugabe weniger Kristalle *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat auf einen pH-Wert von 3,5 angesäuert. Der Reaktionsverlauf lässt sich sehr gut dünnschichtchromatographisch verfolgen. Dazu werden 10 mg Harz entnommen, mit einer Lösung von 1 mg Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat in 0,1 ml THF versetzt und fünf Minuten gerührt. Die Abspatlösung kann anschließend direkt als Tüpfelprobe zur DC-Kontrolle verwendet werden. Nach sechs Stunden ist die Reaktion beendet, so dass die Reaktionslösung abgesaugt werden kann. Das Harz wird anschließend mehrmals abwechselnd mit Acetonitril und Dichlormethan gewaschen. Die Blockierung der freien Hydroxylschutzgruppen von Verbindung **53** in Position 2 und 3 wird durch sechsstündiges Behandeln mit Pyridin und Acetanhydrid im Verhältnis 2:1 erreicht.

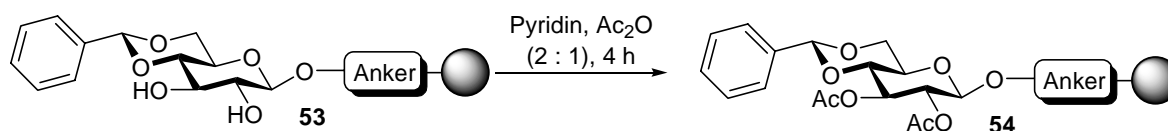


Abb. 3.25: Acetylierung der freien Hydroxylgruppen

Um den für die Einführung des nächsten Glucosebausteins benötigten Akzeptor zu erhalten, muss das 4,6-*O*-Benzylidenacetal **54** regioselektiv zum 6-*O*-Benzylether geöffnet

werden. Hierfür existieren verschiedene Methoden, die alle auf der sauren Aktivierung eines der beiden acetalischen Sauerstoffe und anschließender Hydridübertragung auf das sich intermediär ausbildende Carbeniumion basieren.^{120,121} Protonen greifen hierbei bevorzugt am basischeren Sauerstoff des sekundären Alkohols in 4-Position an, voluminösere Lewis-Säuren hingegen am leichter zugängliche Sauerstoff in 6-Position. Bei der anschließenden Hydridübertragung bildet sich unter Verwendung von Protonen als Aktivatoren der 6-*O*-Benzylether, im Fall von voluminösen Lewis-Basen dagegen der 4-*O*-Benzylether. Als Hydrid-Donoren kommen Triethylsilan¹²¹ oder Metallhydride, wie das milde Natriumcyanoborhydrid,¹²⁰ zum Einsatz.

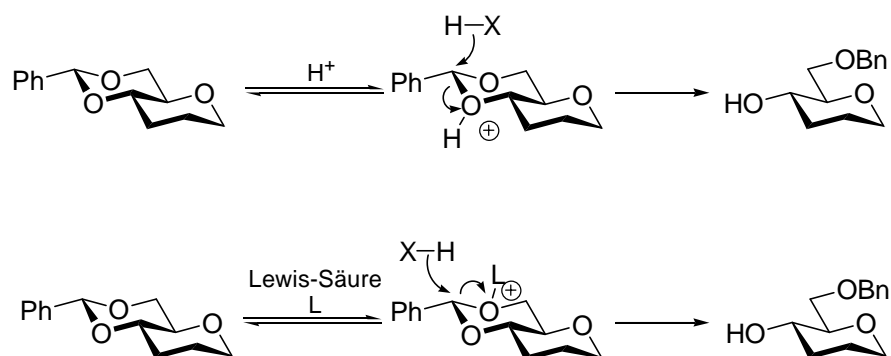


Abb. 3.26: Mechanismus der regioselektiven Benzylidenacetalöffnung

Aufgrund der präparativ einfacheren Handhabung wird bei Synthesen in homogener Phase bevorzugt die von *DeNinno*¹²¹ eingeführte Variante unter Verwendung von Trifluoressigsäure als Protonenquelle und Triethylsilan als Reduktionsmittel verwendet. Nach dieser Methode konnte am polymeren Träger aber kein Umsatz erzielt werden. Dagegen verläuft die Reaktion unter Verwendung von 60 Äquivalenten Natriumcyanoborhydrid als Hydriddonor und HCl als Säure bei einem pH-Wert von 2.5 bis 3 innerhalb von 20 Stunden vollständig. Jedoch konnten auch hier die in Lösung angewandten Bedingungen nicht unverändert auf die Festphasenreaktion übertragen werden. Die Verwendung der dort üblichen zehn Äquivalente an Reduktionsmittel lieferte vornehmlich das durch acidolytische Spaltung des Benzylidenacetals resultierende Produkt. Auch ist die Säurelabilität des Ankers zu berücksichtigen. So tritt bei einem pH-Wert von zwei und niedriger (pH-Papier: *Acilit*[®]) über die ausgedehnte Reaktionszeit von 20 Stunden in erheblichem Maß die sauer katalysierte Peterson-Olefinierung ein. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen zeigte, dass durch die Verwendung großer

¹²⁰ P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.* **1982**, 108, 97

¹²¹ M. P. DeNinno, J. P. Etienne, K. C. Duplatier, *Tetraheadron Lett.* **1995**, 36, 669

Überschüsse des Hydrid-Donors von mehr als 50 Äquivalenten bei einem pH-Wert zwischen 2.5 und 3 die Acidolyse des Benzylidenacetals nicht mehr zu beobachten ist und die *Peterson*-Eliminierung nahezu vollständig verhindert werden kann. Das gewünschte Produkt **55** wird unter diesen Bedingungen gemäß HR-MAS-NMR quantitativ erhalten.

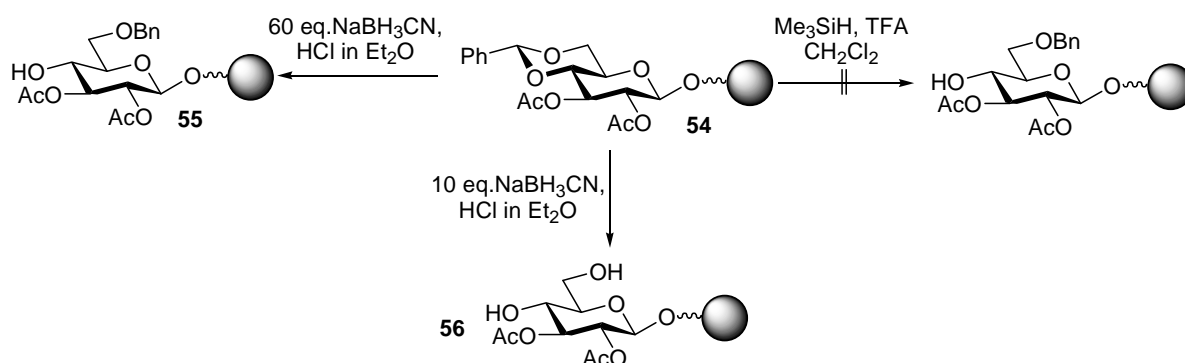


Abb. 3.27: Regioselektive Öffnung des Benzylidenacetals zum 6-*O*-Benzylether **55**

Der festphasengebundene Akzeptor **55** soll im nächsten Schritt mit dem Trichloracetimidatdonor **48** glycosyliert werden. Hierbei zeigte sich jedoch, dass bei den aus der homogenen Phase bekannten Standardbedingungen keine Umsetzung stattfand. Deshalb wurde versucht, durch Variation der Bedingungen, den Verlauf der Reaktion in die gewünschte Richtung zu lenken. In der folgenden Tabelle sind einige der untersuchten Bedingungen dargestellt.

	TMSOTf	Temperatur	Lösungsmittel
A	0.05 Äquiv.	- 20 °C	CH ₂ Cl ₂
B	0.05 Äquiv.	20 °C	CH ₂ Cl ₂
C	0.5 Äquiv.	- 20 °C	CH ₂ Cl ₂
D	0.5 Äquiv.	20 °C	CH ₂ Cl ₂
E	1.0 Äquiv.	20 °C	CH ₂ Cl ₂
F	1.0 Äquiv.	40 °C	THF
G	2.0 Äquiv.	20 °C	CH ₂ Cl ₂

Tabelle 3.2: Übersicht angewendeter Glycosylierungsbedingungen

Es zeigte sich, dass unter den drastischeren Bedingungen in erster Linie die *Peterson*-Olefinierung am Anker beschleunigt wurde. Sie wurde so dominant, dass das Produkt der gewünschten Glycosylierung in keinem der untersuchten Fälle beobachtet werden konnte.

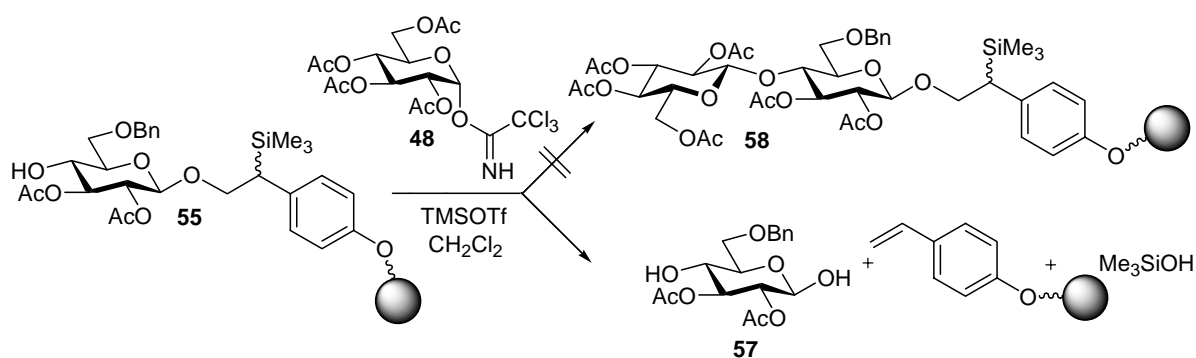


Abb. 3.28: Glycosylierung nach Schmidt am polymeren Träger

3.2.2 Optimierung der Festphasenreaktionen

3.2.2.1 Bestimmung der freien Aminogruppen am polymeren Träger

Um die Probleme im Zusammenhang mit der Glycosylierung zu lösen, soll nach Möglichkeiten gesucht werden, den Verlauf der einzelnen Reaktionsschritte quantitativ zu verfolgen. Die Beladung des aminofunktionalisierten Harzes stellt die erste Reaktion an der festen Phase dar. Für die Untersuchungen der folgenden Reaktionen ist Kenntnis des Umsatzes dieser Kupplung und die sich daraus ergebende Beladung des polymeren Trägers notwendig. Aufschluss hierüber liefert die Bestimmung der freien Aminogruppen. Eine sehr einfache Methode stellt der Kaisertest dar.¹²² Hierfür werden drei Lösungen hergestellt: (1) 1.0 g Ninhydrin in 20 ml Ethanol (2) 80 g Phenol in 20 ml Ethanol (3) 2 ml einer 0.001 M KCN-Lösung in 98 ml Pyridin. Zur Untersuchung überführt man wenige zuvor gründlich gewaschene Harzkügelchen in ein kleines Reagenzglas, versetzt sie mit jeweils zwei bis drei Tropfen der Lösungen und erhitzt für etwa 5 min auf 100 °C. Sind keine freien primären Amine vorhanden, so erhält man eine gelbe Lösung und farblose Perlen. Der Test ist sehr empfindlich, so dass sich die Harzkügelchen schon bei Spuren an freien Aminogruppen (0.002 mmol/g) blau färben. Bei höheren Konzentrationen an freiem Amin tritt eine graduell zunehmende Blaufärbung der überstehenden Lösung ein. Hieraus erhält man die rudimentäre Information, ob noch freie Aminofunktionen vorhanden sind und eventuell eine vage Abschätzungen der Konzentration. Genaue quantitative Aussagen sind mit diesem Test jedoch nicht zu treffen. Die im Folgenden vorgestellte titrimetrische Methode liefert diesbezüglich aussagekräftige Ergebnisse. Sie beruht auf der Umsetzung harzgebundener Aminofunktionen mit Pikrinsäure und deren anschließende Elution mit

¹²² E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595

einem Überschuss einer stärkeren Base.¹²³ Die Konzentration der zuvor am Harz gebundenen Pikrinsäure im Eluat kann dann photometrisch bestimmen werden. Die Durchführung dieser Analyse wird in der folgenden Arbeitsvorschrift beschrieben.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur quantitativen Bestimmung der freien Aminogruppen:

Die Probe wird in ein mit einer Fritte versehenes Reaktionsgefäß eingewogen (ca. 10-20 mg). Anschließend wird das Harz in Dichlormethan vorgequollen (etwa 1 ml Lösungsmittel pro 20 mg Probe), mit 5% (v/v) Diisopropylethylamin in Dichlormethan (2 x 3 min) neutralisiert und mit Dichlormethan gewaschen (3 x 2 min). Man behandelt die Probe mit einer 0.1 M Pikrinsäurelösung in Dichlormethan (2 x 3 min) und wäscht mit Dichlormethan (5 x 2 min). Das Pikrat wird mit einer 5%igen (v/v) Diisopropylethylaminlösung in Dichlormethan (2 x 3 min) eluiert und anschließend mit Dichlormethan (3 x 2 min) nachgewaschen. Eluat und Waschlösung werden im Verhältnis 24:1 mit Ethanol verdünnt und spektroskopisch vermessen. Der molare dekadische Absorptionskoeffizient des Diisopropylammoniumsalzes der Pikrinsäure ($\epsilon_{358} = 14500$) ist im Konzentrationsbereich von $1-20 \cdot 10^{-5}$ M konstant sofern die ethanolische Messlösung weniger als 20% Dichlormethan enthält. Ein günstiges Verhältnis von Harz zu Lösungsmittel ist 1:20 (w/v). Die Konzentration c an freiem Amin ergibt sich entsprechend der folgenden Gleichung.

$$c(\text{mol} / \text{g}) = \frac{\text{Extinktion } E}{\text{Ex.koeffizient } \epsilon} \times 25 (\text{Verdünnung}) \times \frac{\text{Volumen } V \text{ des Eluats}}{\text{Masse } M \text{ der eingesetzt en Probe}}$$

Bei den ermittelten Werten ist es erforderlich, die Blindwerte zu überwachen, um die Messwerte der Analyse um den unspezifischen Anteil korrigieren zu können. Der Blindwert kann auf unterschiedlichen Ursachen beruhen:

- Die verwendeten Reagenzien sind nicht völlig frei von der zu bestimmenden Komponente
- Matrixbestandteile sowie Reaktionsgefäße und Reagenzien zeigen ähnliche Reaktionen wie die Reagenzien mit den zu bestimmenden Komponenten
- Systematische Verunreinigung der Prüfgeräte
- Reagenzienzersetzung

¹²³ B. F. Gisin, *Analytica Chim. Acta.* **1972**, 58, 248

Bei der Analyse des Reaktionsverlaufes wird eine bestimmte Menge an Harz auf die Änderung der Molalität einer funktionellen Gruppe hin untersucht. Der hierbei resultierende Blindwert lässt sich in zwei Komponenten aufteilen. Eine Komponente wird durch unspezifische Bindung bzw. Reaktion des Nachweisreagenzes mit dem Harz verursacht und zeigt somit eine lineare Abhängigkeit von der Masse des Harzes. Die zweite Komponente wird durch alle weiteren oben erwähnten Parameter verursacht und ist in einem gegebenen System eine fixe Größe.

Diese zweite Komponente, lässt sich in jeder Messung recht einfach ermitteln. Um statistische Fehler zu minimieren, werden jeweils drei Analysen einer Probe angesetzt. Verwendet man hierbei unterschiedliche Mengen an Harz, so lässt sich eine Auftragung der gemessenen Größe gegen die Harzmenge vornehmen. Durch lineare Regression erhält man eine Gleichung mit einer massenabhängigen Komponente und einer Konstanten. Aus der Konstanten kann anschließend der Blindwert des Systems berechnet werden. Zur Bestimmung der aus unspezifischer Bindung und Reaktion des Nachweisreagenzes mit dem Harz resultierenden Komponente des Blindwertes verwendet man je nach Problemstellung unterschiedliche Methoden. Dazu analysiert man entweder ein ähnliches Harz, das keine freien Aminofunktionen aufweist, oder man setzt einen kleinen Teil des zu analysierenden Harzes mit der reaktiven Reagenzienkombination bestehend aus Acetanhydrid in Pyridin um, so dass alle Aminfunktionen acetyliert werden. Aus der Auftragung der Extinktion gegen die Menge an verwendetem Harz lässt sich die unspezifische Bindung ermitteln. Dieser Wert ist jedoch mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet, da letztendlich eine Modifikation der eigentlich zu analysierenden Struktur untersucht wird. Im Rahmen der Messgenauigkeit hat es sich hierbei als gute Arbeitsgrundlage erwiesen, die sehr schwache unspezifische Bindung der Pikrinsäure an das Polystyrolharz zu vernachlässigen.

Der nach der oben beschriebenen Arbeitsvorschrift und anschließender Blindwertkorrektur ermittelte Wert gilt für die Fälle, in denen das Harz schon vor der eigentlichen Reaktion eingewogen und anschließend komplett analysiert wird. Entnimmt man die Probe erst nach der Umsetzung, um titrimetrisch den Verlauf einer Reaktion zu bestimmen, so muss weiterhin berücksichtigt werden, dass die Masse des polymeren Trägers durch die Reaktion verändert wird. Je nach Kapazität des Harzes und der durch die Reaktion bedingten Massenänderung kann sich die Masse des Gesamtkonstruktes erheblich ändern (in einzelnen Fällen um mehr als 50 %), was bei Vernachlässigung zu signifikanten Fehlern führen würde. Die reaktionsbedingte Massenänderung des Harzes und die damit verbundene Konzentrationsänderung an freiem Amin bezogen auf die Masse des Ausgangsharzes sind zwei Unbekannte die zur Ermittlung des Umsatzes bestimmt werden müssen. Bei der Analyse ist somit zu berücksichtigen, dass sich die eingewogene

Probemasse aus der Summe des polymeren Trägers, sowie der durch die Umsetzung bedingten Molmassenänderung ergibt. Bezogen auf diese Summe wird die Konzentration x an freiem Amin in mol/g bestimmt. Um diesen Wert mit dem des eingesetzten polymeren Trägers vergleichen zu können, muss er um die Massenänderung korrigiert werden.

$$(1) \quad y = x \frac{m + \Delta m}{m} = x(1 + (z - y) \times M)$$

x = photometrisch ermittelte Konzentration [mol/g], korrigiert um die unspezifische Bindung

y = Konzentration an freien Aminogruppen bezogen auf die Masse der Ausgangsverbindung [mol/g Ausgangsverbindung]

z = Kapazität der Ausgangsverbindung [mol/g]

M = Massenänderung pro umgesetztes Molekül [g/mol]

m = Molmasse des polymeren Trägers je Mol der funktionellen Gruppe

Δm = reaktionsbedingte Massenänderung multipliziert mit dem prozentualen Umsatz der funktionellen Gruppen

Separation der Größen in (1) ergibt

$$(2) \quad y = \frac{x + Mxz}{1 + xM}$$

Dieser Wert y ist nun mit der Kapazität z der Ausgangsverbindung vergleichbar, wodurch sich der Reaktionsverlauf quantitativ erfassen lässt. Der photometrisch ermittelte Wert x muss zuvor, wie oben beschrieben, um den Blindwert korrigiert werden.

3.2.2.2 Bestimmung der freien Hydroxylgruppen am polymeren Träger

Im Gegensatz zu Aminofunktionen sind freie Hydroxylgruppen einer titrimetrischen Bestimmung nicht direkt zugänglich. Sie müssen zuerst mit einem Reagenz quantitativ umgesetzt werden, dass nach darauffolgender Abspaltung photometrisch vermessen werden kann. Die Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-Gruppe scheint hierfür geeignet, da sie leicht einzuführen ist und anschließend durch sekundäre Basen wie Piperidin oder Morpholin wieder schnell und quantitativ abgespalten werden kann. Bei der Abspaltung entsteht durch Deprotonierung an der CH-aciden 9-Position der Fmoc-Gruppe Dibenzofulven. Das sekundäre Amin addiert anschließend unter Ausbildung eines stabilen

Adduktes an die Doppelbindung, welches aufgrund seiner sehr intensiven UV-Absorption zur photometrischen Bestimmung der zuvor umgesetzten Hydroxylgruppen verwendet werden kann.

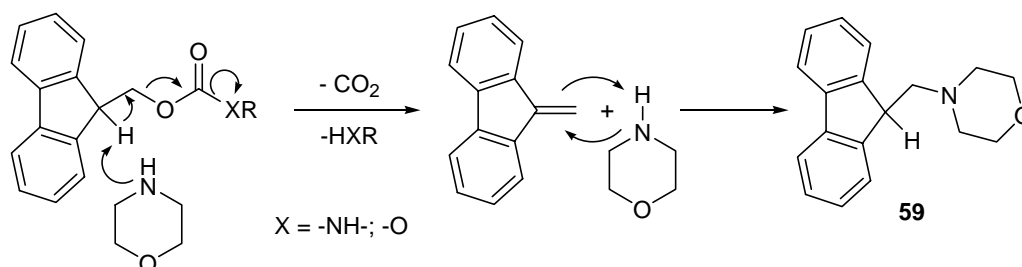


Abb. 3.29: Mechanismus der basenvermittelten Fmoc-Spaltung

Als Base zur Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das sekundäre Amin Morpholin verwendet werden. Die Absorption des Dibenzofulven-Morpholin-Adduktes **59** besitzt ausgeprägte Maxima bei $\lambda = 300.5$ nm und ein noch intensiveres bei $\lambda = 266.8$ nm. Bei diesen Wellenlängen wird der molare dekadische Absorptionskoeffizient bestimmt. Hierzu wird das Addukt **59** hergestellt und chromatographisch gereinigt. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus DMF und Morpholin im Verhältnis 1:1 erstellt und die Extinktion bei den unterschiedlichen Konzentrationen vermessen. Durch Auftragung der Extinktion gegen die Konzentration erhält man aus der mittels linearer Regression ermittelten Steigung den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten ϵ der jeweiligen Wellenlänge.

Konzentration [mol/l]	Wellenlänge	
	267 nm Extinktion	300nm Extinktion
2,67E-04		1,973
1,65E-04	2,541	1,142
5,33E-05	0,916	0,395
2,13E-05	0,319	0,154
1,32E-05	0,177	0,086

Tabelle 3.3: Gemessene Extinktion bei unterschiedlichen Konzentrationen

Der molare dekadische Absorptionskoeffizient ergibt sich somit bei der Wellenlänge von 267 nm zu $\epsilon_{267} = 15530 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und bei der Wellenlänge von 300 nm zu $\epsilon_{300} = 7270 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

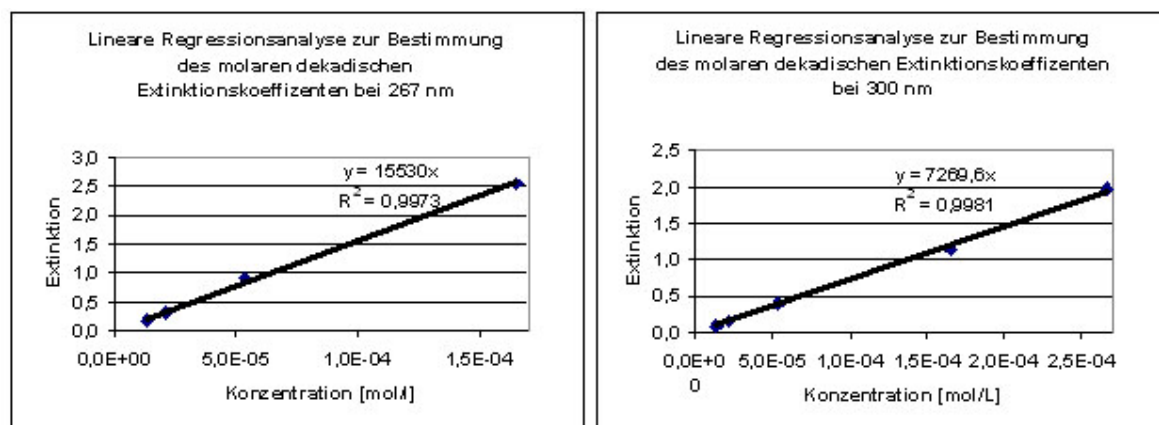


Abb. 3.30: Regressionsanalyse zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung der Fmoc-Konzentration am Harz wird eine definierte Menge des polymeren Trägers (ca. 10 - 40 mg) in einen Festphasenreaktor eingewogen und zweimal je 30 Minuten mit einem Gemisch aus DMF/Morpholin (1:1, v/v) behandelt. Das Harz wird noch dreimal mit 1 ml dieser Lösung gewaschen. Abspaltungs- und Waschlösung werden gesammelt und ausgewogen um über die Dichte ($d_{20} = 0.962 \text{ g/ml}$) das Volumen des Eluates zu bestimmen. Anschließend wird 1 ml des Eluates entnommen, mit DMF/Morpholin auf 25 ml verdünnt und gegen eine Blindlösung aus DMF/Morpholin bei 300 nm vermessen. Die Beladung des Harzes mit der Fmoc-Schutzgruppe ergibt sich somit gemäß der folgenden Gleichung.

$$c (\text{mol} / \text{g}) = \frac{\text{Extinktion } E}{\text{Ex.koeffizient } \varepsilon} \times 25 (\text{Verdünnung}) \times \frac{\text{Volumen } V \text{ des Eluats}}{\text{Masse } M \text{ der eingesetzten Probe}}$$

Blindwerte müssen in diesem System nicht berücksichtigt werden, da sie vernachlässigbar klein sind. Wird die Probe erst nach der Umsetzung entnommen, so ist eine Korrektur aufgrund der reaktionsbedingten Massenänderung analog des in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Verfahrens erforderlich. Um die Konzentration an freien Hydroxylfunktionen bestimmen zu können, müssen diese zuvor mit der Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-Gruppe funktionalisiert werden. Die direkte Umsetzung der Hydroxylgruppen nach einem von *Gioeli* und *Chattopadhyaya* beschriebenen Verfahren¹²⁴ mit einem zehnfachen Überschuss von (9-Fluorenylmethyl)-chlorformiat in Pyridin verlief jedoch nicht quantitativ, wie sich durch Untersuchung an hydroxyfunktionalisierten Harzen mit bekannter Beladungskapazität zeigte. Auch das von *Iadonisi et al.* beschriebene

¹²⁴ C. Gioeli, J. B. Chattopadhyaya, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 672

Verfahren¹²⁵ unter Verwendung von Tetramethylethyldiamin (TMEDA) lieferte an der festen Phase nicht die erhofften hohen Umsatzraten. Bei Durchführung in Lösung wird beschrieben, dass schon durch Verwendung von 1.1 Äquivalenten des entsprechenden Chlorformiates Ausbeuten von über 92 Prozent erzielt werden können. Am polymeren Träger wurden trotz Verwendung eines zehnfachen Überschusses Umsatzraten von maximal 80 Prozent erreicht. Da die direkte Einführung der Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-Gruppe nicht mit dem gewünschten Erfolg verlief, wird im Weiteren die Veresterung mit Fmoc-geschütztem Glycin untersucht. Dazu werden die freien Hydroxylgruppen mit einem zehnfachen Überschuss von Fmoc-Gly-OH unter Verwendung von DIC als Kupplungsreagenz umgesetzt. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit dieses Verfahrens wird es an hydroxyfunktionalisierten polymeren Trägern mit bekannter Beladungskapazität getestet. Als Testharze werden Polystyrol A OH (Rapp Polymere, 1 % DVB, 200 – 400 mesh, 1.39 mmol/g) sowie TentaGel S PHB (Rapp Polymere, 90 µm, 0.24 mmol/g) verwendet. Das Harz wird in Festphasenreaktoren eingewogen und mit 10 Äquivalenten, bezogen auf die Kapazitätsangabe des Herstellers, an Fmoc-Gly-OH in dem entsprechenden Lösungsmittel versetzt. Das Fmoc-Gly-OH wurde zuvor durch fünfminütiges Rühren mit DIC in dem jeweiligen Lösungsmittel aktiviert. Man schüttelt über einen Zeitraum von drei Stunden, saugt die Reaktionslösung ab und wäscht das Harz gründlich mit DMF und Dichlormethan. Anschließend wird die Fmoc-Schutzgruppe mit Morpholin gespalten und die Abspaltungslösung photometrisch vermessen. Über die ermittelte Absorption lässt sich bestimmen wie viele Hydroxylgruppen zuvor mit Fmoc-Gly-OH umgesetzt wurden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Harz	Lsgm.	einfache Umsetzung mit je 10 Äquiv. Fmoc-Gly-OH 10 Äquiv. DIC	zweifache Umsetzung mit je 10 Äquiv. Fmoc-Gly-OH 10 Äquiv. DIC
PS A OH 1.39 mmol/g	DMF	1.42 mmol/g	1.42 mmol/g
	CH ₂ Cl ₂	1.51 mmol/g	1.51 mmol/g
TG S PHB 0.24 mmol/g	DMF	0.25 mmol/g	0.27 mmol/g
	CH ₂ Cl ₂	0.27 mmol/g	0.27 mmol/g

Tabelle 3.4: Kapazitätsbestimmung unterschiedlicher polymerer Träger in unterschiedlichen Lösungsmitteln

¹²⁵ M. Adinolfi, G. Barone, L. Guariniello, A. Iadonisi, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9305

Die vom Hersteller als Anhaltspunkt gegebenen Beladungskapazitäten des polymeren Trägers lassen sich mit diesem Verfahren sehr gut verifizieren. Generell erhält man unter Verwendung des Lösungsmittels Dichlormethan etwas höhere Werte als mit DMF. Dies ist eventuell auf die besseren Quelleigenschaften der Träger in diesem Lösungsmittel zurückzuführen. Des Weiteren zeigt sich, dass eine zweite Umsetzung hierbei nicht notwendig ist, da die Veresterung der Hydroxylgruppen schon nach der ersten Behandlung mit einem zehnfachen Überschuss an Carbonsäurebaustein und Kupplungsreagenz vollständig verläuft. Zur Funktionalisierung der Hydroxylfunktionen an den sterisch anspruchsvolleren Kohlenhydratbausteinen wird auf die zweite Umsetzung dennoch nicht verzichtet.

3.2.2.3 Synthese eines modifizierten Kohlenhydratbausteins

Die größten Probleme bei den durchgeführten festphasengebundenen Reaktionen bereitet die Glycosylierungsreaktion. Um sich dieser intensiv widmen zu können, soll die Anzahl der am polymeren Träger durchgeführten Schutzgruppenmanipulationen auf ein Minimum reduziert werden. Dazu wird der Glycosyldonor **60** synthetisiert, der sich durch eine einzige Deblockierung am Harz in den benötigten Akzeptor überführen lässt.

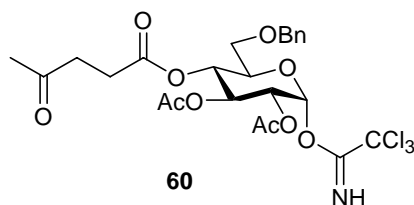


Abb. 3.31: Glycosyldonor **60**

Die Synthese des Bausteins **60** beginnt ausgehend von D-Glucose. Zuerst muss die anomere Position so geschützt werden, dass sie im Verlauf der Schutzgruppenmanipulationen stabil ist, abschließend aber leicht in den Trichloracetimidatdonor überführt werden kann. Dazu wird D-Glucose **46** in siedendem Acetanhydrid unter Verwendung von Natriumacetat als Puffer peracetyliert. Diese Reaktionsbedingungen liefern vorwiegend das thermodynamisch weniger stabile β -peracetylierte Produkt **61**, welches anomerenrein aus Wasser auskristallisiert. Dieses wird benötigt, da das α -Konformer aufgrund der höheren thermodynamischen Stabilität unter den Reaktionsbedingungen der nächsten Stufe nicht umgesetzt werden kann. Durch Bortrifluorid in Ether wird die anomere Acetylschutzgruppe aktiviert und in einer nucleophilen Substitution gegen Ethanthiol ersetzt. Aufgrund der partizipierenden

Nachbargruppe in Position 2 erhält man im Verlauf der Reaktion primär das β -konfigurierte Produkt, welches aber unter den Lewis-sauren Bedingungen langsam anomerisiert. Durch dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle kann der Reaktionsverlauf sehr gut verfolgt werden, so dass bei rechtzeitiger Beendigung der Reaktion das gewünschte Produkt **62** in 94%iger Ausbeute erhalten werden kann. Das Thioglycosid **63** ist nach Abspaltung der verbliebenen Acetylenschutzgruppen unter *Zemplén*-Bedingungen in quantitativer Ausbeute zugänglich.

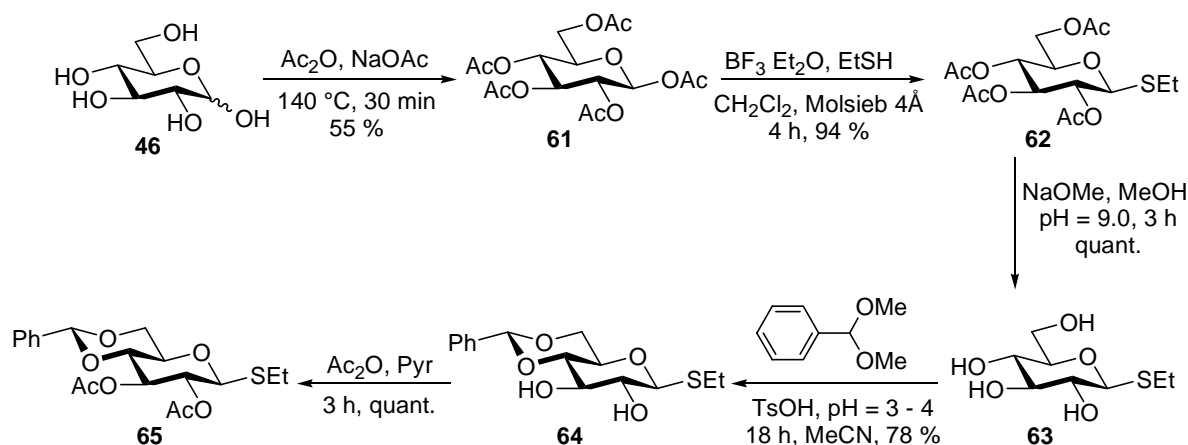


Abb. 3.32: Synthese des 4,6-*O*-Benzylidenacetals **65**

Die Hydroxylgruppen in Position 4 und 6 werden anschließend durch Umsetzung mit Benzaldehyddimethylacetal unter saurer Katalyse in das 4,6-*O*-Benzylidenacetal **64** überführt. Die Bildung des Sechsrings ist gegenüber dem Fünfring bevorzugt, da der Phenylrest hierbei die thermodynamisch günstigere äquatoriale Position einnehmen kann. Behandlung mit Acetanhydrid in Pyridin im Verhältnis 1:2 liefert das komplett blockierte Derivat **65** in quantitativer Ausbeute. Um den für die Einführung des nächsten Glucosebausteins benötigten Akzeptor zu erhalten, muss das 4,6-*O*-Benzylidenacetal regioselektiv zum 6-*O*-Benzylether **66** geöffnet werden. Dies wird mit der bereits beschriebenen Methode nach *DeNinno*¹²¹ unter Verwendung von TFA als Protonenquelle und Triethylsilan als Hydrid-Donor erreicht.

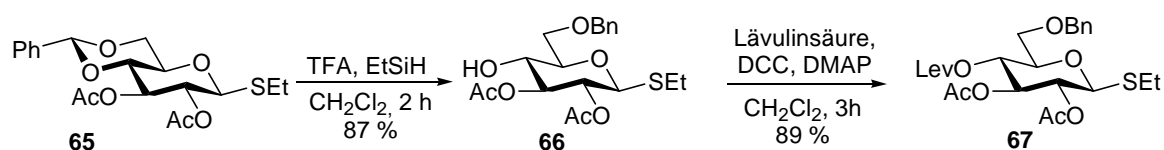


Abb. 3.33: Synthese des Thiodonors **67**

Die freie Hydroxylschutzgruppe in 4-Position wird anschließend mit Lävulinsäure als temporäre Schutzgruppe verestert, so dass man den Thiodonor **67** in 89%iger Ausbeute erhält.¹²⁶ Ein Teil des Thiodonors wird für Glycosylierungsversuche am polymeren Träger zurückbehalten, der Hauptteil in zwei weiteren Stufen zum Trichloracetimidat-Donor **60** umgesetzt. Dazu wird zunächst die thioglycosidische Bindung hydrolysiert. Dies gelingt durch Aktivierung des Thiodonors mit *N*-Iodsuccinimid und Trifluormethansulfonsäure und anschließender Umsetzung mit Wasser. Behandlung mit Trichloracetimidat unter dem katalytischen Einfluss von DBU liefert dann den gewünschten Donor **60** in 94%iger Ausbeute.

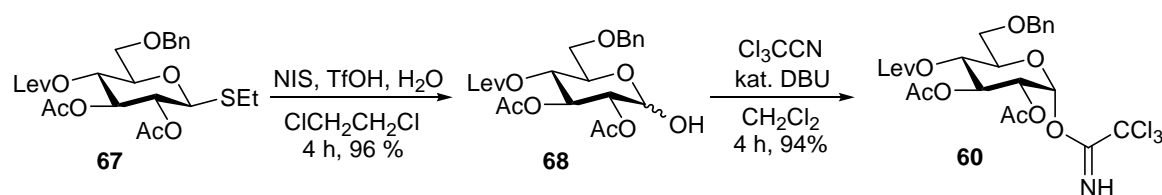


Abb. 3.34: Synthese des Trichloracetimidatdonors **60**

Vor der Anbindung an das Harz wird der PTMSE-Anker mit dem ersten Kohlenhydratbaustein beladen. Dazu glycosyliert man den Anker **45** mit dem Trichloracetimidatdonor **60** nach der oben beschriebenen Modifikation des von *Schmidt*¹¹⁴ eingeführten Verfahrens. Dies gelingt in 86%iger Ausbeute. Um die für die Anbindung an den polymeren Träger benötigte Carbonsäurefunktion zu erhalten, wird der Allylester durch einen Palladium-katalysierten Transfer des Allylresres auf das im 1.2fachen Überschuss eingesetzte Natriumsalz der *p*-Toluolsulfinsäure gespalten.

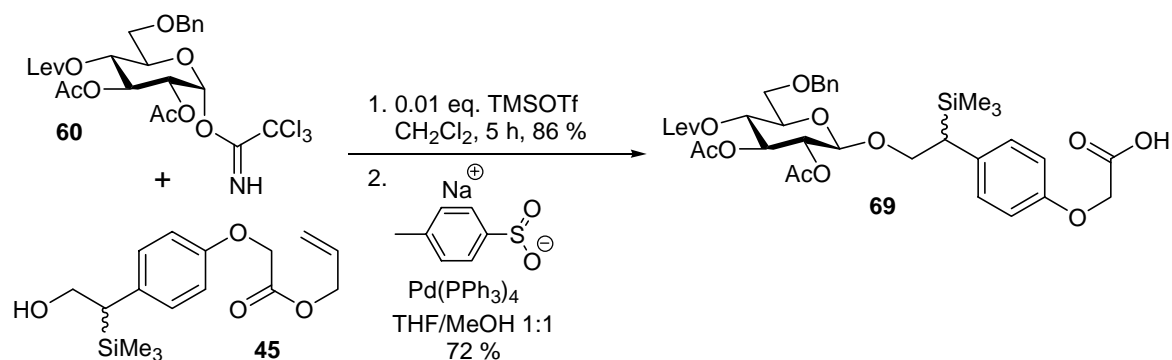


Abb. 3.35: Synthese des Festphasenbausteins **69**

¹²⁶ J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 4875.

3.2.2.4 Beladungsoptimierung

Im Folgenden sollen nun die Bedingungen zur Beladung der aminofunktionalisierten polymeren Träger mit dem ankergebundenen Kohlenhydratbaustein **69** optimiert werden.

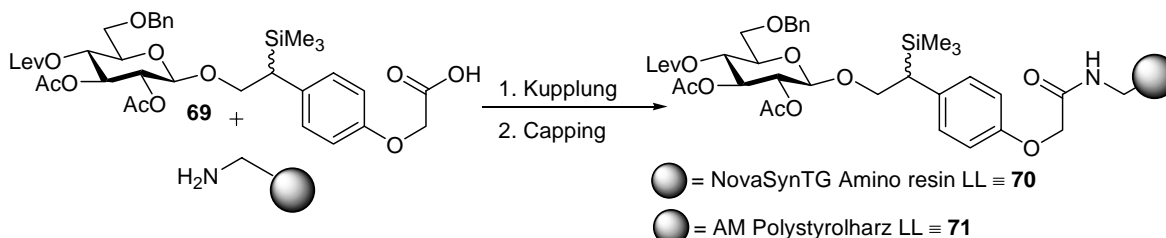


Abb. 3.36: Anbindung an den polymeren Träger

Als polymere Träger werden NovaSyn[®]TG amino resin LL (Herstellerangabe: 0.26 mmol/g; 110 μ m), NovaSyn[®]TG amino resin HL (Herstellerangabe: 0.4 mmol/g; 110 μ m) sowie aminomethyliertes Polystyrolharz (*Novabiochem*, Herstellerangabe: 0.42 mmol/g; 100-200 mesh) verwendet. Die Durchführung der Kupplung an das Harz erfolgt entsprechend den im EXPERIMENTELLEN TEIL auf Seite 136 ausgeführten allgemeinen Arbeitsvorschriften.

Die Beladung der polymeren Träger unter Verwendung eines 1.2fachen Überschusses des Bausteins **69** in verschiedenen Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Kupplungsreagenzien ist in den folgenden Tabellen dargestellt.

NovaSynTG Amino resin LL ermittelte Kapazität: 0.24 mmol/g
(Herstellerangabe: ca. 0.26 mmol/g)

	DIC/DMAP	TBTU/HOBt	HCTU/HOBt
DCM	30%	74%	60%
THF	30%	86%	-
Dioxan	13%	-	-
DCM/DMF	-	42%	-

NovaSynTG Amino resin HL ermittelte Kapazität: 0.43 mmol/g
(Herstellerangabe: ca. 0.42 mmol/g)

	TBTU/HOBt	HCTU/HOBt
DCM	73%	68%
THF	95%	-

AM Polystyrol Harz LL

ermittelte Kapazität: 0.43 mmol/g
(Herstellerangabe: ca. 0.40 mmol/g)

	TBTU/HOBt	HCTU/HOBt
DCM	83%	82%
THF	99%	-
DCM/DMF	38%	-

In allen untersuchten Fällen hat sich die Verwendung der Reagenzienkombination bestehend aus TBTU und HOBt im Lösungsmittel THF als optimal zur Bildung der Amidbindung herausgestellt. Die in der Peptidsynthese häufig angewandte Lösungsmittelkombination aus Dichlormethan und DMF (Konzentration an freiem Amin < 0.001 %) liefert erheblich niedrigere Kupplungsausbeuten.¹²⁷ Nicht umgesetzte Aminogruppen werden durch zweimalige Behandlung mit Acetanhydrid in Pyridin im Verhältnis 1:2 unter Zusatz katalytischer Mengen Dimethylaminopyridin (DMAP) acetyliert, so dass sie im weiteren Verlauf nicht zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Untersuchung mittels Kaisertest und Pikrinsäuretitration zeigen, dass die Konzentration verbleibender freier Aminofunktionen nach dem Capping unterhalb der Nachweisgrenze dieser beiden Analysemethoden liegt. Dementsprechend sollten mehr als 99.5 % der ursprünglich vorhandenen Funktionen umgesetzt sein.

3.2.2.5 Abspaltung der Lävulinoylschutzgruppe

Um zu dem für die Glycosylierung benötigten Akzeptor zu gelangen, wird im nächsten Schritt die Lävulinoylschutzgruppe mit Hydrazin gespalten. In Lösung ist dies unter neutralen Bedingungen in einem Pyridin-Essigsäure-Puffer im Verhältnis 4:1 möglich.¹²⁶ Die Reaktion verläuft über ein intermediär gebildetes Hydrazon, welches unter Cyclisierung den Alkohol freisetzt.¹²⁸

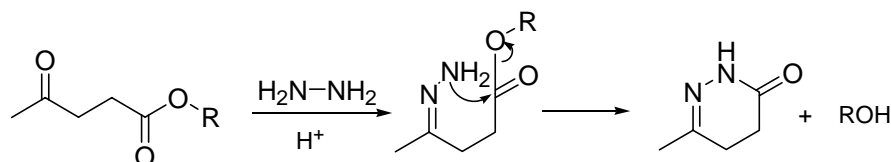


Abb. 3.37: Mechanismus der Spaltung des Lävulinylesters mit Hydrazinacetat

¹²⁷ M. Wagner, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2001

¹²⁸ R. L. Letsinger, M. H. Caruthers, P. S. Miller, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7146

In Saccharidsynthesen am polymeren Träger wurde die Lävulinoylschutzgruppe ebenfalls eingesetzt, wobei unterschiedliche Bedingungen zur Spaltung verwendet wurden.¹²⁹ Zur Ermittlung des Umsatzes werden jeweils ca. 30 mg des entsprechenden Harzes in einen Festphasenreaktor eingewogen und anschließend zweimal über einen Zeitraum von sechs Stunden mit je einem Milliliter der in der Tabelle gegebenen Reagenzienkombination behandelt. Anschließend wird die Konzentration an freien Hydroxylgruppen nach dem in Kapitel 3.2.2.2 beschriebenen Verfahren bestimmt. In der folgenden Tabelle sind einige Ergebnisse dieser Optimierungsversuche dargestellt.

	Reagenzien	NovaSynTG Amino resin LL 0.21 mmol/g	AM Polystyrol LL 0.42 mmol/g
1 ¹²⁶	Pyridin/AcOH/Hydrazinhydrat 4/1/0.5 <i>einfache Umsetzung</i>	93%	78%
2 ¹²⁶	Pyridin/AcOH/Hydrazinhydrat 4/1/0.5 (ca. 100 Äquiv.)	96%	84%
3	DMF/Pyridin/AcOH/ Hydrazinhydrat 5/4/1/ 0.5	65%	49%
4	THF/Pyridin/AcOH/ Hydrazinhydrat 5/4/1/ 0.5	23%	27%
5	Methanol/Hydrazinacetat 10 ml/400 mg (entspr. 40 Äquiv.)	83%	62%
6 ^{129a}	DCM/MeOH/Hydrazinacetat 9/1/400 mg (entspr. 40 Äquiv.)	70% reproduzierbar	71% reproduzierbar
7 ^{129b}	DMF/Hydrazinhydrat 9/1 (ca. 250 Äquiv.)	166%	83%

Tabelle 3.5: Optimierungsversuche zur Spaltung der Lävulinsäureschutzgruppe

Die von *van Boom*¹²⁶ in homogener Phase angewandten Bedingungen lieferten die höchsten Abspaltungsausbeuten. Die Umsetzung muss mindestens zweifach durchgeführt werden um ausreichend hohen Umsatz zu erzielen (vgl. Spalte 1 und 2 in Tabelle 3.5). Jedoch traten bei der Anwendung dieser Reaktion häufig unerwünschte Löslichkeitsprobleme auf. Das Hydrazinhydrat ist in dem Gemisch aus Pyridin und Essigsäure nicht löslich. In einigen Fällen bilden sich beim Schütteln der Emulsion im Festphasenreaktor schlagartig unlösliche Niederschläge. Die gewünschte Reaktion läuft dann nicht mehr ab, und der gebildete Niederschlag muss aufwendig durch häufiges Waschen mit Methanol entfernt werden. Um dieses in etwa 30 bis 50 Prozent der Ansätze auftretende Problem zu umgehen, wurden die Bedingungen variiert. Durch Zusatz von

¹²⁹ (a) T. Zhu, G-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2382; (b) K. Routenberg Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 602

DMF bzw. THF konnte die Häufigkeit des Auftretens der Niederschläge nicht reduziert werden. Darüber hinaus wurden unter diesen Bedingungen in den regulär verlaufenden Umsetzungen niedrigere Ausbeuten erzielt (Spalten 3 und 4). Auch durch Variation der Zusammensetzung der Puffer-Lösung konnte dieses Problem nicht gelöst werden. Die Verwendung geringerer Mengen an Essigsäuren führte zwar zu weniger Niederschlagsbildung, jedoch waren dann die Acetylschutzgruppen nicht mehr ausreichend stabil. Die mangelnde Stabilität der Acetylgruppen zeigte sich auch bei der von *Seeberger*^{129b} beschriebenen Methode, welche deshalb zur Anwendung an Verbindungen mit diesen Schutzgruppen ungeeignet ist (Spalte 7). Das von *Boons*^{129a} beschriebene Verfahren ist frei von Komplikationen und deshalb für automatisierte Anwendungen am zuverlässigsten (Spalte 6). Die Ausbeuten sind jedoch deutlich niedriger als mit der in Spalte 2 beschriebenen Reagenzienkombination.

Aufgrund der aus den Optimierungsversuchen gewonnenen Ergebnisse erfolgte die Umsetzung von **70** und **71** durch zweifache Behandlung mit 40 Äquivalenten an Hydrazinhydrat über jeweils acht Stunden in einem Pyridin-Essigsäure-Puffer (4:1). Im Fall des Tentagelharzes ließen sich so Abspaltungsausbeuten von 96 % und mit dem Polystyrolharz noch 84 % erzielen. Das Harz wurde anschließend mehrmals mit Methanol, DMF und abschließend mit Dichlormethan gewaschen.

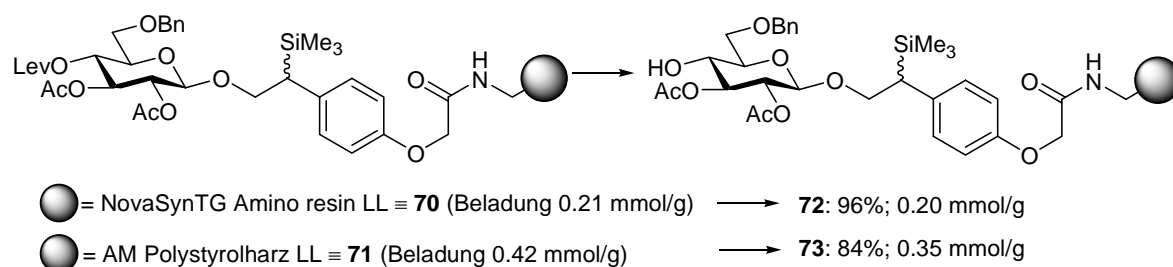


Abb. 3.38: Abspaltung der Lävulinoylschutzgruppe

3.2.2.6 Glycosylierung am polymeren Träger

Für die Glycosylierung der harzgebundenen Akzeptoren **72** und **73** müssen zunächst geeigneten Bedingungen gefunden werden. In den in Kapitel 3.2.1.4 beschriebenen Untersuchungen zeigte sich, dass unter den dort angewandten Konditionen die *Peterson*-Eliminierung über die Glycosylierung dominiert (Abb. 3.28). Die aufgetretenen Probleme werden nachfolgend genauer analysiert. Als Glycosyldonoren werden dazu das Trichloracetimidat **60** und der Thiodonor **67** verwendet. Zur Glycosylierung mit dem Trichloracetimidat wurden unterschiedliche Konzentrationen (0.02 Äquiv., 0.1 Äquiv., 0.5 Äquiv. 1.0 Äquiv. und 2.0 Äquiv.) der Aktivatoren Trimethylsilyltrifluormethan-

sulfonat (TMSOTf) und Dibutylboryltriflat (DBBOTf) bei unterschiedlichen Temperaturen (-20 °C, -10 °C, -5 °C und 20 °C) in unterschiedlichen Lösungsmitteln (Dichlormethan, Dichlormethan/Toluol 1:1, Toluol) sowohl mit als auch ohne Molekularsieb angewandt. In allen Fällen trat in erheblichem Maße die *Peterson-Olefinierung* auf. Da hierbei der Zucker vom Harz abgespalten wurde und lediglich festphasengebundenes Vinylbenzol zurückbleibt, war es nicht möglich, über die Konzentration an freien Hydroxylgruppen Rückschlüsse über die Glycosylierungsausbeute zu ziehen. Bei hoher Temperatur und Aktivatorkonzentration wurde der Zuckerbaustein praktisch vollständig abgespalten. Unter mildereren Bedingungen war die Abspaltung vom Harz zwar weniger ausgeprägt, jedoch trat kaum die gewünschte Glycosylierung ein. Stattdessen wurde selbst nach ausgedehnten Reaktionszeiten von zweimal 18 Stunden mit einem fünffachen Überschuss an Donor neben der *Peterson-Olefinierung* in erster Line unumgesetztes Edukt zurückgewonnen.

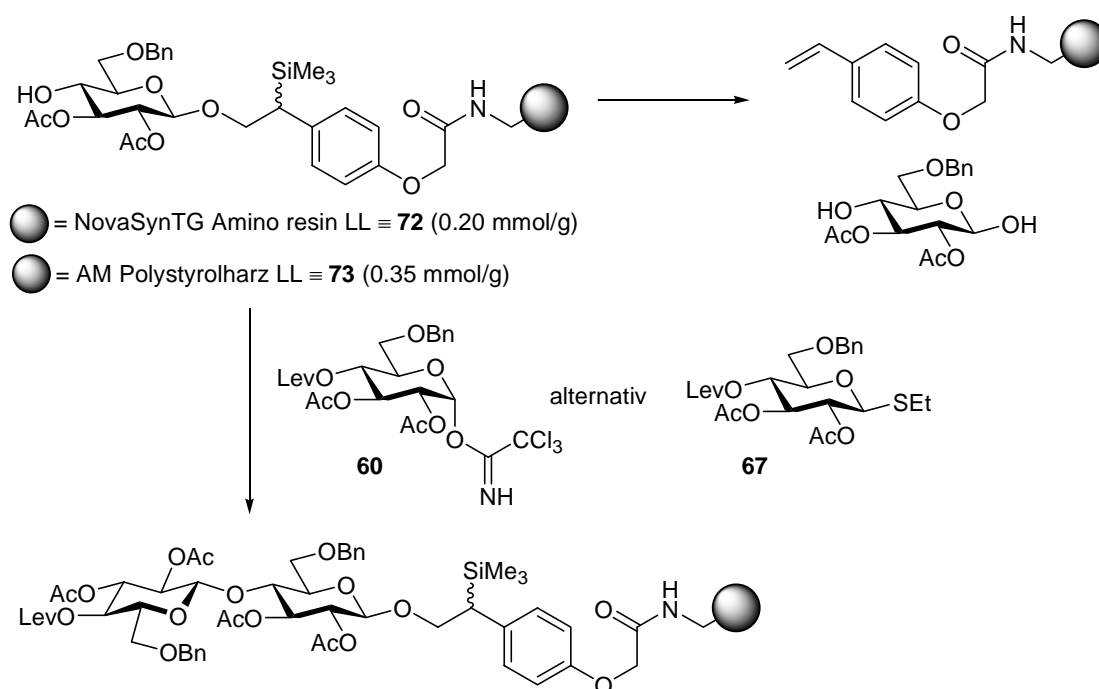


Abb. 3.39: Glycosylierung der festphasengebundenen Akzeptoren

Im besten untersuchten Fall wurden 1.2 g des Tentagel-gebundenen Akzeptors **72** zweimal mit je einem zweifachen Überschuss des Donors **60** unter Aktivierung mit 0.02 Äquivalenten TMSOTf in Dichlormethan umgesetzt. Die Reaktionsdauer betrug vier Stunden, wobei die Temperatur alle 60 Minuten in 5 K Schritten von -20 °C auf -5 °C erhöht wurde. Anschließend wurde der Anker durch Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid-Pentahydrat (TBAF*5 H₂O) in THF gespalten. Wäre der Anker unter den Glycosylierungsbedingungen stabil und diese vollständig verlaufen, so

hätte man 189 mg des Disaccharides erwartet. Erhalten wurden neben 32 mg (38 %) des unglycosylierten Akzeptors **74** jedoch nur 9 mg (5 %) der anomeren Mischung des Disaccharides **73**. Der Hauptteil der verbleibenden 57 % ging durch *Peterson*-Olefinierung bei der Glycosylierung verloren, was sich anhand der olefinischen Protonen des Vinylbenzols im Festkörper-NMR zeigte. Durch Zusatz von Tetramethylharnstoff ließ sich die *Peterson*-Olefinierung zurückdrängen, unter den milderen Bedingungen fand dann jedoch keine Glycosylierung mehr statt.

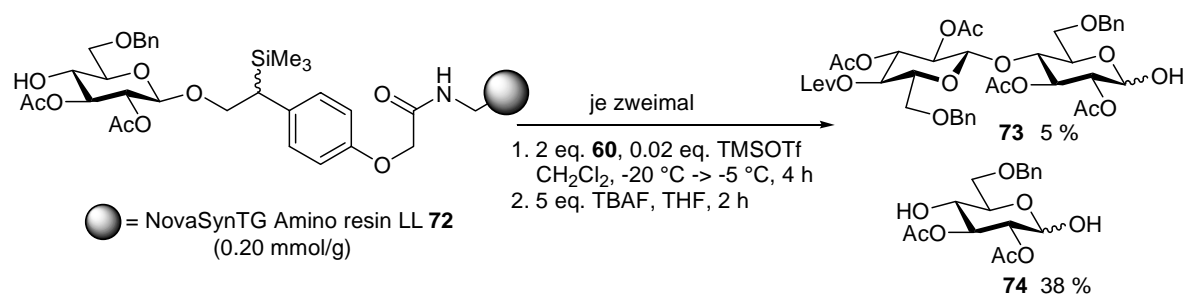


Abb. 3.40: Glycosylierung des Akzeptors **72** nach *Schmidt*

Da unter den in der Glycosylierung nach *Schmidt* angewandten Lewis-sauren Bedingungen in erster Linie die Spaltung des Ankers auftrat, wurde im Weiteren der Thiodonor **67** auf seine Eignung hin überprüft. Zur Glycosylierung wurde das Tentagelharz **72** analog den von *van Boom*¹³⁰ für Reaktionen in Lösung beschriebenen Bedingungen umgesetzt. Die Reaktion wurde bei 0 °C in 1,2-Dichlorethan/Ether im Verhältnis 1:1 mit einem zweifachen Überschuss des Thiodonors durchgeführt. Zur Aktivierung des Donors wurden zwei Äquivalente *N*-Iodsuccinimid und katalytische Mengen (0.1 Äquiv.) an Trifluormethansulfonsäure verwendet. Die *Peterson*-Olefinierung wurde hierbei nicht beobachtet. Unter diesen Bedingungen fand allerdings auch die gewünschte Glycosylierung kaum statt. Das Produkt konnte zwar massenspektroskopisch nachgewiesen werden, jedoch wurde weniger als 1 mg isoliert, was einer Ausbeute von maximal drei Prozent entspricht. Als Hauptprodukt wurde auch hier der unumgesetzte Akzeptor zurückgewonnen. Da der Anker unter diesen Bedingungen ausreichend stabil ist, konnte der Reaktionsverlauf über die Bestimmung der Konzentration an freien Hydroxylgruppen verfolgt werden. Es wurde eine Reihe an unterschiedlichen Reaktionsbedingungen auf die Glycosylierungsausbeute hin untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass auch die Verwendung großer Reagenzienüberschüsse bei langen Reaktionszeiten und erhöhter Temperatur zu keinem signifikanten Umsatz führt.

¹³⁰ G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331

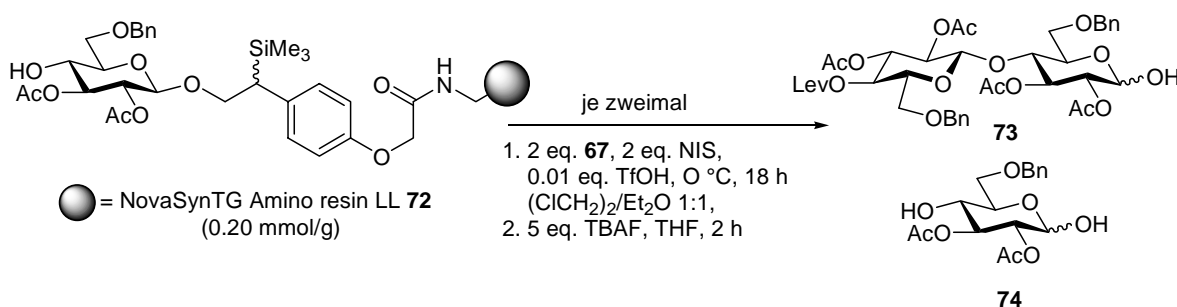
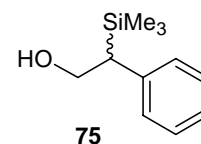


Abb. 3.41: Glycosylierung des Akzeptors **72** unter Verwendung des Thiodonors **67**

Zwei Probleme stellten sich bei den bisher untersuchten Glycosylierungen am polymeren Träger als wesentlich heraus. Zum einen sind die verwendeten Kohlenhydrate an sich schon sterisch gehinderte Verbindungen. Durch die Anknüpfung des Zuckers an einen polymeren Träger wird die sterische Belastung noch weiter erhöht. Besonders die wenig reaktive 4-Position scheint unter diesen Gegebenheiten einer Glycosylierung kaum noch zugänglich zu sein. Weiterhin ist der PTMSE-Anker unter den sauren Glycosylierungsbedingungen nicht ausreichend stabil, obwohl diese Komplikation in Vorversuchen mit der PTMSE-Schutzgruppe **75** in Lösung nicht auftrat. Für die unterschiedliche Stabilität gibt es mehrere mögliche Ursachen. Zum einen werden bei Glycosylierungen in Lösung kürzere Reaktionszeiten bei niedrigeren Temperaturen und geringeren Mengen an Promotor angewandt. Des Weiteren besitzt die Schutzgruppe im Gegensatz zum Anker keine Oxoalkylgruppe in *ortho*-Position. Diese erhöht die Elektronendichte im Ring und macht den Anker empfänglicher gegenüber einer sauren Olefinierung. Durch Verwendung stabilerer Anker und reaktiverer Glycosylakzeptoren sollen diese beiden Probleme umgangen werden.



3.2.2.7 Synthese reaktiver Glycosylakzeptoren

Die in der Festphasensynthese eingesetzten Kohlenhydratbausteine sollen zum einen geeignete Donoren darstellen und zum anderen durch möglichst wenige Schutzgruppenmanipulationen in reaktive Akzeptoren umgewandelt werden können. Der in den bisherigen Fällen verwendeten Bausteins **60** ist zwar ein guter Donor, besitzt aber als Akzeptor eine zu niedrigen Reaktivität. Aus diesem Grund wird die Verbindung dahingehend modifiziert, dass die reaktive 6- anstelle der 4-Position zur weiteren Umsetzung temporär geschützt wird. Dies wird erreicht, indem man die Verbindung **65** mit dem Hydridonor Triethylsilan unter Aktivierung durch die Lewis-Säure

Dichlorphenylboran zum 4-*O*-Benzylether **76** öffnet¹³¹ und die freiwerdende Hydroxylfunktion in 6-Position mit Lävulinsäure schützt.

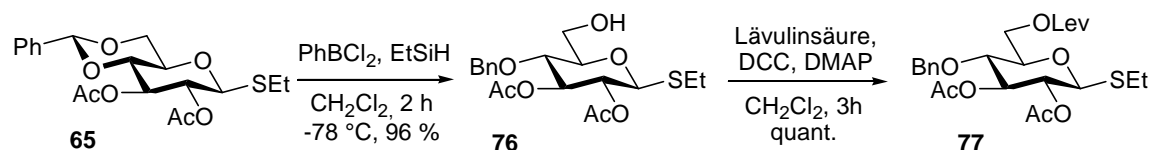


Abb. 3.42: Synthese des Thiodonors **77**

Der erhaltene Thiodonor wird in zwei Stufen weiter zum Trichloracetimidatbaustein **79** umgesetzt.

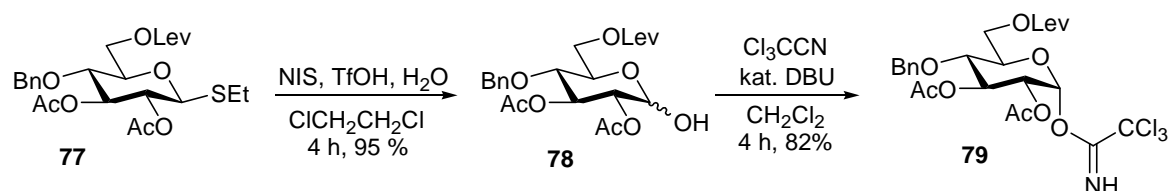


Abb. 3.43: Synthese des Festphasenbausteins **79**

Dieser Baustein vereint mehrere günstige Eigenschaften. So steuert die Acetylgruppe in 2-Position die Stereochemie der entstehenden glycosidischen Bindung, nach Abspaltung der Lävulinoylschutzgruppe erhält man einen reaktiven Akzeptor und darüber hinaus verhindert die Benzyletherschutzgruppe in 4-Position Acetylgruppenwanderung zur primären Hydroxylfunktion in Position 6.

Als weiterer Festphasenbaustein wird der von *Schmidt* beschriebene 2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-mannosyltrichloracetimidatdonor **80** verwendet.^{138b} Ausgehend von D-Mannose **81** erfolgt die Synthese des Bausteins in sechs Stufen. Die Mannose wird dazu mit Acetanhydrid in Pyridin peracetyliert und anschließend durch HBr in das anomere Bromid **82** überführt. Hieraus bildet sich unter dem Einfluss der nichtnucleophilen Base 2,6-Lutidin in Allylalkohol als Lösungsmittel der Orthoester **83** in quantitativer Ausbeute. Die anschließende Spaltung der Acetylschutzgruppen erfolgt durch Behandlung mit bei Raumtemperatur gesättigtem ammoniakalischem Methanol.¹³² Deprotonierung der freien Hydroxylgruppen mit Natriumhydrid in DMF und Umsetzung mit Benzylbromid liefert den entsprechenden Benzylether **85**. Mit 60%iger Essigsäure lässt sich der Orthoester **85** zum Halbacetal öffnen, welches anschließend mit Trichloracetonitril unter dem Einfluss katalytischer Mengen DBU zum Trichloracetimidat **80** umgesetzt wird.¹³³

¹³¹ M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5547

¹³² H. Paulson, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 289

¹³³ F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 31

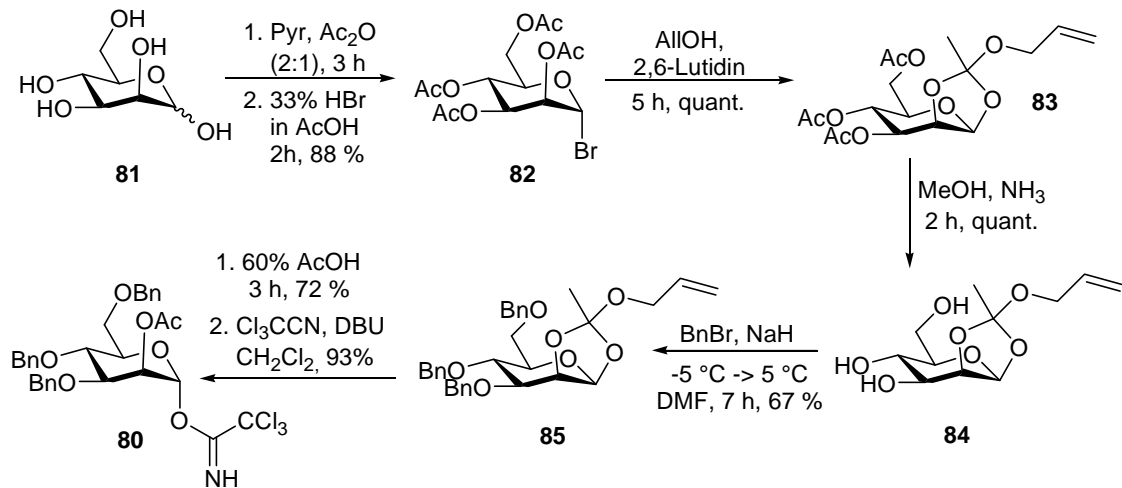


Abb. 3.44: Synthese des Mannosebausteins **80**

Auch bei diesem Baustein wird über den Nachbargruppeneffekt der Acetylschutzgruppe die Stereochemie der Glycosylierung kontrolliert, so dass selektiv α -glycosidische Bindungen erhalten werden.

Beide Bausteine werden im Weiteren auf ihre Anwendbarkeit in der Festphasen-oligosaccharidsynthese untersucht und mit dem in vorherigen Synthesen benutzten Baustein **60** verglichen.

3.2.2.8 Synthese alternativer Ankergruppen

Zur Erhöhung der Säurestabilität des PTMSE-Ankers **45** muss die Elektronendichte im Phenylring reduziert werden. Dies zu erreichen wurde auf zwei Wegen versucht. Im ersten Fall soll der Sauerstoff in *ortho*-Position nicht mehr direkt sondern über eine Methylenbrücke an den Phenylring gebunden werden. Der unerwünschte +M-Effekt des Sauerstoffs wird somit ausgeschaltet. Im zweiten Fall soll die Reduktion der Elektronendichte durch eine elektronenziehende Nitril-Gruppe am Phenylring erreicht werden.

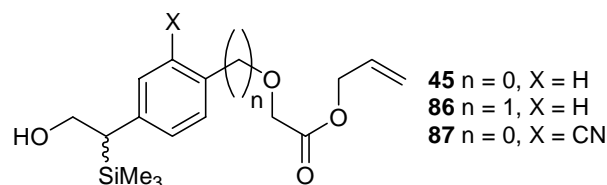


Abb. 3.45: Modifikationen des PTMSE-Ankers zur Erhöhung der Stabilität

Zur Darstellung des Ankers mit der Methylenbrücke zwischen Ring und Sauerstoff **86** wird zunächst 1-(4-Brombenzoxy)-1-ethoxyethan **88** aus 4-Brombenzylalkohol synthetisiert,¹³⁴ welches analog der in Abb. 3.17 gezeigten Vorgehensweise lithiiert werden soll.

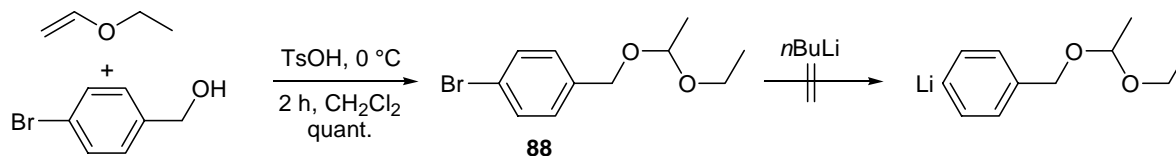


Abb. 3.46: Synthese von 1-(4-Brombenzoxy)-1-ethoxyethan

Der Austausch des Broms gegen Lithium verlief jedoch nicht erfolgreich. Stattdessen wird die Verbindung wahrscheinlich in benzylicher Position deprotoniert. Da der Brom-Lithium-Austausch hier nicht gelang, wurde der zweite Weg eingeschlagen, wobei versucht wurde, die Elektronendichte im Ring mittels einer elektronenziehenden Nitrilgruppe zu reduzieren. Dazu wird zunächst durch Bromierung von 2-Cyanophenol **89** mit NBS in Acetonitril 4-Brom-2-cyanophenol **90** in 72%iger Ausbeute dargestellt,¹³⁵ welches anschließend entsprechend dem oben bereits beschriebenen Verfahren mit der Ethoxyethylschutzgruppe versehen wird.

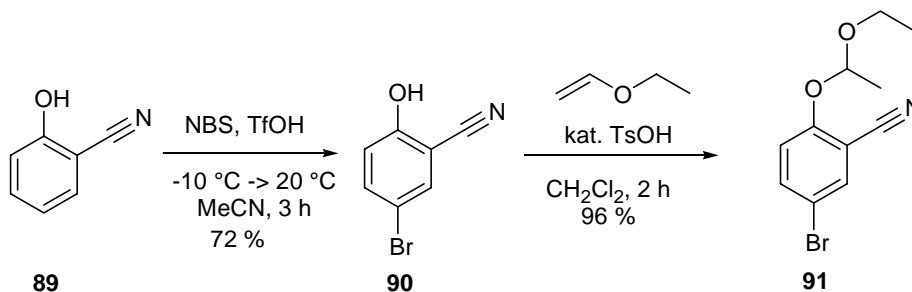


Abb. 3.47: Synthese des ethoxyethylgeschützten 4-Brom-2-cyanophenols **91**

Die Verbindung **91** wurde anschließend einem Halogen-Metall-Austausch unterworfen wodurch die Arylgrignardverbindung **92** erhalten wird. Transmetallierung mit CuCN·LiCN liefert das Normant-Cuprat **93**,¹³⁶ welches anschließend nucleophil das Epoxid **42** zum Produkt **94** öffnen soll.

¹³⁴ A. I. Meyen, D. L. Comins, D. M. Roland, R. Henning, K. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7104

¹³⁵ T. Oberhauser, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4505

¹³⁶ (a) M. Abarbi, J. Thiobonnet, L. Bérillon, F. Dehmel, M. Rottländer, P. Knochel, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4618; (b) A. Inoue, K. Kitagawa, H. Shinokubo, K. Oshima, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4333

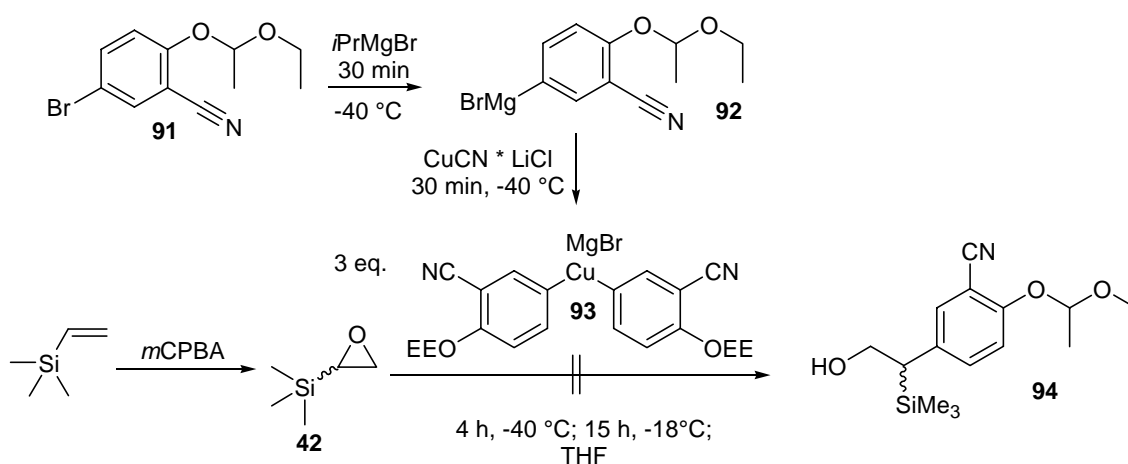
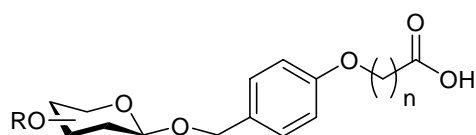


Abb. 3.48: Synthese des *Normant*-Cuprates und Versuch der nucleophilen Epoxidöffnung

Jedoch konnte dieses bei der Aufarbeitung nicht isoliert werden. Auch durch Verwendung der analogen Iodverbindung und Anwendung unterschiedlicher Temperaturbedingungen war das Misslingen dieser Reaktion nicht zu umgehen. Aufgrund dieser Komplikationen wurde auf weitere Versuche zur Erhöhung der Stabilität des PTMSE-Ankers verzichtet und stattdessen auf in der Saccharidsynthese bereits bewährte Ankersysteme zurückgegriffen. Im Weiteren wird zum einen ein dem von *Ito* und *Ogawa*¹³⁷ beschriebenen Anker analoges *p*-Alkoxybenzylankersystem und zum anderen der von *Schmidt* beschriebene Alkylthioanker verwendet.¹³⁸

Das von *Ito* und *Ogawa* beschriebene Ankersystem liefert ausgehend von *p*-Hydroxybenzaldehyd in sieben Stufen den vorbeladenen Anker **95**.



$n = 5$ **95** *p*-Alkoxybenzylanker nach *Ito* und *Ogawa*
 $n = 1$ **96** verwendeter *p*-Alkoxybenzylanker

Abb. 3.49: *p*-Alkoxybenzylankersysteme

Die aufwendige Route über sieben Stufen wurde in dieser Arbeit entsprechend der PTMSE-Synthese modifiziert, so dass der vorbeladene Anker **96** in drei Stufen erhalten werden kann. Dazu wird der kommerziell erhältliche *p*-Hydroxybenzylalkohol **97** unter Verwendung von Kaliumcarbonat regioselektiv an der phenolischen Hydroxylgruppe mit Chloressigsäureallylester im Sinne einer *Williamson*'schen Ethersynthese umgesetzt.

¹³⁷ H. Shimizu, Y. Ito, O. Kanie, T. Ogawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 2841

¹³⁸ (a) J. Rademann, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3989 (b) J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3650

Anschließend glycosyliert man den funktionalisierten Benzylalkohol **98** und gelangt je nach verwendetem Donor zu den Produkten **99** bzw. **100**.

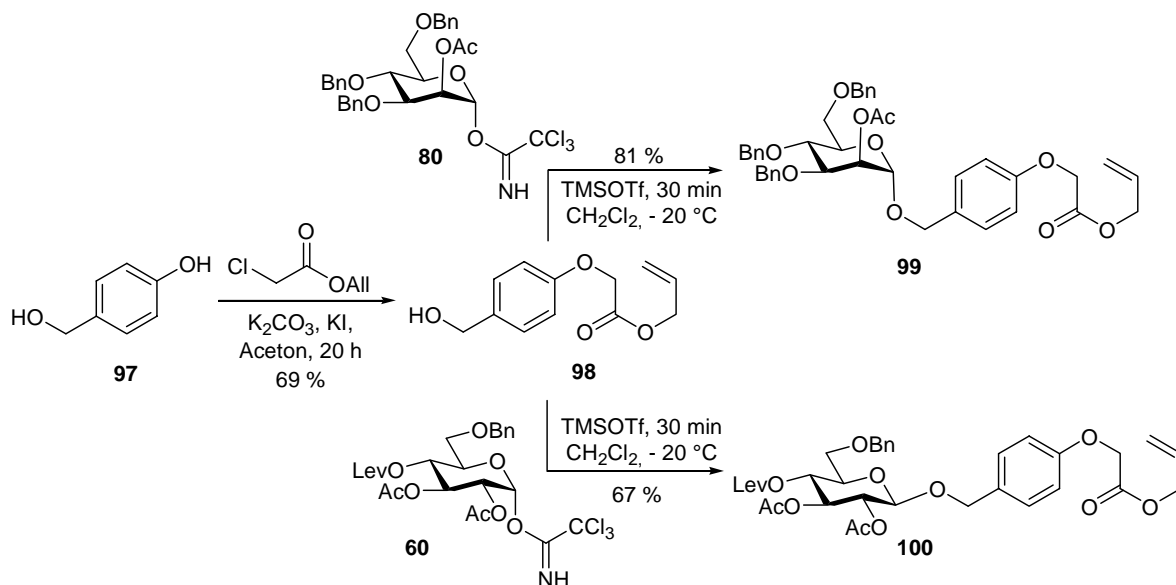


Abb. 3.50: Synthese und Glycosylierung des *p*-Alkoxybenzylankers

Vor der Anbindung an das Harz wird der Allylester durch einen Palladium-katalysierten Allyltransfer auf das im 1.2fachen Überschuss eingesetzte Natriumsalz der *p*-Toluolsulfinsäure gespalten, so dass die zur Anbindung benötigte Carbonsäurefunktion erhalten wird.

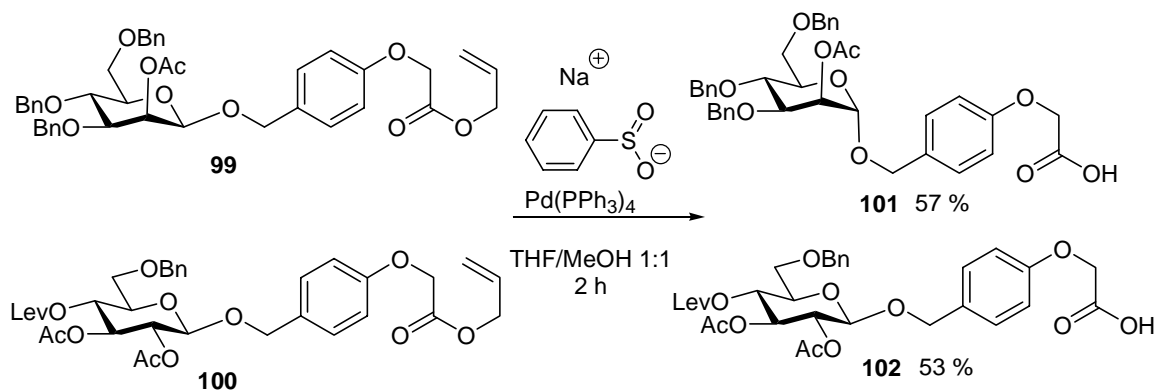


Abb. 3.51: Spaltung des Allylesters

Die mit dem ersten Kohlenhydratbaustein beladenen Anker werden über eine Amidbindung mit dem aminofunktionalisierten TentaGel-Harzes (*NovaSyn TG amino resin*, Novabiochem, 90 μm beads, 0.24 mmol/g) verknüpft. Als Kupplungsreagenzien werden TBTU und HOBt unter Zusatz von zwei Äquivalenten *N*-Methylmorpholin als

Base verwendet. Die Kupplung erfolgt durch 20stündiges Schütteln in einem *Merrifield*-Festphasenreaktor mit THF als Lösungsmittel.

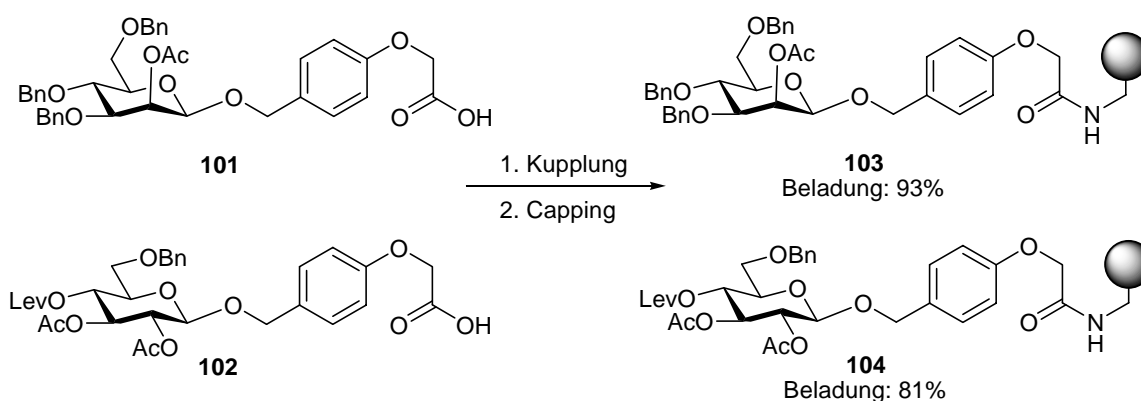


Abb. 3.52: Beladung des polymeren Trägers mit dem ankergebundenen Kohlenhydratbaustein

Man erhält somit den harzgebundenen Mannosebaustein **103** in 93%iger den Glucosebaustein **104** in 81%iger Ausbeute.

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Bausteinen am *p*-Alkoxybenzylankersystem wurden noch weitere Modellsysteme am Alkylthioanker synthetisiert.^{138b} Als polymerer Träger wurde hierfür chlormethyliertes Polystyrolharz (*Rapp Polymere*, Beladungskapazität: 1.35 mmol/g, mesh 200-400, 1% Divinylbenzol) verwendet.

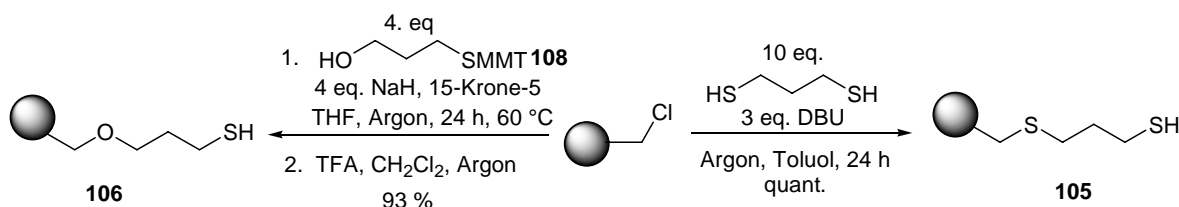


Abb. 3.53: Darstellung der Alkylthioanker funktionalisierten Polystyrolharze

Zur Darstellung von **105** wurde das Harz in Toluol vorgequollen und unter Verwendung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) mit Propan-1,3-dithiol in quantitativer Ausbeute funktionalisiert.¹³⁹ Zur Funktionalisierung mit 1-Mercaptopropan-3-ol muss die Thiofunktion vor der Anbindung an das Harz geschützt werden. Dies gelingt in zwei Stufen ausgehend von 3-Mercaptopropionsäuremethylester. Dieser wird in Pyridin gelöst und mit (Monomethoxytriphenyl)methylchlorid umgesetzt. Die Methylesterfunktion des erhaltenen Produktes **107** wird mit Lithiumaluminiumhydrid in THF zur Hydroxylgruppe reduziert. *S*-(Monomethoxytrityl)-1-mercaptopropan-3-ol **108** ist so in 70%iger Ausbeute zugänglich.

¹³⁹ M. Ono, H. Miyake, T. Saiko, A. Kaji, *Synthesis* **1980**, 952

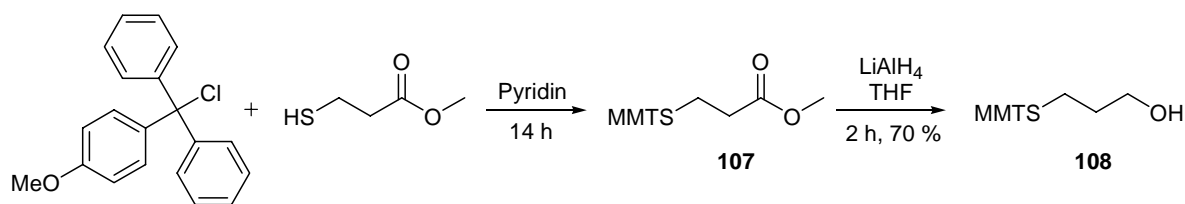


Abb. 3.54: Synthese von 1-Mercatopropan-3-ol **108**

Zur Funktionalisierung des Harzes wird dieses in THF vorgequollen und mit je vier Äquivalenten des Alkohols **108**, 15-Krone-5 und NaH versetzt. Anschließend schüttelt man die Reaktionsmischung 20 Stunden bei 60 °C, filtriert die Reaktionsmischung ab und wäscht das Harz abwechselnd je dreimal mit Dichlormethan und DMF. Die Monomethoxytritylschutzgruppe wird durch mehrmaliges Waschen des Harzes mit einer 5%igen Trifluoressigsäure-Lösung in Dichlormethan entfernt. Man erhält das mit 1-Mercatopropan-3-ol funktionalisierten Harz **106** in 93%iger Ausbeute. Die beiden polymeren Träger **105** und **106** werden, solange sie freie Thiolfunktionen besitzen, stets unter einer Argonatmosphäre aufbewahrt.

Über den Schwefelgehalt, dessen prozentualer Anteil an der Gesamtmasse mittels Elementaranalyse bestimmt werden kann, lässt sich der Umsatz der Reaktion entsprechen der folgenden Formel berechnen.

$$s = \frac{x \times n[S]}{M + x\Delta M} \Rightarrow x = \frac{s \times M}{n[S] - s\Delta M}$$

s = prozentualer Anteil von Schwefel an der Gesamtmasse

x = Umsatz der Reaktion

ΔM = reaktionsbedingte Massenänderung

M = Gewicht des polymerem Trägers pro Mol funktioneller Gruppe

n = Anzahl der Schwefelatome pro Moleküleinheit

$[S]$ = Molmasse von Schwefel [g/mol]

Die oben gegebenen Funktionalisierungsausbeuten wurden anhand dieser Formel berechnet. Auch bei den im Weiteren mit den Alkylthioankerfunktionalisierten polymeren Trägern durchgeführten Reaktionen wurde die Elementaranalyse zur Umsatzbestimmung verwendet. Dabei macht man sich zu nutze, dass die Anknüpfung weiterer schwefelfreier Kohlenhydratbausteine den Anteil des Schwefels an der Gesamtmasse reduziert.

Zur Glycosylierung des mit Propan-1,3-dithiol funktionalisierten Harzes **105** wurden 2 g entsprechend 2.7 mmol mit einem 1.5fachen Überschuss des Trichloracetimidatdonors **60** unter Aktivierung durch 0.5 Äquivalente des Promotors TMSOTf in Dichlormethan bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Neutralisation und Absaugen der Reaktionslösung wurden 1.27 Äquivalente des Donors zurückgewonnen, woraus sich ein 23%iger Umsatz ergibt. Um den Umsatz zu steigern, wurde die Glycosylierungsreaktion unter gleichen Bedingungen ein weiteres Mal über einen 20stündigen Zeitraum durchgeführt, woraufhin weitere 21 % Umsatz erzielt werden konnten. Insgesamt wurden somit 44 % der Thiofunktionen glycosyliert. Dies konnte durch den mittels Elementaranalyse bestimmten Wert von 42 % Umsatz bestätigt werden. Die in der Literatur unter gleichen Bedingungen bei lediglich einstündiger Reaktionszeit beschrieben quantitativen Ausbeuten konnten nicht reproduziert werden. Durch Umsetzung des Harzes **106** unter den gleichen Bedingungen wurde eine etwa 46%ige Beladung erzielt.

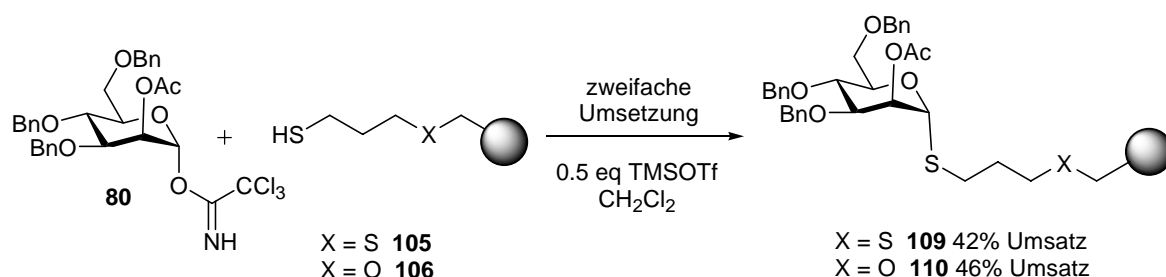


Abb. 3.55: Glycosylierung der alkylthiofunktionalisierten polymeren Träger

Um unerwünschte Nebenreaktionen mit den Thiofunktionen bei weiteren Glycosylierungen zu vermeiden, wurden diese durch Behandlung mit Acrylnitril in Dichlormethan in nicht störende Thioether umgewandelt.

3.2.2.9 Glycosylierung der harzgebundenen Monosaccharide

Die temporären Schutzgruppen der in der folgenden Abbildung gezeigten Bausteine wurden jeweils entfernt und die erhaltene Hydroxylgruppe einer Glycosylierung an der festen Phase unterworfen.

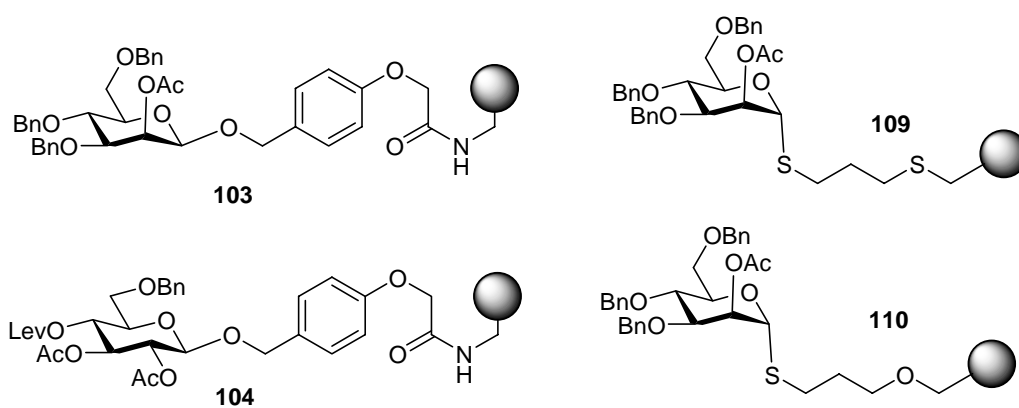


Abb. 3.56: Monosaccharidbausteine am polymeren Träger

Trotz stabiler Ankersysteme und reaktiverer Akzeptoren verlief die Glycosylierung in keinem der untersuchten Fälle mit zufriedenstellenden Ausbeuten. Nach Glycosylierung und nachfolgender Abspaltung vom polymeren Träger wurde in allen Fällen der unglycosylierte Akzeptor als Hauptprodukt erhalten. Beim Arbeiten mit großen Überschüssen an Donor konnte dieser, trotz langer Reaktionszeiten und hoher Promotorkonzentrationen, nach der Glycosylierung wieder unzersetzt zurückgewonnen werden, ohne dass die Hydroxylgruppe des Akzeptors angegriffen wurde. Auch die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel, die alle eine gute Quellung des polymeren Trägers bewirken, konnte den Umsatz nicht erhöhen. In allen Fällen kann das Disaccharid massenspektrometrisch in der Abspaltmischung nachgewiesen werden. Die Isolierung handhabbarer Mengen gelingt aber nur bei sehr großen Ansätzen, da die Glycosylierung in allen untersuchten Fällen weniger als 5 % Ausbeute liefert.

3.2.3 Fazit zur Festphasenoligosaccharidsynthese

Im Rahmen der beschriebenen Untersuchungen wurden Glycosylierungen und Schutzgruppenmanipulationen auf ihre Anwendungsmöglichkeiten in Festphasenoligosaccharidsynthesen hin überprüft und optimiert. Dabei zeigte sich, dass viele Reaktionen, teilweise nach entsprechender Modifikation, erfolgreich am polymeren Träger durchgeführt werden können. In diesen Fällen kann die festphasengebundene Methode ihre Stärken ausspielen, wie die durch Überschuss an eingesetzten Bausteinen und Reagenzien erreichbaren kürzeren Reaktionszeiten und höheren Umsätze, sowie die Vereinfachung von Reinigungsprozeduren. Bei einigen Reaktionstypen zeigten sich allerdings erhebliche Kompatibilitätsprobleme. So sanken insbesondere die Glycosylierungsausbeuten erheblich

bei Durchführung der Reaktion am polymeren Träger. Mehrere Ursachen können hierfür verantwortlich gemacht werden. So sind Kohlenhydrate sterisch gehinderte Moleküle. Die weitere Blockade einer Seite mit dem Trägermaterial verstärkt dieses Problem und reduziert Reaktionsgeschwindigkeit sowie Ausbeute. Auch muss das aktivierte Oxocarbeniumion mit der nucleophilen Akzeptorfunktion zusammentreffen. In Polystyrolharzen ist der Zugang aufgrund der unpolaren Umgebung im Harz erschwert. Auch die Polyethylenglycolseitenketten in Tentagelharzen könnten mit dem Oxocarbeniumion wechselwirken und somit zu einem den Umsatz reduzierenden Pseudoverdünnungseffekt beitragen. Aus diesen Gründen reagieren möglicherweise lediglich die Akzeptoren an der Oberfläche der Harzkugeln ausreichend schnell mit dem Glycosyldonor zum gewünschten Produkt. Insgesamt konnte die Synthese am polymeren Träger nicht soweit optimiert werden, dass hierüber größere Mengen der für spätere Synthesen notwendigen Bausteine zugänglich wären. Stattdessen werden für die weiteren Glycopeptidsynthesen die mittels Standardverfahren in der homogenen Phase gewonnenen Kohlenhydratantigene verwendet.

3.3 Glycopeptidsynthese

Für die Synthese von Peptiden und Glycopeptiden kommt sowohl der Aufbau in Lösung als auch an polymeren Trägern in Betracht. Trotz zahlreicher Erfolge bei der Darstellung komplexer Strukturen in Lösung^{140,141} hat sich für die meisten Problemstellungen die Festphasensynthese etabliert. Die Grundlagen hierfür wurden 1963 in Pionierarbeiten von Merrifield¹¹ gelegt, für die er 1984 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Wie schon im Zusammenhang mit den Saccharidsynthesen beschrieben, besteht der entscheidende Vorteil der Festphasensynthese darin, dass der an einem polymeren Träger immobilisierte Peptidstrang leicht von den in Lösung vorliegenden Reagenzien durch Filtration und Waschen befreit werden kann. Dies ermöglicht den Einsatz eines großen Reagenzienüberschusses, der zu einer Beschleunigung der Reaktion sowie zur Erhöhung des Umsatzes führt. Aufwendige Isolierungs- und Reinigungsschritte können somit vermieden werden. Darüber hinaus sind Festphasensynthesen im Hinblick auf mögliche Automatisierungen besonders geeignet, was aufgrund der vielen, linear mit der Anzahl der Aminosäuren wachsenden Schritte beim Aufbau großer Peptide zu erheblichen Zeiteinsparungen führen kann.

3.3.1.1 Polymere Träger und Ankersysteme

Gebräuchlich Trägermaterialien sind sowohl mit Divinylbenzol quervernetzte Polystyrolharze als auch zusammen mit polaren Lösungsmitteln einsetzbare TentaGel[®]-Harze.¹⁶ Quervernetzte Polystyrolharze zeigen etwas bessere Quelleigenschaften in den zur Festphasensynthese verwendeten Lösungsmitteln und sind somit für Standardanwendungen vorzuziehen (Tabelle 3.6).^{142,119} Bei Verwendung dieser Trägermaterialien in TFA muss das Quellen jedoch durch Zusatz von Dichlormethan unterstützt werden. Niedrige Beladungen in einer Größenordnung von 0.2 bis maximal 0.5 mmol/g werden gewählt, um störende Wechselwirkungen zwischen den wachsenden Peptidsträngen zu minimieren.

¹⁴⁰ H. Kunz, M. Schultz, in *Glycopeptides and Related Compounds* (Eds.: D. G. Large, C. D. Warren), M. Dekker, Inc., New York, **1997**

¹⁴¹ J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X.-T. Chen, D. Sames, P. W. Glunz, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2662

¹⁴² R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951

Lösungsmittel	TentaGel HL	Wang-Harz
	0.4-0.6 mmol/g	0.5-1.0mmol/g
NMP	4.4	6.4
DMF	4.6	5.6
CH ₂ Cl ₂	5.7	8.3
TFA	6.0	2.0

Tabelle 3.6: Quellvolumen (ml/g) von Polystyrol- (Trockenvolumen 1.6 ml/g) und TentaGel-Harz (Trockenvolumen 1.7 ml/g)

An den Anker werden mehrere Anforderungen gestellt. So muss er eine unter allen verwendeten Reaktionsbedingungen stabile Verknüpfung des wachsenden Peptidstranges mit dem Harz gewährleisten, orthogonal zu den temporären Schutzgruppen spaltbar sein und wenn möglich einen reaktivitätsverbessernden Abstand zwischen Harz und Reaktionszentrum schaffen. Am Ende der Synthese soll er sich unter Bedingungen, die die Integrität des Peptides bzw. Glycopeptides nicht beeinträchtigen, möglichst vollständig spalten lassen. Dazu kommen je nach Problemstellung säurelabile (z. B. Wang, SASRIN),^{143,144} fluoridlabile (PTMSEL),¹⁴⁵ allylische (z. B. HYCRON),¹⁴⁶ basenlabile¹⁴⁷ und photolabile¹⁴⁸ Ankersysteme zum Einsatz.

3.3.1.2 Schutzgruppen für die N-terminale Aminofunktion

Zur Blockierung der N-terminalen Aminofunktion kommen verschiedene Schutzgruppen, wie z. B. die durch katalytische Hydrierung spaltbare Benzyloxycarbonyl-Funktion¹⁴⁹ oder die sauer spaltbare *tert*-Butyloxycarbonyl-Funktion,^{150,151} in Frage. Aufgrund der milden und einfach handhabbaren Spaltungsbedingungen findet heute die Synthese nach der Fmoc-Strategie die breiteste Anwendung.^{73,152} Hierbei dient die basenlabile Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-Gruppe zum temporären Schutz der Aminofunktion.^{153,154} Die Spaltung erfolgt durch sekundäre Basen wie Piperidin¹⁵⁵ oder Morpholin.¹⁵⁶

¹⁴³ S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328

¹⁴⁴ M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005

¹⁴⁵ M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 317

¹⁴⁶ O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 803

¹⁴⁷ W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295

¹⁴⁸ D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 610

¹⁴⁹ M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192

¹⁵⁰ F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686

¹⁵¹ G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180

¹⁵² C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246

¹⁵³ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748

¹⁵⁴ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404

¹⁵⁵ B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939

¹⁵⁶ P. Schultheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64

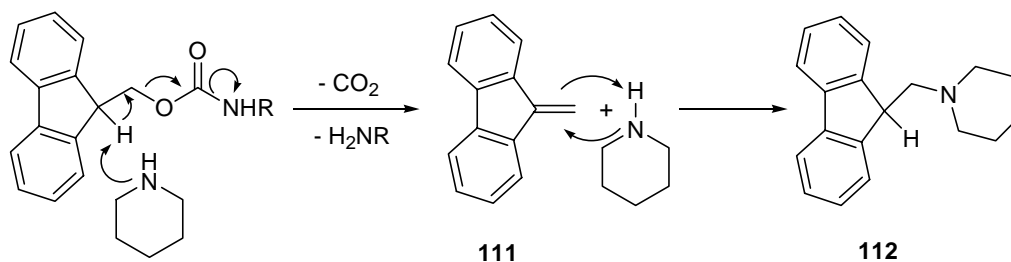


Abb. 3.57: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung mit Piperidin

Durch Deprotonierung an der CH-aciden 9-Position der Fmoc-Gruppe und nachfolgende Decarboxylierung entsteht das Dibenzofulven. Das sekundäre Amin addiert sich anschließend unter Ausbildung eines stabilen Adduktes **112** an die Doppelbindung. Die sehr intensive UV-Absorption dieser Verbindung kann in der Synthese zur Reaktionskontrolle verwendet werden.

3.3.1.3 Knüpfung der Peptidbindung

Trotz der bemerkenswerten Stabilität gegenüber reinem Wasser - die Halbwertszeit hinsichtlich der Hydrolyse bei Raumtemperatur beträgt etwa 7 Jahre¹⁵⁷ - ist die Peptidbindung energiereich. Zu ihrer Knüpfung muss daher mindestens ein energielieferndes, meist an der Carboxylgruppe aktiviertes Aminosäurederivat (Säureanhydrid,¹⁵⁸ Azid,¹⁵⁸ Säurehalogenid¹⁵⁹) eingesetzt werden. Die ersten von *Emil Fischer* im Jahre 1903 durchgeführten Peptidsynthesen erfolgten durch Umsetzung von α -Halogen-carbonsäurechloriden mit ungeschützten Aminosäureestern und nachfolgendem Austausch des α -Halogens gegen die Aminogruppe durch Behandlung mit Ammoniak. Diese Methode erwies sich jedoch als wenig geeignet, da die betreffenden Halogenacylverbindungen unter den angewandten Bedingungen zur Racemisierung neigen, darüber hinaus schwer zugänglich und wenig beständig sind. In heute überwiegend angewandten Methoden wird die aktivierte Spezies aus einer freien Carbonsäure *in situ* erzeugt. Die Carbonsäure wird dazu mit einem Aktivierungsreagenz, wie z. B. Posphoniumsalzen,^{160,161} oder den Uroniumsalzen *O*-(1*H*-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU),¹⁶² *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluorophosphat (TBTU)¹⁶³ und *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-

¹⁵⁷ D. Kahn et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7529

¹⁵⁸ N. Sewald, H. D. Jakubke, "Peptides: Chemistry and Biology", 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **2002**

¹⁵⁹ L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268

¹⁶⁰ B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219

¹⁶¹ 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

¹⁶² L. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201

¹⁶³ R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927

tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU)¹⁶⁴ unter milden Bedingungen in einen Aktivester überführt. Die Kupplungsreagenzien können abhängig von ihren Herstellungsbedingungen entweder als Uroniumsalze oder in Form der weniger reaktiven Guanidiniumsalze vorliegen. Unter basischen Bedingungen lagert sich die Uroniumsalzform in die thermodynamisch stabilere Guanidiniumform um.¹⁶⁵ Die oben beschriebenen Aktivierungsreagenzien haben die früher häufig verwendeten Carbodiimide wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC) und *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC) aufgrund höherer Reaktivität, der unterbleibenden Acylwanderung und geringerer Racemisierungstendenz weitgehend aus den Routineanwendungen verdrängt.

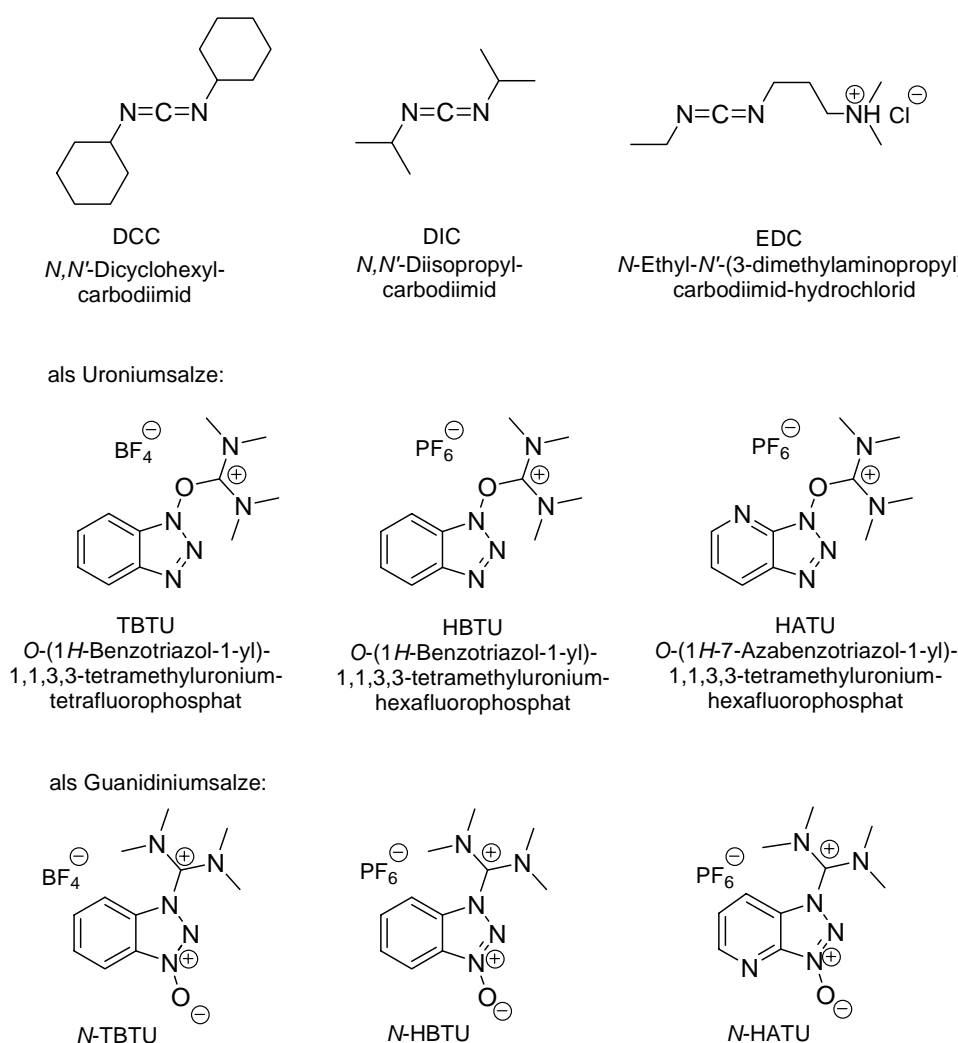


Abb. 3.58: Struktur gängiger Kupplungsreagenzien

¹⁶⁴ V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269

¹⁶⁵ L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen und zur weiteren Verminderung der Racemisierung wird bei Kupplungen mit TBTU und HBTU zudem noch 1-Hydroxybenzotriazol HOBt¹⁶⁶ als Additiv zugesetzt; bei Kupplungen mit HATU hat sich dementsprechend das 7-Aza-Analogon HOAt¹⁶⁷ bewährt. Der sich hiermit bildende Aktivester zeigt zwar eine etwas geringere Reaktivität im Vergleich zu den primär entstehenden *O*-Acylisoharnstoffen, ist aber aufgrund verminderter Tendenz zu Nebenreaktionen längere Zeit stabil. Vor allem bei sterisch anspruchsvollen Kupplungen ist dies von entscheidendem Vorteil.



Abb. 3.59: Struktur von HOBt und HOAt

HATU ist das reaktivste, aber auch das teuerste Kupplungsreagenz. HOAt stellt als stärkere Säure ($pK_s = 3.28$) im Vergleich zu HOBt ($pK_s = 4.60$) zudem eine bessere Abgangsgruppe dar, was eine höhere Reaktivität des HOAt-Aktivesters zur Folge hat. Dieses Reagenzienpaar wird dementsprechend für anspruchsvolle Kupplungsreaktionen eingesetzt, wie z. B. für die Anknüpfung von glycosylierten Aminosäurebausteinen und des Mitogens Pam₃Cys.

Der Mechanismus von Aktivesterbildung und anschließender Peptidkupplung ist in Abb. 3.60 am Beispiel der Kupplungsreagenzien TBTU und HOBt dargestellt. Carbonsäurekomponente, TBTU und das Additiv HOBt werden in einem geeigneten Lösungsmittel vorgelegt. Anschließend wird die Reaktion durch Deprotonierung der Carbonsäure und des Additivs mit *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA, *Hünigs Base*) gestartet. Die deprotonierte Carbonsäure greift nucleophil am Carbonylkohlenstoff des Harnstoffderivates, unter Ausbildung des reaktiven *O*-Acyl-Uroniumsalzes **113** an, welches wiederum mit dem deprotonierten HOBt zum Aktivester **114** reagiert. Dieser wird mit der Aminkomponente, die im Falle der Festphasensynthese am polymeren Träger immobilisiert ist, unter Bildung der gewünschten Amidbindung umgesetzt.

¹⁶⁶ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788

¹⁶⁷ L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397

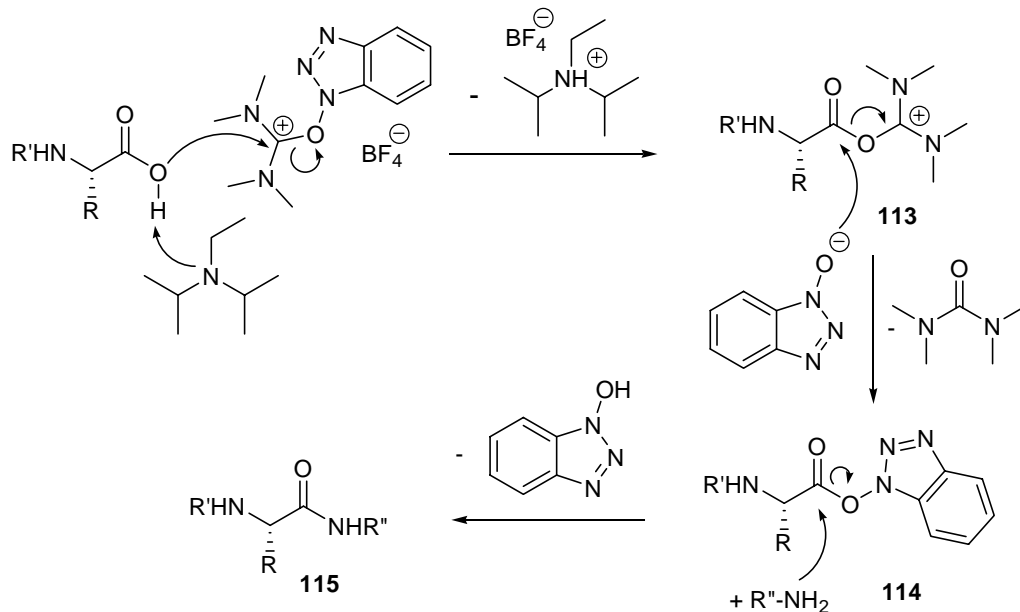


Abb. 3.60: Mechanismus der Peptidkupplung unter Verwendung von TBTU und HOBT

Die sterisch anspruchsvolle, nicht nucleophile Base DIPEA wird verwendet um zum einen den Angriff an den Carbonylkohlenstoff und zum anderen die Deprotonierung in α -Position der Carbonsäure und der damit einhergehenden Racemisierung zu verhindern. Verwendet man HOAt anstelle von HOBT, wird die Bildung der Peptidbindung durch eine Vorkoordination der Aminkomponente über eine Wasserstoffbrückenbindung in unmittelbarer Nachbarschaft zum Carbonylkohlenstoff des Aktivesters zusätzlich beschleunigt.

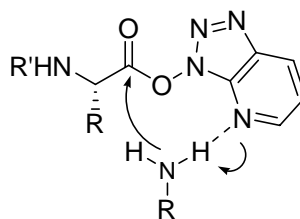


Abb. 3.61: Vororientierung der Aminkomponente bei der Verwendung von HOAt

3.3.1.4 Allgemeines Protokoll der automatisierten Festphasensynthese

Peptid- und Glycopeptidsynthesen werden an fester Phase in einem Perkin Elmer ABI 433A-Peptidsynthesiser durchgeführt. Als Träger wurde ein säurelabiles HMPB-BHA-Harz verwendet, das aus mit Benzhydrylamin (BHA) modifiziertem Polystyrol besteht. Als Anker trägt dieses Polystyrol-BHA-Harz die 4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutansäure (HMPB) und gehört somit zur Klasse der SASRIN (Super acid sensitive resin)-Harze, die schon durch Behandlung mit 1%iger Trifluoressigsäure das

Peptid freisetzen können. Durch eine niedrige Beladung von ungefähr 0.2 mmol/g Harz sollen störende Wechselwirkungen während der Synthese vermieden werden.

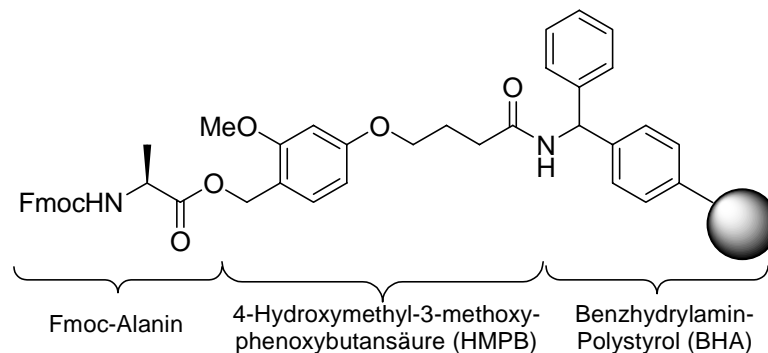


Abb. 3.62: Struktur des mit Alanin beladenen HMPB-BHA-Harzes

Die Peptide werden nach der Fmoc-Strategie vom C- zum N-terminalen Ende hin aufgebaut. Zum Aufbau der Glycopeptide werden die Fmoc-geschützten, bereits glycosylierten Aminosäurebausteine in einer linearen Strategie analog den unglycosylierten Bausteine in die Peptidsynthese mit eingebracht. Die Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren und der Kohlenhydrate werden so geschützt, dass sie unter den Bedingungen der sequenziellen Aminosäuresynthese permanent stabil sind. Die verwendeten, säurelabilen Schutzgruppen für die jeweiligen Aminosäuren sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Die Carbonsäurefunktion der Sialinsäure wird als Benzylester geschützt. Die Aminofunktionen der Kohlenhydrate werden acetyliert und die Hydroxylgruppen entweder ebenfalls acetyliert in einem Fall aber auch ungeschützt eingesetzt.

Schutzgruppe	Aminosäure
<i>tert</i> -Butylether	Serin, Threonin
<i>tert</i> -Butylester	Asparaginsäure Glutaminsäure
Tryl-Gruppe	Histidin, Asparagin Cystein, Glutamin
2,2,5,7,8-Pentamethyl- chroman-6-sulfonyl-(Pmc)	Arginin

Tabelle 3.7: Schutzgruppen für die Seitenkettefunktionen der Aminosäuren

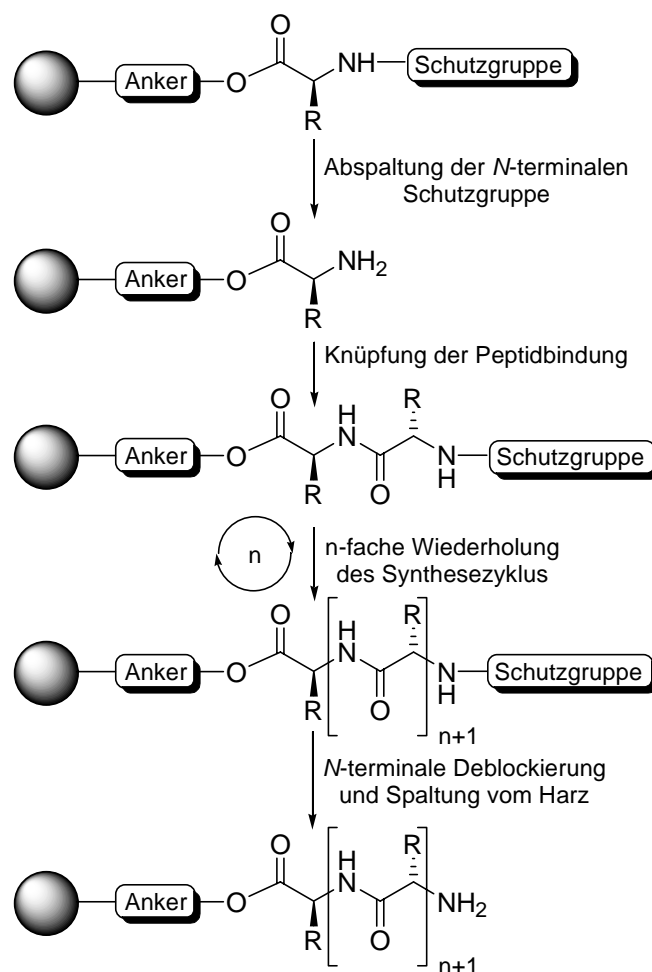


Abb. 3.63: Prinzip der sequenziellen Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield

Im Peptidsynthesizer werden die einzelnen Aminosäurebausteine in automatisierten, iterativen Synthesesyklen zu einem Peptid gekuppelt. Jeder Zyklus setzt sich aus drei Teilschritten zusammen. Zunächst wird die terminale Fmoc-Schutzgruppe durch wiederholte Behandlung mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Die UV-spektroskopische Untersuchung der Abspaltung dient der Kontrolle des Reaktionsverlaufes. Der Vergleich mit Werten aus vorangegangenen Abspaltungen erlaubt hierbei Rückschlüsse über den Erfolg der einzelnen Kupplungsschritte. Im Anschluss an die Deblockierung findet die Knüpfung der Peptidbindung statt. Hierzu wird ein zehnfacher Überschuss des Aminosäurebausteins sowie der Kupplungsreagenzien HBTU und HOBT und dementsprechend 20 Äquivalente *N*-Ethyl-diisopropylamin verwendet. Die Reaktionsdauer beträgt 30 Minuten. Zur Anknüpfung der wertvollen, sterisch anspruchsvollen, glycosylierten Aminosäuren wird lediglich ein doppelter Überschuss des Bausteins verwendet. Hierbei kommt das reaktivere Reagenzienpaar bestehend aus HATU und HOBT bei einer Reaktionszeit von fünf Stunden zum Einsatz. Die abfiltrierte Reaktionslösung wird anschließend gesammelt, um den unumgesetzten Baustein

zurückzugewinnen. Im Anschluss an den Kupplungsschritt werden nicht umgesetzte Aminofunktionen durch Behandlung mit einem Cappingreagenz, bestehend aus Acetanhydrid, DIPEA und katalytischer Mengen HOBt, acetyliert. Dadurch lässt sich die Entstehung von Fehlsequenzen und somit komplexen, schwierig zu trennenden Produktgemischen vermeiden. Die acetylierten Abbruchpeptide lassen sich in der Regel leicht durch chromatographische Verfahren vom gewünschten Produkt trennen. Ist der Angriff am Aminoterminus erschwert, beispielsweise unmittelbar neben einer sterisch anspruchsvollen, glycosylierten Aminosäure, kann die in der Sequenz folgende Aminosäure in einer Doppelkupplung angeknüpft werden. Hierzu wird das Harz zweimal ohne zwischenzeitliche Acetylierung mit jeweils 10 Äquivalenten der aktivierten Aminosäure behandelt, um die Kupplungsausbeute zu erhöhen. Am Ende der Synthese wird das Harz in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und das Glycopeptid mit TFA, Wasser und Triisopropylsilan im Verhältnis 17:1:1 abgespalten. Unter diesen Bedingungen werden auch die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten entfernt, so dass lediglich noch die Kohlenhydrateinheit deblockiert werden muss, um zur Zielstruktur zu gelangen.

3.3.1.5 Potenzielle Nebenreaktionen der Peptidsynthese

Abgesehen von unvollständigem Umsatz in den jeweiligen Reaktionsschritten, können weitere Nebenreaktionen den Verlauf der Peptidsynthese beeinträchtigen. Hierbei sind vor allem die Diketopiperazinbildung, die Aspartimidumlagerung und die Ornithinbildung aus Arginin zu nennen. Die Diketopiperazinbildung findet auf der Stufe des Dipeptides statt. Unter den basischen Bedingungen der Piperidin vermittelten Fmoc-Abspaltung kommt es zur intramolekularen Aminolyse der Esterbindung unter Bildung eines cyclischen Dipeptides bei gleichzeitiger Abspaltung vom Harz.^{168,169}

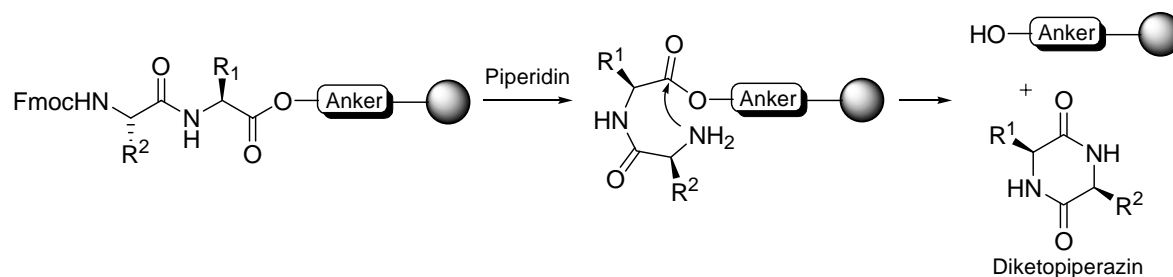


Abb. 3.64: Diketopiperazinbildung

¹⁶⁸ M. Rothe, J. Mazánek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *11*, 293

¹⁶⁹ M. Rothe, J. Mazánek, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, *3*, 439

Die Geschwindigkeit dieser Nebenreaktion hängt von der Aminosäuresequenz, dem sterischen Anspruch des Esters und der Fähigkeit der Alkoxy- bzw. Aryloxygruppe als Abgangsgruppe zu fungieren ab. Die Cyclisierungstendenz wird vor allem durch Prolin und zu geringerem Anteil auch durch Glycin in der Sequenz des Dipeptides begünstigt, nimmt jedoch mit zunehmend voluminöseren Seitenketten der Aminosäuren stark ab. Sterisch anspruchsvolle Ankersysteme können bei problematischen Startsequenzen eingesetzt werden, um den Angriff der Aminofunktion auf den Carbonylkohlenstoff zu behindern. Eine weitere Nebenreaktion, die in Asparaginsäure enthaltenden Sequenzen auftreten kann, ist die Aspartimidumlagerung. In der basenkatalysierten Variante wird zunächst das Amidproton der C-terminal benachbarten Aminosäure abstrahiert. Durch einen nucleophilen Angriff des Amidstickstoffs am Carbonylkohlenstoff der geschützten β -Carboxylfunktion der Asparaginsäure bildet sich intermediär das Aspartimid.

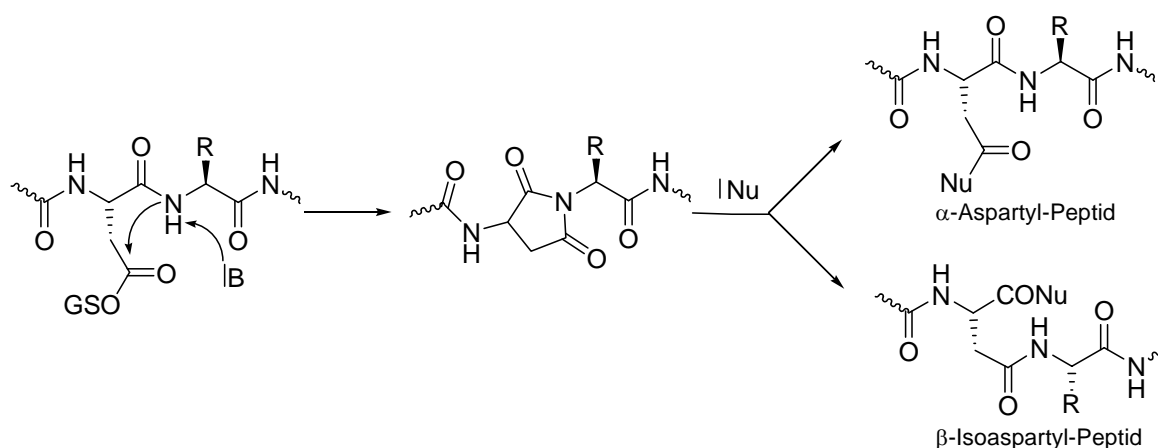


Abb. 3.65: Mechanismus der Aspartimidumlagerung

Der Fünfring kann unter Hydrolysebedingungen zum α -Aspartyl-, aber auch zum unerwünschten β -Isoaspartylpeptid geöffnet werden. Weiterhin ist eine aminolytische Ringöffnung mit Piperidin möglich, was letztendlich am Auftreten eines, im Vergleich zur Zielstruktur um 67 u schwereren Massenpeaks erkannt werden kann. Das Ausmaß dieser Nebenreaktion ist stark von der in der Sequenz vorangehenden Aminosäure abhängig. Durch Schutz der β -Carboxylfunktion der Asparaginsäure als sterisch und elektronisch abgeschirmter *tert*-Butylester lässt sich die Geschwindigkeit dieser Nebenreaktion verringern. Bei Synthesen nach der Fmoc-Strategie tritt diese Reaktion dann trotzdem in erheblichem Maße auf, wenn die Asparaginsäure in der Synthesesequenz auf Asparagin, Glycin, Alanin oder Glutamin folgt.¹⁷⁰ Darüber hinaus kann die Reaktion auch unter sauren

¹⁷⁰ Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thornqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9689

Bedingungen, wie bei der Acidolyse der säurelabilen Schutzgruppen, induziert werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Sequenz der immundominanten Region der Wiederholungseinheit von MUC1 folgt die Asparaginsäure auf *tert*-Butyl-geschütztes Threonin. In dieser Konstellation wird Asparidimidumlagerung unter den in der Synthese angewandten Bedingungen nicht beobachtet. Als letzte der oben aufgeführten Nebenreaktionen ist die Bildung von Ornithin aus Arginin zu nennen. Die Guanidinogruppe des Arginins besitzt eine gewisse Nucleophilie und kann somit während der Kupplungsschritte acyliert werden. Dieses Acylierungsprodukt wird durch Abspaltung eines 2-Iminoimidazolidins zu Ornithin umgesetzt.

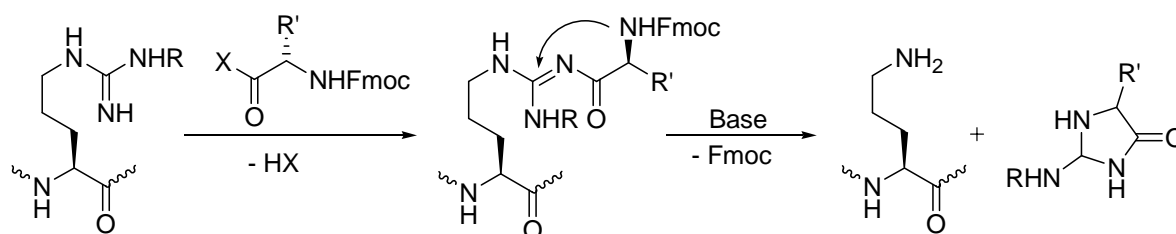


Abb. 3.66: Umwandlung von Arginin in Ornithin durch Acylierung mit Aminosäuren

Auch kann bei der Aktivierung der Carbonsäure des Argininbausteins intramolekulare Lactambildung eintreten, was den Verbrauch eines Teils der eingesetzten Aminosäure zur Folge hat. Durch Verwendung von Sulfonylschutzgruppen kann die Nucleophilie der Guanidinogruppe soweit herabgesetzt werden, dass die Nebenreaktionen nicht mehr stattfinden. Durch Modifikation der ursprünglich von *Emil Fischer*¹⁷¹ eingeführten *p*-Toluolsulfonyl-Schutzgruppe wurden die heute verwendeten Gruppen wie z. B. die 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-(Pmc)- oder die 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-(Pbf)-Gruppe erhalten. Sie zeichnen sich gegenüber der *p*-Toluolsulfonyl-Schutzgruppe durch leichtere Spaltbarkeit im Säuren aus.¹⁷² Das Risiko der Sulfonierung von Serin und Threonin während der Abspaltung kann durch Zusatz von Wasser als Abfangreagenz minimiert werden.

¹⁷¹ E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1915**, 48, 93

¹⁷² R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron* **1991**, 47, 6353

3.4 Darstellung immunogener Glycopeptidkonjugate

3.4.1 Immunologischer Hintergrund

Um eine Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene auszulösen, muss die Toleranz des Immunsystems gegenüber solchen Strukturen gebrochen werden. Tumorzellen sind in der Regel weit weniger immunogen als körperfremde Pathogene, jedoch können die veränderten Strukturen sehr wohl vom Immunsystem erkannt werden. Dies zeigt sich z. B. an der Ansammlung von Zellen des Immunsystems am Tumor, sowie der, wenn auch in der Regel schwachen, Antikörperbildung gegen die veränderten MUC1-Glycopeptidstrukturen von Tumorzellen. Im Folgenden sollen kurz die Mechanismen der B-Zell-Aktivierung erläutert werden, um anschließend Strategien zur Synthese von Vakzinen aufzuzeigen, die dies in tumorspezifischer Weise ermöglichen.

Die hochspezifischen Antigenrezeptoren an der Oberfläche von B-Zellen haben zwei Funktionen bei der Zellaktivierung. Erstens senden sie ein Signal in die Zelle sobald ein Antigen gebunden wird. Zum anderen schleusen sie das Antigen ins Zellinnere, wo es abgebaut und an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden wird. Der gebildete Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex wandert anschließend an die Oberfläche, um dort antigenspezifischen T-Helferzellen präsentiert zu werden.

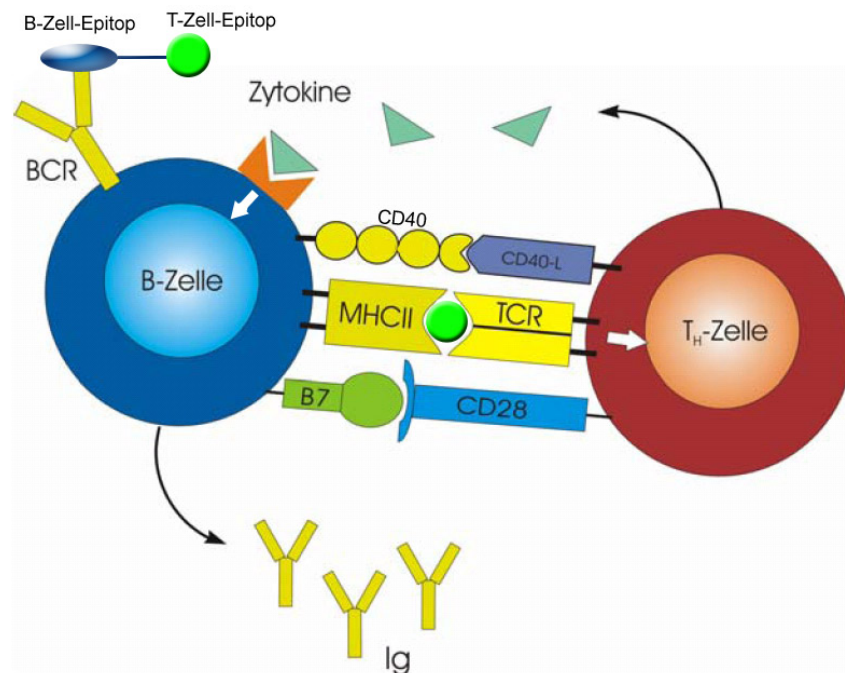


Abb. 3.67: T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung

Trifft eine B-Zelle auf eine T_H-Zelle, mit einem für den präsentierten Peptid:MHC-Klasse-II-Komplex spezifischen T-Zell-Rezeptor, so führt dies dazu, dass die T_H-Zelle membrangebundene und lösliche Effektormoleküle zur Aktivierung der B-Zelle synthetisiert. Die Summe dieser costimulatorischen Signale bewirkt eine Anregung der B-Zelle zur Proliferation und zur Differenzierung in Immunglobulin sezernierende Plasmazellen (Abb. 3.67).^{173,174} B-Zell-Rezeptor und aktivierte T-Helferzelle müssen also zur Initiierung dieses Entwicklungsganges jeweils ein Epitop desselben Antigens erkennen. Diese gekoppelte Erkennung trägt dazu bei, die Selbsttoleranz des Immunsystems sicherzustellen. Hierin liegt im Gegenzug aber auch einer der wesentlichen Gründe, warum tumorassoziierte Antigene, die sich lediglich im Glycosylierungsmuster von Strukturen gesunder Zellen unterscheiden, kaum in der Lage sind, eine Immunantwort auszulösen. B-Zellen präsentieren nach der intrazellulären Prozessierung des Antigens meist nur das von Kohlenhydratstrukturen befreite Peptidrückgrat im Peptid:MHC-II-Komplex. Da es sich hierbei aber um eine körpereigene Aminosäuresequenz handelt, unterbleibt das kostimulatorische Signal der T-Helferzelle, was zu einer Anergisierung der B-Zelle führt.

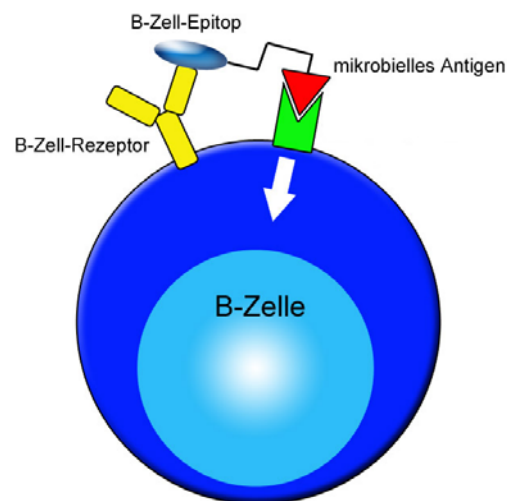


Abb. 3.68: Thymusunabhängige B-Zell-Aktivierung

Neben der oben beschriebenen thymusabhängigen B-Zell-Aktivierung können bestimmte mikrobielle Antigene, die B-Zelle direkt, d.h. ohne Hilfe von T-Zellen aktivieren. Dies ermöglicht dem Organismus rasch auf wichtige bakterielle Erreger zu reagieren (Abb. 3.68). Die somatische Hypermutation sowie der Wechsel zu Immunglobulinisotypen hängen allerdings von der Wechselwirkung antigenstimulierter B-Zellen mit T-Helferzellen in den peripheren Lymphorganen ab. Daher sind Antikörper, die

¹⁷³ C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, "Immunologie", 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 2002

¹⁷⁴ D. C. Parker, *Annu. Rev. Immunol.* 1993, 11, 331

ausschließlich durch mikrobielle Antigene induziert wurden, weniger variabel und funktionell weniger flexibel als solche, die mithilfe von T-Zellen gebildet wurden.¹⁷³

Zur Induktion von Immunantworten gegen selbst nur schwach immunogenen tumorassoziierten Strukturen mit Hilfe synthetischer Impfstoffkonjugate bestehen dementsprechend mehrere Möglichkeiten, die im Folgenden aufgezeigt werden sollen.

3.4.2 Glycopeptid-Mitogen-Konjugate

Eine Möglichkeit zur Induktion der Immunantwort besteht in der kovalenten Anbindung eines Mitogens an das B-Zell-Epitop. Als Mitogene bezeichnet man Substanzen, welche in der Lage sind Zellen, im speziellen B-Zellen, in einer nicht antigenspezifischen Weise zu aktivieren. Dieser Mechanismus basiert auf der Fähigkeit des angeborenen Immunsystems gewisse Bestandteile von Pathogenen (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) durch Rezeptoren zu erkennen und dieses Signal ins Zellinnere zu übertragen. Es zeigte sich, dass Moleküle aus der Familie der Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) für Erkennung und Signaltransduktion verantwortlich sind, und somit eine Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen.¹⁷⁵ TLR4 erkennt z. B. Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien wohingegen TLR2 Peptidoglycane und verschiedenste bakterielle Lipoproteine erkennt.¹⁷⁶ Bakterielle Lipoproteine sind gekennzeichnet durch die einzigartige *N*-terminale Lipoaminosäure *N*-Acyl-*S*-diacylglyceryl-cystein. Sowohl Lipid- als auch Proteinanteil tragen zur Erkennung durch TLR2 bei.^{177, 178, 179} Als Mitogen soll in dieser Arbeit das synthetische Analogon des *N*-Terminus eines Lipoproteins aus der Membran des *Escheria-coli*-Bakteriums verwendet werden, bei dem der *S*-Glycerylcysteinbaustein vollständig *N*- und *O*-palmitoyliert und *C*-terminal mit Serin verknüpft vorliegt.¹⁸⁰ Dieser Baustein wurde von Jung¹⁸¹ als kleinste Einheit identifiziert, die noch zu optimaler Stimulation von Monocyten, Neutrophilen und B-Zellen in der Lage ist. Das Mitogen soll über den flexiblen, nicht immunogenen Triethylenglycolspacer mit dem tumorassoziierten Glycopeptid aus der Wiederholungseinheit von MUC1 verknüpft

¹⁷⁵ R. Medzhitov, P. Preston-Hurburt, C. A. Janeway Jr., *Nature* **1997**, 388, 394

¹⁷⁶ M. Nishiguchi, M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, N. A. Begum, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima, T. Seya, *J. Immunol.* **2001**, 166, 2610

¹⁷⁷ H. D. Brightbill, D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R.-B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, *Science* **1999**, 285, 732

¹⁷⁸ A. O. Aliprantis, R.-B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, A. Zychlinsky, *Science* **1999**, 285, 736

¹⁷⁹ M. Hirschfeld, C. J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J. H. Weis, R. M. Wooten, J. J. Weis, *J. Immunol.* **1999**, 16, 2382

¹⁸⁰ G. Jung, C. Carrera, H. Brueckner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1608

¹⁸¹ J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, *J. Med. Chem.* **1991**, 34 (7), 1969

werden. Der Aufbau soll in einer automatisierten Festphasensynthese erfolgen, wobei im letzten Schritt der *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bis-palmitoyloxy-(2*R,S*)-propyl-(*R*)-cystein (Pam₃Cys)-Baustein eingeführt werden soll.

3.4.2.1 Synthese des Mitogens Pam₃Cys-OH

Die Synthese des Mitogens Pam₃Cys-OH erfolgt in sechs Stufen ausgehend von L-Cystin nach literaturbekannter Strategie.¹⁸² Im ersten Schritt wird L-Cystin **116** durch säurekatalysierte Umesterung mit *tert*-Butylacetat als Lösungsmittel in den Bis-*tert*-butylester **117** überführt. Durch Umsetzung mit FmocOSu und *N*-Methylmorpholin in THF werden anschließend die beiden Aminofunktionen blockiert. Um zu dem *S*-Glycerylcysteinderivat **119** zu gelangen, wird zunächst die Disulfidbrücke mit Zinkpulver reaktiv gespalten. Das intermediär entstandene Thiol wird dann mit (±)-Glycidol unter nucleophilem Angriff am niedriger substituierten Kohlenstoffzentrum regioselektiv zum gewünschten Thioether umgesetzt.

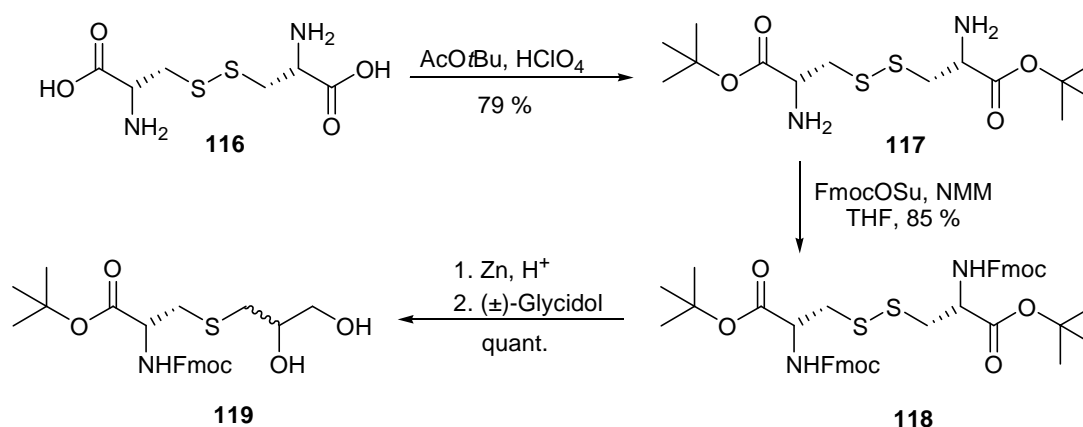


Abb. 3.69: Synthese des *S*-Glycerylcysteinderivates **119**

Dieser wird in THF gelöst, um die freien Hydroxylfunktionen unter *Steglich*-Bedingungen mit Palmitinsäure zu funktionalisieren. Durch Behandlung mit 50%iger Morpholinlösung in DMF wird die Fmoc-Schutzgruppe gespalten. Die erhaltene freie Aminofunktion wird ebenfalls mit Palmitinsäure unter Verwendung von TBTU/HOBt als Kupplungsreagenzien acyliert. Die acidolytische Spaltung des *tert*-Butylesters liefert schließlich den gewünschten Mitogenbaustein **122**.

¹⁸² F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hamalainen, M. C. Feiters, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989

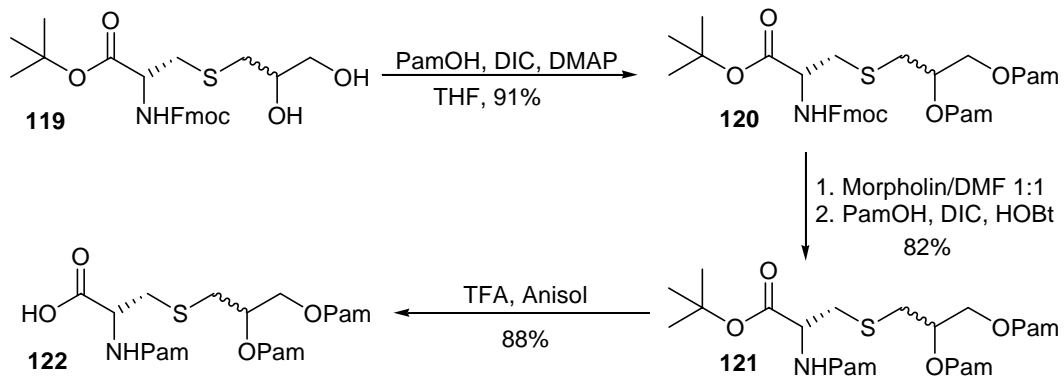
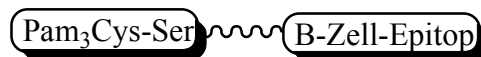


Abb. 3.70: Synthese von Pam₃Cys-OH **122**

3.4.2.2 Synthese von Mitogenkonjugaten

Es soll nun versucht werden vollsynthetische Konjugate aus tumorassoziierten Glycopeptiden und Pam₃Cys als Mitogen darzustellen. Die Synthese sollte Idealerweise in einer automatisierten Festphasensynthese durchgeführt werden, wobei die Einführung des *N*-terminalen Mitogens den letzten Syntheseschritt darstellt.



3.4.2.3 Synthesestrategie

Zur Synthese des Heterotop-Konjugates wurde als B-Zell-Epitop eine Partialesequenz der Wiederholungseinheit von MUC1, bestehend aus 16 Aminosäuren gewählt. Dieser Ausschnitt enthält das mittels Epitopmapping als besonders immunogen identifizierte PDTRP-Motiv.¹⁸³ Das *N*-terminal auf das Motiv folgenden Threonin ist mit dem tumorassoziierten ST_N-Antigen derivatisiert.



Abb. 3.71: B-Zell-Epitop mit PDTRP-Motiv und ST_N-Antigen

Durch Konjugation an das Mitogen Pam₃Cys **122** soll ein Vakzin erhalten werden, welches eine robuste Immunantwort gegen das B-Zell-Epitop induziert. Glycopeptid und Mitogen sollen über den Triethylenglycol-Spacer **35** verbunden werden, um gegenseitige konformationelle Beeinflussungen zu reduzieren. In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass die Acetylschutzgruppen der Kohlenhydrateinheit des ST_N-Bausteins im Anschluss an

¹⁸³ C. Petrarca, A. Rughetti, H. Rahimi, F. D'Agostini, V. Turchi, C. Apollonj Ghetti, G. Scambia, L. Frati, M. Nuti, *Eur. J. Cancer* **1996**, 32A, 2155

die Synthese nicht selektiv gegenüber den Palmitinsäureestern gespalten werden können.¹⁸⁴ Daher wurde versucht, das Schutzgruppenmuster des ST_N-Antigens schon vor dem Einbau in das Glycopeptid diesbezüglich anzupassen. Die basenlabilen Acetylschutzgruppen wurden durch säurelabile *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppen ersetzt, die unter den Bedingungen zur Abspaltung des Glycopeptides vom Harz zusammen mit den Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren entfernt werden können. Bei dem so erhaltenen Glycopeptid müsste lediglich der Benzylester reaktiv gespalten werden um zur gewünschten Zielstruktur zu gelangen. Das Problem der Spaltung der Palmitinsäureester unter den basischen *Zemplén*-Bedingungen wäre somit umgangen. Es fanden sich jedoch keine Bedingungen, unter denen die *tert*-Butylesterschutzgruppe der Carbonsäure orthogonal zu den *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppen gespalten werden konnte. Aus diesem Grund wurde ein anderer Weg eingeschlagen, um das Problem der mangelnden Stabilität der Palmitinsäureester gegenüber den basischen *Zemplén*-Bedingungen zu umgehen. Hierbei sollen die Acetylschutzgruppen schon am polymeren Träger gespalten werden bevor das Mitogen **122** angeknüpft wird. Die Bildung der Amidbindung zwischen Glycopeptid und Pam₃Cys findet dann in Gegenwart der freien Hydroxylgruppen des Kohlenhydrates statt. Hierzu wird folgendermaßen verfahren. Die Partialsequenz des MUC1-Glycoproteins wird aufgebaut und mit dem Triethylenglycolspacer **35** sowie der Aminosäure Serin verknüpft. Die Synthese erfolgt ausgehend von dem mit Fmoc-Alanin vorbeladenen HMPB-BHA-Polystyrol-Harz **123** durch sequenzielle Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren nach dem beschriebenen Standardprotokoll in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Die glycosylierte Aminosäure **29** an Position 14 wird in einem Überschuss von lediglich zwei Äquivalenten eingesetzt. Die Aktivierung der Carboxyfunktion dieses Aminosäurebausteins erfolgt mit Hilfe der reaktiveren Reagenzienkombination HATU/HOAt in Verbindung mit *N*-Methylmorpholin (NMM). Aufgrund des geringen Überschusses und des größeren sterischen Anspruches der Aminosäure wird die Reaktionszeit auf 5 h verlängert. Die Verwendung von NMM anstelle von DIPEA vermindert das Racemisierungsrisiko. Die beiden auf den sterisch anspruchsvolleren ST_N-Baustein folgenden Aminosäuren werden in einer Doppelkupplung angeknüpft, die Kupplung des Linkers und von Serin erfolgt wieder vollautomatisch entsprechend dem Standardprotokoll. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wird abgespalten und das Harz in ein *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt. Die Spaltung der Acetylschutzgruppen an der Kohlenhydrateinheit erfolgt durch Behandlung des festphasengebundenen Glycopeptides mit Natriumbenzylat in Benzylalkohol/Dioxan 1:1. Anschließend wird Pam₃Cys **122** in Gegenwart der freien Hydroxylgruppen mit der Aminofunktion des terminalen Serins verknüpft. Die Aktivierung der Carboxyfunktion des Mitogenbausteins erfolgt mit Hilfe der reaktiven Reagenzienkombination HATU/HOAt in Verbindung mit

¹⁸⁴ T. Becker, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2006

N-Methylmorpholin (NMM) als Base. Aufgrund eines lediglich fünffachen Überschusses und des größeren sterischen Anspruches des Bausteins wird die Reaktionszeit auf 48 h verlängert.

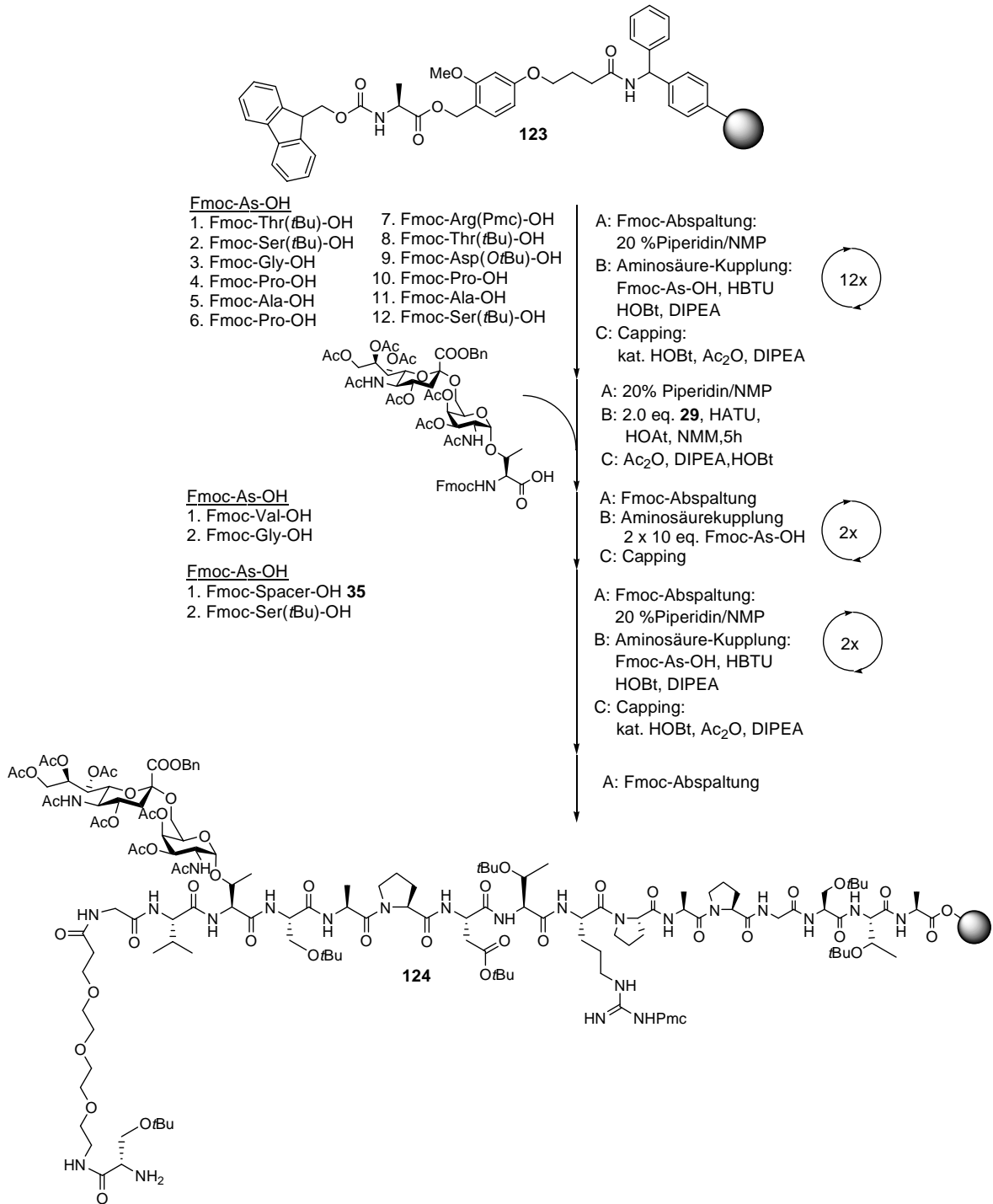


Abb. 3.72: Festphasensynthese des Glycopeptides

Durch Behandlung mit einer Emulsion aus Trifluoressigsäure und den Kationenscavengern Triisopropylsilan und Wasser wird das Konjugat acidolytisch vom Harz gespalten. Im gleichen Reaktionsschritt werden sämtliche säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen entfernt.

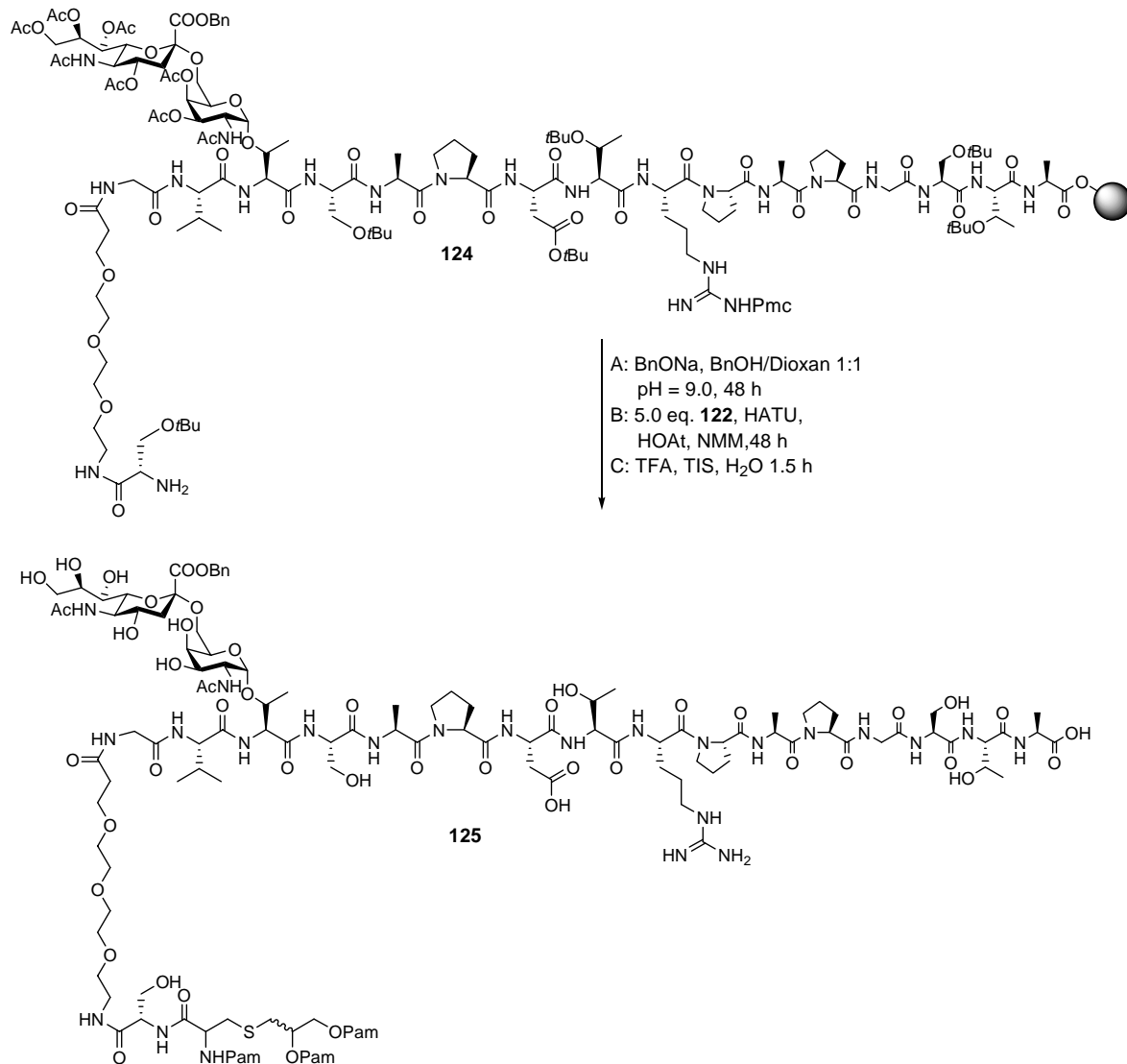


Abb. 3.73: Deacetylierung, Kupplung und Abspaltung des Mitogenkonjugates **125**

In der Abspalllösung kann das erhaltene Produkt **125** massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Eine Reinigung des Produktes mittels RP-HPLC sowohl an C18- als auch an C4-Säulen ist nicht möglich.

3.4.3 Synthese eines Heterotop-Konjugates aus einem Glycoprotein und einem universellen T-Zell-Epitop

Eine weitere Methode zur Verstärkung der Immunogenität ist die Darstellung eines Heterotop-Konjugates, bestehend aus einem B-Zell- und einem T-Zell-Epitop. Das tumorassoziierte Antigen, hier eine glycosylierte Sequenz aus der Wiederholungseinheit von MUC1, fungiert als B-Zell-Epitop, welches mit einem Tetanustoxoidprotein konjugiert wird. Die B-Zelle erkennt und bindet die untypisch glycosylierte MUC1-Sequenz, nimmt das ganze Konjugat auf und präsentiert die Toxoidpeptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen an der Oberfläche. T-Helferzellen, die aufgrund früherer Impfungen gegen Tetanus gebildet wurden, erkennen den Komplex auf der B-Zell-Oberfläche und initiieren durch Aktivierung der B-Zelle die Produktion von Antikörpern gegen das B-Zell-Epitop.



Abb. 3.74: Heterotop-Konjugat

3.4.3.1 Synthesestrategie

Als B-Zell-Epitop wurde wieder die bereits unter Kapitel 3.4.2.3 beschriebene Partialsequenz der Wiederholungseinheit von MUC1 gewählt. Durch Konjugation an eine Teilsequenz des Tetanustoxins soll ein vollsynthetisches Vakzin erhalten werden, welches eine kräftige Immunantwort gegen das MUC1-Glycopeptid induziert. Die Tetanustoxin-Teilsequenz besteht aus 15 Aminosäuren und enthält die als universelles T-Zell-Epitop identifizierte Aminosäureabfolge YSYFPSV, die in der Lage ist, mit vielen unterschiedlichen HLA-Allelen zu interagieren.¹⁸⁵ Beide Epitope sollen über den flexiblen, nicht immunogenen Triethylenglycol-Spacer **35** verbunden werden, um gegenseitige konformationelle Beeinflussungen zu reduzieren.

3.4.3.2 Synthese des Heterotopkonjugates

Die Synthese des Heterotop-Konjugates erfolgt ausgehend von mit Fmoc-Alanin vorbeladenen HMPB-BHA-Polystyrol-Harz **123** durch sequenzielle Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren nach dem beschriebenen Standardprotokoll in einer Ansatzgröße von 0.1 mmol. Zur Kupplung des ST_N-Bausteins wird, wie im vorhergehenden Unterkapitel beschrieben, verfahren. Die beiden auf den sterisch anspruchsvolleren

¹⁸⁵ 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

ST_N-Baustein folgenden Aminosäuren werden in einer Doppelkupplung angeknüpft, die Kupplung des Linkers und der folgenden 15 Fmoc-Aminosäuren erfolgt wieder vollautomatisch entsprechend dem Standardprotokoll.

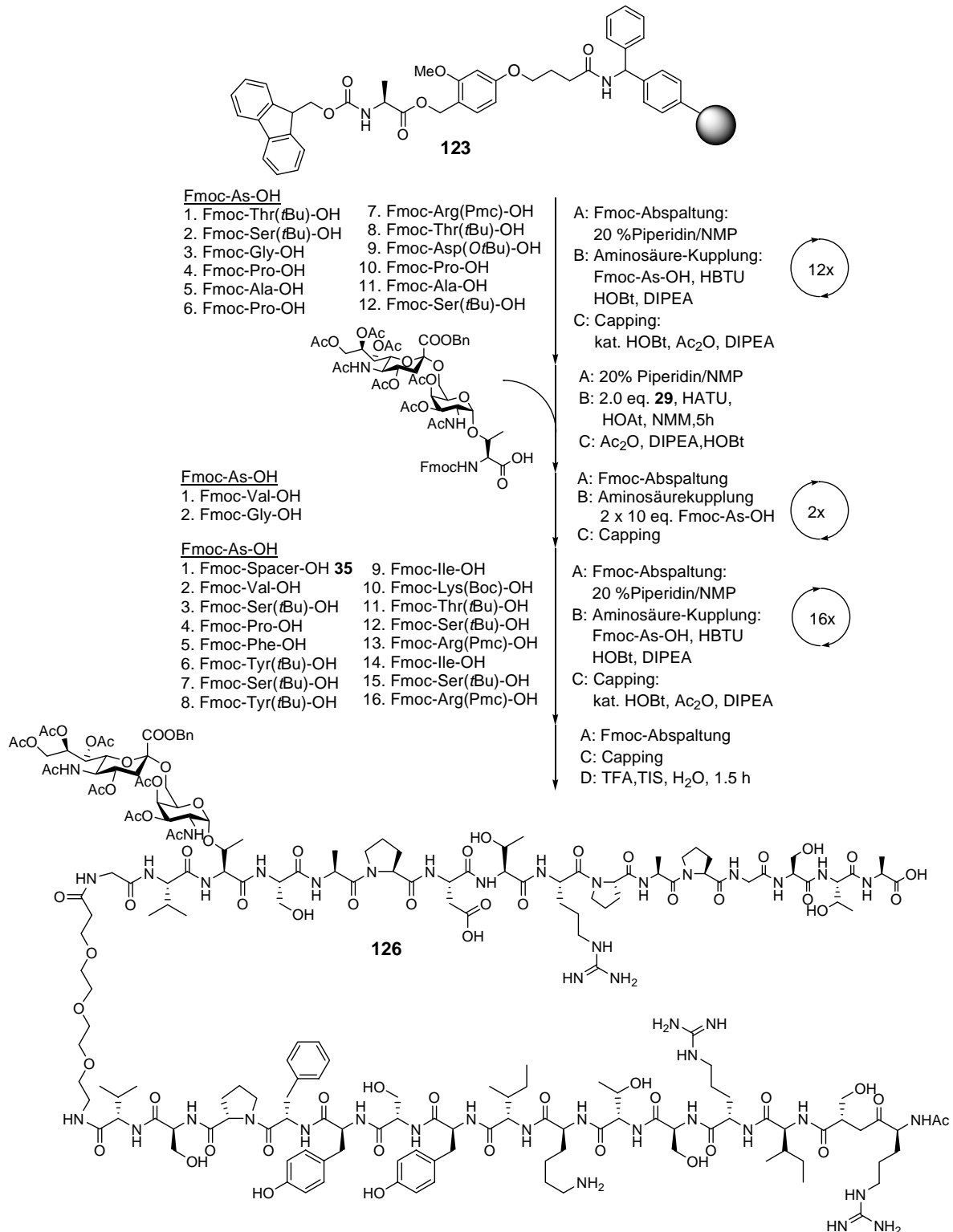


Abb. 3.75: Festphasensynthese des Heterotopkonjugates

Nach beendeter Synthese wird das Harz in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und durch Behandlung mit einer Emulsion aus Trifluoressigsäure und den Kationenscavengern Triisopropylsilan und Wasser vom Harz gespalten. Simultan werden hierbei sämtliche säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen entfernt. Das in TFA gelöste Produkt wird durch Kodestillation mit Toluol im Feinvakuum von Lösungsmitteln befreit, mit Diethylether ausgefällt, durch präparative RP-HPLC gereinigt und anschließend lyophilisiert. Das aus 31 Aminosäuren sowie dem Spacer bestehende Produkt **126** wird in einer Gesamtausbeute von 58 % über 63 Stufen erhalten. Dies entspricht einem mittleren Umsatz von über 99 % je Arbeitsschritt. Die bei der UV-spektroskopischen Reaktionskontrolle beobachteten konstanten Werte zeigen ebenfalls, dass während der Festphasensynthese keine Probleme z. B. durch Rückfaltung oder Diketopiperazinbildung auftraten. Um zum vollständig deblockierten Zielmolekül zu gelangen, müssen noch die Schutzgruppen der Kohlenhydrateinheit des ST_N-Bausteins entfernt werden. Im ersten Schritt wird die Benzylester-Schutzgruppe der Neuraminsäure durch katalytische Hydrierung an Palladium (10 % auf Aktivkohle) entfernt. Der Reaktionsverlauf wird durch analytische HPLC verfolgt. Nach 60stündiger Reaktionszeit ist nur noch das debenzylierte Produkt nachzuweisen. Zur Spaltung der Acetylschutzgruppen wird das Rohprodukt in Wasser gelöst, durch Zusatz katalytischer Mengen einer 1 N Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 9.0 eingestellt und 48 Stunden gerührt. Nach vollständigem Umsatz wird die Lösung mit Essigsäure neutralisiert und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Nach Gefriertrocknung erhält man das Heterotop-Konjugat **127** in einer 44%igen Ausbeute über zwei Stufen.

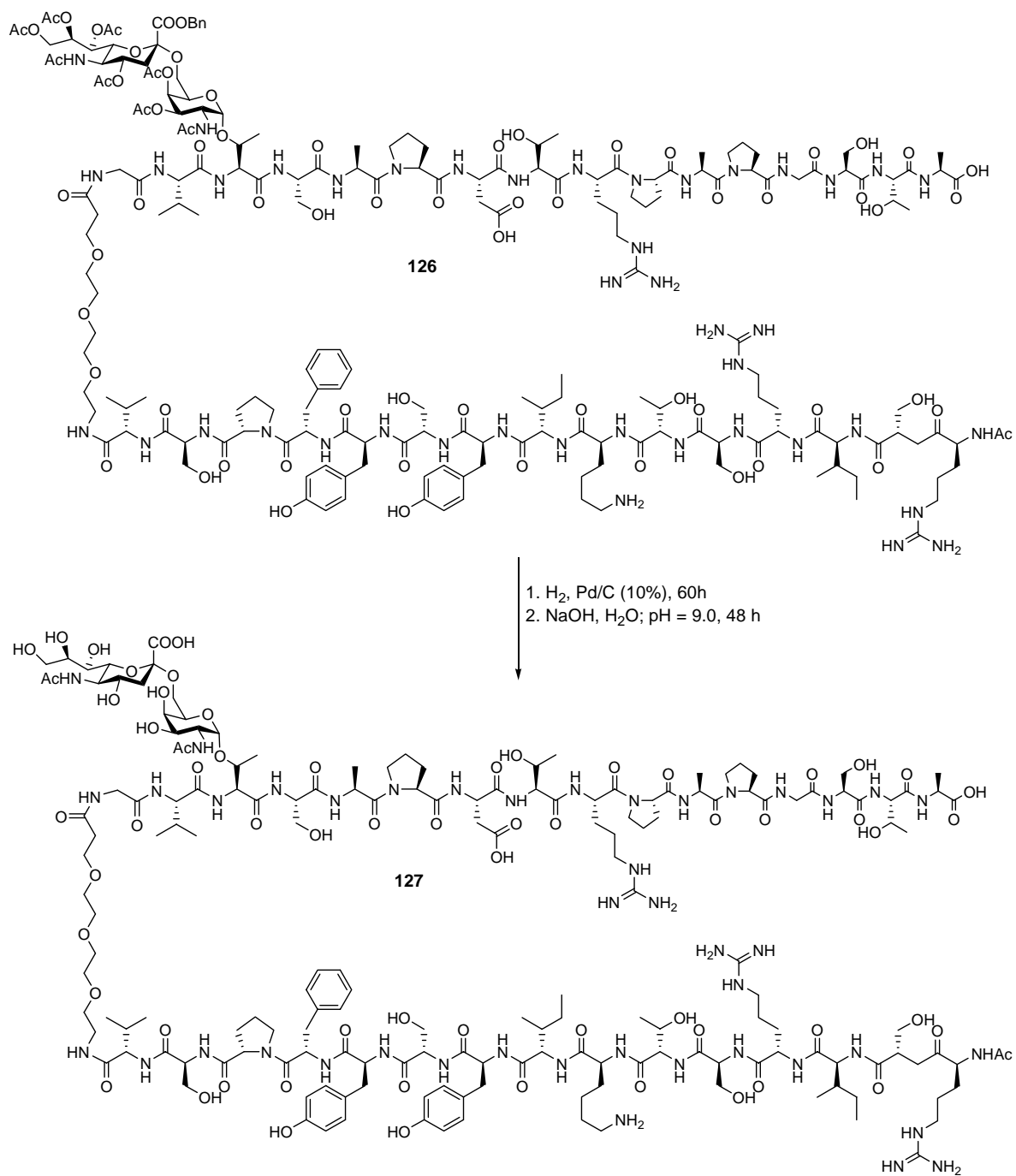


Abb. 3.76: Vollständige Deblockierung zum ST_N-Glycopeptid 127

4 Zusammenfassung

Festphasenoligosaccharidsynthesen

Um den mit der Synthese der Saccharidbausteine verbundenen Zeitaufwand zu reduzieren, sollten festphasenunterstützte, leicht automatisierbare Strategien entwickelt werden. Das Ziel war, durch Optimierung von Schutzgruppenmanipulationen und Glycosylierungsreaktionen Saccharidbausteine zu finden, die sich in besonderer Form zur Anwendung am polymeren Träger eignen. Für die Optimierungen ist es notwendig, über Analysetechniken zu verfügen, die eine quantitative Verfolgung des Reaktionsablaufes erlauben. Dies ist zum Beispiel durch Bestimmung der Konzentration an freien Amino- bzw. Hydroxylgruppen möglich. Die Menge freier Aminogruppen am polymeren Träger wurde über die bereits etablierte Methode der Titration mit Pikrinsäure ermittelt. Zur Bestimmung der Konzentration freier Hydroxylgruppen wurde eine einfache und effiziente Reaktionsabfolge gefunden, die eine UV-spektroskopische Analyse erlaubt. Dazu werden die freien Hydroxylgruppen mit Fmoc-geschütztem Glycin funktionalisiert, die Fmoc-Schutzgruppe anschließend mit Morpholin gespalten, und die Konzentration des entstehenden Dibenzofulven-Morpholin-Adduktes in der Abspaltung UV-spektroskopisch bestimmt.

Die Festphasenreaktionen wurden an mit 1% Divinylbenzol quervernetztem Polystyrolharz sowie an Tentagel-Harz durchgeführt. Zur Verknüpfung zwischen Kohlenhydrat und polymerem Träger kamen der PTMSE-Anker, ein *p*-Alkoxybenzylanker und zwei verschiedene Alkylthioanker zum Einsatz.

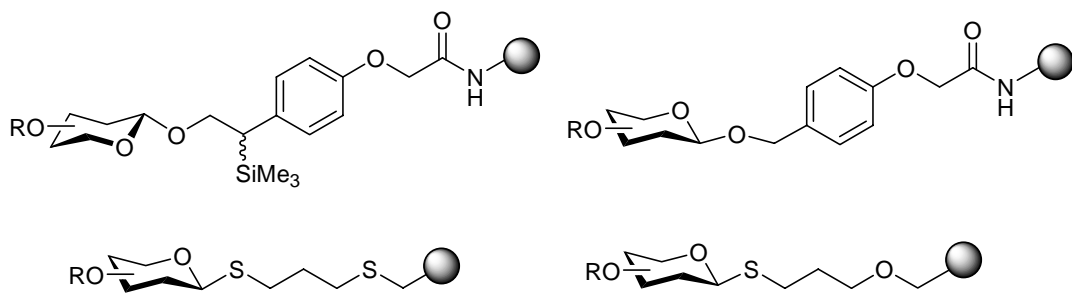


Abb. 4.1: In Festphasensynthesen verwendete Ankersysteme

Die Bedingungen zur Anknüpfung der mit Carboxylgruppen ausgestatteten Anker über Amidbindungen an das Harz, zur Spaltung der Lävulinoylschutzgruppe, sowie zur reduktiven Öffnung der Benzylidenacetalschutzgruppe wurden optimiert, sodass sich diese Reaktionen nun in sehr hohen Ausbeuten am polymeren Träger durchführen lassen.

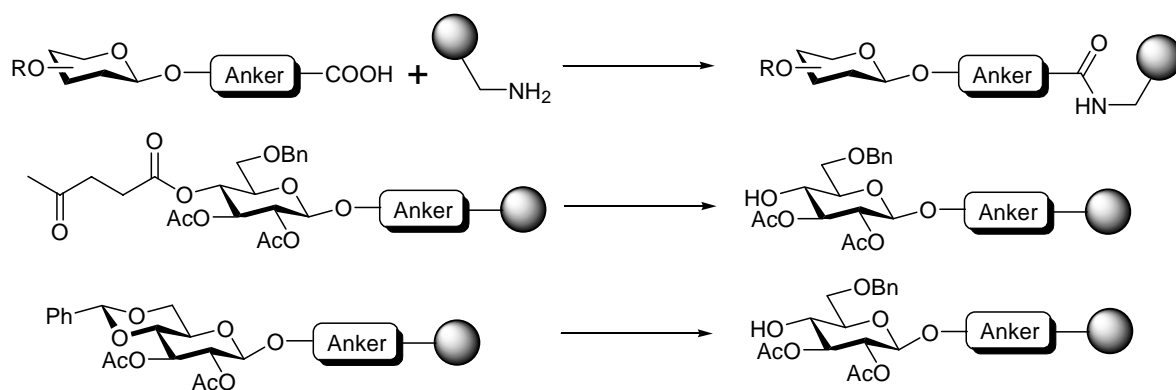


Abb. 4.2: Zur Anwendung am polymeren Träger optimierte Reaktionen

Bei anderen Reaktionstypen, wie z. B. der *Zemplén*-Umesterung und der Acetylierung freier Hydroxylgruppen konnten die in homogener Phase angewandten Bedingungen ohne große Variation direkt auf Synthesen an der festen Phase übertragen. Speziell Glycosylierungsreaktionen zeigten jedoch erhebliche Kompatibilitätsprobleme mit der polymeren Matrix. Verschiedene Lösungsmittel, Trägermaterialien, Akzeptoren, Reaktionsbedingungen, Ankersysteme, Glycosyldonoren (Trichloracetimide, Thioglycoside, Glycosylhalogenide) und Promotoren wurden untersucht, ohne dass in einem System akzeptable Umsätze erzielt werden konnten. Mehrere Ursachen können hierfür verantwortlich gemacht werden. So wird der sterische Anspruch der ohnehin gehinderten Kohlenhydrate durch Anbindung an das Trägermaterial weiter erhöht, was zu einer Verringerung von Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute führen kann. Außerdem könnte das Oxocarbeniumion infolge der hydrophoben Umgebung in Polystyrolharzen bzw. wegen Wechselwirkungen mit den Polyethylenglycolketten des Tentagelharzes am produktiven Zusammentreffen mit dem Akzeptor gehindert werden. Aus diesen Gründen reagieren möglicherweise lediglich die Akzeptoren an der Oberfläche der Harzkugeln ausreichend schnell mit dem Glycosyldonor zum gewünschten Produkt. Insgesamt lagen die Ausbeuten aller an der festen Phase durchgeführten Glycosylierungen bei maximal 5 Prozent, in den meisten Fällen jedoch darunter. Aufgrund dieser niedrigen Ausbeuten war es nicht möglich über festphasenunterstützte Reaktionen größere Mengen an Kohlenhydratbausteinen für die geplanten Glycopeptidsynthesen zu gewinnen. Für die weiteren Glycopeptidsynthesen werden daher die mittels Standardverfahren in der homogenen Phase gewonnenen Kohlenhydratantigene verwendet.

Glycopeptidsynthesen

Tumorzellen unterscheiden sich von gesunden Zellen unter anderem durch ein verändertes Profil an Oberflächenglycoproteinen. So ist das membranständige Glycoprotein MUC1 in malignen Epithelzellen stark überexprimiert und zeigt infolge veränderter Aktivitäten mehrerer Glycosyltransferasen ein modifiziertes Glycosylierungsmuster. Diese charakteristisch verkürzten, frühzeitig sialylierten Oligosaccharidketten stellen selbst immunogene Strukturen dar und führen zudem zu einer Freilegung von in gesunden Zellen abgeschirmten Sequenzen des Proteingerüsts. Das freigelegte Peptid kann dadurch ebenfalls zu einem Angriffspunkt für das Immunsystem werden. Diese tumorspezifischen Strukturveränderungen stellen einen interessanten Angriffspunkt zur Entwicklung von Antitumorstoffen dar. Um zu potentiellen Impfstoffen zu gelangen, ist es jedoch nötig, die Immunogenität der selbst nur schwach immunogenen Glycopeptide durch Konjugation zu erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vollsynthetische Konjugate, auf Basis einer 16 Aminosäuren langen, tumorassoziierten Glycopeptidpartialstruktur aus dem MUC1, zur möglichen Verwendung als Antitumorstoffe synthetisiert werden. Die Darstellung erfolgte durch eine automatisierte Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie. Das Saccharidantigen wurde in Form des glycosylierten Aminosäurebausteins anstelle des *N*-terminal das immundominante Peptidepitop *PDTRP* flankierenden Threonins in die MUC1-Peptidsequenz integriert.

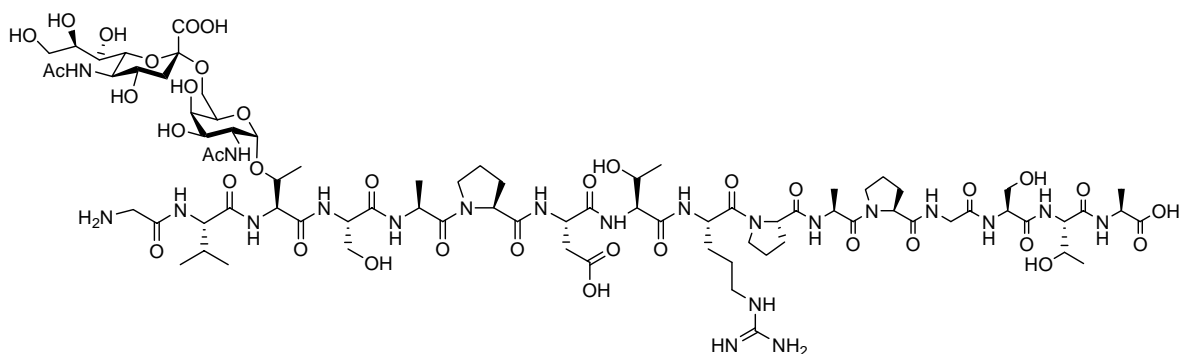


Abb. 4.3: Tumorassoziierte Glycopeptidpartialstruktur aus MUC1

Zur Steigerung der Immunogenität wurde das glycosylierte Hexadecapeptid über einen nicht immunogenen Spacer mit einem T-Zell-Epitop aus dem Tetanustoxoidprotein sowie mit einem Mitogen verknüpft. Die von dem Tetanustoxoid stammenden Peptidfragmente vermitteln nach Präsentation über MHC-II-Komplexe die Aktivierung der B-Zelle durch

spezifische T-Helferzellen. Das Mitogen, hier das mit Serin verknüpfte *N*-Palmitoyl-*S*-(2,3-bispalmitoyloxy-(2*R*,*S*)-propyl)-(*R*)-cystein (Pam₃Cys), vermag über Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) eine T-Zell-unabhängige Aktivierung der B-Zelle auszulösen.

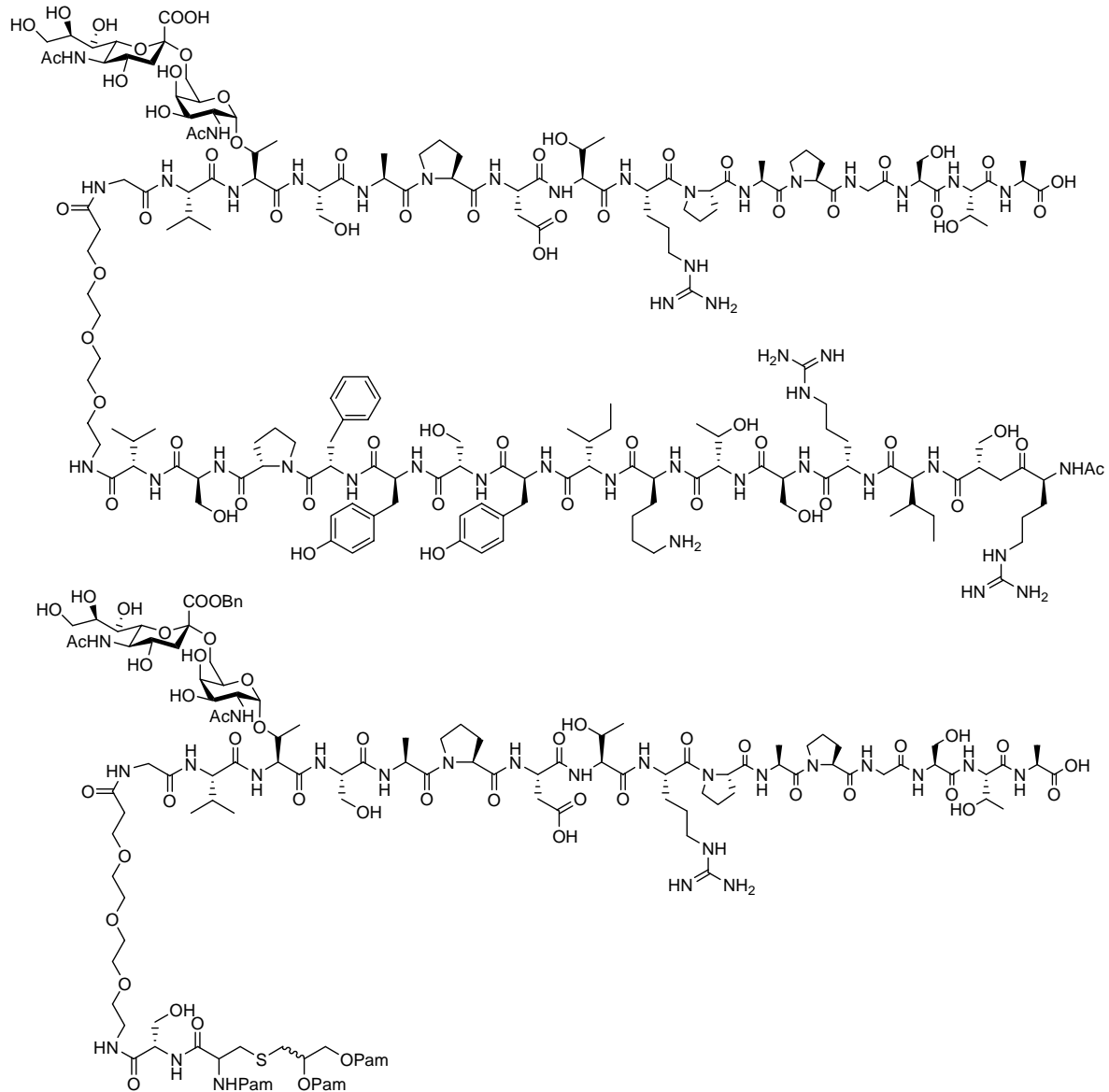


Abb. 4.4: MUC1-Heterotopkonjugate

Zur Synthese des Mitogenkonjugates sind noch Optimierungen im Syntheseablauf und insbesondere bei der Reinigung notwendig. Die immunologische Evaluierung des MUC1-Tetanustoxin-Heterotopkonjugates als mögliches Antitumorvakzin ist geplant.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

Soweit im Einzelnen nicht näher spezifiziert, wurden alle Reaktionen bei Raumtemperatur unter Rühren durchgeführt. Alle mit „i. Vak.“ oder „i. Feinvak.“ bezeichneten Destillationen wurden – sofern nicht anders vermerkt – bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C ausgeführt.

Die bei den Summenformeln in runden Klammern () angegebenen Molmassen beziehen sich auf die natürliche Isotopenverteilung, die Zahlenwerte in den Massenspektren sowie in eckigen Klammern [] auf die Massen der häufigsten Isotope ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{23}Na , ^{32}S , ^{35}Cl und ^{39}K .

Dünnschichtchromatographie:

Für die dünnschichtchromatographische Analysen wurden mit *Kieselgel 60 F₂₅₄* beschichtete Aluminium-Fertigplatten der Firma *Merck*, Darmstadt (Deutschland), verwendet. Die Chromatogramme wurden zunächst unter der UV-Lampe auf Fluoreszenzlöschung untersucht. Anschließend wurden die DC-Platten durch Einwirkung von Iod-Dämpfen in einer mit Iod-Kristallen versehenen DC-Entwicklungskammer oder durch Eintauchen in eines der folgenden Färbereagenzien und Erhitzen mit einem Heißluftfön entwickelt.

Verwendete Färbereagenzien:

- *Ninhydrin-Reagenz*: Lösung von 1.5 g Ninhydrin in einer Mischung aus 15 ml Essigsäure und 15 ml Methanol;
- *Seebach-Reagenz*: Lösung aus 1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 2.5 g Molybdato-phosphorsäure in einer Mischung aus 94 ml dest. Wasser und 6 ml konz. Schwefelsäure;
- *Zuckerreagenz*: 1:1 (v/v) Mischung aus 1 M ethanolischer Schwefelsäure und 0.2%iger ethanolischer 3-Methoxyphenol-Lösung;
- *Kaliumpermanganat-Lösung*: Lösung von 1.0 g Kaliumpermanganat und 5.0 g Natriumcarbonat in 250 ml Wasser.

Lösungsmittel:

Sofern nicht anders beschrieben, wurden Lösungsmittel der Qualitätsstufe p.a., *pro analysi*, verwendet. Die absolutierten Lösungsmittel wurden nach üblichen Verfahren getrocknet und frisch destilliert eingesetzt.^{186,187}

Flashchromatographie:

Säulenchromatographische Trennungen wurden nach dem Verfahren der Flashchromatographie durchgeführt.¹⁸⁸ Als Säulenmaterial wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 40-75 μm der Firma *Acros Organics*, Geel (Belgien), verwendet. Die Menge an verwendetem Kieselgel sowie die Laufmittelgemische sind bei den einzelnen Verbindungen angegeben. Die Zusammensetzung der Laufmittelgemische wird stets in Volumenverhältnissen (v/v) notiert.

Die **Schmelzpunkte** wurden mit einer Apparatur nach *Dr. Tottoli* der Firma *Büchi*, Flawil (Schweiz), bestimmt und sind nicht korrigiert.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem Polarimeter 241 der Firma *Perkin-Elmer*, Wellesley (USA), bei den Wellenlängen $\lambda = 546 \text{ nm}$ und $\lambda = 578 \text{ nm}$ (Quecksilberdampfampe) mit einer 1 dm langen Polarimeterzelle bestimmt und die gemessenen Drehwerte auf die Natrium-D-Linie ($\lambda = 589 \text{ nm}$) extrapoliert. Die verwendeten Lösungsmittel und Konzentrationen (g/100 ml, Lösungsmittel) sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt. Auf die Angabe der Einheit des spezifischen Drehwertes (deg ml/g dm) wird im Folgenden verzichtet.

Massenspektrometrie:

- FD-Massenspektren wurden mit einem *Finnigan-MAT-95*-Spektrometer der Firma *ThermoElectron*, Boston (USA), gemessen.
- ESI-Massenspektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:
Gerät 1: Navigator-Instrument der Firma *ThermoElectron*, Boston (USA), bei Verwendung von Acetonitril-Wasser-Gemischen als Lösungsmittel, einer Probenkonzentration von 0.1 mg/ml, einer Flussrate von 0.75 ml/min, einer Cone Voltage von 35-70 V und einem N_2 -Strom von 300 l/h.

¹⁸⁶ D. D. Perrin, E. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, Vol. 3rd ed. Pergamon Press, Oxford, 1988

¹⁸⁷ J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis der Organischen Chemie*, VCH, Weinheim, 1996

¹⁸⁸ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* 1978, 43, 2923

Gerät 2: Micromass-Q-TOF-Ultima-3-Spektrometer der Firma *Waters*, Milford (USA), bei Verwendung von Acetonitril-Wasser-Gemischen als Lösungsmittel, einer Probenkonzentration von 0.1 mg/ml, einer Flussrate von 5 μ l/min und einer Cone Voltage von 70-80 V.

- Hochauflösende ESI-Massenspektren (HR-ESI) wurden mit Gerät 2 aufgenommen, wobei hier zur Kalibrierung eine Lösung von 400 mg Natriumiodid und 10 mg Cäsiumiodid in 400 ml eines Wasser-Isopropanol-Gemischs (v/v, 1:1) zum Einsatz kam. Der Gerätehersteller garantiert eine Genauigkeit von mindestens 5 ppm bezogen auf die Differenz von gemessener zur berechneten Masse geteilt durch die berechnete Masse. Die bei den Spektren angegebenen Werte der gemessenen und berechneten Molekülmassen beziehen sich auf die Neutalmoleküle, obwohl die Molekülkationen angegeben sind. Das Gerät ist so kalibriert, dass die Masse des Elektrons von 0.000549 u berücksichtigt wird.
- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Tofspec E-Gerät der Firma *Micromass*, Manchester (UK), bzw. einem *Bruker* Time-of-flight REFLEX-Spektrometer gemessen. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. Dabei kam ein Stickstofflaser mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 337$ nm zum Einsatz. Die angegebenen Messwerte geben den Schwerpunkt der Einhüllenden aller Isotopenpeaks an.

Elementaranalyse:

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

NMR-Spektroskopie:

Die NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma *Bruker*, Ettlingen (Deutschland), aufgenommen:

- Bruker AC-300: 300 MHz- 1 H-NMR und 75.5 MHz- 13 C-NMR
- Bruker AM-400: 400 MHz- 1 H-NMR und 100.6 MHz- 13 C-NMR
- Bruker AC-400: 400 MHz- 1 H-NMR und 100.6 MHz- 13 C-NMR

Die durchgeführten NMR-Experimente sowie die verwendeten Lösungsmittel sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt. Zur Kennzeichnung der Multiplizität wurden folgende Abkürzungen genutzt:

s	Singulett	ddt	Duplett vom Duplett vom Triplet
s _b	breites Singulett	t	Triplet
d	Duplett	q	Quartett
dd	Duplett vom Duplett	m	Multiplett
dt	Duplett vom Triplet	m _c	zentriertes Multiplet

Die angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als Standard ($\delta = 0$ ppm). Zur Angabe der Interpretation der ^1H - und ^{13}C -Signale wurden die Atome der Saccharid-Bausteine in den Kupplungsprodukten mit folgenden Abkürzungen bezeichnet:

D-Glucose: Glc D-Galactose: Gal Sialinsäure: Sia

Die Benennung der Aminosäure-Bausteine sowie die Nummerierung der ^1H - und ^{13}C -Signale folgen der IUPAC-Empfehlung von 1983.¹⁸⁹

HR-MAS-NMR-Spektroskopie wurde in 4 mm MAS-Rotoren durchgeführt. Dazu wurde der Rotor mit etwa einem Milligramm der Probe befüllt, und anschließend durch drei Tropfen des deuterierten Lösungsmittels gequollen. Es wurden Rotoren der Firma *Bruker Analytik GmbH*, Karlsruhe (Deutschland), verwendet die durch Einsatz entsprechender Spacer ein sphärisches Probevolumen aufweisen. Die Spektren wurden an dem mit einer kommerziellen MAS-Einheiten ausgestatteten Bruker DRX-700-NMR-Spektrometer aufgenommen.

Analytische und präparative RP-HPLC:

Die analytische HPLC wurde mit einer MaxiStar-K1000- bzw. einer Maxistar-K1001-Gradienten-Pumpe, einem Vierkanal-Entgaser sowie einem Diodenarraydetektor DAD K2800 unter Verwendung der Software *ChromGate* der Firma *Knauer*, Berlin (Deutschland), durchgeführt. Es wurde eine RP-Trennsäule der Marke Luna[®] C₁₈(2) (5 μm , 250 x 4.6 mm) der Firma *Phenomenex*, Torrance (USA), verwendet.

Präparative RP-HPLC-Trennungen wurden unter Verwendung zweier Ministar-K500-Pumpen in Hochdruckgradientenschaltung in Verbindung mit einer präparativen Mischkammer sowie einem variablen Wellenlängenmonitor der Firma *Knauer*, Berlin (Deutschland), durchgeführt. Hierbei kam eine RP-Trennsäule der Marke Luna[®] C₁₈(2) (10 μm , 250 x 50 mm) der Firma *Phenomenex*, Torrance (USA), zum Einsatz.

¹⁸⁹ International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry, *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 595

Die Flussraten für analytische RP-HPLC-Trennungen betragen 1 ml/min und für präparative RP-HPLC-Trennungen 20 ml/min. Als Eluenten wurden Wasser-Acetonitril-Gemische verwendet, denen – sofern vermerkt – 0.1 % Trifluoressigsäure zugesetzt wurden. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch ca. eine halbe Stunde im Ultraschallbad entgast. Das Wasser wurde einem Simplicity-185-Wasseraufbereitungssystem der Firma *Millipore*, Billerica (USA), entnommen und das verwendete Acetonitril in HPLC-Qualität bei *Fisher Scientific*, Hampton (USA; in Deutschland: Schwerte), erworben. Die Detektion erfolgte durch UV/VIS-Absorption über einen Wellenlängenbereich von 200 nm bis 500 nm (analytische RP-HPLC) bzw. bei einer Wellenlänge von 214 nm (präparative RP-HPLC).

pH-Werte:

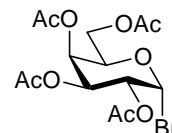
Zur pH-Kontrolle wurden die nicht blutenden Indikatorstäbchen *Acilit*[®] (pH 0-6.0), *Neutralit*[®] (pH 5.0-10.0) und *Alkalit*[®] (pH 7.5-14) der Firma *Merck*, Darmstadt (Deutschland), verwendet. Bei Reaktionen in organischen Lösungsmitteln wurden die zuvor mit Wasser befeuchteten Indikatorstäbchen mit einem Tropfen der Lösung benetzt. Die angegebenen pH-Werte sind nur für wässrige Lösungsmittelsysteme genau. In organischen Lösungsmitteln dienen sie nur der Reproduzierbarkeit der Reaktion, da keine Kalibration durchgeführt wurde.

Festphasenpeptidsynthesen wurden mit einem ABI-433A-Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems*, Foster City (USA; in Deutschland: Weiterstadt) durchgeführt. Zur Verfolgung der Fmoc-Abspaltung kam ein Series-200-UV/VIS-Detektor der Firma *PerkinElmer*, Wellesley (USA), zum Einsatz. Die eingesetzten Aminosäuren sowie die Kupplungsreagenzien lieferten die Firmen *Novabiochem*, Läfelfingen (Schweiz) und *Orpegen*, Heidelberg. *N*-Methylpyrrolidin-2-on wurde von *IRIS Biotech*, Marktredwitz (Deutschland), und *N,N'*-Dimethylformamid von der Firma *Roth*, Karlsruhe (Deutschland), erworben.

5.2 Synthese der Festphasenbausteine

5.2.1 Synthese des ST_N-Antigens

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid (2)⁷⁶

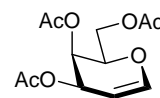


Ein mit KPG-Rührer und Innenthermometer ausgestatteter 1l-Dreihalskolben wird mit 275 ml Essigsäureanhydrid befüllt, auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise mit 1.6 ml 70%iger Perchlorsäure versetzt. Man lässt die Lösung auf Raumtemp. erwärmen, und gibt 67 g (0.37 mol) D-Galactose portionsweise zu, so dass die Reaktionstemperatur zwischen 30 °C und 40 °C gehalten werden kann. Nach vollständiger Acetylierung (DC-Kontrolle; $R_f = 0.28$ (Toluol/EE 3:2)) wird die Mischung auf 20 °C abgekühlt und bei dieser Temperatur tropfenweise mit 61 ml (176 g, 0.65 mol, 5.3 Äquiv.) PBr₃ und anschließend mit 20 ml Wasser versetzt. Bis zur vollständigen Umsetzung wird 2 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wird zur Hydrolyse vorsichtig in einen mit 500 ml Eiswasser und 250 ml Dichlormethan befüllten 2 l-Erlenmeyerkolben gegossen und kräftig gerührt. Die org. Phase wird abgetrennt, mit 200 ml Eiswasser, fünfmal mit 250 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung, einmal mit 250 ml einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird in wenig Diethylether aufgenommen und durch Zusatz von Petrolether ausgefällt. Man erhält 152 g eines farblosen, amorphen Feststoffs, welcher ohne Reinigung weiter umgesetzt wird.

Ausbeute: 152 g (quant.); farbloser, kristalliner Feststoff; $R_f = 0.58$ (Toluol/EE 3:2).

C₁₄H₁₉BrO₉ (411.2) [410.02].

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (3)¹⁹⁰



Ein mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Innenthermometer ausgestatteter 2-l-Dreihalskolben wird mit 550 ml Wasser und 400 ml Essigsäure befüllt, auf -18 °C abgekühlt und nacheinander mit 150 g (2.3 mol, 6 Äquiv.) Zinkstaub und einer Lösung von 15 g Kupfersulfat in 75 ml Wasser versetzt. Sobald das Zink dunkel wird und die Wasserstoffentwicklung beginnt, gibt man tropfenweise 150 g (0.37 mol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-

¹⁹⁰ F. Shafizadeh, *Methods in carbohydrate Chemistry*, Vol 2., New York, 1963, 409

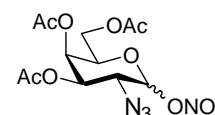
acetyl- α -D-galactopyranosylbromid **2** gelöst in 200 ml Dichlormethan hinzu. Es wird 2 h bei dieser Temperatur gerührt, über *Hyflo* filtriert und mit 200 ml Essigsäure/Wasser (1:1) und 200 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird mit 250 ml Eiswasser und zweimal mit 250 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende gelbliche, hochviskose Öl wird i. Feinvak. destilliert.

Ausbeute: 81.1 g (80 %); farbloses, hochviskoses Öl; Sdp._{0.1 mbar}: 116 °C (Lit.:¹⁹¹ 129 °C (0.2 mbar)); R_f = 0.52 (Toluol/EE 3:2).

C₁₂H₁₆O₇ (272.25) [272.09]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 6.42 (dd, ³J_{H1,H2} = 6.3 Hz, ⁴J_{H1,H3} = 1.7 Hz, 1H, H-1); 5.51 (m_c, 1H, H-3); 5.41-5.35 (m, 1H, H-4); 4.69 (ddd, ³J_{H2,H1} = 6.3 Hz, ³J_{H2,H3} = 2.2 Hz, ⁴J_{H2,H4} = 1.5 Hz, 1H, H-2); 4.33-4.10 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 2.09, 2.05, 1.99 (3s, 9H, CH₃CO-).

3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat
(**4**)⁷⁶

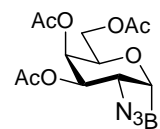


Cer(IV)-ammoniumnitrat (144.0 g, 0.26 mol, 3.0 Äquiv.), das mehrere Tage i. Vak. über Phosphorpentoxid getrocknet wurde und 13.7 g (0.21 mol, 2.4 Äquiv.) i. Feinvak. getrocknetes Natriumazid werden bei -18 °C unter Stickstoff mit absol. Acetonitril versetzt. Zu der intensiv gerührten Suspension tropft man 24 g (0.09 mol) 3,4,6-Tri-O-acetyl-D-galactal **3** gelöst in 300 ml absol. Acetonitril. Man rührt 16 h bei -28 °C. Anschließend gießt man die Reaktionsmischung in eine gut gerührte Mischung aus 500 ml Diethylether und 500 ml Wasser. Die org. Phase wird abgetrennt, mit 200 ml Eiswasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird flashchromatographisch an 750 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 4:1).

Ausbeute: 15.9 g (48 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.61 (Toluol/EE 7:3); R_f = 0.22 (°Hex/EE 4:1).

C₁₂H₁₆N₄O₁₀ (376.28) [376.09]

¹⁹¹ S. Birnbach, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1985

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (7)⁷⁶

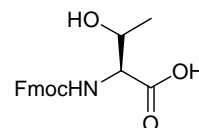
Zu einer Suspension von 23.6 g (272 mmol, 7.25 Äquiv.) trockenem Lithiumbromid in 250 ml absol. Acetonitril gibt man eine Lösung von 14.1 g (37.5 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-D-galactopyranosylnitrat **4** in 80 ml Acetonitril. Das Reaktionsgemisch wird 15 h bei Raumtemp. unter Argonatmosphäre gerührt und anschließend mit 500 ml Dichlormethan verdünnt. Es wird zweimal mit je 250 ml einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Das erhaltene gelbe Öl kann ohne Reinigung weiter umgesetzt werden.

Ausbeute: 14.8 g (quant.); gelbes Öl; $R_f = 0.72$ (Toluol/EE 2:1).

$C_{12}H_{16}N_3O_7Br$ (394.18) [393.04]

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin (9)**⁷⁸

(Fmoc-Thr-OH)

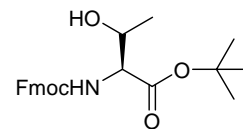


Eine Lösung von 17.7 g (148.5 mmol) L-Threonin und 12.5 g (149 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 800 ml Aceton/Wasser (1:1) wird portionsweise mit 50.1 g (149 mmol) *N*-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyloxy)-succinimid (FmocOSu) versetzt und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit konz. HCl auf pH = 2 angesäuert und das Aceton i. Vak. entfernt. Das Produkt wird dreimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert, die org. Phase je zweimal mit 100 ml 1 N HCl und 100 ml dest. Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in wenig Diethylether aufgenommen und mit Petrolether ausgefällt.

Ausbeute: 49.5 g (quant.); farbloser, kristalliner Feststoff; $R_f = 0.17$ (c Hex/EE 2:1); $[\alpha]_D^{22} = 1.2$ ($c = 1$, CH_2Cl_2).

$C_{19}H_{19}NO_5$ (341.36) [341.13]

300 MHz-¹H-NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] 7.75 (d, $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 2H, H4-, H5-Fmoc); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.0$ Hz, 1H, NH); 7.42-7.20 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.53 (d, $^3J_{NH,CH} = 8.5$ Hz, 1H, NH); 4.39 (d, $^3J_{CH_2,CH} = 6.6$ Hz, 2H, CH₂-Fmoc); 4.30-4.15 (m, 3H, T ^{α} , T ^{β} , -OH); 1.31 (d, $^3J_{T^\alpha,T^\beta} = 6.2$ Hz, 3H, T ^{α}).

N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester*(11)**¹⁹²(Fmoc-Thr-*Ot*Bu)

Eine Mischung aus 110.7 g (537 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 22.6 g (698 mmol) *tert*-Butanol und 1.2 g (12.0 mmol) wasserfreiem Kupfer-(I)-chlorid wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Nach 4 d wird die dunkelgrüne Reaktionsmischung mit 100 ml absol. Dichlormethan verdünnt. Eine Lösung von 55.0 g (161 mmol) Fmoc-Thr-OH **9** in 250 ml absol. Dichlormethan wird innerhalb von 30 min unter Kühlung im Wasserbad zugetropft. Man rührt 90 min, wobei unter ständiger DC-Kontrolle darauf zu achten ist, dass die OH-Gruppe nicht ebenfalls *tert*-butyliert wird. Man filtriert den ausgefallenen *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff ab und wäscht mit eiskaltem Dichlormethan nach. Das Filtrat wird dreimal mit je 50 ml einer NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Zwischenzeitlich ausfallender Harnstoff wird abfiltriert. Der Rückstand wird in wenig Ethylacetat aufgenommen und einige Stunden bei -30 °C aufbewahrt. Hierbei ausfallender Harnstoff wird wieder abfiltriert. Ethylacetat wird anschließend i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 1000 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Toluol/EE 3:1). Das erhaltene Produkt wird in wenig Diethylether aufgenommen und durch Zugabe von Petrolether ausgefällt.

Ausbeute: 32.7 g (55%); farbloser, kristalliner Feststoff; Smp.: 73 °C; R_f = 0.33 (Toluol/EE 4:1); $[\alpha]_D^{22} = -9.7$ (c = 1.0, CHCl₃), Lit.¹⁹²: $[\alpha]_D^{28} = -9.5$ (c = 1.05, CHCl₃).

C₂₃H₂₇NO₅ (397.46) [397.19]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.75 (d, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.4 Hz, 2H, H4-, H5-Fmoc); 7.56 (d, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 6.3 Hz, 2H, H1-, H8-Fmoc); 7.38 (t, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = ³J_{H6,H7} = ³J_{H6,H5} = 7.4 Hz, 2H, H3-, H6-Fmoc); 7.29 (t, ³J_{H1,H2} = ³J_{H2,H3} = ³J_{H7,H8} = ³J_{H7,H6} = 7.4 Hz, 2H, H2-, H7-Fmoc); 5.53 (d, ³J_{NH,CH} = 8.5 Hz, 1H, NH); 4.39 (d, ³J_{CH2,CH} = 6.6 Hz, 2H, CH₂-Fmoc); 4.30-4.15 (m, 3H, T^α, T^β, -OH); 1.47 (s, 9H, *t*Bu); 1.22 (d, ³J_{T^χ,T^β} = 5.9 Hz, 3H, T^χ).

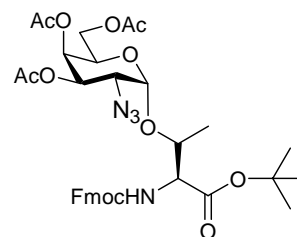
75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.3 (CO), 156.8 (CO-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 82.6 (C(CH₃)₃), 67.2 (CH₂-Fmoc), 59.7 (T^α) 47.2 (C9-Fmoc), 28.1 (C(CH₃)₃), 20.0 (T^γ).

ESI-MS (positiv) m/z: 420.3 ([M+Na]⁺, ber.: 420.3).

¹⁹² G. Braum, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1991.

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (12)¹⁹³**

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-OtBu)



Eine Lösung von 12.8 g (37.5 mmol) Fmoc-Thr-OtBu **11** in 140 ml absol. Dichlormethan und 120 ml absol. Toluol wird zusammen mit 40 g gepulvertem Molekularsieb (4 Å) eine Stunde unter Argon gerührt. Durch Eiskühlung wird die Temperatur der Suspension auf 0 °C abgesenkt, bevor unter Lichtausschluss 14.8 g (53.7 mmol, 1.4 Äquiv.) Silbercarbonat hinzugefügt werden. Die Reaktionsmischung wird anschließend mit einer Lösung von 1.9 g (9.0 mmol, 0.24 Äquiv.) wasserfreiem Silberperchlorat in 60 ml absol. Toluol versetzt. Es wird 30 min bei 0 °C gerührt, bevor innerhalb von 30 min eine Lösung aus 14.8 g (37.5 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid **7** in 300 ml absol. Dichlormethan/Toluol (1:1) zugetropft wird. Nach Erwärmen auf Raumtemp. wird 20 h gerührt. Die gelbe Lösung wird mit 300 ml Dichlormethan verdünnt und über *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wird zweimal mit jeweils 300 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung und zweimal mit je 300 ml einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat werden die Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 500 g Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/EE, 10:1).

Ausbeute: 11.9 g (45 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.52$ (CH₂Cl₂/EE 10:1); $[\alpha]_D^{22} = 65.1$ (c = 1, CHCl₃), Lit.¹⁹³: $[\alpha]_D^{23} = 65.8$ (c = 1, CHCl₃).

C₃₅H₄₂N₄O₁₂ (710.73 g) [710.28]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.76 (d, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.4 Hz, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.61 (d, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 7.4 Hz, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.38 (t, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = ³J_{H6,H7} = ³J_{H6,H5} = 7.4 Hz, 2H, H3-, H6-Fmoc) 7.33-7.25 (m, 2H, H2-, H3-Fmoc), 5.64 (d, ³J_{NH-T α} = 9.6 Hz, 1H, NH-Urethan), 5.45 (d, ³J_{CH2,H9} = 2.6 Hz, 1H, H4), 5.32 (dd, ³J_{H3,H4} = 3.3 Hz, ³J_{H3,H2} = 11.0 Hz, 1H, H3), 5.09 (d, ³J_{H1,H2} = 3.3 Hz, 1H, H1) 4.48-4.20 (m, 6H, H5, H6_a, H6_b, H9-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 4.11-4.04 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 3.62 (dd, ³J_{H2,H1} = 3.7 Hz, ³J_{H2,H3} = 11.4 Hz, 1H, H2), 2.06, 2.03, 2.02 (3s, 9H, CH₃CO), 1.47 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.33 (d, ³J_{T γ ,T β} = 6.3 Hz, 3H, T ^{γ})

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.6, 170.5, 170.1, 170.0 (CH₃CO-), 156.9 (CO-Urethan), 143.9 (C1_a-, C8_a-Fmoc), 141.4 (C4_a-, C5_a-Fmoc), 127.6 (C3-, C6- Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 99.3 (C1), 82.9

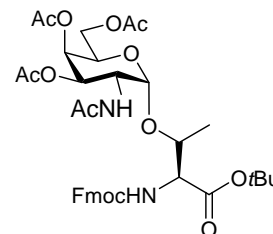
¹⁹³ B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473.

(C(CH₃)₃), 70.5 (T^β), 68.4, 68.1, 67.4, 67.3 (C3, C4, C5, CH₂-Fmoc), 61.9 (C6), 59.1 (T^α), 57.1 (C2), 47.1 (C9-Fmoc), 28.2 (C(CH₃)₃), 20.74 (CH₃CO), 18.86 (T^γ).

ESI-MS (positiv) m/z: 733.2 ([M+Na]⁺, ber.: 733.3); 677.3 ([M-*i*Buten+Na]⁺, ber.: 677.2).

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-actamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester**
(13)¹⁹³

(Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-*O**t*Bu)



In 1000 ml einer Mischung aus THF, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) werden 11.7 g (16.5 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalN₃)-*O**t*Bu **12** gelöst. Dazu werden 10.8 g (165 mmol) Zink-Staub gegeben, welcher zuvor durch Aufschlännen in 400 ml einer 2%-igen CuSO₄-Lösung aktiviert, nacheinander mit Wasser und Ethanol gewaschen und mit Ethylacetat getrocknet worden war. Es wird 16 h bei Raumtemp. gerührt. Nachfolgend wird über *Hyflo* filtriert, mit 300 ml THF gewaschen, die Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol kdestilliert. Das Rohprodukt wird in 200 ml Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 150 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit 100 ml einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an 500 g Kieselgel (Laufmittel: ^cHex/EE 1:1).

Ausbeute: 7.8 g (65 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.31 (^cHex/EE 1:3);

[α]_D²² = 59.8 (c = 1, CHCl₃), Lit.: [α]_D²³ = 62.4 (c = 1, CHCl₃).

C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (726.77) [726.30]

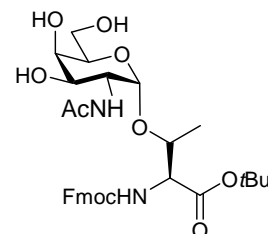
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.76 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.4 Hz), 7.62 (d, 2H, H1-, H8-, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 7.0 Hz), 7.45-7.25 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.90 (d, 1H, NH-Urethan, ³J_{NH-T α} = 9.6 Hz), 5.3 (d, 1H, NH-GalNAc, ³J_{NH,H2} = 9.2 Hz), 5.38 (sb, 1H, H4), 5.07 (dd, 1H, H3, ³J_{H3,H4} = 2.6 Hz, ³J_{H3,H2} = 11.2 Hz), 4.87 (d, 1H, H1, ³J_{H1,H2} = 2.9 Hz) 4.65-4.55 (m, 1H, H2), 4.48-4.38 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.30-4.05 (m, 6H, H5, H6_a, H6_b, H9-Fmoc, T^α, T^β), 2.15 (s, 3H, CH₃CO), 2.02 (s, 3H, CH₃-AcNH), 1.98 (s, 6H, CH₃CO), 1.46 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.31 (d, 3H, T^γ, ³J_{T γ ,T β} = 6.3 Hz);

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.9, 170.5, 170.48, 170.1 (CH₃CO-), 156.6 (CO-Urethan), 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 100.0 (C1), 83.23

(C(CH₃)₃), 68.7, 67.4, 67.4, 67.3 (5C, C3, C4, C5, T^β, CH₂-Fmoc), 62.1 (C6), 58.9 (T^α), 47.32, 47.17 (C2, C9-Fmoc), 28.07 (C(CH₃)₃), 23.23, 20.73, 20.63 (CH₃CO), 18.56 (T^γ); ESI-MS (positiv) m/z: 749.5 ([M+Na]⁺, ber.:749.3); 693.5 ([M-*i*Buten+Na]⁺, ber.:693.3).

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-actamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**14**)¹⁹³**

(Fmoc-Thr(α GalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 7.6 g (10.5 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₃GalNAc)-OtBu **13** in 120 ml absol. Methanol wird unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes tropfenweise mit frisch hergestellter 1%iger methanolischer Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht ist. Es wird 6 h gerührt, wobei der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wird. Nach vollständiger Deacetylierung (DC-Kontrolle) wird mit 1 N Essigsäure in Methanol neutralisiert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird flashchromatographisch an 300 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/MeOH, 20:1).

Ausbeute: 4.2 g (67%); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.11 (EE/MeOH, 20:1); $[\alpha]_D^{22} = 40.2$ (c = 1, CHCl₃), Lit.:¹⁹⁴ $[\alpha]_D^{22} = 44.7$ (c = 1, CHCl₃).

C₃₁H₄₄N₂O₁₀ (600.66) [600.48]

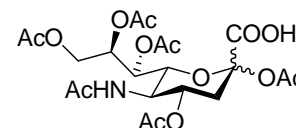
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.4 Hz), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 7.4 Hz,); 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = ³J_{H6,H7} = ³J_{H6,H5} = 7.2 Hz); 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, ³J_{H1,H2} = ³J_{H2,H3} = ³J_{H7,H8} = ³J_{H7,H6} = 6.4 Hz); 6.84 (d, 1H, NH-GalNAc, ³J_{NH,H2} = 7.7 Hz), 5.72 (d, 1H, NH-Urethan, ³J_{NH-T α} = 9.6 Hz), 5.07 (dd, 1H, H3, ³J_{H3,H4} = 2.7 Hz, ³J_{H3,H2} = 11.1 Hz), 4.85 (d, 1H, H1, ³J_{H1,H2} = 3.3 Hz) 4.66-4.52 (m, 1H, H2), 4.48-4.41 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.31-4.09 (m, 6H, H5, H6_a, H6_b, H9-Fmoc, T^α, T^β), 2.08 (s, 3H, CH₃-AcNH), 1.43 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.37 (d, 3H, T^γ, J_{T γ ,T β} = 4.0 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 173.9 (COOtBu), 171.3, 171.0 (CH₃COO-), 156.6 (CO-Urethan), 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 99.7 (C1), 83.2 (C(CH₃)₃), 70.8, 70.1, 69.7, 67.3 (C3, C4, C5, T^β, CH₂-Fmoc), 62.5 (C6), 60.5 (T^α), 50.8, 47.2 (C2, C9-Fmoc), 28.0 (CH₃-*t*Bu), 22.9, (CH₃CO), 18.9 (T^γ).

¹⁹⁴ S. Dziadek, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2005.

ESI-MS (positiv) m/z: 639.4 ($[M+K]^+$, ber.: 639.3), 623.4 ($[M+Na]^+$, ber.: 623.3), 567.4 ($[M-i\text{Buten}+Na]^+$, ber.: 567.2).

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonsäure (20)¹⁰⁶
(Ac₅NeuNAcCOOH)

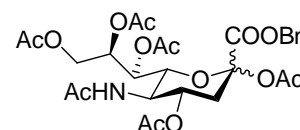


Zu einer Lösung aus 20.0 g (65 mmol) *N*-Acetylneuraminsäure in 250 ml Pyridin werden unter Eiskühlung 120 ml Acetanhydrid getropft. Man rührt 16 h bei Raumtemp. und entfernt die Lösungsmittel i. Vak. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol kodestilliert und kann anschließend ohne Reinigung weiter umgesetzt werden.

Ausbeute: 33.6 g (quant.); gelbliches Öl; $R_f = 0.28$ (EtOH/CHCl₃ 3:1).

C₂₁H₂₉NO₁₄ (519.45) [519.16]

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosid (21)¹⁰⁶
(Ac₅NeuNAcCOOBn)



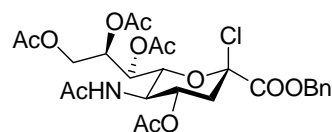
Eine Lösung von 33.6 g (65 mmol) Ac₅NeuNAcCOOH **20** in 100 ml Ethanol wird mit 10.5 g (32.5 mmol) Cäsiumcarbonat, gelöst in 15 ml Wasser, versetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird weitere 30 min bei Raumtemp. gerührt. Man entfernt das Ethanol i. Vak. und destilliert den Rückstand mehrmals mit Toluol, bis ein farbloser, amorpher Feststoff zurückbleibt. Der Rückstand wird in 150 ml DMF aufgenommen, langsam mit 76 ml (110 g, 0.64 mmol, 10 Äquiv.) Benzylbromid versetzt und 18 h gerührt. Das Lösungsmittel und überschüssige Reagenzien werden i. Feinvak. entfernt. Man nimmt den Rückstand in 100 ml Ethylacetat auf, filtriert unlösliches Cäsiumbromid ab und befreit die org. Phase i. Vak. vom Lösungsmittel. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt flashchromatographisch an 1000 g Kieselgel (Laufmittel: EE/^CHex, 7:1). In der folgenden Umsetzung werden beide hierbei erhaltenen Anomere eingesetzt.

Ausbeute: 36.2 g (92 %); farbloser, amorpher Feststoff; α -Anomer: $R_f = 0.38$ (EE); β -Anomer: $R_f = 0.32$ (EE).

C₂₈H₃₅NO₁₄ (609.58) [609.21]

Benzyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chloro-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonat (22)¹⁰⁶

(β Ac₄NeuNAcCOOBnCl)



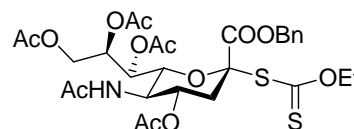
35.9 g (58.9 mmol) Ac₅NeuNAcCOOBn **21** werden mit einer auf 0 °C abgekühlten Mischung von 60 ml (66.2 g, 0.84 mol, 14 Äquiv.) Acetylchlorid und 0.6 ml Wasser versetzt. Die Reaktionsmischung wird 3 d bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird überschüssiges Acetylchlorid i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne Reinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 34.5 g (quant.); gelbbraunes Öl; R_f = 0.42 (EE).

C₂₆H₃₂ClNO₁₂ (585.98) [585.16]

***O*-Ethyl-S-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]dithiocarbonat (23)**

(α Ac₄NeuNAcCOOBnXan)



Eine Lösung von 32.5 g (55.5 mmol) β Ac₄NeuNAcCOOBnCl **22** in 400 ml absol. Ethanol wird unter Argon mit 16.9 g (105 mmol, 1.9 Äquiv.) Kaliummethylxanthogenat versetzt und 2 d bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 400 ml Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 200 ml einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Das Rohprodukt wird flashchromatographisch an 1000 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/^CHex 6:1).

Ausbeute: 16.8 g (45 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.28 (EE).

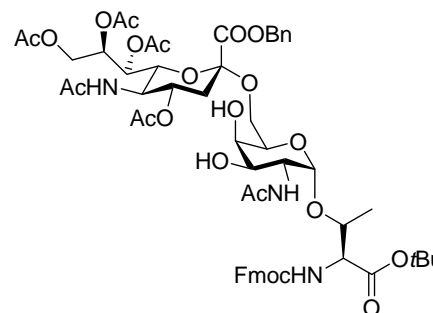
C₂₉H₃₇NO₁₃S₂ (671.74) [671.31].

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.38-5.25 (m, 5H, H_{ar}-Bn), 5.32-5.13 (m, 5H, H7, H8, CH₂-Bn, NH), 4.82 (td, 1H, H4, ³J_{H4,H5} = 4.3 Hz, ³J_{H4,H3} = 11.0 Hz), 4.54 (dd, 1H, H6, ³J_{H6,H5} = 10.8 Hz, ³J_{H6,H7} = 2.0 Hz), 4.48-3.87 (m, 4H, H5, H9, OCH₂CH₃), 2.64 (dd, 1H, H3_{eq}, ²J_{H3eq,H3ax} = 12.9 Hz, ³J_{H3eq,H4} = 4.4 Hz), 2.11, 2.10, 1.99, 1.86 (m, 19H, CH₃CO-, H3_{ax}), 1.19 (t, 3H, -OCH₂CH₃, ³J_{CH₂,CH₃} = 7.2 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 207.2 (CS), 170.7, 170.6, 170.5, 170.2, 170.1 (CO), 168.0 (C1), 134.9 (C_{quart.}-Bn), 128.9, 128.6, 128.5, 128.00 (C-Bn), 86.7 (C2), 75.2, 70.8, 70.5, 68.8, 68.1, 67.7 (C4, C6, C7, C8, CH₂-Bn, -CH₂CH₃), 61.9 (C9), 49.2 (C5), 37.1 (C3), 23.3 (CH₃CONH-), 21.1, 20.9, 20.7 (CH₃CO-), 13.1 (OCH₂CH₃).

ESI-MS (positiv) m/z: 710.2 ([M+K]⁺, ber.:710.3); 694.3 ([M+Na]⁺, ber.:694.3), 572.3 ([M-Xan+Na]⁺, ber.: 572.2).

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-non-2-uloopyranosyl)onat]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (27)**^{106,193}
(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalNAc)-*O**t*Bu)



Herstellung einer 1.6 M Lösung von Methylsulfonylbromid in 1,2-Dichlorethan:

410 μ l (7.99 mmol) Brom werden zu einer Lösung von 709 μ l (7.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 ml absol. 1,2-Dichlorethan getropft. Es wird 16 h unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.

Glycosylierung: Eine Lösung von 1.56 g (2.60 mmol) Fmoc-Thr(α GalNAc)-*O**t*Bu **14** und 4.35 g (6.48 mmol, 2.5 Äquiv.) α Ac₄NeuNAcCOOBnXan **23** in einer Mischung aus 60 ml absol. Acetonitril und 22.5 ml absol. Dichlormethan wird zusammen mit 5 g pulverisiertem Molekularsieb (4 Å) 1 h unter Argonatmosphäre in einem Braunglaskolben gerührt. Anschließend werden 1.67 g (6.5 mmol, 2.5 Äquiv.) trockenes Silbertriflat zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf -65 °C abgekühlt. Über einen Zeitraum von 30 min werden 4.06 ml (6.5 mmol) einer 1.6 M Lösung von Methylsulfonylbromid in 1,2-Dichlorethan zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei -65 °C gerührt und anschließend mit 925 μ l (666 mg, 6.8 mmol) Diisopropylethylamin neutralisiert. Man rührt weitere 15 min bei dieser Temperatur, lässt auf Raumtemp. erwärmen, verdünnt mit 200 ml Dichlormethan und filtriert die Reaktionsmischung über *Hyflo*. Die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 200 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Ethylacetat/Ethanol, 20:1).

Ausbeute: 1.61 g (54 %); farbloser, amorpher Feststoff, $R_f = 0.21$ (EE/EtOH, 20:1); $[\alpha]_D^{22} = 4.9$ (c = 1, CHCl₃), Lit.:¹⁰⁶ $[\alpha]_D^{22} = 6.3$ (c = 1, CHCl₃).

C₅₇H₇₁N₃O₂₂ (1150.18) [1149.45]

400 MHz-¹H-NMR [COSY] (CDCl₃): δ [ppm] 7.74 (dd, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³ $J_{H4,H3} =$ ³ $J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, ⁴ $J_{H4,H2} =$ ⁴ $J_{H5,H7} = 2.6$ Hz), 7.61 (dd, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³ $J_{H1,H2} =$ ³ $J_{H8,H7} = 7.1$ Hz, ⁴ $J_{H1,H3} =$ ⁴ $J_{H8,H6} = 2.8$ Hz), 7.43-7.26 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{ar}-Bn), 6.71 (d, 1H, NH-GalNAc, ³ $J_{NH,H2} = 7.4$ Hz), 5.52 (d, 1H, NH-Fmoc, ³ $J_{NH-T\alpha} = 7.8$ Hz), 5.34 (dt, 1H, H8', ³ $J_{H8',H9'} = 6.8$ Hz, ³ $J_{H8',H7'} = 2.4$ Hz) 5.29 (d, 1H, H7', ³ $J_{H8',H7'} =$ ³ $J_{H6',H7'} = 8.0$ Hz); 5.24 (d, 1H, CH₂-Bn_a, ² $J_{CHa,CHb} = 11.9$ Hz), 5.17 (d, 1H, CH₂-Bn_b, ² $J_{CHa,CHb} = 11.9$ Hz), 4.86-4.79 (m, 1H, H4'), 4.79 (d, 1H, H1, ³ $J_{H1,H2} = 3.5$ Hz), 4.45 (d, 2H, CH₂-Fmoc, ³ $J_{CH2,H9} = 7.0$ Hz), 4.34 (dd, 1H, H9a', ³ $J_{H9'a,H8'} = 2.4$ Hz, ² $J_{H9'a,H9'b} = 12.3$ Hz),

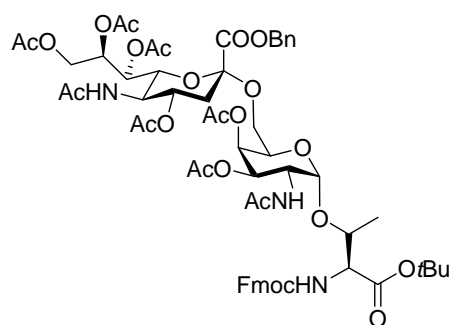
4.28-4.01 (m, 7H, H5', H6', H9-Fmoc, H9b', H2, T^α, T^β), 3.89 (dd, 1H, H6a, ³J_{H6a,H5} = 7.3 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.3 Hz), 3.75-3.65 (m, 3H, H3, H4, H5), 3.51 (dd, 1H, H6b, ³J_{H6b,H5} = 3.9 Hz, ³J_{H6b,H6a} = 10.1 Hz), 2.60 (dd, 1H, H3'_{eq}, ²J_{H3'_{eq},H3'_{ax}} = 12.9 Hz, ³J_{H3'_{eq},H4'} = 4.4 Hz), 2.11, 2.09, 2.08, 2.00, 1.84 (5s, 19H, CH₃CONH-, CH₃CO-, H3'_{ax}), 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.26 (d, 3H, T^γ, J_{T^γ,T^β} = 7.0 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 173.4, 171.3, 170.8, 170.4, 170.3, 170.1 (CH₃CO-), 167.5 (C1'), 156.5 (CO-Urethan), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.8 (C_{quart}-Bn), 129.0, 128.8, 128.6 (C_{ar}-Bn), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 99.5 (C1), 98.8 (C2'), 83.3 (C(CH₃)₃), 76.7 (T^β), 72.9 (C6'), 69.5, 69.3 (C3, C5, C7'), 69.0 (C4'), 68.4 (C4), 67.9 (CH₂-Bn), 67.60 (C8'), 67.2 (CH₂-Fmoc), 64.4 (C6), 62.6 (C9'), 59.0 (T^α), 51.0 (C2), 49.3 (C5'), 47.22 (C9-Fmoc), 37.4 (C3'), 28.0 (C(CH₃)₃), 23.1, 22.8, 21.1, 20.9, 20.8 (CH₃-Ac), 18.9 (T^γ).

ESI-MS (positiv) m/z: 1172.5 ([M+Na]⁺, ber.:1172.4).

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galactonon-2-ulopyranosyl)onat]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (28)¹⁰⁶**

(Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-*O**t*Bu)



Eine Lösung von 1.45 g (1.26 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2→6)- α GalNAc)-*O**t*Bu **27** in 10 ml Pyridin wird unter Eiskühlung mit 5 ml Acetanhydrid versetzt, 1 h bei 0 °C und anschließend 16 h bei Raumtemp. gerührt. Die schwach gelbe Reaktionsmischung wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und überschüssiges Acetanhydrid durch Zugabe von 20 ml Eiswasser hydrolysiert. Die organische Phase wird dreimal mit jeweils 150 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit 150 ml einer ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol kodestilliert und durch Flashchromatographie an 200 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE).

Ausbeute: 1.32 g (85 %); farbloser, amorpher Feststoff; R_f = 0.49 (EE); [α]_D²² = 28.1 (c = 1, CHCl₃), Lit.:¹⁰⁶ [α]_D²² = 28.0 (c = 1, CHCl₃).

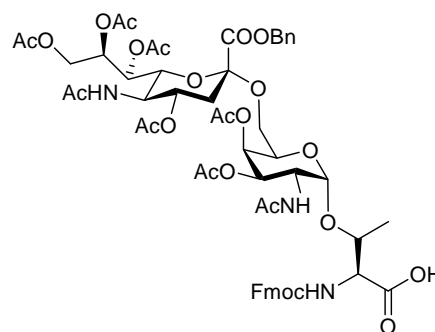
C₆₁H₇₅N₃O₂₄ (1234.25) [1233.45]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.4 Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 7.0 Hz), 7.43-7.26 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{ar}-Bn), 5.95 (d, 1H, NH-GalNAc, ³J_{NH,H2} = 9.2 Hz), 5.62 (d, 1H, NH-Fmoc, J_{NH-Tα} = 9.6 Hz), 5.32-5.21 (m, 3H, H7', H8', CH₂-Bn_a), 5.16-5.07 (m, 2H, H4, CH₂-Bn_b), 4.96 (dd, 1H, H3, ³J_{H3,H2} = 11.6 Hz, ³J_{H3,H4} = 2.8 Hz), 4.84-4.73 (m, 2H, H1, H4'), 4.59-4.46 (m, 3H, CH₂-Fmoc, H2), 4.27-4.14 (m, 5H, H9a', H9-Fmoc, T^β, T^α), 4.08-3.97 (m, 3H, H6', H5', H9b'), 3.96-3.88 (m, 1H, H5), 3.84-3.78 (m, 1H, H6a), 3.10 (dd, 1H, H6b, ³J_{H6b,H5} = 4.1 Hz, ²J_{H6b,H6a} = 10.3 Hz), 2.54 (dd, 1H, H3'_{eq}, ²J_{H3'_{eq},H3'_{ax}} = 12.7 Hz, ³J_{H3'_{eq},H4'} = 4.4 Hz), 2.11, 2.06, 2.03, 2.00, 1.98, 1.83 (6s, 25H, CH₃CONH-, CH₃CO-, H3'_{ax}), 1.42 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.23 (d, 3H, T^γ, ³J_{T^γ,T^β} = 7.0 Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.5, 170.4, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.1 (CO-*Ot*Bu, CH₃CO), 167.3 (C1'), 156.7 (CO-Urethan), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.6 (C_{quart.}-Bn), 129.0, 128.8, 128.6 (C-Bn), 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 100.2 (C1), 98.8 (C2'), 83.0 (C(CH₃)₃), 77.0 (T^β), 72.6, 68.9, 68.0, 67.8, 67.5, 67.2, 67.0 (C3, C4, C5, CH₂-Fmoc, CH₂-Bn, C4', C6', C7', C8'), 64.0, 62.5 (C6, C9'), 59.13 (T^α), 49.13 (C5'), 47.4, 47.2 (C2, C9-Fmoc), 37.60 (C3^α), 28.07 (CH₃-*t*Bu), 23.1, 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃CO), 18.6 (T^γ).

ESI-MS (positiv) m/z: 1256.5 ([M+Na]⁺, ber.:1256.4), 1234.6 ([M+H]⁺, ber.:1234.5), 1200.5 ([M-*i*Buten+Na]⁺, ber.: 1200.4).

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosyl)onat]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (29)¹⁰⁶**
(FmocThr(α Ac₄NeuNAcCOOBn(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)OH



Eine Lösung von 1.25 g (1.01 mmol) Fmoc-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-*Ot*Bu **28** in 20 ml Dichlormethan wird mit 1.5 ml Anisol und 20 ml Trifluoressigsäure versetzt. Es wird 3 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wird die Reaktionlösung fünfmal mit Toluol kodestilliert. Das so erhaltene Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an 150 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE/MeOH 2:1).

Ausbeute: 1.13 g (95 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.30$ (EE/MeOH, 3:1); $[\alpha]_D^{22} = 34.4$ ($c = 1$, CHCl_3), Lit.:¹⁰⁶ $[\alpha]_D^{22} = 29.1$ ($c = 1$, CHCl_3).

$\text{C}_{57}\text{H}_{65}\text{N}_3\text{O}_{24}$ (1178.15) [1177.41]

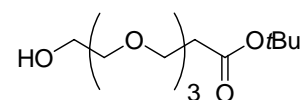
HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1200.40 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.:1200.40).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl_3): δ [ppm] 7.75 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz), 7.61 (d, 2H, H1-, H8-, $^3J_{\text{H1,H2}} = ^3J_{\text{H8,H7}} = 7.0$ Hz), 7.43-7.26 (m, 9H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, 5x $\text{H}_{\text{ar-Bn}}$), 5.95 (d, 1H, NH-Fmoc, $^3J_{\text{NH-T}\alpha} = 9.6$ Hz), 5.62 (d, 1H, NH-GalNAc, $^3J_{\text{NH,H2}} = 9.2$ Hz), 5.32-5.21 (m, 3H, H7', H8', $\text{CH}_2\text{-Bn}_a$), 5.16-5.07 (m, 2H, H4, $\text{CH}_2\text{-Bn}_b$), 5.00-4.89 (dd, 1H, H3, $^3J_{\text{H3,H2}} = 11.4$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 2.9$ Hz), 4.82 (m, 2H, H1, H4'), 4.59-4.46 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, H2, T ^{β}), 4.27-4.14 (m, 4H, H6', H9a', H9-Fmoc, T ^{α}), 4.11-3.97 (m, 3H, H5, H5', H9b'), 3.83 (m, 1H, H6a), 3.10 (dd, 1H, H6b, $J_{\text{H6b,H5}} = 4.1$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 10.3$ Hz), 2.54 (dd, 1H, H3'_{eq}, $^2J_{\text{H3'eq,H3'ax}} = 12.9$ Hz, $^3J_{\text{H3'eq,H4'}}$ = 4.4 Hz), 2.10, 2.06, 2.00, 1.98, 1.83 (5s, 25H, $\text{CH}_3\text{CO-}$, $\text{CH}_3\text{CONH-}$, H3'_{ax}), 1.23 (d, 3H, T ^{γ} , $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 7.0$ Hz).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl_3): δ [ppm] 170.55, 170.38, 170.17, 170.11, 170.02, 169.65, 169.31 (-CHCO-, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 167.33 (C1'), 156.56 (CO-Urethan), 143.84, 143.71 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.31 (C4a-, C5a-Fmoc), 134.68 (C_{quart}-Bn), 129.03, 128.85, 128.67 (C-Bn), 127.76 (C3-, C6-Fmoc), 127.10 (C2-, C7-Fmoc), 125.06 (C1-, C8-Fmoc), 120.03 (C4-, C5-Fmoc), 100.06 (C1), 98.57 (C2'), 77.02 (T ^{β}), 72.60, 68.88, 68.04, 67.85, 67.59, 67.21, 67.09 (C3, C4, C5, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, C4', C6', C7', C8'), 63.88, 62.35 (C6, C9'), 59.13 (T ^{α}), 49.13 (C5'), 47.38, 47.21 (C2, C9-Fmoc), 37.60 (C3'), 23.16, 21.00, 20.81, 20.70, 20.63 (CH_3CO), 18.61 (T ^{γ}).

5.2.2 Synthese des Triethylglycolspacers

12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecanansäure-*tert*-butylester (31)¹⁹⁵



Zu einer Lösung von 25.6 ml (188.0 mmol) wasserfreiem Triethylglycol in 100 ml absol. THF werden unter Argon 43 mg (1.9 mmol) Natrium gegeben. Nachdem das Natrium vollständig gelöst ist, werden 9.6 ml (66 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester zugesetzt, und es wird 15 h gerührt. Durch Zugabe von 1.6 ml 1 N HCl wird die Reaktionsmischung neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mit 70 ml einer ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten

¹⁹⁵ O. Seitz, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1995.

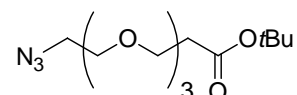
org. Phasen werden mit 30 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel i. Vak. wird das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: EE).

Ausbeute: 12.9 g (66%); farbloses Öl; $R_f = 0.41$ (EE).

$C_{13}H_{26}O_6$ (278.34) [278.17].

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] 3.73-3.66 (m, 14H, OCH_2), 2.87 (sb, 1H, OH) 2.46 (t, 2H, $-COCH_2-$, $^3J = 6.3$ Hz), 1.39 (s, 9H, CH_3-tBu).

12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (32)¹⁰⁶



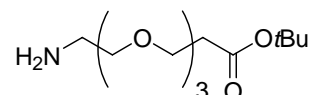
Eine Lösung von 12.8 g (55 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **31** in 20 ml absol. Dichlormethan wird mit 15.8 ml (112 mmol, 2 Äquiv.) Triethylamin versetzt. Unter Eiskühlung werden 7.3 ml (95 mmol) Mesitylchlorid zugetropft. Es wird 4 h gerührt, das gebildete Triethylaminhydrochlorid über *Hyflo* abfiltriert und der Rückstand mit 50 ml Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit je 20 ml Eiswasser und einmal mit 20 ml einer ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 20 ml DMF aufgenommen, mit 18.4 g (284 mmol) Natriumazid versetzt und 15 h bei 60 °C gerührt. Man entfernt das DMF i. Feinvak. und löst den Rückstand in 50 ml Wasser. Die wässrige Phase wird viermal mit je 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: C Hex/EE 3:1).

Ausbeute: 12.3 g (73 %); farbloses Öl; $R_f = 0.43$ (C Hex/EE 2:1).

$C_{13}H_{25}N_3O_5$ (303.35) [303.18]

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] 3.70-3.50 (m, 12H, OCH_2), 3.34 (t, 2H, N_3CH_2 , $^3J = 5.0$ Hz), 2.45 (t, 2H, $COCH_2$, $^3J = 6.6$ Hz), 1.40 (s, 9H, CH_3-tBu).

12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (33)¹⁰⁶



Eine Suspension einer Ni-Al-Legierung (8.9 g) in 250 ml Wasser wird solange mit festem NaOH versetzt bis bei weiterer Zugabe keine Gasentwicklung mehr auftritt. Nach zehnminütigem stehen bei Raumtemp. wird die Mischung 30 min auf 70 °C erwärmt. Die überstehende Lösung wird abdekantiert. Das Raney-Nickel wird mit Wasser neutral

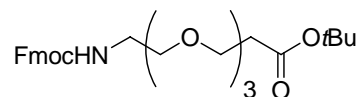
gewaschen und im Anschluss mehrmals mit Isopropanol gespült. Zum Katalysator werden 12.0 g (39.6 mmol) Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **32**, gelöst in 50 ml Isopropanol, gegeben. Durch wiederholtes Anlegen eines Wasser-strahlvakuum und Belüften mit Argon wird die Reaktionsmischung von Sauerstoff befreit und anschließend mit Wasserstoff überschichtet. Die Lösung wird 18 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Raney-Nickel wird über *Hyflo* abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Et₂O/MeOH 1:1).

Ausbeute: 7.9 g (72 %); farbloses Öl; R_f = 0.11 (Et₂O/MeOH, 1:1).

C₁₃H₂₇NO₅ (277.36) [277.19]

ESI-MS (positiv) m/z: 278.2 ([M+H]⁺, ber.: 278.2).

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**34**)**



Zu einer Lösung von 7.6 g (27 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester **33** in 200 ml einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) werden 2.35 g (28 mmol) Natriumhydrogencarbonat gegeben. Die Reaktionsmischung wird mit 9.8 g (29 mmol) FmocOSu versetzt und 18 h gerührt. Anschließend wird die Lösung mit halbkonz. HCl auf pH = 5 angesäuert, wobei sich das Produkt als Öl abscheidet. Das Aceton wird i. Vak. entfernt und das Produkt viermal mit jeweils 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wird mit 150 ml 1 N HCl und 150 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende Öl wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: C₆Hex/EE 2:1).

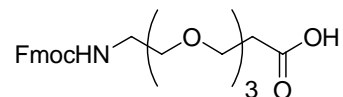
Ausbeute: 12.0 g (89 %); farbloses Öl; R_f = 0.20 (C₆Hex/EE 2:1).

C₂₈H₃₇NO₇ (499.60) [499.26]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.73 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{H4,H3} = ³J_{H5,H6} = 7.4 Hz), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 7.4 Hz), 7.37 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = ³J_{H6,H7} = ³J_{H6,H5} = 7.4 Hz); 7.28 (dt, 2H, H2-, H7-Fmoc, ³J_{H1,H2} = ³J_{H2,H3} = ³J_{H7,H8} = ³J_{H7,H6} = 7.4 Hz, ⁴J_{H4,H2} = ⁴J_{H7,H5} = 1.1 Hz); 5.42 (sb, 1H, NH-Urethan), 4.38 (d, 2H, CH₂-Fmoc, ³J_{CH₂,H₉} = 7.0 Hz), 4.20 (t, 1H, H9-Fmoc, ³J_{H₉,CH₂} = 6.8 Hz), 3.75-3.50 (m, 12H, OCH₂), 3.38 (t, 2H, NH-CH₂, ³J = 5.1 Hz), 2.46 (t, 2H, CH₂CO, ³J = 6.4 Hz), 1.42 (s, 9H, CH₃-*t*Bu).

ESI-MS (positiv) m/z: 538.1 ($[M+K]^+$, ber.: 538.2), 522.1 ($[M+Na]^+$, ber.: 522.3), 500.2 ($[M+H]^+$, ber.: 500.3), 444.1 ($[M-i\text{Buten}+H]^+$, ber.: 444.2), 278.1 ($[M-\text{Fmoc}+H]^+$, ber.: 278.2).

***N*-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxa-**
dodecansäure (35)



N-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **34** (4 g, 8.0 mmol) werden 2.5 h in einer Mischung aus 30 ml Trifluoressigsäure und 3 ml Wasser gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit 30 ml Toluol verdünnt, i. Vak. eingengt und der erhaltene Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 40:1:0.5). Zum Entfernen von Essigsäureresten wird der Rückstand anschließend viermal mit Toluol kodestilliert.

Ausbeute: 3.5 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.23$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 40:1:0.5).

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ (443.49) [443.19]

300 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz), 7.58 (d, 2H, H1-, H8-, $^3J_{\text{H1,H2}} = ^3J_{\text{H8,H7}} = 7.7$ Hz), 7.45-7.20 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.60 (sb, 1H, -COOH), 5.53 (sb, 1H, NH-Urethan), 4.45-4.35 (m, 2H, CH_2 -Fmoc), 4.20 (t, 1H, H9-Fmoc, $^3J_{\text{H9,CH2}} = 6.6$ Hz), 3.71 (t, 2H, 11- CH_2 , $^3J = 5.9$ Hz), 3.66-3.50 (m, 10H, OCH_2), 3.45-3.32 (m, 2H, 12- CH_2), 2.58 (t, 2H, 2- CH_2 , $^3J = 6.0$ Hz).

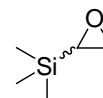
75.5 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ [DEPT] (CDCl_3): δ [ppm] 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 70.4, 70.35 (5- CH_2 , 6- CH_2), 66.7 (3- CH_2), 66.3 (CH_2 -Fmoc), 47.1 (C9-Fmoc), 40.9 (12- CH_2), 34.7 (2- CH_2).

ESI-MS (positiv) m/z: 482.2 ($[M+K]^+$, ber.: 482.2), 466.2 ($[M+Na]^+$, ber.: 466.2), 444.2 ($[M+H]^+$, ber.: 444.2).

5.3 Festphasenoligosaccharidsynthesen

5.3.1 Synthese des PTMSE-Ankers

2-Trimethylsilyloxiran (42)¹¹²



In einem Dreihalskolben werden 30.9 g (0.13 mol) *m*-Chlorperbenzoesäure in 300 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Über einen Tropftrichter wird eine Lösung von 20.0 ml (0.13 mol, 13.0 g) Trimethylvinylsilan in 60 ml Dichlormethan tropfenweise zugegeben. Es wird 80 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird der farblose Niederschlag abfiltriert. Man wäscht das Filtrat nacheinander mit je 200 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg., einer ges. NaHSO₃-Lsg. und nochmals mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet. Dichlormethan wird über eine 15 cm-Vigreux-Kolonnen entfernt. Der Rückstand wird in einer Mikrodestillationsapparatur bei vermindertem Druck (370 mbar) destillativ gereinigt.

Ausbeute: 11.9 g (78 %); farblose Flüssigkeit; Sdp._{370mbar}: 72-76 °C; $n_D^{25} = 1.414$

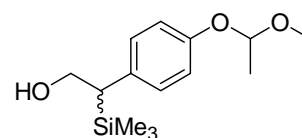
(Lit.:¹¹² Sdp.: 109-110 °C; $n_D^{25} = 1.414$).

C₅H₁₂OSi (116.23) Ber.: C 51.67 H 10.41
 [116.07] Gef.: C 51.03 H 10.50

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 2.87 (t, ²J = 5.5 Hz, 1H, *cis*-CH₂CH-TMS); 2.52 (dd, ³J_{cis} = 5.9 Hz, ³J_{trans} = 4.0 Hz, 1H, CH-TMS); 2.16 (dd, ²J = 5.5 Hz, ³J_{trans} = 4.0 Hz, 1H, *trans*-CH₂CH-TMS); 0.03 (s, 9H, -Si(CH₃)₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 44.5, 44.1 (Oxiran-C); -3.9 (-Si(CH₃)₃).

[2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]-ethanol (43)¹⁹⁶



1. Lithiierung:

In 250 ml absol. Diethylether werden 61.5 g (250 mmol) frisch destilliertes 1-(4-Bromphenoxy)-1-ethoxyethan **40** gelöst und unter Argon gerührt. Bei -45 °C werden 157 ml einer *n*-Butyllithium-Lsg. (1.6 M in Hexan, 250 mmol) innerhalb von 30 min zugetropft. Nach 20 min Rühren bei -40 °C liegt eine klare, orangefarbene Lösung vor.

¹⁹⁶ M. Wagner, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2001

Man lässt innerhalb von 45 min auf 10 °C erwärmen und rührt anschließend weitere 90 min bei dieser Temperatur.

2. Cupratbildung und Addition:

In einem 1 l-Dreihalskolben werden 23.0 g Cu(I)I (120 mmol) in 70 ml absol. Diethylether suspendiert. Die lithiierte Lösung wird mit Hilfe einer Edelstahldoppelkanüle in einen mit Argon gefluteten 500 ml Tropftrichter überführt und dann bei 0 °C innerhalb von 70 min zugetropft. Man rührt weitere 30 min und kühlt anschließend auf -50 °C ab. Bei dieser Temperatur werden 4.9 g (5.2 ml, 40 mmol) 2-Trimethylsilyloxiran **42** mit einer Spritze zugetropft und es wird 5 h gerührt. Dann tauscht man die Aceton/Trockeneis-Kühlung gegen eine Eis-Kochsalz-Kühlung und rührt 18 h. Man versetzt das Reaktionsgemisch mit 300 ml einer ges. NH₄Cl-Lösung, rührt 30 min und überführt die Mischung in einen Scheidetrichter. Es wird mit 500 ml Ethylacetat und 200 ml ges. NH₄Cl-Lsg versetzt und kräftig geschüttelt. Die org. Phase wird zweimal mit 250 ml ges. NH₄Cl-Lsg. gewaschen. Die wässrigen Phasen werden zweimal mit je 300 ml Ethylacetat gegengeschüttelt. Man trocknet die vereinigten org. Phasen über Na₂SO₄ und befreit sie i. Vak. von den Lösungsmitteln. Der Rückstand (60 g) wird durch Flashchromatographie an 1100 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 6:1 mit 0.1 % Triethylamin). Das Produkt wird viermal mit Toluol kodestilliert um letzte Reste des Triethylamins zu entfernen.

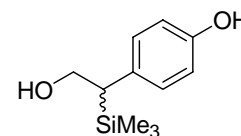
Ausbeute: 7.5 g (63 %); orange-braunes Öl; R_f = 0.11 (°Hex/EE 7:1); R_f = 0.23 (°Hex/EE 4:1).

C ₁₅ H ₂₆ O ₃ Si (282.45)	Ber.:	C 63.78	H 9.28
[282.17]	Gef.:	C 63.43	H 8.94

300 MHz-¹H-NMR (Aceton-d₆): δ [ppm] 7.05 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, arom. H); 6.89 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, arom. H); 5.35 (q, ³J = 5.2 Hz, 1H, O-CH-O); 4.10-3.90 (m, 2H, CH₂-OH); 3.78-3.65 (m, 1H, CH₂-O); 3.60-3.46 (m, 1H, CH₂-O); 2.85 (s, 1H, -OH); 2.34 (dd, ³J = 5.1 Hz, ³J = 9.2 Hz, 1H, CH-TMS); 1.39 (d, ³J = 5.2 Hz, 3H, CH₃-CH); 1.12 (t, ³J = 7.0, 3H, CH₃CH₂-); -0.04 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (Aceton-d₆): δ [ppm] 155.4 (C_{ipso} Ar-O); 136.4 (C_{ipso} Ar-CH); 129.6 (2C, arom. C); 118.0 (2C, arom. C); 100.3 (O-CH-O); 63.5 (CH₂-OH); 61.7 (CH₃CH₂-O); 40.9 (TMS-CH); 20.6 (CH₃CH-); 15.4 (CH₃CH₂-); -2.3 (Si(CH₃)₃).

[2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol (**44**)¹⁹⁶



Unter Argon löst man 5.5 g (26.6 mmol) [2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **43** in 100 ml Methanol. Die Reaktionsmischung wird mit einer Lösung von 250 mg (0.95 mmol, 0.04 Äquiv.) PPTS in 12 ml Methanol versetzt und 2 h

gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie an 400 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 3:1).

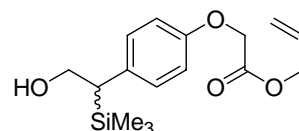
Ausbeute: 4.3 g (78 %); farbloser, kristalliner Feststoff; Schmp.: 138 °C; $R_f = 0.09$ (°Hex/EE 3:1).

$C_{11}H_{18}O_2Si$ (210.34) Ber.: C 62.81 H 8.63
[210.11] Gef.: C 63.20 H 9.00

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ (Aceton- d_6): δ [ppm] 7.96 (s, 1H, Phenol-OH); 6.94 (dd, $^3J = 6.6$ Hz, $^4J = 1.84$ Hz, 2H, arom. H); 6.71 (dd, $^3J = 6.6$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 2H, arom. H); 4.07-3.87 (m, 2H, CH_2 -OH); 3.39 (t, 1H, $^3J = 5.2$ Hz, -OH); 2.28 (dd, $^3J = 9.2$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, CH-TMS); -0.05 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$)

$75.5\text{ MHz-}^{13}\text{C-NMR}$ (Aceton- d_6): δ [ppm] 155.5 ($C_{ipso\text{ Ar-O}}$); 133.7 ($C_{ipso\text{ Ar-CH}}$); 129.5 (2C, arom. C); 115.7 (2C, arom. C); 63.7 (CH_2 -O); 40.8 (TMS-CH); -2.1 (3C, $Si(CH_3)_3$).

4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)ethyl]-phenoxyessigsäureallylester (45)¹⁹⁶



In 75 ml Aceton werden 4.0 g (19 mmol) **44** gelöst. Unter Argon gibt man nacheinander 3.3 g (23.8 mmol) K_2CO_3 , 0.45 g (2.4 mmol) KI und 2.7 ml (23.2 mmol) Chloressigsäureallylester zu. Es wird bei Raumtemp. gerührt. Nach 18 h werden zusätzlich 1.3 g (9.4 mmol) K_2CO_3 , 0.16 g (1.0 mmol) KI und 1.0 ml (8.9 mmol) Chloressigsäureallylester zugegeben und weitere 20 h gerührt. Die Mischung wird über *Hyflo* filtriert. Der Filterkuchen wird mit 160 ml Aceton nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt. Der braune, ölige Rückstand wird chromatographisch an 400 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 3:1). Man erhält ein farbofes Öl, welches nach Trocknen i. Feinvak. und lagern im Gefrierfach kristallisiert.

Ausbeute: 4.3 g (73 %); farbloser, kristalliner Feststoff; Schmp.: 27 °C; $R_f = 0.28$ (°Hex/EE 3:1).

$C_{16}H_{24}O_4Si$ (308.44) Ber.: C 62.30 H 7.84
[308.14] Gef.: C 62.28 H 7.83

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ ($CDCl_3$): δ [ppm] 6.99 (dd, $^4J = 2.9$ Hz, $^3J = 9.6$ Hz, 2H, arom. H); 6.82 (dd, $^4J = 2.9$ Hz, $^3J = 9.6$ Hz, 2H, arom. H); 5.89 (ddt, $^3J_{trans} = 17.3$ Hz, $^3J_{cis} = 11.8$ Hz, $^3J = 5.9$ Hz; 1H, Allyl-H); 5.29 (m, 1H, H_{trans}); 5.23 (dd, $^3J_{cis} = 11.8$ Hz, $^2J = 1.5$ Hz, 1H, H_{cis}); 4.67 (m, 2H, CH_2 -CH=CH $_2$); 4.60 (s, 2H, O- CH_2 -CO-); 4.04 (t, $^3J = 11.4$ Hz, 1H,

$\text{CH}_2\text{-OH}$); 3.91 (dd, $^2J = 11.0$ Hz, $^3J = 4.4$ Hz; 1H, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 2.35 (dd, $^3J = 4.4$ Hz, $^3J = 11.4$ Hz, 1H, CH-TMS); -0.07 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

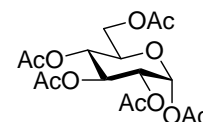
75.5 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 168.8 (Carbonyl-C); 155.7 ($\text{C}_{\text{ipso Ar-O}}$); 133.6 ($\text{C}_{\text{ipso Ar-CH}}$); 131.4 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$); 128.8 (2C, arom. C); 200.0 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$); 115.0 (2C, arom. C); 65.8, 65.5 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-O-CO-CH}_2\text{-O}$); 63.1 ($-\text{CH}_2\text{-OH}$); 40.7 ($-\text{CH-TMS}$); -2.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$)

ESI-MS (positive) m/z: 372.3 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$, ber.: 372.2); 347.1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 347.1); 331.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 331.1).

5.3.2 Modellsynthesen am polymeren Träger

Penta-*O*-acetyl- α -D-glucopyranose (47)

($\alpha\text{Ac}_5\text{Glc}$)



Zu einem Gemisch aus 280 ml Acetanhydrid und 1 ml Perchlorsäure gibt man bei 0 °C portionsweise 72 g D-Glucose. Nach Beendigung der Zugabe wird die Lösung 1 h bei 45 °C gerührt. Man gießt die leicht gelbliche Reaktionsmischung vorsichtig in ein Eis/NaOAc/Aceton-Gemisch (1.3 kg Eis; 100 ml H_2O ; 34 g NaOAc; 200 ml Aceton) und rührt 15 h. Der farblose Niederschlag wird abfiltriert, aus Methanol umkristallisiert und 20 h i. Feinvak. über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 83 g (54 %); farblose Kristalle; Schmp.: 109 °C; $[\alpha]_D^{22} = 100.0$ ($c = 0.74$, CH_2Cl_2), (Lit. Aldrich Feinchemikalien: Schmp.: 109-111 °C, $[\alpha]_D^{22} = 102$ ($c = 1.0$, CHCl_3)), $R_f = 0.45$ (PE/EE 3:1).

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (390.34) Ber.: C 49.23 H 5.68
[390.12] Gef.: C 48.90 H 5.58

300 MHz- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 6.30 (d, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, 1H, H-1); 5.44 (dd, $^3J_{\text{H3,H2}} = 9.6$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.9$ Hz, 1H, H-3); 5.12 (dd, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H4,H5}} = 9.9$ Hz, 1H, H-4); 5.05 (dd, $^3J_{\text{H3,H2}} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, 1H, H-2); 4.24 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 4.1$ Hz, 1H, H-6a); 4.05 (m, 2H, H-5, H-6b); 2.15, 2.06, 2.01, 2.00, 1.99 (5s, 15H, $-\text{COCH}_3$).

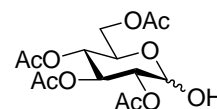
75.5 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ (ppm): 170.5, 170.1, 169.6, 169.3, 168.7 ($\text{CH}_3\text{CO-}$); 89.0 (C-1); 69.8 (C-2, C-3); 69.1 (C-5); 67.9 (C-4); 61.4 (C-6); 20.8, 20.6, 20.6 ($\text{CH}_3\text{CO-}$).

ESI-MS (positiv) m/z: 803.1 ($[\text{M}+\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 803.2); 469.9 ($[\text{M}+\text{K}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$, ber.: 470.2); 454.0 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$, ber.: 454.1); 429.0 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, ber.: 429.2); 413.1

([M+Na]⁺, ber.: 413.1); 394.1 ([M-AcOH+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 394.1); 352.9 ([M-AcOH+Na]⁺, ber.: 353.0); 331.0 ([M-AcO]⁺, ber.: 331.1); 292.0 ([M-2AcOH+Na]⁺, ber.: 292.0).

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose¹⁹⁷

(Ac₄Glc-OH)



Zu einer Lösung von 4.13 ml (61 mmol, 3.7 g, 1.2 Äquiv.) Ethylendiamin in 100 ml THF gibt man tropfenweise 4.13 ml (71 mmol, 4.3 g, 1.4 Äquiv.) Eisessig. Dies führt zur Bildung eines farblosen Niederschlages. Penta-*O*-acetyl- α -D-glucose (20 g, 51 mmol) **47** wird zugegeben und die resultierende Suspension 24 h gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Zugabe von 100 ml Dichlormethan verdünnt und anschließend mit 40 ml Wasser ausgeschüttelt. Man wäscht die org. Phase nacheinander mit 80 ml 2 N HCl, 80 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg., 40 ml Wasser, trocknet über MgSO₄ und entfernt die Lösungsmittel i. Vak. Der Rückstand (ca. 20 g) wird mittels Flashchromatographie an 600 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

Ausbeute: 13.7 g (77 %); farbloses, hochviskoses Öl; $[\alpha]_D^{22} = 65.0$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); R_f = 0.22 (°Hex/EE 1:1).

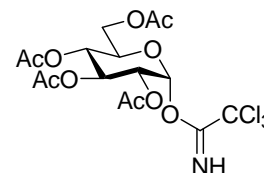
C₁₄H₂₀O₁₀ (348.30) [348.11]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 5.50 (dd, ³J_{H3,H4} = 9.9 Hz, ³J_{H2,H3} = 9.6 Hz, 1H, H-3); 5.42 (d, ³J_{H1,H2} = 3.3 Hz, 1H, H-1); 5.06 (dd, ³J_{H4,H3} = 9.9 Hz, ³J_{H4,H5} = 9.6 Hz, 1H, H-4); 4.85 (dd, ³J_{H2,H1} = 3.7 Hz, ³J_{H2,H3} = 10.3 Hz, 1H, H-2); 4.29-3.96 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 3.79 (s_b, 1H, -OH); 2.06, 2.05, 2.00, 1.98 (4s, 12H, CH₃CO-).

75.5-MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.9, 170.2, 169.7, 169.5 (CH₃CO-); 90.0 (C-1); 71.1, 69.8, 68.5 (C-2, C-3, C-5); 67.1 (C-4); 62.0 (C-6); 20.7, 20.7, 20.6, 20.5 (CH₃CO-).

ESI-MS (*positiv*) m/z : 719.0 ([M+M+Na]⁺, ber.: 719.2); 428.0 ([M+CH₃CN+K]⁺, ber.: 428.1); 412.1 ([M+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 412.1); 387.0 ([M+K]⁺, ber.: 387.1); 371.0 ([M+Na]⁺, ber.: 371.1); 351.9 ([M-AcOH+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 352.1); 311.0 ([M-AcOH+Na]⁺, ber.: 311.0).

¹⁹⁷ J. Zhang, P. Kovác, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-trichloracetimidat**(48)**¹⁹⁸(α Ac₄Glc-trichloracetimidat)

Eine Lösung von 6.0 g (18 mmol) Ac₄GlcOH in 60 ml absol. Dichlormethan wird unter Argon mit 13.0 g (90 mmol) Trichloracetonitril und 20 Tropfen (0.1 ml) DBU versetzt. Die Lösung wird 4 h bei Raumtemp. gerührt. Im Verlauf der Reaktion findet eine Farbänderung von farblos nach dunkelbraun statt. Anschließend wird das Lösungsmittel und überschüssiges Trichloracetonitril i. Vak. destillativ entfernt. Das zurückbleibende Rohprodukt (12.5 g) wird durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: ^cHex/EE 2:1).

Ausbeute: 6.6 g (77 %); farbloses, hochviskoses Öl; $[\alpha]_D^{22} = 114.2$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂),

Lit.:¹⁹⁹ $[\alpha]_D^{22} = 103.0$ ($c = 1.2$, CHCl₃); $R_f = 0.13$ (^cHex/EE 2:1); $R_f = 0.48$ (^cHex/EE 1:1).

C₁₆H₂₀Cl₃NO₁₀ (492.69) Ber.: C 39.00 H 4.05 N 2.84

[491.02] Gef.: C 39.19 H 4.15 N 2.78

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 8.67 (s, 1H, NH); 6.53 (d, ³J_{H1,H2} = 3.7 Hz, 1H, H-1); 5.53 (t, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = 9.9 Hz; 1H, H-3); 5.15 (dd, ³J_{H3,H4} = 9.9 Hz, ³J_{H4,H5} = 9.6 Hz, 1H, H-4); 5.10 (dd, ³J_{H2,H3} = 9.9 Hz, ³J_{H2,H1} = 3.7 Hz, 1H, H-2); 4.29-4.04 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 2.05, 2.02, 2.00, 1.99 (4s, 12H, CH₃CO-).

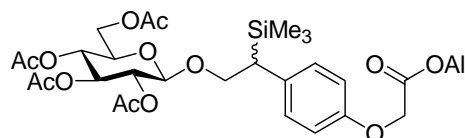
75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.5, 169.9, 169.8, 169.5 (CH₃CO-); 160.8 (C=NH); 92.9 (C-1); 70.0, 69.8, 69.7 (C-2, C-3, C-5); 67.8 (C-4); 61.4 (C-6); 20.6, 20.5, 20.4 (CH₃CO-).

ESI-MS (*positiv*) m/z : 559.1 ([M(1*³⁵Cl, 2*³⁷Cl)+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 559.0); 557.1 ([M(2*³⁵Cl, 1*³⁷Cl)+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 557.0); 555.1 ([M(3*³⁵Cl)+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 555.0); 518.1 ([M(1*³⁵Cl, 2*³⁷Cl)+Na]⁺, ber.: 518.0); 516.1 ([M(2*³⁵Cl, 1*³⁷Cl)+Na]⁺, ber.: 516.0); 514.1 ([M(3*³⁵Cl)+Na]⁺, ber.: 514.0); 454.1 ([M(3*³⁵Cl)-AcOH+Na]⁺, ber.: 454.0); 394.2 ([M(3*³⁵Cl)-2AcOH+Na]⁺, ber.: 394.0); 353.1 ([M-Cl₃C(NH)OH+Na]⁺, ber.: 353.1).

¹⁹⁸ S. Sato, Y. Ito, T. Nukada, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1987**, 167, 197

¹⁹⁹ R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763

4-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyessigsäureallylester (49)



Eine Lösung von 2.3 g (7.5 mmol) 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)ethyl]phenoxyessigsäureallylester **45** und 5.3 g (11.4 mmol, 1.5 Äquiv.) Ac₄Glc-trichloracetimidat **48** in 30 ml absol. Dichlormethan wird auf -20 °C abgekühlt. Man tropft langsam 2.0 ml einer 0.05 M Lösung von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (0.1 mmol, 0.01 Äquiv.) in Dichlormethan zu. Innerhalb kurzer Zeit bildet sich ein farbloser Niederschlag von Trichloracetamid. Nach insgesamt 30 min bei -20 °C wird mit festem NaHCO₃ versetzt und gerührt, bis die Lösung basisch ist. Man gibt weitere 30 ml Dichlormethan hinzu und wäscht nacheinander mit 30 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und 30 ml einer ges. NaCl-Lsg., trocknet über MgSO₄ und befreit i. Vak. vom Lösungsmittel. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt durch Flashchromatographie an 300 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 5:2).

Ausbeute: 3.8 g (71 %); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -12.4$ (c = 1.0, CH₂Cl₂); R_f = 0.05 (°Hex/EE 5:2).

C₃₀H₄₂O₁₃Si (638.75) [638.24]

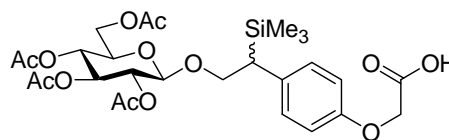
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 6.96 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 2H, Phenyl-H); 6.77 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 4.0 Hz, 2H, Phenyl-H); 5.98-5.81 (m, 1H, -CH₂=CH-); 5.34-5.19 (m, 2H, -CH₂=CH-); 5.16-4.89 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4.68 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 4.59 (s, 2H, O-CH₂-CO-); 4.52 (d, ³J_{H1A,H2A} = 8.1 Hz, 0.5H, H-1A); 4.40 (d, ³J_{H1B,H2B} = 8.1 Hz, 0.5H, H-1B); 4.31-4.04 (m, 3H, H-6a, H-6b, -CH₂-O); 3.88-3.76 (m, 1H, -CH₂-O); 3.67-3.56 (m, 1H, H-5); 2.42-2.32 (m, 1H, -CH-TMS); 2.06, 2.00, 1.99, 1.97, 1.94, 1.89, 1.65 (s, 12H, CH₃CO-); -0.07, -0.08 (2s, 9H, -Si(CH₃)₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.7, 170.2, 169.2 (CH₃CO-); 168.7 (O-CH₂-CO-O); 155.4, 155.4 (C_{ipso} Ar-O); 135.1, 134.9 (C_{ipso} Ar-CH); 131.4 (-CH=CH₂); 128.6, 128.4 (Phenyl-C); 119.0 (CH₂=CH-); 114.49, 114.46 (Phenyl-C); 101.0, 99.3 (C-1); 77.2, 73.0, 72.7, 71.7, 71.3, 71.2, 71.0, 70.6, 68.5, 68.5 (C-2, C-3, C-4, C-5); 65.7, 65.5, 61.9, 61.9 (O-CH₂-CH-, CH₂=CH-CH₂-O, C-6); 37.3, 36.2 (-CH-TMS); 20.7, 20.6, 20.5, 20.3 (CH₃CO-); -2.4, -2.6 (-Si(CH₃)₃).

Wegen des Stereozentrums am PTMSE-Anker zeigen die NMR-Spektren jeweils die Mischung zweier Diastereomere.

ESI-MS (positiv) m/z: 677.4 ([M+K]⁺, ber.: 677.2); 661.4 ([M+Na]⁺, ber.: 661.2); 371.2 ([M+Na-PTMSE]⁺, ber.: 371.1).

4-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]phenoxyessigsäure (50)



Zu 1.3 g (2.0 mmol) **49** in 20 ml dest. THF gibt man unter Argonatmosphäre 120 mg (0.12 mmol, 0.05 Äquiv.) Pd(PPh₃)₄ und eine Lösung von 482 mg (2.7 mmol, 1.4 Äquiv.) des Natriumsalzes der *p*-Toluolsulfinsäure in 12 ml Methanol. Man rührt 2 h bei Raumtemp. und entfernt anschließend das Lösungsmittel i. Vak. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 15:1).

Ausbeute: 0.88 g (70 %); gelblicher, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -13.8$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); $R_f = 0.08$ (CH₂Cl₂/Methanol 15:1).

C₂₇H₃₈O₁₃Si (598.67) [598.21]

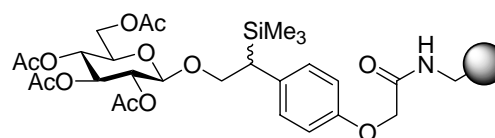
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 6.97 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 2H, Phenyl-H); 6.73 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 4.0 Hz, 2H, Phenyl-H); 5.19-4.98 (m, 2H, H-3, H-4); 4.97 (dd, ³*J*_{H1A,H2A} = 8.1 Hz, ³*J*_{H3A,H2A} = 9.2 Hz, 0.5H, H-2A); 4.86 (dd, ³*J*_{H1B,H2B} = 8.1 Hz, ³*J*_{H3B,H2B} = 9.2 Hz, 0.5H, H-2B); 4.59 (s, 2H, O-CH₂-CO-); 4.51 (d, ³*J*_{H1A,H2A} = 8.1 Hz, 0.5H, H-1A); 4.37 (d, ³*J*_{H1B,H2B} = 8.1 Hz, 0.5H, H-1B); 4.33-4.05 (m, 3H, H-6a, H-6b, -CH₂-O); 3.90-3.77 (m, 1H, -CH-CH₂-O); 3.67-3.56 (m, 1H, H-5); 2.41-2.30 (m, 1H, CH-TMS); 2.06, 2.00, 1.99, 1.96, 1.94, 1.89, 1.65 (s, 12H, CH₃CO-); -0.07, -0.08 (2s, 9H, Si(CH₃)₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 172.1 (-COOH), 170.4, 169.4, 169.4, 169.3 (CH₃CO-); 154.98 (C_{ipso} ArO); 135.4, 135.2 (C_{ipso} Ar-CH); 128.7, 128.6 (C_{arom.}); 114.5, 114.47 (C_{arom.}); 100.9, 99.4 (C-1); 73.0, 72.8, 71.6, 71.3, 71.2, 71.1, 70.6 (C-2, C-3, C-4, C-5); 68.5, 68.4 (-CH₂-OH); 62.0, 61.9 (C-6); 37.4, 36.3 (-CH-TMS); 20.7, 20.6, 20.5, 20.3 (CH₃CO-); -2.4, -2.6 (-Si(CH₃)₃).

Wegen des Stereozentrums am PTMSE-Anker zeigen die NMR-Spektren jeweils die Mischung zweier Diastereomere.

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 637.4 ([M+K]⁺, ber.: 637.2); 621.4 ([M+Na]⁺, ber.: 621.2); 371.2 ([M+Na-PTMSE]⁺, ber.: 371.1).

Beladung von TentaGel S NH₂ mit 4-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]phenoxyessigsäure (51)



Zu einer Lösung von 450 mg (0.75 mmol) **50** in einer Mischung aus 30 ml Dichlormethan und 6 ml DMF werden 116 mg (0.75 mmol) HOBt, 154 mg (169 μ l, 1.5 mmol, 2 Äquiv.)

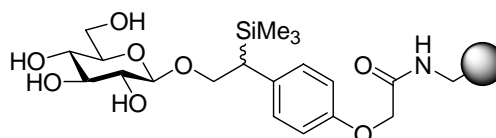
N-Methylmorpholin und 240 mg (0.75 mmol) TBTU gegeben. Es wird 20 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend gibt man die Reaktionslösung in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor, in dem 4.0 g TentaGel S NH₂ (*NovaSyn TG amino resin*, Novabiochem, 90 μm, Beladung: 0.24 mmol/g, 0.96 mmol, 1.25 Äquiv.) in 30 ml Dichlormethan über einen Zeitraum von 30 min vorgequollen wurden. Man schüttelt 18 h bei Raumtemp. und filtriert die Reaktionslösung anschließend ab. Das Harz wird dreimal mit je 25 ml DMF sowie dreimal mit je 25 ml Dichlormethan gewaschen und i. Feinvak. getrocknet.

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 1757 (s) (C=O Valenzschwingung); 1674 (m) (Amid I); 1510 (w) (Amid II).

Capping der freien Aminfunktionen des beladenen Harzes

3.2 g des polymeren Trägers werden mit 80 ml Pyridin/Acetanhydrid (3:1) versetzt und 20 min geschüttelt. Anschließend wird dreimal mit je 30 ml DMF, einmal mit je 30 ml MeOH, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂ und zweimal mit je 30 ml Diethylether gewaschen. Das Harz wird i. Feinvak. getrocknet.

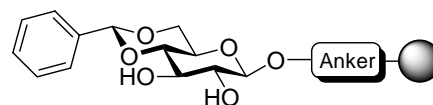
PTMSEL-β-D-glucopyranosid an TentaGel (52)



3.2 g **51** werden in einem Festphasenreaktor mit 60 ml Methanol über einen Zeitraum von 30 min vorgequollen. Anschließend wird tropfenweise mit einer Lösung von 40 mg Na in 30 ml absol. Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 9-9.5 eingestellt ist (ca. 3 ml). Man schüttelt 3 h. Anschließend wird dreimal mit je 30 ml Methanol und dreimal mit je 30 ml Dichlormethan gewaschen. Das Harz wird i. Feinvak. getrocknet.

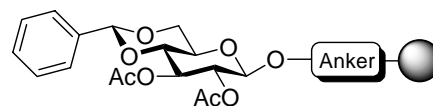
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 1674 (m) (Amid I, C=O Valenzschwingung); 1510 (w) (Amid II).

PTMSEL-4,6-*O*-benzyliden-β-D-glucopyranosid an TentaGel (53)



3.0 g **52** werden in einem Festphasenreaktor 30 min mit 80 ml Acetonitril vorgequollen. Es wird mit 2.7 ml Benzaldehyddimethylacetal versetzt, mit wenigen Kristallen 4-Toluolsulfonsäure-monohydrat auf einen pH-Wert von 3-4 angesäuert und über einen Zeitraum von 6 h geschüttelt. [Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 9:1), nach vorheriger Abspaltung des Zuckers vom Harz. Dazu werden etwa 20 mg des Harzes aus der Reaktionsmischung in 0.5 ml THF gelöst, mit einer Lösung von 5 mg Ammoniumfluorid in 0.5 ml THF versetzt und 20 min gerührt. $R_f = 0.31$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)]. Nach vollständigem Ablauf wird die Reaktionslösung abfiltriert, das Harz zweimal mit je 30 ml Acetonitril und Dichlormethan gewaschen und i. Feinvak. getrocknet.

PTMSEL-2,3-di-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzyliden- β -D-glucopyranosid an Tentagel (54)



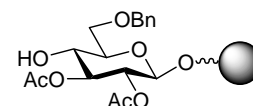
3.0 g **53** werden in einem Festphasenreaktor mit 30 ml einer Pyridin-Acetanhydrid-Mischung (2:1 v/v) versetzt und 4 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend wird das Reagenziengemisch durch Filtration entfernt und das Harz mit je 20 ml CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, MeOH und dreimal mit je 20 ml Dichlormethan gewaschen und i. Feinvak. getrocknet.

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 1755(s) (C=O-Valenzschwingung); 1674(m) (Amid I, C=O-Valenzschwingung); 1510(w) (Amid II).

700 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): δ [ppm] 7.45-7.25 (m, 5H, Phenyl-H, Bzn); 7.15-7.00 (m, 5H, Phenyl-H, PTMSEL überlagert mit Phenyl-H des Polystyrols); 5.50, 5.49 (2s, 1H, -CH-Bzn); 5.30-5.20 (m, 1H, H-3); 4.98 (dd, ³J_{H1A,H2A} = 7.0 Hz, ³J_{H2A,H3A} = 9.2 Hz, 0.5H, H-2A); 4.92 (dd, ³J_{H1B,H2B} = 7.8 Hz, ³J_{H2B,H3B} = 9.5 Hz, 0.5H, H-2B); 4.64 (d, ³J_{H1A,H2A} = 7.0 Hz, 0.5H, H-1A); 4.54 (d, ³J_{H1B,H2B} = 7.8 Hz, 0.5H, H-1B); 4.46 (s, 4H, -O-CH₂-CO-); 4.40-4.20 (m, 2H, H-5, -CH₂-O-); 3.90-3.82 (m, 1H, H-6a); 3.90-3.50 (Signal unterdrückt, Watergate-Sequenz); 2.45-2.35 (m, 1H, -CH-TMS); 2.03, 2.00, 1.97, 1.72 (4s, 6H, CH₃CO-); -0.02, -0.03 (2s, 18H, -Si(CH₃)₃).

Wegen des Stereozentrums am PTMSE-Anker zeigt das NMR-Spektrum die Mischung zweier Diastereomere.

PTMSEL-2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosid an Tentagel (55)



In einem Festphasenreaktor werden 300 mg (0.06 mmol) **54** 15 min in 3 ml absol. THF vorgequollen. Hierzu gibt man 230 mg (3.6 mmol, 60 Äquiv.) NaCNBH₃ und versetzt mit einer bei -10 °C ges. etherischen HCl-Lsg. bis sich ein pH-Wert von 2-3 eingestellt hat (*Acilit*[®]). Man schüttelt 19 h bei Raumtemp., wobei der pH-Wert gegebenenfalls nachreguliert werden muss. Anschließend wäscht man mit THF (3 x 5 ml), ges. NaHCO₃-Lsg. (2 x 5 ml), dest. Wasser (3 x 10 ml), THF, MeOH, THF, DMF, Piperidin/DMF (1/5, v/v), DMF, CH₂Cl₂ (2 x mit je 5 ml) und abschließend dreimal mit je 5 ml Dichlormethan. Das Harz wird i. Feinvak. getrocknet.

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 1755(s) (C=O-Valenzschwingung); 1674(m) (Amid I, C=O-Valenzschwingung); 1510 (w) (Amid II).

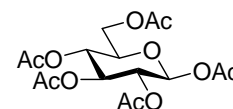
700 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): δ [ppm] 7.40-7.20 (m, 5H, Phenyl-H, Bzn); 7.15-6.75 (m, 5H, Phenyl-H, PTMSEL überlagert mit Phenyl-H des Polystyrols); 5.05-4.95 (m, 1H, H-3); 4.90-4.80 (m, 1H, H-2); 4.75, 4.72 (2s, 2H, O-CH₂Bn); 4.60, 4.58 (2s, 2H, -O-CH₂CO-); 4.53, 4.41 (s_b, 1H, H-1); 4.35-4.25 (m, 1H, -CH₂CH-TMS); 3.85-3.80 (m, 1H, -CH₂CH-TMS); 3.80-3.70 (m, 1H, H-4, Signal überlagert mit Methylen-Gruppen des PEGs); 3.70-3.50 (m, H-6a, H-6b, CH₂-PEG Signal in diesem Bereich durch Watergate-Sequenz unterdrückt); 3.43-3.40 (m, 1H, H-5); 2.40-2.35 (m, 1H, -CH-TMS); 2.02, 1.96, 1.72 (4s, 6H, CH₃CO-); -0.02, -0.03 (2s, 9H, -Si(CH₃)₃).

Wegen des Stereozentrums am PTMSE-Anker zeigt das NMR-Spektrum die Mischung zweier Diastereomere.

5.3.3 Optimierung der Festphasenreaktionen

Penta-*O*-acetyl-β-D-glucopyranose (61)²⁰⁰

βAc₅Glc



Eine Suspension von 12.5 g (0.15 mol) Natriumacetat in 150 ml (1.6 mol) Acetanhydrid wird in einem Zweihalskolben mit Dimrothkühler zum Sieden erhitzt. Die Heizquelle wird entfernt und 25 g (0.14 mol) wasserfreie D-Glucose werden so zugegeben, dass die Mischung am Sieden bleibt. Nachdem die Zugabe der Glucose beendet ist, rührt man weitere 30 min unter Rückfluss, gießt auf 500 ml Eis und rührt 2 h. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit eiskaltem Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 36.5 g (67 %); farbloser, kristalliner Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = 8.2$ (1, CH₂Cl₂); Schmp.: 137 °C (Lit.:²⁰⁰ 139 °C); R_f = 0.19 (°Hex/EE 1:1).

C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	(390.34)	Ber.:	C 49.23	H 5.68
	[390.12]	Gef.:	C 49.25	H 5.67

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 5.68 (d, ³J_{H1,H2} = 8.1 Hz, 1H, H-1); 5.22 (dd, ³J_{H3,H2} = 9.6 Hz, ³J_{H4,H3} = 9.2 Hz, 1H, H-3); 5.10 (dd, ³J_{H1,H2} = 8.5 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.2 Hz, 1H, H-2); 5.09 (dd, ³J_{H4,H3} = 9.6 Hz, ³J_{H4,H5} = 9.9 Hz, 1H, H-4); 4.26 (dd, ³J_{H6a,H5} = 4.4 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 12.5 Hz, 1H, H-6a); 4.07 (dd, ²J_{H6b,H6a} = 12.5 Hz, ³J_{H6b,H5} = 2.2 Hz, 1H, H-6b); 3.85-3.75 (m, 1H, H-5); 2.08, 2.05, 2.00, 1.98 (5s, 15H, CH₃CO-).

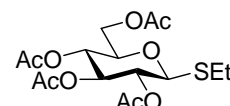
²⁰⁰ A. Burgard, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1995

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.5, 170.0, 169.3, 169.2, 168.9 (CH₃CO-); 91.6 (C-1); 72.73, 72.67, 70.2, 67.7 (C-2, C-3, C-4, C-5); 61.4 (C-6); 20.8, 20.6, 20.5 (CH₃CO-).

ESI-MS (positiv) m/z : 803.3([M+M+Na]⁺, ber.: 803.2); 454.2 ([M+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 454.1); 429.2 ([M+K]⁺, ber.: 429.3); 423.3 ([M+Na]⁺, ber.: 413.1); 394.3 ([M-AcOH+CH₃CN+Na]⁺, ber.:394.1); 353.2 ([M-AcOH+Na]⁺; ber.: 353.1).

Ethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosid (62)

βAc₄GlcSEt



Eine Lösung von 24.5 g (62.9 mmol) βAc₅Glc **61** und 5.4 ml (4.5 g, 73.5 mmol, 1.2 Äquiv.) Ethanthiol in 250 ml absol. Dichlormethan wird zusammen mit 2 g Molekularsieb (4 Å) 30 min bei Raumtemp. unter Argon gerührt. Anschließend kühlt man den Ansatz auf 0 °C ab und versetzt langsam mit 19.0 ml (21.5 g, 151 mmol, 2.5 Äquiv.) BF₃-Etherat. Nach vierstündigem Rühren bei Raumtemp. wird das Molsieb durch Filtration über *Hyflo* abgetrennt. Man gießt das Filtrat unter kräftigem Rühren in eine Mischung aus 50 ml Eis und 50 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung. Die Lösung wird mit festem NaHCO₃ neutralisiert. Die wässrige Phase wird anschließend zweimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird aus 200 ml Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 23.2 g (94 %); farbloser, kristalliner Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -12.3$ (c = 1, CH₂Cl₂); R_f = 0.29 (°Hex/EE 1:1); Schmp.: 80°C (Lit.:²⁰¹ 80 °C).

C₁₆H₂₄O₉S (392.42) [392.11]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 5.19 (dd, ³J_{H₃,H₂} = 9.2 Hz, ³J_{H₄,H₃} = 9.6 Hz, 1H, H-3); 5.05 (dd, ³J_{H₃,H₄} = 9.9 Hz, ³J_{H₂,H₃} = 9.2 Hz, 1H, H-4); 5.00 (dd, ³J_{H₁,H₂} = 9.6 Hz, ³J_{H₃,H₂} = 9.6 Hz, 1H, H-2); 4.46 (dd, ³J_{H₁,H₂} = 9.9 Hz, 1H, H-1); 4.21 (dd, ³J_{H₆,H₅} = 4.8 Hz, ²J_{H₆,H_{6'}} = 12.1 Hz, 1H, H-6); 4.09 (dd, ²J_{H_{6'},H₆} = 12.1 Hz, ³J_{H_{6'},H₅} = 2.6 Hz, 1H, H-6'); 3.68 (ddd, ³J_{H₃,H₄} = 9.9 Hz, ³J_{H_{6'},H₅} = 2.6 Hz, ³J_{H₆,H₅} = 4.8 Hz, 1H, H-5); 2.68 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, -SCH₂CH₃); 2.04, 2.02, 1.99, 1.98 (4s,12H, CH₃CO-); 1.24 (t, ³J = 7.35 Hz, 3H, -SCH₂CH₃).

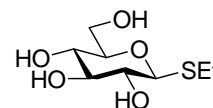
75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.6, 170.1, 169.4, 169.3 (4s, CH₃CO-); 83.5 (C-1); 75.8, 73.9, 69.8, 68.2 (C-2, C-3, C-4, C-5); 62.1 (C-6); 24.1 (-SCH₂CH₃); 20.7, 20.6, 20.5 (4C, CH₃CO-); 14.8 (-SCH₂CH₃).

²⁰¹ S. Houdier, P. M. Vottero, *Carbohydr. Res.* **1993**, 248, 377

ESI-MS (positiv) m/z : 807.4 ($[M+M+Na]^+$, ber.:807.2); 456.2($[M+Na+CH_3CN]^+$, ber.: 456.2); 431.2 ($[M+K]^+$, ber.: 431.2); 415.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 415.1); 333.2 ($[M-2AcOH+H]^+$, ber.: 331.1); 213.1 ($[M-3AcOH+H]^+$, ber.: 213.1).

Ethyl-1-thio- β -D-gluco-pyranosid (63)

β GlcSEt



Eine Lösung von 23.2 g (59.1 mmol) **62** in 200 ml Methanol wird unter ständiger pH-Kontrolle langsam mit einer Lösung von 20 mg Natrium in 20 ml Methanol versetzt, bis sich ein pH-Wert von 8.5-9.5 eingestellt hat. Man rührt 3 h. Nach vollständiger Deacetylierung wird die Lösung mit *Amberlyst 15* neutralisiert. Anschließend wird der Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 11.9 g (90%); farbloses, hochviskoses Öl; $[\alpha]_D^{22} = -26.5$ (1, MeOH); $R_f = 0.13$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 16:1); $R_f = 0.0$ ($^{\circ}Hex/EE$ 1:1).

$C_8H_{16}O_5S$ (224.27) [224.07]

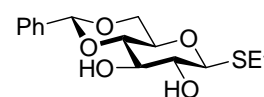
300 MHz- 1H -NMR (*MeOH-d*₄): δ [ppm] 4.41 (dd, $^3J_{H1,H2} = 9.6$ Hz, 1H, H-1); 3.89 (dd, $^3J_{H6a,H5} = 1.5$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 11.9$ Hz, 1H, H-6a); 3.68 (dd, $^2J_{H6b,H6b} = 11.9$ Hz, $^3J_{H6b,H5} = 5.2$ Hz, 1H, H-6b); 3.40-3.30 (m, 7H, H-3, H-4, H-5, 4*OH); 3.23 (dd, $^3J_{H1,H2} = 9.6$ Hz, $^3J_{H3,H2} = 8.8$ Hz, 1H, H-2); 2.78 (m, 2H, -SCH₂CH₃); 1.32 (t, 3J = 7.5 Hz, 3H, -SCH₂CH₃).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (*MeOH-d*₄): δ [ppm] 86.9 (C-1); 82.0; 79.6 74.3 71.5 (C-2, C-3, C-4, C-5); 63.0 (C-6); 24.9 (-S-CH₂CH₃); 15.4 (-S-CH₂CH₃).

ESI-MS (positiv) m/z : 471.3 ($[M+M+Na]^+$, ber.: 471.1); 288.2 ($[M+CH_3CN+Na]^+$, ber.: 288.1); 247.2 ($[M+Na]^+$; ber.: 247.1).

Ethyl-4,6-*O*-benzyliden-1-thio- β -D-gluco-pyranosid (64)²⁰²

β BznGlcSEt



Eine Lösung von 11.9 g (53.1 mmol) **63** in 250 ml Acetonitril wird mit 17.9 ml frisch destilliertem Benzaldehyddimethylacetal (17.6 g, 116 mmol, 2.2 Äquiv.) versetzt und durch wenige Kristalle von 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat auf pH = 3-4 angesäuert. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemp. gerührt. Man neutralisiert mit *N*-Ethyl-diisopropylamin und entfernt das Lösungsmittel i. Vak. Die Reinigung des

²⁰² T. Nakagawa, K. Ueno, M. Kashiwa, J. Watanabe, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 1921

Rohproduktes (ca. 14 g) erfolgt mittels Flashchromatographie an 500 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

Ausbeute: 12.9 g (78%); farbloser, kristalliner Feststoff; Schmp.: 138 °C, (Lit.:²⁰² 130 °C); $[\alpha]_D^{22} = -61.4$ (1, CH₂Cl₂), (Lit.:²⁰² $[\alpha]_D^{22} = -59$); $R_f = 0.16$ (°Hex/EE 1:1).

C₁₅H₂₀O₅S (312.38) [312.10]

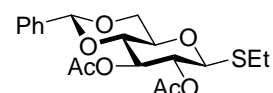
300 MHz-¹H-NMR (MeOH-*d*₄): δ [ppm] 7.55-7.40 (m, 2H, arom. H); 7.40-7.25 (m, 3H, arom. H); 5.50 (s, 1H, Benzyliden-H); 4.40 (d, ³J_{H1,H2} = 9.6 Hz, 1H, H-1); 4.30 (dd, ³J_{H3,H4} = 10.7 Hz, ³J_{H3,H2} = 10.3 Hz, 1H, H-3); 3.75 (dd, ³J_{H4,H5} = 8.5 Hz, ³J_{H4,H3} = 8.8 Hz, 1H, H-4); 3.73 (dd, ³J_{H1,H2} = 9.9 Hz, ³J_{H3,H2} = 10.3 Hz, 1H, H-2); 3.55-3.30 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 3.2 (sb, 1H, -OH); 2.91 (sb, 1H, -OH); 2.72 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, -S-CH₂CH₃); 1.29 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, -S-CH₂CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (MeOH-*d*₄): δ [ppm] 136.9 (C_{ipso}), 129.7, 129.3, 129.0, 128.3, 126.3 (5C, C-arom.), 101.9 (CH-Bzn), 86.5 (C-1); 80.3, 74.5, 73.2, 70.5 (C-2, C-3, C-4, C-5); 68.6 (C-6); 24.7 (-S-CH₂CH₃); 15.2 (-S-CH₂CH₃).

ESI-MS (positiv) m/z : 647.5 ([M+M+Na]⁺, ber.: 647.2); 376.3 ([M+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 376.1); 335.2 ([M+Na]⁺; ber.: 335.2).

Ethyl-2,3-di-O-acetyl -4,6-O-benzyliden -1-thio-β-D-glucopyranosid (65)

βAc₂BznGlcSEt



Man gibt 30 ml Pyridin/Acetanhydrid (v/v, 2:1) zu 12.9 g (41.3 mmol) **64** und rührt 3 h bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Reagenzien i. Feinvak. entfernt und der Rückstand dreimal mit je 10 ml Toluol und zweimal mit je 10 ml Dichlormethan kdestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mittels Flashchromatographie an 500 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 3:2).

Ausbeute: 14.7 g (90 %); farbloser, kristalliner Feststoff; Schmp.: 140 °C; $[\alpha]_D^{22} = -53.9$ (c = 1, CH₂Cl₂); $R_f = 0.56$ (°Hex/EE 1:1).

C ₁₉ H ₂₄ O ₇ S	(396.45)	Ber.:	C 57.56	H 6.10	S 8.09
	[396.12]	Gef.:	C 57.47	H 6.16	S 8.08

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): δ [ppm] 7.45-7.25 (m, 5H, Phenyl-H); 5.48 (s, 1H, Bzn-H); 5.32 (dd, ³J_{H3,H4} = 9.2 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.2 Hz, 1H, H-3); 5.02 (dd, ³J_{H1,H2} = 9.9 Hz, ³J_{H3,H2} = 8.8 Hz, 1H, H-2); 4.56 (d, ³J_{H1,H2} = 10.3 Hz, 1H, H-1); 4.35 (dd, ³J_{H6a,H5} = 4.8 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.7 Hz, 1H, H-6a); 3.76 (dd, ³J_{H6b,H5} = 9.9 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 10.3 Hz, 1H, H-6b); 3.67 (dd, ³J_{H4,H5} = 9.6 Hz, ³J_{H4,H3} = 9.6 Hz, 1H, H-4); 3.54 (ddd, ³J_{H6b,H5} = 9.9 Hz,

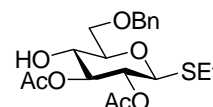
$^2J_{\text{H6a,H5}} = 4.8 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H4,H5}} = 9.9 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 2.69 (m, 2H, -S-CH₂CH₃); 2.03, 2.02 (2s, 6H, CH₃CO-); 1.25 (t, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 3H, -S-CH₂CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.0, 169.6 (CH₃CO-); 136.8 (C_{ipso}), 129.1, 128.2, 126.1 (5C, C-arom.), 101.5 (CH-Bzn), 84.1 (C-1); 78.3, 76.6, 70.7, 70.6 (C-2, C-3, C-4, C-5); 68.5 (C-6); 24.3 (-S-CH₂CH₃); 20.7 (CH₃CO-); 14.8 (-S-CH₂CH₃).

ESI-MS (positiv) m/z : 815.5 ([M+M+Na]⁺, ber.: 815.2); 460.3 ([M+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 460.1); 419.3 ([M+Na]⁺, ber.: 419.1); 400.3 ([M-AcOH+CH₃CN+Na]⁺, ber.: 400.1); 359.3 ([M-AcOH+Na]⁺, ber.: 359.1).

Ethyl-2,3-di-O-acetyl-6-O-benzyl-1-thio-β-D-glucopyranosid (66)

β-Ac₂BnGlc-SEt



Zu einer Lösung aus 14.7 g (37 mmol) **65** und 23.3 ml (139 mmol, 3.7 Äquiv.) Triethylsilan in 50 ml Dichlormethan gibt man bei 0 °C 9.6 ml (125 mmol, 3.4 Äquiv.) TFA. Nach Ende der Zugabe lässt man auf Raumtemp. erwärmen und rührt bis das gesamte Edukt umgesetzt ist (ca. 2 h). Anschließend wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und mit 50 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt. Man gibt solange festes NaHCO₃ hinzu bis keine weitere Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Die org. Phase wird nacheinander mit 50 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und mit 50 ml Wasser gewaschen. Die Waschlösungen werden mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an 700 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

Ausbeute: 13.2 g (87 %); farblose, hochviskose Flüssigkeit; $[\alpha]_D^{22} = -40.2$ (1, CH₂Cl₂); $R_f = 0.35$ (°Hex/EE 1:1).

C₁₉H₂₆O₇S (398.47) [398.14]

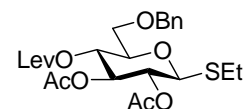
400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): δ [ppm] 7.35-7.25 (m, 5H, Phenyl-H); 5.05 (dd, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.2 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H3,H2}} = 9.2 \text{ Hz}$, 1H, H-3); 4.94 (dd, $^3J_{\text{H1,H2}} = 9.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H3,H2}} = 9.6 \text{ Hz}$, 1H, H-2); 4.56 (dd, $J = 15.8 \text{ Hz}$, $J = 11.8 \text{ Hz}$, 2H, -O-CH₂-Phenyl); 4.45 (d, $^3J_{\text{H1,H2}} = 9.9 \text{ Hz}$, 1H, H-1); 3.85-3.65 (m, 3H, H-4, H-6a, H-6b); 3.35 (m, 1H, H-5); 3.00 (sb, 1H, -OH); 2.75-2.55 (m, 2H, -S-CH₂CH₃); 2.06, 2.02 (2s, 6H, CH₃CO-); 1.23 (t, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 3H, -S-CH₂CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 171.2, 169.6 (CH₃CO-); 137.5 (C_{ipso}); 128.5, 127.9, 127.7 (5C, C-arom.); 83.3 (C-1); 78.0, 73.7, 70.9, 70.3, 69.9 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6); 24.1 (-S-CH₂CH₃); 20.8, 20.7 (CH₃CO-); 14.8 (-S-CH₂CH₃).

ESI-MS (positiv) m/z : 819.5 ($[M+M+Na]^+$, ber.: 819.2); 462.3 ($[M+CH_3CN+Na]^+$, ber.: 462.2); 421.3 ($[M+Na]^+$; ber.: 421.1); 402.3 ($[M-AcOH+CH_3CN+Na]^+$, ber.: 402.1); 361.3 ($[M-AcOH+Na]^+$; ber.: 361.1); 342.3 ($[M-2AcOH+CH_3CN+Na]^+$, ber.: 342.1); 301.2 ($[M-2AcOH+Na]^+$, ber.: 301.1).

Ethyl-2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzy-4-*O*-lävulinoyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (67)¹²⁶

β Ac₂BnLevGlc-SEt



Zu einer Lösung aus 8.0 g (20.1 mmol) **60**, 2.4 g (20.7 mmol, 2.0 ml) Lävulinsäure und 0.24 g (2.0 mmol, 0.1 Äquiv.) DMAP in 100 ml Dichlormethan gibt man bei 0 °C 5.4 g (27.7 mmol, 1.3 Äquiv.) DCC und rührt 3 h. Der Ansatz wird filtriert und das Filtrat mit 100 ml Dichlormethan verdünnt. Man wäscht die org. Phase mit je 80 ml eiskalter 0.1 N HCl, ges. NaHCO₃-Lsg. und Wasser. Die wässrigen Phasen werden zweimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Die Reinigung des Rohproduktes (ca. 10 g) erfolgt durch Flashchromatographie an 500 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

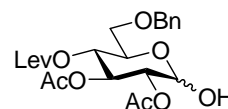
Ausbeute: 8.9 g (89 %); farbloser, kristalliner Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -10.8$ (1, CHCl₃); Lit.: $[\alpha]_D^{23} = -6.4$ (0.56, CHCl₃); $R_f = 0.35$ (°Hex/EE 1:1); $R_f = 0.54$ (CH₂Cl₂/MeOH 19:1); Schmp.: 74°C;

C ₂₄ H ₃₂ O ₉ S	(496.57)	Ber.:	C 58.05	H 6.50	S 6.46
	[496.18]	Gef.:	C 58.08	H 6.50	S 6.51

300 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): δ [ppm] 7.35-7.20 (m, 5H, Phenyl-H); 5.22 (dd, ³J_{H3,H4} = 9.6 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.2 Hz, 1H, H-3); 5.06 (dd, ³J_{H1,H2} = 9.9 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.6 Hz, 1H, H-2); 4.99 (dd, ³J_{H4,H5} = ³J_{H3,H4} = 9.6 Hz, 1H, H-4); 4.50 (s, 2H, -O-CH₂Bn); 4.47 (d, ³J_{H1,H2} = 10.3 Hz, 1H, H-1); 3.70-3.60 (m, 1H, H-5); 3.60-3.50 (m, 2H, H-6a, H-6b); 2.75-2.55 (m, 4H, -CH₂CH₂COO-, -S-CH₂CH₃); 2.45-2.25 (m, 2H, CH₃COCH₂-); 2.11 (s, 3H, -CH₂COCH₃); 2.03, 2.02 (2s, 6H, CH₃CO-); 1.25 (t, ³J = 7.5 Hz, 3H, -SCH₂CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 205.9 (CH₃COCH₂-); 171.2 (CH₃CO-); 170.4 (-CH₂CO-); 169.6 (CH₃CO-); 137.9 (C_{ipso}); 128.3, 127.8, 127.6 (5C, C-arom.); 83.3 (C-1); 76.6, 73.7, 73.5, 70.1, 69.3, 69.2 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, -O-CH₂-Ph); 37.8 (-CH₂COO-); 29.6 (CH₃COCH₂CH₂-); 27.7 (CH₃COCH₂CH₂-); 24.1 (-S-CH₂CH₃); 20.7, 20.6 (CH₃CO-); 14.9 (-S-CH₂CH₃).

FD-MS (positiv) m/z : 993.2 ($[M+M]^+$, ber.: 992.4); 496.6 ($[M]^+$, ber.: 496.2).

2,3-Di-O-acetyl-6-O-benzyl-4-O-lävulinoyl-D-glucopyranose (68)Ac₂BnLevGlc

Zu einer Lösung von 3.5 g (7.0 mmol) **67** und 250 μ l (14 mmol, 2 Äquiv.) Wasser in 25 ml 1,2-Dichlorethan tropft man langsam eine Lösung aus 1.6 g (7.0 mmol) NIS und 70 μ l (0.8 mmol, 0.1 Äquiv.) TfOH in 25 ml 1,2-Dichlorethan/Ether (1/1; v/v). Man rührt weitere 2 h; die Reaktionsmischung färbt sich dabei tiefviolett. Die org. Phase wird mit 50 ml Dichlormethan verdünnt, mit 30 ml einer ges. Na₂O₃S₂-Lsg. und 30 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Das zurückbleibende Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 500 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: ^cHex/EE 3:2).

Ausbeute: 3.05 g (96%), davon 2.0 g (63%) β -Anomer, 0.45 g (14%) α -Anomer, 0.6 g (19%) Anomerengemisch.

C₂₂H₂₈O₁₀ (452.45) [452.17]

β -Anomer: R_f = 0.16 (^cHex/EE 1:1); farbloses, hochviskoses Öl; $[\alpha]_D^{22}$ = 70.5 (c = 1, CH₂Cl₂).

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.35-7.25 (m, 5H, Phenyl-H); 5.51 (dd, ³J_{H3,H4} = 9.8 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.8 Hz, 1H, H-3); 5.41 (d, ³J_{H1,H2} = 7.0 Hz, 1H, H-1); 5.06 (m, 1H, H-4); 4.85 (dd, ³J_{H1,H2} = 7.0 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.8 Hz, 1H, H-2); 4.51 (s, 2H, -O-CH₂-Phenyl); 4.25-4.15 (m, 1H, H-5); 3.55-3.45 (m, 2H, H-6a, H-6b); 2.75-2.55 (m, 2H, -CH₂CH₂COO-); 2.45-2.30 (m, 2H, CH₃COCH₂-); 2.13 (s, 3H, -CH₂COCH₃); 2.04, 2.02 (2s, 6H, CH₃CO-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 206.0 (CH₃COCH₂-); 171.9 (CH₃CO-); 171.2 (-CH₂COO-); 169.2 (CH₃CO-); 137.7 (C_{ipso}); 128.3, 128.0, 127.7 (5C, C-arom.); 91.5 (C-1); 73.6, 73.2, 71.0, 69.9, 68.1 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, -O-CH₂-Ph); 37.6 (-CH₂COO-); 29.6 (CH₃COCH₂-); 27.7 (CH₃COCH₂-); 21.0, 20.9 (CH₃CO-).

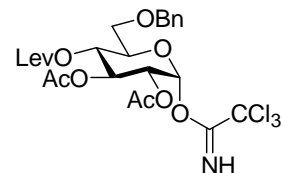
α -Anomer: R_f = 0.11 (^cHex/EE 1:1); farbloses, hochviskoses Öl.

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.40-7.15 (m, 5H, Phenyl-H); 6.22 (d, ³J_{H1,H2} = 3.9 Hz, 1H, H-1); 5.30-5.10 (m, 2H, H-3, H-4); 4.47 (s, 2H, -O-CH₂-Phenyl); 4.00-3.90 (m, 1H, H-5); 3.84 (dd, ³J_{H1,H2} = 3.9 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.6 Hz, 1H, H-2); 3.56 (dd, ²J_{H6a,H6b} = 10.9 Hz, ³J_{H6a,H5} = 3.7 Hz, 1H, H-6a), 3.48 (dd, 2H, ²J_{H6a,H6b} = 10.9 Hz, ³J_{H6a,H5} = 7.0 Hz, 1H, H-6a); 2.80-2.55 (m, 2H, -CH₂CH₂COO-); 2.50-2.25 (m, 2H, -CH₂CH₂COO-); 2.16 (s, 3H, -CH₂COCH₃); 2.13, 2.11 (2s, 6H, CH₃CO-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 206.0 (CH₃COCH₂-); 171.9 (CH₃CO-); 171.2 (-CH₂COO-); 169.2 (CH₃CO-); 137.7 (C_{ipso}); 128.3, 128.0, 127.7 (5C, C-arom.); 91.5 (C-1); 73.6, 73.2, 71.0, 69.9, 68.1 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, -O-CH₂-Ph); 37.6 (-CH₂COO-); 29.6 (CH₃COCH₂-); 27.7 (CH₃COCH₂-); 21.0, 20.9 (CH₃CO-).

ESI-MS (positiv) m/z : 491.2 ($[M+K]^+$, ber.: 491.1); 475.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 475.3); 415.2 ($[M+AcOH+Na]^+$, ber.: 415.1); 359.1 ($[M+LevOH+Na]^+$, ber.: 359.1); 299.1 ($[M+AcOH+LevOH+Na]^+$, ber.: 299.1).

2,3-Di-O-acetyl-6-O-benzyl-4-O-lävulinoyl- α -D-glucopyranosyltrichloracetimidat (60)



Eine Lösung von 1.7 g (3.7 mmol) **68** in 20 ml Dichlormethan wird mit 2.9 g (18.8 mmol, 2.1 ml, 5 Äquiv.) Trichloracetonitril und 6 Tropfen DBU versetzt. Während die Lösung über 4 h bei Raumtemp. gerührt wird, verfärbt sie sich von leicht gelb nach braun. Das Lösungsmittel und überschüssiges Trichloracetonitril werden i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 100 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: $^{\circ}\text{Hex}/\text{EE}$ 3:2).

Ausbeute: 2.1 g (94%), gelbliches, hochviskoses Öl; $R_f = 0.42$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EE}$ 1:1); $R_f = 0.21$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EE}$ 2:1); $[\alpha]_D^{22} = 89.8$ ($c = 1$, CH_2Cl_2).

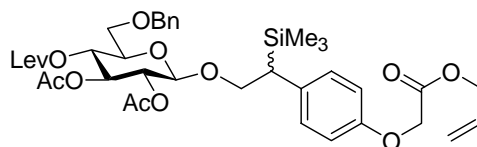
$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{Cl}_3\text{NO}_{10}$	(595.08)	Ber.:	C 48.30	H 4.73	N 2.35
	[596.84]	Gef.:	C 48.82	H 5.19	N 2.34

$300 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 8.63 (s, 1H, NH); 7.35-7.25 (m, 5H, Phenyl-H); 6.54 (d, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, 1H, H-1); 5.57 (dd, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H4,H5}} = 9.9$ Hz, 1H, H-4); 5.28 (dd, $^3J_{\text{H3,H4}} = 9.9$ Hz, $^3J_{\text{H3,H2}} = 9.9$ Hz, 1H, H-3); 5.09 (dd, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, $^3J_{\text{H3,H2}} = 9.9$ Hz, 1H, H-2); 4.48 (s, 2H, -O-CH₂-Phenyl); 4.25-4.10 (m, 1H, H-5); 3.65-3.50 (m, 2H, H-6a, H-6b); 2.75-2.55 (m, 2H, CH₃COCH₂CH₂COO-); 2.50-2.30 (m, 2H, CH₃COCH₂CH₂COO-); 2.13 (s, 3H, -CH₂COCH₃); 2.04, 2.02 (2s, 6H, CH₃CO-).

$75.5 \text{ MHz-}^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 205.9 (CH₃COCH₂-); 171.2 (CH₃CO-); 170.2 (-CH₂COO-); 169.8 (CH₃CO-); 160.9 (Cl₃C-), 137.7 (C_{ipso}); 128.3, 127.9, 127.6 (5C, C_{arom.}); 93.1 (C-1); 73.5, 71.3, 69.9, 69.7, 68.4, 67.8 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, -O-CH₂-Ph); 37.6 (-CH₂COO-); 29.6 (CH₃COCH₂-); 27.7 (CH₃COCH₂-); 20.7, 20.4 (CH₃CO-).

ESI-MS (positiv) m/z : 663.2 ($[M(1^{*35}\text{Cl}, 2^{*37}\text{Cl})+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}]^+$, ber.: 663.1); 661.2 ($[M(2^{*35}\text{Cl}, 1^{*37}\text{Cl})+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}]^+$, ber.: 661.1); 659.2 ($[M(3^{*35}\text{Cl})+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}]^+$, ber.: 659.1); 622.1 ($[M(1^{*35}\text{Cl}, 2^{*37}\text{Cl})+\text{Na}]^+$, ber.: 622.1); 620.1 ($[M(2^{*35}\text{Cl}, 1^{*37}\text{Cl})+\text{Na}]^+$, ber.: 620.1); 618.1 ($[M(3^{*35}\text{Cl})+\text{Na}]^+$, ber.: 618.1); 475.3 ($[M-\text{Cl}_3\text{CCN}+\text{Na}]^+$, ber.: 475.2).

4-[2-(2,3-Di-O-acetyl-6-O-benzyl-4-O-lävulinoyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäureallylester



Eine Lösung von 1.41 g (4.6 mmol) **60** und 2.75 g (4.6 mmol) 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäureallylester **45** in 25 ml absol. Dichlormethan wird auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und langsam mit 0.46 ml (0.046 mmol, 0.01 Äquiv.) einer 0.1 M Lösung von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat in Dichlormethan versetzt. Nach 30minütigem Rühren bei dieser Temperatur wird mit festem NaHCO_3 versetzt, mit 30 ml Dichlormethan verdünnt und mit 30 ml einer ges. NaHCO_3 -Lsg. und 30 ml einer ges. NaCl -Lsg. gewaschen. Die Waschlösungen werden mit 30 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten org. Phasen über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an 450 g Kieselgel (Laufmittel: $^{\circ}\text{Hex}/\text{EE}$ 1:1).

Ausbeute: 2.9 g (86 %), $R_f = 0.18$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EE}$ 1:1); farbloses, hochviskoses Öl; $[\alpha]_D^{22} = -2.1$ ($c = 1$, CH_2Cl_2).

$\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{O}_{13}\text{Si}$ (742.88) [742.30]

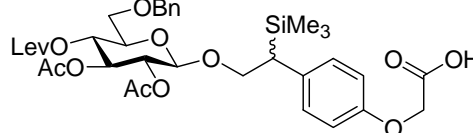
Wegen des Stereozentrums am PTMSE-Anker zeigen die NMR-Spektren jeweils die Mischung zweier Diastereomere.

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 7.34-7.24 (m, 5H, Bn- $\text{H}_{\text{arom.}}$); 6.96 (dd, $^4J = 1.1$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, PTMSEL- $\text{H}_{\text{arom.}}$); 6.75 (dd, $^3J = 8.8$ Hz, $^4J = 2.9$ Hz, 2H, PTMSEL- $\text{H}_{\text{arom.}}$); 5.88 (m, 1H, Allyl-H); 5.35-4.80 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, $\text{CH}_2=\text{CH-}$); 4.67 (dd, $^3J = 5.9$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2-$); 4.58, 4.57 (2s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$); 4.52 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{COO}$); 4.49 (d, $^3J_{\text{H1A-H2A}} = 4.8$ Hz, 0.5H, H-1A); 4.39 (d, $^3J_{\text{H1B-H2B}} = 7.7$ Hz, 0.5H, H-1B); 4.34-4.25 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH-TMS}$); 3.90-3.75 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH-TMS}$); 3.68-3.50 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 2.68-2.58 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO-}$); 2.41-2.30 (m, 3H, $-\text{CH-TMS}$, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO-}$); 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO-}$); 2.00, 1.97, 1.89, 1.64 (4s, 12H, $\text{CH}_3\text{CO-}$); -0.07, -0.09 (2s, 9H, $\text{Me}_3\text{Si-}$).

$75.5\text{ MHz-}^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 205.9 ($\text{CH}_3\text{COCH}_2-$), 171.3, 170.5, 170.4, 169.2, 168.8 ($\text{CH}_3\text{COO-}$, $-\text{CH}_2\text{COO-}$), 155.4, 155.3 ($\text{C}_{\text{ipso Ar-O}}$); 137.9 ($\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2-$); 135.3 ($\text{C}_{\text{ipso-Bn}}$); 135.0, 131.4 ($\text{C}_{\text{ipso Ar-CH}}$); 128.6, 128.5, 128.3, 128.1, 127.8, 127.7, 127.6 ($\text{C}_{\text{arom.}}$); 119.0 ($\text{CH}_2=\text{CH-}$); 114.4 ($\text{C}_{\text{arom.}}$); 101.0, 99.3 (C-1); 73.6, 73.4, 72.9, 72.6, 72.1, 71.4, 71.2, 70.7, 69.5, 69.2, 69.1, 68.6, 65.7, 65.5 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, $-\text{CH}_2\text{CH-TMS}$, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$, $\text{CH}_2\text{COO-}$, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2-$); 37.6 ($-\text{CH}_2-\text{COO}$); 37.3, 36.2 ($-\text{CH-TMS}$); 29.6 ($\text{CH}_3\text{COCH}_2-$); 27.8 ($\text{CH}_3\text{COCH}_2-$); 20.6, 20.5, 20.3 ($\text{CH}_3\text{COO-}$, $\text{CH}_3\text{COCH}_2-$); -2.3, -2.5 ($\text{Me}_3\text{Si-}$).

ESI-MS (positiv) m/z : 781.17 ($[M+K]^+$, ber.: 781.26); 765.25 ($[M+Na]^+$, ber.: 765.29); 705.27 ($[M+AcOH+Na]^+$, ber.: 705.27); 475.19 ($[M+PTMSEL+Na]^+$, ber.: 475.16).

4-[2-(2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-4-*O*-lävulinoyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure (69)



Zu 2.9 g (3.9 mmol) 4-[2-(2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-4-*O*-lävulinoyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäureallylester in 20 ml dest. THF gibt man unter Argonatmosphäre zwei Spatelspitzen (0.27 g, 0.23 mmol, 0.06 Äquiv.) $Pd(PPh_3)_4$ und eine Lösung von 0.90 g (4.2 mmol, 1.1 Äquiv.) Natrium-*p*-toluolsulfinat-Dihydrat in 6 ml Methanol. Es wird 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an 450 g Kieselgel (Laufmittel: CH_2Cl_2 /Methanol 15:1).

Ausbeute: 2.0 g (73 %); farbloser, kristalliner Feststoff; $R_f = 0$ (c Hex/EE 1:1); $R_f = 0.18$ (CH_2Cl_2 /MeOH 15:1); Smp.: 117 °C; $[\alpha]_D^{22} = 1.2$ ($c = 1$, CH_2Cl_2).

$C_{35}H_{46}O_{13}Si$ (702.82) [702.27]

Wegen des Stereozentrums am PTMSE-Anker zeigen die NMR-Spektren die Mischung zweier Diastereomere.

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] 7.38-7.245 (m, 5H, Bn- $H_{arom.}$); 6.95 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, PTMSEL- $H_{arom.}$); 6.75 (m, 2H, PTMSEL- $H_{arom.}$); 5.15-4.80 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4.60-4.45 (m, 4.5H, $-CH_2-Ph$, $-OCH_2COO-$, H-1A), 4.36 (d, $^3J_{H1B-H2B} = 8.1$ Hz, 0.5H, H-1B); 4.35-4.25 (m, 1H, $-CH_2CH-TMS$); 3.85-3.75 (m, 1H, $-CH_2CH-TMS$); 3.68-3.48 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 2.72-2.58 (m, 2H, $-CH_2CH_2COO-$); 2.45-2.30 (m, 3H, $-CH-TMS$, CH_3COCH_2-); 2.19 (s, 3H, CH_3COCH_2-); 1.99, 1.96, 1.89, 1.65 (4s, 12H, CH_3COO-); -0.07, -0.09 (2s, 9H, Me_3Si).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR [DEPT] ($CDCl_3$): δ [ppm] 206.2, 206.1 (CH_3COCH_2-), 171.4, 170.6, 169.4 (CH_3COO- , $-CH_2CH_2COO-$), 155.1 ($C_{ipso Ar-O}$); 137.9, 135.3 ($C_{ipso-Bn}$); 135.1, 133.9 ($C_{ipso Ar-CH}$); 128.6, 128.5, 128.3, 127.8, 127.7, 127.6 ($C_{arom.}$); 114.5 ($C_{arom.}$); 100.8, 99.4 (C-1); 73.6 ($-OCH_2COOH$); 73.3, 72.9, 72.6, 71.4, 71.3 (C-2, C-3, C-4); 71.2 (O- CH_2-Ph); 70.7 (C-6); 69.4 (C-5); 69.1, 69.0 ($-CH_2CH-TMS$); 37.6 ($-CH_2CH_2-COO-$); 37.3, 36.2 ($-CH-TMS$); 29.6 (CH_3COCH_2-); 27.8 (CH_3COCH_2-); 20.6, 20.5, 20.3 (CH_3COO- , CH_3COCH_2-); -2.3, -2.5 (Me_3Si).

ESI-MS (positiv) m/z : 782.1 ($[M+K+CH_3CN]^+$, ber.: 782.3); 741.2 ($[M+K]^+$, ber.: 741.2); 725.3 ($[M+Na]^+$, ber.: 725.3).

Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Kupplung des PTMSEL-gebundenen Kohlenhydrats an den polymeren Träger

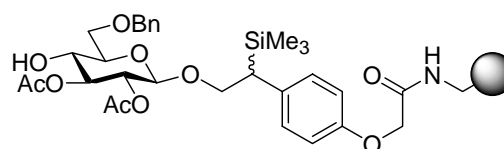
Kupplung mit TBTU bzw. HCTU und HOBt

Zu einer Lösung von 1.2 Äquiv. (bezogen auf die Kapazität des polymeren Trägers) **69** in dem entsprechenden in der Tabelle gegebenen Lösungsmittel werden 1.2 Äquiv. HOBt, 2.4 Äquiv. *N*-Methylmorpholin und 1.2 Äquiv. des jeweiligen Kupplungsreagenzes gegeben. Es wird 20 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend gibt man die Reaktionslösung in einen Festphasenreaktor, in dem 1 Äquiv. des polymeren Trägers eingewogen und in dem Lösungsmittel über 30 min vorgequollen wurde. Man schüttelt 18 h bei Raumtemp. und filtriert die Reaktionslösung anschließend ab. Das Harz wird je dreimal mit dem Lösungsmittel, mit DMF und mit Dichlormethan gewaschen. Man bestimmt entsprechend dem Protokoll zur Beladungsbestimmung die verbleibenden freien Aminogruppen.

Kupplung mit DIC und DMAP

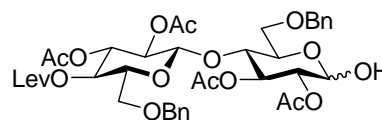
Zu einer Lösung von 1.2 Äquiv. (bezogen auf die Kapazität des polymeren Trägers) **69** in dem entsprechenden in der Tabelle angegebenen Lösungsmittel gibt man 1.2 Äquiv. DIC. Die Carbonsäure wird durch 20minütiges Rühren bei Raumtemp. aktiviert. Anschließend gibt man die Reaktionslösung zusammen mit etwa 0.2 Äquiv. DMAP in einen Festphasenreaktor, in dem 1 Äquiv. des polymeren Trägers eingewogen und in dem Lösungsmittel über 30 min vorgequollen wurde. Man schüttelt 18 h bei Raumtemp. und filtriert die Reaktionslösung anschließend ab. Das Harz wird je dreimal mit dem Lösungsmittel, mit DMF und mit Dichlormethan gewaschen. Man bestimmt entsprechend dem Protokoll zur Beladungsbestimmung die verbleibenden freien Aminogruppen.

4-[2-(2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure an Tentagel (**72**)



Das Harz **70** (1.2 g, 0.25 mmol) wird in einen Festphasenreaktor gegeben, mit einer Emulsion aus 0.49 ml (0.5 g, 10 mmol) Hydrazinhydrat in 5 ml Pyridin/Essigsäure 4:1 versetzt und 8 h geschüttelt. Die Reagenzien werden abfiltriert, und die Abspaltung ein zweites Mal wiederholt. Man wäscht das Harz abwechselnd mit Dichlormethan, DMF und Methanol. Anschließend wird mit Aceton versetzt, 5 min geschüttelt, abgesaugt und i. Feinvak. getrocknet.

2',3'-Di-O-acetyl-6-O-benzyl-4'-O-lävulinoyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-acetyl-6-O-benzyl-D-glucopyranose (73)



In einem Festphasenreaktor werden 1.2 g (0.24 mmol) Harz **72** unter einer Argonatmosphäre in 15 ml absol. Dichlormethan vorgequollen. Das Lösungsmittel wird abfiltriert und das Harz mit 286 mg (0.48 mmol, 2 Äquiv.) **60** in 20 ml absol. Dichlormethan versetzt. Man kühlt auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und initiiert die Reaktion durch langsames Zutropfen von 100 μl (0.005 mmol, 0.02 Äquiv.) einer 0.05 M Lösung von TMSOTf in absol. Dichlormethan. Man schüttelt 4 h und erhöht die Temperatur dabei alle 60 min um 5 K. Bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird die Reaktionslösung abgesaugt, das Harz zweimal mit je 10 ml absol. Dichlormethan gewaschen und die oben beschriebene Glycosylierung ein zweites Mal wiederholt. Nach der zweiten Durchführung wird das Harz nacheinander mehrmals abwechselnd mit Dichlormethan und Methanol gewaschen. Zur Spaltung des Ankers wird das Harz zweimal über jeweils einen Zeitraum von 2 h mit einer Lösung von 151 mg (0.48 mmol, 2 Äquiv.) TBAF*3H₂O in 15 ml THF behandelt. Es wird zweimal mit 15 ml THF gewaschen. Man vereinigt Abspalt- und Waschlösungen, verdünnt mit 150 ml Dichlormethan und wäscht mit 20 ml Wasser und mit 20 ml einer ges. NaCl-Lösung. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Das Rohprodukt wird mittels semipräparativer HPLC gereinigt.

Ausbeute: 9 mg (5 %) Anomerengemisch; farbloses, hochviskoses Öl; $R_f = 0.19$ ($^{\circ}\text{Hex/EE}$ 1:1).

$\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{O}_{17}$ (788.79) [788.29]

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 7.45-7.20 (m, 10H, H-arom.), 5.47-5.33 (m, 1H, H-2), 5.13-4.92 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.88-4.31 (m, 8.5H, H-4, H-3, H-2', H-1', H-1 α , 2 x CH₂-Bn), 4.05-3.25 (m, 7.5H, H-1 β , α -OH, β -OH, H-5, H-5', H6a, H6b, H6a', H6b'), 2.75-2.55 (m, 2H, CH₃COCH₂-), 2.48-2.30 (m, 2H, -CH₂COO-), 2.13, 2.11 (2s, 3H, CH₃COCH₂-), 2.07, 2.06, 2.04, 2.03, 2.02, 1.97 (6s, 12H, CH₃CO-).

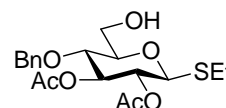
$75.5\text{ MHz-}^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 206.0 (CH₃COCH₂-), 171.5, 171.2, 171.1, 170.5, 170.4, 170.25, 170.2, 170.1, 169.3, 168.8 (CH₃CO-, CH₃COCH₂-), 137.8, 137.6, 137.5 (C_{ipso}), 128.8, 128.5, 128.4, 128.39, 128.3, 128.24, 128.21, 128.18, 128.0, 127.9, 127.8, 127.74, 127.71, 127.6, 127.0 (C-arom.), 99.9 (C1a'), 97.5 (C1b'), 95.6 (C-1 β), 90.2 (C-1 α), 77.2, 75.0, 74.7, 74.4, 73.8, 73.7, 73.6, 73.3, 73.0, 72.7, 71.8, 71.3, 70.2, 70.1, 69.8, 69.6, 69.3, 69.2, 69.0, 68.7, 68.5, 67.8, 67.2, 65.3 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-2', C-3', C-

4', C-5', C-6', -CH₂-Ph), 37.8, 37.6 (-CH₂COO-), 29.7, 29.6 (CH₃COCH₂-), 27.8, 27.7 (CH₃COCH₂-), 20.9, 20.74, 20.67, 20.63, 20.58 (CH₃CO-).

ESI-MS (positiv) m/z: 811.4 ([M+Na]⁺, ber.: 811.3); 713.2 ([M-LevOH+H₂O+Na]⁺, ber.: 713.2).

Ethyl-2,3-di-O-acetyl-4-O-benzyl-1-thio-β-D-glucopyranosid (76)

βAc₂BnGlc-SEt



Eine Lösung aus 8.5 g (21 mmol) **65** und 5.2 ml (3.8 g, 33 mmol, 1.6 eq) Triethylsilan in 200 ml Dichlormethan wird mit 4 g Molekularsieb (4Å) 20 min bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Die Lösung wird auf -78 °C abgekühlt und langsam mit 3.3 ml (4.0 g, 25 mmol) Dichlorphenylboran versetzt und eine weitere Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Sobald die Umsetzung vollständig ist (DC) wird die Reaktionslösung nacheinander mit Triethylamin (10 ml) und Methanol (10 ml) versetzt, auf Raumtemp. erwärmt, mit ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und i. Vak von den Lösungsmitteln befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an 700 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 2:1).

Ausbeute: 8.5 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -51.6$ (c = 1, CH₂Cl₂); R_f = 0.35 (°Hex/EE 1:1).

C ₁₉ H ₂₆ O ₇ S	(398.47)	Ber.:	C 57.27	H 6.58	S 8.05
	[398.14]	Gef.:	C 57.27	H 6.32	S 7.57

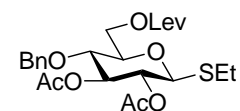
300-MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.35-7.10 (m, 5H, Phenyl-H); 5.24 (t, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = 9.4 Hz, 1H, H-3); 4.89 (t, ³J_{H1,H2} = ³J_{H3,H2} = 9.6 Hz, 1H, H-2); 4.61 (s, 2H, -O-CH₂-Phenyl); 4.49 (d, ³J_{H1,H2} = 9.9 Hz, 1H, H-1); 3.89 (dd, ³J_{H6a,H5} = 2.6 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 12.5 Hz, 1H, H-6a); 3.75-3.60 (m, 2H, H-4, H-6b) 3.45 (m_c, 1H, H-5); 2.75-2.60 (m, 2H, -SCH₂CH₃); 2.02, 1.96 (2s, 6H, CH₃CO-); 1.24 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, -SCH₂CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.1, 169.8 (CH₃CO-); 137.5 (C_{ipso}); 128.0, 127.98, 127.8 (5C, C-arom.); 84.3 (C-1); 79.5, 75.9, 75.4, 74.8, 70.6, 61.6 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, CH₂-Benzyl); 24.4 (-SCH₂CH₃); 20.8, 20.7 (CH₃CO-); 14.9 (-SCH₂CH₃).

ESI-MS (positiv) m/z : 497.3 ([M+K+AcOH]⁺, ber.: 497.2); 481.3 ([M+Na+AcOH]⁺, ber.: 481.2); 462.3 ([M+K+CH₃CN]⁺, ber.: 462.2); 437.2 ([M+K]⁺, ber.: 437.1); 421.2 ([M+Na]⁺, ber.: 421.1).

Ethyl-2,3-di-O-acetyl-4-O-benzyl-6-O-lävulinoyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (77)

β -Ac₂BnLevGlc-SEt



Zu einer Lösung aus 5.8 g (14.6 mmol) **76**, 1.8 g (15.5 mmol, 1.6 ml) Lävulinsäure und 0.18 g (1.5 mmol, 0.1 Äquiv.) DMAP in 60 ml Dichlormethan gibt man 3.9 g (19.0 mmol, 1.3 Äquiv.) DCC hinzu und rührt 3 h bei Raumtemp. Der Ansatz wird filtriert und das Filtrat mit 100 ml Dichlormethan verdünnt. Man wäscht die org. Phase nacheinander mit je 80 ml eiskalter 0.1 N HCl, ges. NaHCO₃-Lsg. und Wasser. Die wässrigen Phasen werden zweimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Die Reinigung des Rohproduktes (ca. 7 g) erfolgt durch Flashchromatographie an 400 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 2:1).

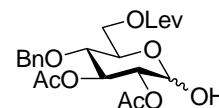
Ausbeute: 7.2 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{22} = -35.9$ (c = 1, CH₂Cl₂); $R_f = 0.50$ (°Hex/EE 2:1); $R_f = 0.90$ (CH₂Cl₂/MeOH 19:1).

C ₂₄ H ₃₂ O ₉ S	(496.57)	Ber.:	C 58.05	H 6.50	S 6.46
	[496.18]	Gef.:	C 58.58	H 6.50	S 6.22

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.30-7.15 (m, 5H, Phenyl-H); 5.24 (t, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = 9.0 Hz, 1H, H-3); 4.90 (t, ³J_{H1,H2} = ³J_{H3,H2} = 9.8 Hz, 1H, H-2); 4.56 (s, 2H, -CH₂-Phenyl); 4.35 (d, ³J_{H1,H2} = 10.3 Hz, 1H, H-1); 4.33 (dd, ³J_{H6a,H5} = 1.8 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 12.1 Hz, 1H, H-6a); 4.22 (dd, ³J_{H6b,H5} = 4.4 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 12.1 Hz, 1H, H-6b); 4.99 (t, ³J_{H4,H5} = ³J_{H3,H4} = 9.2 Hz, 1H, H-4); 3.60-3.50 (m_c, 1H, H-5); 2.75-2.50 (m, 6H, -CH₂CH₂COO-, -SCH₂CH₃, CH₃COCH₂-); 2.16 (s, 3H, -CH₂COCH₃); 2.02, 1.94 (2s, 6H, CH₃CO-); 1.23 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, -SCH₂CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 206.3 (CH₃COCH₂-); 172.3 (-CH₂CO-); 170.0, 169.7 (CH₃CO-); 137.2 (C_{ipso}); 128., 128.1, 128.0 (5C, C-arom.); 83.3 (C-1); 76.0, 75.7, 74.8, 70.5, 62.9 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, -O-CH₂-Ph); 37.8 (-CH₂COO-); 29.8 (CH₃COCH₂-); 27.7 (CH₃COCH₂-); 24.3 (-SCH₂CH₃); 20.8, 20.7 (CH₃CO-); 14.9 (-SCH₂CH₃).

FD-MS (positiv) m/z : 595.4 ([M+K+AcOH]⁺, ber.: 595.2); 579.4 ([M+Na+AcOH]⁺, ber.: 579.2); 535.3 ([M+K]⁺, ber.: 535.1); 519.3 ([M+Na]⁺, ber.: 519.2).

2,3-Di-O-acetyl-4-O-benzyl-6-O-lävulinoyl-D-glucopyranose (78)Ac₂BnLevGlc

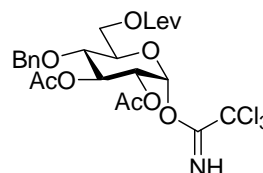
Zu einer Lösung von 5.4 g (10.9 mmol) **77** und 400 µl (22 mmol, 2 Äquiv.) Wasser in 40 ml 1,2-Dichlorethan tropft man langsam eine Lösung aus 2.5 g (10.9 mmol) NIS und 110 µl (1.1 mmol, 0.1 Äquiv.) TfOH in 40 ml 1,2-Dichlorethan-Ether (1/1; v/v). Man rührt weitere 2 h; die Reaktionsmischung färbt sich dabei tiefviolett. Die org. Phase wird mit 50 ml Dichlormethan verdünnt, mit ges. Na₂O₃S₂-Lsg und ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Das zurückbleibende Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 500 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 2:1).

Ausbeute: 4.68 g (95 %); Anomerengemisch; leicht gelbes, hochviskoses Öl.

C₂₂H₂₈O₁₀ (452.45) Ber.: C 58.40 H 6.24

[452.17] Gef.: C 58.33 H 6.10

ESI-MS (positiv) m/z : 491.2 ([M+K]⁺, ber.: 491.1); 475.3 ([M+Na]⁺, ber.: 475.1); 415.2 ([M-AcOH+Na]⁺, ber.: 415.1); 359.1([M-LevOH+Na]⁺, ber.: 359.1); 299.1 ([M-AcOH-LevOH +Na]⁺, ber.: 299.1).

2,3-Di-O-acetyl-4-O-benzyl-6-O-lävulinoyl-α-D-glucopyranosyl-trichloracetimidat (79)

Eine Lösung von 3.1 g (6.9 mmol) **78** in 20 ml Dichlormethan wird mit 5.0 g (34.5 mmol, 3.5 ml, 5 Äquiv.) Trichloracetonitril und 6 Tropfen DBU versetzt. Während die Lösung über 4 h bei Raumtemp. gerührt wird, verfärbt sie sich von leicht gelb nach tiefbraun. Das Lösungsmittel und überschüssiges Trichloracetonitril wird i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 250 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 3:2).

Ausbeute: 3.34 g (82 %); farbloses, hochviskoses Öl; R_f = 0.17 (°Hex/EE 2:1); [α]_D²² = 67.1 (c = 1, CH₂Cl₂).

C₂₄H₂₈Cl₃NO₁₀ (595.08) Ber.: C 48.30 H 4.73 N 2.35

[596.84] Gef.: C 48.47 H 4.63 N 2.49

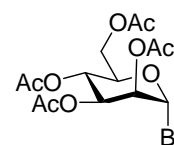
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 8.61 (s, 1H, NH); 7.35-7.25 (m, 5H, Phenyl-H); 6.46 (d, ³J_{H1,H2} = 3.7 Hz, 1H, H-1); 5.63 (t, ³J_{H3,H4} = ³J_{H2,H3} = 9.8 Hz, 1H, H-3); 5.03 (dd, ³J_{H2,H1} = 3.7 Hz, ³J_{H3,H2} = 10.3 Hz, 1H, H-2); 4.59 (s, 2H, -CH₂-Phenyl); 4.40-4.25 (m, 2H, H-6a, H-6b); 4.15-4.05 (m, 1H, H-5); 3.74 (t, ³J_{H3,H24} = ³J_{H4,H5} = 9.6 Hz, 1H, H-4); 2.85-

2.70 (m, 2H, -CH₂COO-); 2.65-2.50 (m, 2H, CH₃COCH₂-); 2.17 (s, 3H, -CH₂COCH₃); 1.98, 1.97 (2s, 6H, CH₃CO-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 206.3 (CH₃COCH₂-); 172.3 (-CH₂COO-); 170.1 (CH₃COCH₂-); 169.7 (CH₃CO-); 161.0 (Cl₃C-), 137.1 (C_{ipso}); 128.6, 128.19, 128.16 (5C, C_{arom.}); 93.2 (C-1); 75.2, 75.0, 71.6, 71.3, 70.2, 62.1 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, -O-CH₂-Ph); 37.8 (-CH₂COO-); 29.8 (CH₃COCH₂-); 27.8 (CH₃COCH₂-); 20.9, 20.5 (CH₃CO-).

ESI-MS (positiv) m/z : 638.2 ([M(1* ³⁵Cl, 2* ³⁷Cl)+K]⁺, ber.: 663.0); 634.2 ([M(2* ³⁵Cl, 1* ³⁷Cl)+K]⁺, ber.: 634.0); 632.2 ([M(3* ³⁵Cl)+K]⁺, ber.: 632.0), 622.2 ([M(1* ³⁵Cl, 2* ³⁷Cl)+Na]⁺, ber.: 622.1); 620.2 ([M(2* ³⁵Cl, 1* ³⁷Cl)+Na]⁺, ber.: 620.1); 618.1 ([M(3* ³⁵Cl)+Na]⁺, ber.: 618.1); 475.3([M-Cl₃CCN+Na]⁺, ber.: 475.2); 435.3([M-Cl₃CCONH₂]⁺, ber.: 435.2).

Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosylbromid (82)²⁰³



Zu einem Gemisch aus 300 ml Pyridin und 150 ml Acetanhydrid gibt man bei 0° C portionsweise 36 g (0.2 mol) D-Mannose. Man lässt auf Raumtemp. erwärmen und rührt weitere 3 h. Die Lösungsmittel werden i. Feinvak. entfernt, gefolgt von zweimaliger Kodestillation des Rückstandes mit Toluol. Das erhaltene Rohprodukt wird in 200 ml einer 33%igen Lösung von HBr in Eisessig gelöst und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 250 ml Dichlormethan verdünnt, vorsichtig mit Eiswasser versetzt und durch Zugabe von festem Na₂CO₃ neutralisiert. Die org. Phase wird fünfmal mit je 100 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 100 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende orange-braune Öl wird flashchromatographisch an 600 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 3:2).

Ausbeute: 68.4 g (88 %); farbloses, viskoses Öl; $[\alpha]_D^{22} = 118.0$ (c = 1, CH₂Cl₂); (Lit.²⁰⁴ $[\alpha]_D^{25} = 123.2$ (c = 1, CHCl₃)); R_f = 0.22 (°Hex/EE 3:2).

C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	(390.34)	Ber.:	C 40.89	H 4.66
	[390.12]	Gef.:	C 40.88	H 4.69

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 6.25 (d, ³J_{H1,H2} = 1.5 Hz, 1H, H-1); 5.67 (dd, ³J_{H3,H2} = 3.3 Hz, ³J_{H4,H3} = 9.9 Hz, 1H, H-3); 5.40 (dd, ³J_{H1,H2} = 1.5 Hz, ³J_{H3,H2} = 3.3 Hz, 1H, H-2); 5.33 (dd, ³J_{H4,H3} = 9.9 Hz, ³J_{H4,H5} = 10.3 Hz, 1H, H-4); 4.29 (dd, ³J_{H6a,H5} = 4.8 Hz, ²J_{H6a,H6b} = 12.5 Hz, 1H, H-6a); 4.18 (ddd, ³J_{H4,H5} = 10.3 Hz, ³J_{H5,H6a} = 4.8 Hz, ³J_{H5,H6b} =

²⁰³ W. A. Boomer, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3372

²⁰⁴ P. A. Levene, R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.* **1931**, *90*, 89

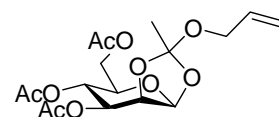
2.0 Hz, 1H, H-5); 4.09 (dd, $^2J_{H6a,H6b} = 12.5$ Hz, $^3J_{H6b,H5} = 2.0$ Hz, 1H, H-6b); 2.13, 2.06, 2.03, 1.97 (4s, 12H, CH₃CO-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.5, 169.6, 169.5 (4C, CH₃CO-); 83.0 (C-1); 72.8, 72.1, 67.9, 65.3, 61.4 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6); 20.7, 20.62, 20.60, 20.5 (CH₃CO-).

ESI-MS (positiv) m/z : 433.03 ([M+Na]⁺, ber.: 433.01).

1,2-*O*-(Allyloxyethyliden)-3,4,6-tri-*O*-acetyl-β-D-mannopyranose

(83)¹³²



Tetra-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosylbromid **82** (8.3 g, 0.020 mol) wird in 100 ml Allylalkohol (85.4 g, 1.5 mol, 75 Äquiv.) gelöst und mit 3 ml 2,6-Lutidin (2.76 g, 0.026 mol, 1.3 Äquiv.) versetzt. Es wird 5 h bei Raumtemp. gerührt, mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und auf Eis gegossen. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert. Man wäscht die org. Phasen mit 75 ml Wasser, trocknet über MgSO₄ und entfernt das Lösungsmittel i. Vak. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie an 300 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 5:1).

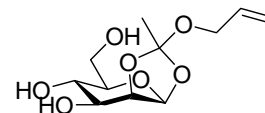
Ausbeute: 7.8 g (quant.); farblose Kristalle; $[\alpha]_D^{22} = -9.5$ (1, CH₂Cl₂), Lit.¹³²: $[\alpha]_D^{20} = -11.6$ (c = 1, CH₂Cl₂); Schmp.: 101 °C; R_f = 0.13 (°Hex/EE 5:1); R_f = 0.37 (°Hex/EE 2:1).

C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	(388.37)	Ber.:	C 52.57	H 6.23
	[388.14]	Gef.:	C 52.66	H 6.16

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 5.86 (ddd, $^3J_{trans} = 17.3$ Hz, $^3J_{cis} = 10.7$ Hz, 1H, Allyl-H); 5.46 (d, $^3J_{H1,H2} = 2.2$ Hz, 1H, H-1); 5.28 (dd, $^3J_{H4,H3} = 9.6$ Hz, $^3J_{H4,H5} = 9.9$ Hz, 1H, H-4); 5.24 (dd, $^3J_{trans} = 17.3$ Hz, $^2J = 1.5$ Hz, 1H, -CH=CH_{trans}H_{cis}); 5.15-5.05 (m, 2H, H-3, -CH=CH_{trans}H_{cis}); 4.59 (dd, $^3J_{H1,H2} = 2.8$ Hz, $^3J_{H3,H2} = 3.9$ Hz, 1H, H-2); 4.22 (dd, $^3J_{H6a,H5} = 5.2$ Hz, $^2J_{H6a,H6b} = 12.1$ Hz, 1H, H-6a); 4.12 (dd, $^2J_{H6a,H6b} = 12.1$ Hz, $^3J_{H6b,H5} = 2.6$ Hz, 1H, H-6b); 4.01 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.66 (ddd, $^3J_{H4,H5} = 9.9$ Hz, $^3J_{H5,H6a} = 5.2$ Hz, $^3J_{H5,H6b} = 2.6$ Hz, 1H, H-5); 2.10 2.05, 2.03 (3s, 9H, CH₃CO); 1.75 (s, 3H, CH₃-Orthoester).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.6, 170.3, 169.4 (3C, CH₃CO-); 133.9 (-CH=CH₂); 124.2 (C_{quart.}-Orthoester); 116.7 (-CH=CH₂); 97.3 (C-1); 76.4 (C-2); 71.4, 70.5, 65.5, 63.7 (C-3, C-4, C-5, C-6); 62.3 (-CH₂-CH=CH₂); 24.7 (CH₃-Orthoester) 20.7, 20.67, 20.62 (CH₃CO-).

ESI-MS (positiv) m/z : 411.32 ([M+Na]⁺, ber.: 411.13); 408.32 ([2M+Ca]²⁺, ber.: 408.12); 329.08 ([M+H]⁺, ber.: 329.12).

1,2-*O*-(Allyloxyethyliden)- β -D-mannopyranose (84**)¹³²**

1,2-*O*-(Allyloxyethyliden)-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-mannopyranose **83** (7.8 g, 0.02 mol) wird in 10 ml Methanol gelöst, und mit 100 ml, bei Raumtemperatur gesättigter, ammoniakalischer Methanollösung versetzt. Nach zweistündigem Rühren wird der Ammoniak im Stickstoffstrom entfernt, die Lösung i. Vak. eingengt, zweimal mit je 25 ml Toluol kodestilliert und getrocknet.

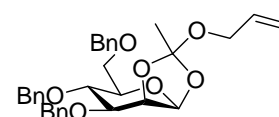
Ausbeute: 5.5 g (quant.); farbloses Öl; $[\alpha]_D^{22} = 1.8$ ($c = 1$, MeOH), $[\alpha]_D^{22} = 13.0$ ($c = 1.35$, CHCl₃); $R_f = 0$ (°Hex/EE 1:1).

C₁₁H₁₈O₇ (262.26) [262.11]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 5.86 (ddd, ³ $J_{trans} = 17.3$ Hz, ³ $J_{cis} = 10.7$ Hz, ³ $J = 5.2$ Hz, 1H, Allyl-H); 5.45 (d, ³ $J_{H1,H2} = 2.6$ Hz, 1H, H-1); 5.25 (dd, ³ $J_{trans} = 17.3$ Hz, ² $J = 1.5$ Hz, 1H, -CH=CH_{trans}H_{cis}); 5.13 (dd, ³ $J_{cis} = 10.7$ Hz, ² $J = 1.1$ Hz, 1H, -CH=CH_{trans}H_{cis}); 4.49 (m, 1H, H-2); 4.04 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.90-3.65 (m, 4H, H-3, H-4, H-6a, H-6b); 3.29 (m, 1H, H-5); 1.68 (s, 3H CH₃-Orthoester).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 137.3 (-CH=CH₂); 123.5 (C_{quart.}-Orthoester); 116.9 (-CH=CH₂); 97.7 (C-1); 78.7 (C-2); 74.8 (C-5); 72.1, 67.7, 63.7 62.0 (C-3, C-4, C-6, -CH₂-CH=CH₂), 24.9 (CH₃-Orthoester).

ESI-MS (positiv) m/z : 285.12 ([M+Na]⁺, ber.: 285.12); 245.09 ([M-Allyl+Na]⁺, ber.: 245.06).

1,2-*O*-(Allyloxyethyliden)-3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-mannopyranose (85**)**

Das Triol **84** (5.4g, 0.02 mol) und Benzylbromid (10.3 g, 7.2 ml, 0.06 mol, 1 Äquiv.) werden in 100 ml DMF gelöst und bei -10° C portionsweise mit entöltem NaH (1.44 g, 0.06 mol, 1.0 Äquiv.) versetzt. Man rührt 3 h bei dieser Temperatur, lässt auf 5 °C erwärmen und rührt weitere 4 h. Die Lösung wird bei 0 °C mit 10 ml MeOH versetzt, i. Feinvak. eingengt und der Rückstand in 200 ml Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird zweimal mit 100 ml Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wird flashchromatographisch an 300 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 4:1).

Ausbeute: 7.3 g (67%); farbloser, amorpher Feststoff; Smp.: 61 °C; $[\alpha]_D^{22} = 15.3$ ($c = 1$, CH₂Cl₂); $R_f = 0.83$ (°Hex/EE 1:1).

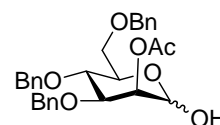
C₃₂H₃₆O₇ (532.62) Ber.: C 72.16 H 6.81
 [532.25] Gef.: C 72.19 H 6.83

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.45-7.15 (m, 15H, Phenyl-H), 5.92 (ddd, ³J_{trans} = 17.3 Hz, ³J_{cis} = 10.7 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1H, Allyl-H); 5.34 (d, ³J_{H1,H2} = 2.6 Hz, 1H, H-1); 5.30 (dd, ³J_{trans} = 17.3 Hz, ²J = 1.8 Hz, 1H, -CH=CH_{trans}H_{cis}); 5.17 (dd, ³J_{cis} = 10.7 Hz, ²J = 1.5 Hz, 1H, -CH=CH_{trans}H_{cis}); 4.89 (d, ²J = 11.0 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.77 (s, 2H, -O-CH₂-Ph); 4.65-4.50 (m, 3H, -CH-Ph); 4.39 (dd, ³J_{H1,H2} = 2.6 Hz, ³J_{H3,H2} = 4.0 Hz, 1H, H-2); 4.05 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂); 3.93 (dd, ³J_{H4,H3} = 9.2 Hz, ³J_{H4,H5} = 9.2 Hz, 1H, H-4); 3.75-3.65 (m, 3H, H-3, H-6a, H-6b); 3.42 (ddd, ³J_{H4,H5} = 9.2 Hz, ³J_{H5,H6} = 2.6 Hz, ³J_{H5,H6} = 4.1 Hz, 1H, H-5); 1.43 (s, 3H, CH₃-Orthoester).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 138.3, 137.9 (C_{ipso}); 134.5 (-CH=CH₂); 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.8, 127.5, 127.4 (C_{arom.}); 123.8 (C_{quart.}-Orthoester); 116.5 (-CH=CH₂); 97.5 (C-1); 79.0, 76.9, 75.2, 74.2, 73.4, 72.4, 69.0, 63.7 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, 3 x -CH-Ph, -CH₂-CH=CH₂), 24.9 (CH₃-Orthoester).

ESI-MS (positiv) m/z : 571.13 ([M+K]⁺, ber.: 571.34); 550.20 ([M+Na]⁺, ber.: 550.24); 552.63 ([2M+Ca]²⁺; ber.: 552,23).

O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl-β-D-mannopyranose²⁰⁵



Der Orthoester **85** (3.85 g, 7.2 mmol) wird in 100 ml 60%iger Essigsäure gelöst und 3 h bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand zweimal mit je 25 ml Toluol kodestilliert und flashchromatographisch an 300 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel ^cHex/EE 2:1).

Ausbeute: 2.6 g (73 %); farbloses Öl; R_f = 0.59 (^cHex/EE 1:1).

C₂₉H₂₇O₇ (492.56) [492.21]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.35-7.20 (m, 15H, Phenyl-H), 5.35 (dd, ³J_{H1,H2} = 1.8 Hz, ³J_{H3,H2} = 3.3 Hz, 1H, H-2); 5.20 (m, 1H, H-1); 4.84 (d, ²J = 10.7 Hz, 1H, CH-Ph); 4.69 (d, ²J = 11.0 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.59 (d, ²J = 12.1 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.51 (d, ²J = 11.0 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.49 (d, ²J = 12.1 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.43 (d, ²J = 10.7 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.05-3.95 (m, 2H, H-6a, H-6b); 3.75-3.65 (m, 3H, H-3, H-4, H-5); 3.41 (s, 1H, OH); 2.13 (s, 3H, CH₃).

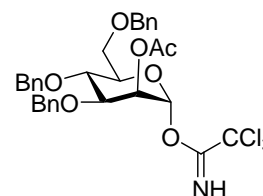
75.5 MHz-¹³C-NMR [DEPT] (CDCl₃): δ [ppm] 170.5 (CH₃CO); 138.3, 137.9, 137.8 (C_{ipso}); 128.5, 128.4, 128.36, 128.3, 128.2, 128.1, 128.04, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6

²⁰⁵ F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 31

(C_{arom.}); 92.5 (C-1); 77.6 (C-2); 75.1 73.4, 71.8 (CH₂-Ph); 74.6, 71.1, 69.0 (C-3, C-4, C-5); 69.2 (C-6); 21.1 (CH₃CO).

ESI-MS (positiv) m/z : 531.14 ([M+K]⁺, ber.: 531.17); 515.10 ([M+Na]⁺, ber.: 515.20); 475.11 ([M-OH]⁺; ber.: 475.21).

2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl-β-D-mannopyranosyl-trichloracetimidat (80)²⁰⁵



Eine Lösung von 2.4 g (4.9 mmol) *O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-β-D-mannopyranose in 100 ml Dichlormethan wird mit 6 ml (60 mmol, 8.6 g, 12 Äquiv.) Trichloracetonitril und 6 Tropfen DBU versetzt. Während die Lösung 4 h bei Raumtemp. gerührt wird, färbt sie sich von leicht gelb nach braun. Das Lösungsmittel und überschüssiges Trichloracetonitril werden i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie an 200 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 3:2 mit 1 % Triethylamin).

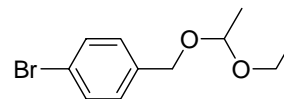
Ausbeute: 2.9 g (93%), *R*_f = 0.82 (°Hex/EE 1:1); farbloses Öl; $[\alpha]_D^{22} = 35.2$ (c = 1, CHCl₃), Lit.²⁰⁵: $[\alpha]_D^{25} = 36.3$ (c = 0.9, CHCl₃).

C₃₁H₃₂Cl₃NO₇ (636.95) [635.12]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 8.36 (s, 1H, NH); 7.40-7.20 (m, 15H, Phenyl-H), 6.30 (d, ³J_{H1,H2} = 1.8 Hz, 1H, H-1); 5.49 (m, 1H, H-2); 4.86 (d, ²J = 10.7 Hz, 1H, CH-Ph); 4.73 (d, ²J = 11.4 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.68 (d, ²J = 11.8 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.61 (d, ²J = 11.4 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.52 (d, ²J = 10.7 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.49 (d, ²J = 12.1 Hz, 1H, -CH-Ph); 4.05-3.90 (m, 3H, H-3, H-4, H-5); 3.84 (dd, ³J_{H6a,H5} = 3.5 Hz, ²J = 11.0 Hz, 1H, H-6a); 3.70 (dd, ³J_{H6b,H5} = 1.1 Hz, ²J = 11.0 Hz, 1H, H-6b); 2.18 (s, 3H, CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.1 (CH₃CO); 159.9 (C=NH); 138.3, 137.5 (C_{ipso}); 128.5, 128.4, 128.37, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 (C_{arom.}); 95.3 (C-1); 77.3 (C-2); 75.4 73.6, 72.1 (CH₂-Ph); 74.4, 73.4.1, 68.4, 67.3 (C-3, C-4, C-5, C-6); 21.1 (CH₃CO).

ESI-MS (positiv) m/z : 662.12 ([M(1*³⁵Cl, 2*³⁷Cl)+Na]⁺; ber.: 662.12); 660.10 ([M(2*³⁵Cl, 1*³⁷Cl)+Na]⁺; ber.: 660.12); 658.10 ([M(3*³⁵Cl)+Na]⁺; ber.: 658.12); 497.11([M-Trichloracetamid+Na]⁺; ber.: 497.19); 475.17 ([M-Trichloracetamid+H]⁺; ber.:475.21).

1-(4-Brombenzoxy)-1-ethoxyethan (88)

4-Brombenzylalkohol (3.74 g, 0.02 mol) und Vinylethylether (2.16 g, 2.88 ml, 0.03 mol, 1.5 Äquiv.) werden in 30 ml Dichlormethan gelöst, mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Man neutralisiert mit Diisopropylethylamin und entfernt die Lösungsmittel i. Vak. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 300 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

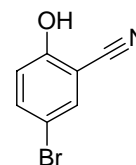
Ausbeute: 5.2 g (quant.); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.88$ (°Hex/EE 1:1).

$C_{11}H_{15}BrO_2$ (259.14) [258.03]

300 MHz- 1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] 7.44(d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, o -H_{arom}); 7.19 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 2H, m -H_{arom}); 4.78 (q, $^3J = 5.5$ Hz, 1H, O-CH-O); 4.57 (d, $^2J = 12.1$ Hz, 1H, -CH₂-O); 4.45 (d, $^2J = 12.1$ Hz, 1H, -CH₂-O); 3.64 (m, 1H, -CH₂CH₃); 3.50 (m, 1H, -CH₂CH₃); 1.34 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 3H, -CH-CH₃), 1.19 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, -CH₂CH₃).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] 137.5, 137.2 (C_{para}); 131.5, 131.4 (C_{arom}); 121.4, 121.3 (C_{ortho}); 99.2 (O-CH-O); 66.2, 66.1 (-CH₂-PhBr); 60.7 (CH₃CH₂-); 19.8 (CH₃CH-); 15.3 (CH₃CH₂-).

FD-MS (positiv) m/z : 260.5 ($[M(^{81}Br)]^+$; ber.: 260.0); 258.3 ($[M(^{79}Br)]^+$; ber.: 258.0).

4-Bromo-2-cyano-phenol (90)¹³⁵

Zu einer Lösung von 1.0 g (8.4 mmol) 2-Cyanophenol in 20 ml Acetonitril gibt man bei -18 °C nacheinander 0.73 ml (1.26 g, 8.4 mmol) Trifluormethansulfonsäure und 1.53 g (8.6 mmol, 1.02 Äquiv.) NBS. Man lässt auf Raumtemp. erwärmen und rührt 3 h. Anschließend gibt man 10 ml einer 38%igen NaHSO₃-Lösung zu und extrahiert mit Dichlormethan (2 x 50 ml). Die org. Phase wird mit 25 ml einer ges. NaCl-Lösung gewaschen über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Umkristallisieren aus Benzol gereinigt.

Ausbeute: 1.2 g (72%); farbloser, kristalliner Feststoff; Schmp.: 159 °C (Lit.¹³⁵: 159 °C); $R_f = 0.57$ (°Hex/EE 1:1).

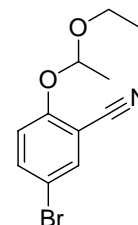
C_7H_4BrO	(198.02)	Ber.:	C 42.46	H 2.04	N 7.07
	[196.95]	Gef.:	C 42.49	H 2.09	N 7.09

300 MHz- 1H -NMR ($DMSO-d_6$): δ [ppm] 11.41 (s, 1H, -OH); 7.85 (d, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H3); 7.64 (dd, $^3J = 9.0$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, H5); 6.96 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, H6).

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] 159.7 (C2); 137.6 (C4); 135.1 (C6); 118.4 (C3); 115.7 (-CN); 109.8 (C5); 101.1 (C1).

FD-MS (positiv) m/z: 199.2 ([M(⁸¹Br)]⁺; ber.: 199.0); 197.2 ([M(⁷⁹Br)]⁺; ber.: 197.0).

5-Bromo-2-ethoxyethoxy-benzonitril (91)



4-Bromo-2-cyano-phenol **90** (0.94 g, 4.7 mmol) und Vinylethylether (0.63 g, 0.84 ml, 9.4 mmol, 2 Äquiv.) werden in 15 ml Dichlormethan gelöst, mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt und 2 h bei Raumtemp gerührt. Man neutralisiert mit Hünigsbase und entfernt die Lösungsmittel i. Vak. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an 100 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 1:1 mit 1% Triethylamin).

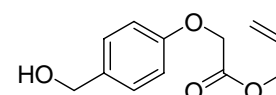
Ausbeute: 1.2 g (94%); beigefarbener, amorpher Feststoff; R_f= 0.80 (°Hex/EE 1:1); Schmp.: 28 °C.

C₁₁H₁₂BrNO₂ (270.12) [269.01]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.64 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 2H, H6); 7.57 (dd, ³J = 9.2 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 2H, H4); 7.14 (d, ³J = 9.2 Hz, 2H, H3); 5.48 (q, ³J = 5.2 Hz, 1H, O-CH-O); 3.75 (m, 1H, -CH₂CH₃); 3.56 (m, 1H, -CH₂CH₃); 1.54 (d, ³J = 5.2 Hz, 3H, -CH-CH₃), 1.17 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, -CH₂CH₃).

FD-MS (positiv) m/z: 271.2 ([M(⁸¹Br)]⁺; ber.: 271.0); 269.2 ([M(⁷⁹Br)]⁺; ber.: 269.0).

p-Hydroxymethylphenoxyessigsäureallylester (98)



Man löst 10.6 g *p*-Hydroxybenzylalkohol (85 mmol) und 11.5 g Chloressigsäureallylester (10.0 ml, 85 mmol) in 80 ml Aceton und versetzt mit 15 g K₂CO₃ (109 mmol, 1.3 Äquiv.) und 1.5 g KI. Die resultierende Suspension wird 20 h unter Rückfluss gerührt. Die Salze werden abfiltriert, das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und das erhaltene Rohprodukt durch Flashchromatographie an 400 g Kieselgel gereinigt (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

Ausbeute: 13.0 g (69 %); farbloses Öl; R_f= 0.56 (°Hex/EE 1:1).

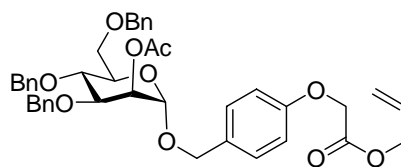
C₁₂H₁₄O₄ (222.24) [222.09]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.26 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, *m*-H_{arom.}); 6.87 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, *o*-H_{arom.}); 5.95-5.80 (m, 1H, Allyl-H); 5.31 (dd, ³J = 17.3 Hz, ²J = 1.2 Hz, 1H, *trans*-H); 5.25 (dd, ³J = 10.5 Hz, ²J = 1.2 Hz, 1H, *cis*-H); 4.63 (s, 2H, O-CH₂-COO-); 4.58 (s, 2H, -CH₂-OH), 1.79 (s_b, 1H, -OH).

75.5 MHz-¹³C-NMR [DEPT] (CDCl₃): δ [ppm] 168.6 (-COO-); 157.3 (*ipso*-C_{arom}); 134.3 (CH₂=CH-); 131.4 (*p*-C_{arom}); 128.6 (*m*-C_{arom}); 114.8 (CH₂=CH-); 114.7 (*o*-C_{arom}); 65.8 (O-CH₂-COO-); 65.4 (CH₂=CH-CH₂-); 64.8 (HO-CH₂-).

ESI-MS (positiv) m/z : 467.17 ([M+M+Na]⁺; ber.: 467.17); 245.09 ([M+Na]⁺; ber.: 245.08); 205.11 ([M-AllylOH+H₂O+Na]⁺; ber.: 205.05).

***p*-(2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)-phenoxyessigsäureallylester (99)**



Eine Lösung von 0.44 g (2.0 mmol) *p*-Hydroxymethylphenoxyessigsäureallylester **99** und 1.4 g (2.2 mmol, 1.1 Äquiv.) **80** in 20 ml absol. Dichlormethan wird zusammen mit 1.0 g Molsieb 4Å 30 min bei Raumtemp. gerührt und dann auf -20 °C abgekühlt. Man versetzt das Reaktionsgemisch langsam mit 4 ml einer 0.05 M Lösung von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat in Dichlormethan. Nach 30minütigem Rühren bei dieser Temperatur wird der Reaktionsansatz mit festem NaHCO₃ versetzt, mit 30 ml Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit 30 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und 30 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die Waschlösungen werden mit 30 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an 150 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

Ausbeute: 1.24 g (81 %); farbloses, hochviskoses Öl; R_f = 0.82 (°Hex/EE 1:1); [α]_D²² = 3.7 (c = 1, CH₂Cl₂).

C₄₁H₄₄O₁₀ (696.78) [696.29]

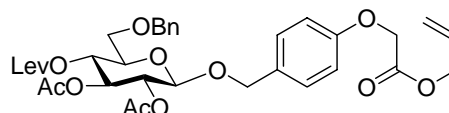
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.35-7.10 (m, 17H, Phenyl-H, *m*-H-Anker), 6.85 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, *o*-H-Anker); 5.91 (ddt, ³J = 5.9 Hz, ³J_{cis} = 10.3 Hz, ³J_{trans} = 17.3 Hz, 1H, Allyl-H); 5.37 (dd, ³J_{H1,H2} = 1.8 Hz, ³J_{H3,H2} = 2.9 Hz, 1H, H-2); 5.32 (dd, ³J = 17.3 Hz, ²J = 1.1 Hz, 1H, H_{trans}-Allyl); 5.25 (dd, ³J = 10.3 Hz, ²J = 1.1 Hz, 1H, H_{cis}-Allyl); 4.89 (d, ³J_{H1,H2} = 1.8 Hz, 1H, H-1); 4.83 (d, ²J = 12.5 Hz, 1H, CH-Ph); 4.70-4.35 (m, 9H, 7*CH-Bn, -OCH₂CO); 4.05-3.60 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b); 2.12 (s, 3H, CH₃).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 170.1 (CH₃CO); 168.5 (CH₂CO); 157.6 (C_{ipso} Ar-O); 138.3, 138.2, 137.9 (C_{ipso} Bn); 129.8 (CH₂=CH-); 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5 (C_{arom}); 119.2 (CH₂=CH-); 114.7, 114.6 (C_{ortho}-Anker); 96.9 (C-1);

78.3 (C-2); 77.2, 75.2, 74.3, 73.4, 71.8, 71.5, 68.8, 68.7, 65.9, 65.5, 65.4 (C-3, C-4, C-5, C-6, 3 x CH-Bn, O-CH₂-Ph-O, O-CH₂-CO, O-CH₂-CH=CH₂); 21.1 (CH₃CO).

ESI-MS (positiv) m/z : 719.20 ([M+Na]⁺; ber.: 719.20); 475.16 ([M-Anker+H]⁺; ber.: 475.21).

***p*-(2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-4-*O*-lävulinoyl-β-D-glucopyranosyloxymethyl)-phenoxyessigsäureallylester (100)**



Eine Lösung von 0.22 g (1.0 mmol) *p*-Hydroxymethylphenoxyessigsäureallylester **98** und 0.70 g (1.2 mmol, 1.2 Äquiv.) **60** in 10 ml absol. Dichlormethan wird zusammen mit 0.4 g Molsieb 4Å 30 min bei Raumtemp. gerührt und dann auf -20 °C abgekühlt. Man versetzt das Reaktionsgemisch langsam mit 4 ml einer 0.05 M Lösung von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat in Dichlormethan. Nach 30minütigem Rühren bei dieser Temperatur wird der Reaktionsansatz mit festem NaHCO₃ versetzt, mit 30 ml Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit 30 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. und 30 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die Waschlösungen werden mit 30 ml Dichlormethan extrahiert, die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Flashchromatographie an 450 g Kieselgel (Laufmittel: °Hex/EE 1:1).

Ausbeute: 240 mg (67 %), farbloses, viskoses Öl; R_f = 0.52 (°Hex/EE 1:1); $[\alpha]_D^{22} = -14.5$ (c = 1, CH₂Cl₂).

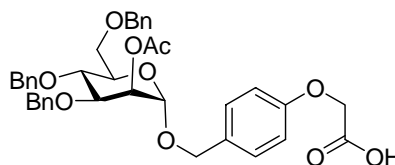
C₃₄H₄₀O₁₃ (656.67) [656.25]

400 MHz-¹H-NMR [¹H-¹H-COSY] (CDCl₃): δ [ppm] 7.40-7.25 (m, 5H, Benzyl-H); 7.19 (d, ³J = 8,6 Hz, 2H, m-H-Anker); 6.84 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, o-H-Anker); 5.90 (ddt, ³J = 5.9 Hz, ³J_{cis} = 10.2 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, 1H, Allyl-H); 5.32 (dd, ³J = 17.2 Hz, ²J = 1.6 Hz, 1H, H-trans-Allyl); 5.25 (dd, ³J = 10.2 Hz, ²J = 1.6 Hz, 1H, H-cis-Allyl); 5.15 (dd, ³J_{H3,H4} = 9.4 Hz; ³J_{H4,H5} = 9.8 Hz, 1H, H-4); 5.05 (dd, ³J_{H3,H4} = 9.4 Hz; ³J_{H3,H2} = 9.4 Hz, 1H, H-3); 4.99 (dd, ³J_{H1,H2} = 7.8 Hz, ³J_{H3,H2} = 9.4 Hz, 1H, H-2); 4.80 (d, ²J = 12.1 Hz, 1H, H-6a); 4.68 (dt, ³J = 5.9 Hz; ⁴J = 1.2 Hz, 2H, CH₂-Allyl); 4.62 (s, 2H, CH₂-Benzyl); 4.55-4.50 (m, 3H, H-6b, O-CH₂-COO-); 4.48 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, H-1); 3.68-3.58 (m, 3H, H-5, CH₂-

Anker); 2.68-2.58 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$) 2.43-2.30 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ -); 2.11 (s, 3H, CH_3COCH_2 -); 2.00, 1.96 (2s, 6H, CH_3 -Acetyl).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR [HMQC] (CDCl_3): δ [ppm]: 205.9 (CH_3COCH_2 -); 171.3, 169.3, 168.5 (CH_3COO -; $-\text{CH}_2\text{COO}$ -); 157.6 (C_{ipso} -Anker); 131.4 ($\text{CH}_2=\text{CH}$ -); 130.1 (C_{ipso} -Benzyl); 129.5 (C_{para} -Anker); 129.4 (C_{metha} -Anker); 128.4, 128.0, 127.7 (C-arom., Benzyl); 119.1 ($\text{CH}_2=\text{CH}$ -); 114.6 (C_{ortho} -Anker); 99.0 (C-1), 73.6 ($-\text{OCH}_2\text{CO}$ -); 73.4 (C-5); 72.7 (C-4); 71.5 (C-2); 70.1 (C-6); 69.4 (C-3); 69.0 (CH_2 -Anker); 65.9 (CH_2 -Allyl); 65.4 (CH_2 -Benzyl); 37.6 (CH_3COCH_2 -); 29.6 (CH_3COCH_2 -); 27.7 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ -); 20.6 (CH_3CO -).
ESI-MS (positiv) m/z : 695.3 ($[\text{M}+\text{K}]^+$; ber.: 695.35); 679.36 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$; ber.: 679.24).

4-[(2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyloxy)methyl]-phenoxyessigsäure (101)



Zu 1.24 g (1.8 mmol) **99** in 25 ml dest. THF gibt man unter Argonatmosphäre zwei Spatelspitzen (120 mg, 0.10 mmol, 0.06 Äquiv.) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ und eine Lösung von 423 mg (2.4 mmol, 1.3 Äquiv.) des Natriumsalzes der *p*-Toluolsulfinsäure in 15 ml Methanol. Es wird 2 h bei Raumtemp. gerührt und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 15:1).

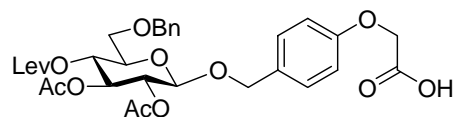
Ausbeute: 0.74 g (53 %); farbloses Öl; $[\alpha]_D^{22} = 18.9$ ($c = 1.0$, MeOH); $R_f = 0.09$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 15:1).

$\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$ (656.72) [656.26].

300 MHz- ^1H -NMR (CDCl_3): δ [ppm] 7.35-7.15 (m, 15H, Benzyl-H); 7.09 (m, 2H, H_m -Anker); 6.79 (m, 2H, H_o -Anker); 5.33 (m, 1H, H-2); 4.85-4.75 (m, 2H, H-1, CH_2 -Bn); 4.70-4.20 (m, 9H, $-\text{CH}_2\text{CO}$ -, 7x- CH -Bn); 4.00-3.55 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, H6a, H6b); 2.05 (s, 3H, CH_3CO -).

75.5 MHz- ^{13}C -NMR (CDCl_3): δ [ppm] 172.1, 170.4, 169.9 (CH_3COO -; $-\text{CH}_2\text{COO}$ -; $-\text{COOH}$); 158.2 (C_{ipso} -Anker); 138.1, 137.9, 137.8 (C_{ipso} -Benzyl); 129.7, 128.3, 128.0, 127.6, 127.5, 126.5, 125.9 (C-arom., Benzyl); 115.0 (C_{ortho} -Anker); 96.7 (C-1), 78.3, 77.5, 77.2, 76.7, 75.1, 74.2, 73.4, 71.8, 71.5, 68.7 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, $-\text{OCH}_2\text{CO}$ -, CH_2 -Anker, CH_2 -Benzyl); 21.1 (CH_3CO -).

**4-[(2,3-Di-O-acetyl-6-O-benzy-4-O-lävulinoyl- β -D-glucopyranosyloxy)methyl]-phenoxyessigsäure
(102)**



Zu 1.5 g (2.3 mmol) **100** in 25 ml dest. THF gibt man unter Argonatmosphäre zwei Spatelspitzen (130 mg, 0.12 mmol, 0.05 Äquiv.) Pd(PPh₃)₄ und eine Lösung von 490 mg (2.8 mmol, 1.2 Äquiv.) des Natriumsalzes der *p*-Toluolsulfinsäure in 15 ml Methanol. Es wird 2 h bei Raumtemp. gerührt und das Lösungsmittel anschließend i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 15:1).

Ausbeute: 0.74 g (53 %); farbloses, zähes Öl; $[\alpha]_D^{22} = -11.6$ (c = 1.0, MeOH); R_f = 0.11 (CH₂Cl₂/Methanol 15:1).

C₃₁H₃₆O₁₃ (616.16) [616.22].

300 MHz-¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] 7.45-7.25 (m, 5H, Benzyl-H); 7.25-7.15 (m, 2H, *m*H-Anker); 6.95-6.80 (m, 2H, *o*H-Anker); 5.27 (dd, ³J_{H4-H3} = ³J_{H4-H5} = 9.6 Hz, 1H, H-4); 5.01 (dd, ³J_{H3-H4} = ³J_{H3-H2} = 9.6 Hz, 1H, H-3); 4.85-4.70 (m, 2H, H-2, H-6a); 4.56 (s, 4H, CH₂-Benzyl, -OCH₂CO-); 4.55-4.35 (m, 2H, H-1, H-6b); 4.00-3.85 (m, 1H, H-5); 3.60-3.40 (m, 2H, CH₂-Anker); 2.75-2.65 (m, 2H, CH₃COCH₂-); 2.38 (t, ³J = 5.9 Hz, 2H, -CH₂CH₂COO-); 2.11 (s, 3H, CH₃COCH₂-); 2.00, 1.97 (2s, 6H, CH₃-Acetyl)

75.5 MHz-¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ [ppm] 206.8 (CH₃COCH₂-); 172.1, 171.2, 169.7, 169.1 (CH₃COO-, -CH₂COO-, -COOH); 158.0 (C_{ipso}-Anker); 138.1 (C_{ipso}-Benzyl); 129.3 (C_{para}-Anker); 129.2 (C_{meta}-Anker); 128.3, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6 (C-arom., Benzyl); 114.4 (C_{ortho}-Anker); 98.8 (C-1), 72.5 (-OCH₂CO-); 72.3 (C-5); 72.1 (C-4); 71.3 (C-2); 70.1 (C-6); 68.6 (C-3); 68.4 (CH₂-Anker); 65.7 (CH₂-Benzyl); 37.3 (CH₃COCH₂-); 29.5 (CH₃COCH₂-); 27.7 (-CH₂CH₂COO-); 20.6 (CH₃CO-).

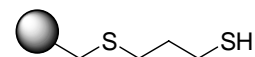
ESI-MS (positiv) m/z : 639.19 ([M+Na]⁺; ber.: 639.11); 459.13 ([M-LevOH-AcOH+H₂O+Na]⁺; ber.: 459.16).

Allgemeine Vorschrift zur Kupplung der Bausteine 101 und 102 an den aminofunktionalisierten polymeren Träger

Zu einer Lösung von 1.2 Äquiv. (bezogen auf die Kapazität des polymeren Trägers) des ankergebundenen Monosaccharidbausteins in THF werden 1.2 Äquiv. HOBt, 2.4 Äquiv. *N*-Methylmorpholin und 1.2 Äquiv. TBTU gegeben. Es wird 20 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend gibt man die Reaktionslösung in einen Festphasenreaktor, in dem

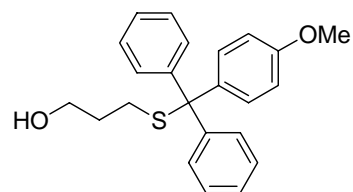
1 Äquiv. des polymeren Trägers in THF über 30 min vorgequollen wurde. Man schüttelt 18 h bei Raumtemp. und filtriert die Reaktionslösung anschließend ab. Das Harz wird je zweimal mit THF, DMF und Dichlormethan gewaschen.

Propan-1,3-dithiol-funktionalisiertes Polystyrolharz (105)²⁰⁶



Chlormethyliertes Polystyrolharz (1.1 g, 1.49 mmol) (*Rapp Polymere*, Beladungskapazität: 1.35 mmol/g, mesh 200-400, 1% Divinylbenzol) wird unter einer Argonatmosphäre in 20 ml entgastem Toluol vorgequollen und mit 1.3 ml (1.4 g, 13 mmol, 9 Äquiv.) Propan-1,3-dithiol versetzt. Es wird 15 min geschüttelt und dann tropfenweise mit 0.45 ml (0.46 g, 3 mmol, 2 Äquiv.) DBU versetzt. Man schüttelt weitere 24 h, filtert die Reaktionslösung ab und wäscht mehrmals abwechselnd mit Dichlormethan und DMF. Das Harz wird i. Feinvak getrocknet. Durch Elementaranalyse wurde ein quantitativer Umsatz bestimmt (1.35 mmol/g, Schwefelgehalt: 8.00 %).

S-(Monomethoxytrityl)-1-mercaptopropan-3-ol (108)²⁰⁶



Ein Lösung von 7.1 g (23.1 mmol, 1.1 Äquiv.) (Monomethoxytrityl)methylchlorid in 50 ml Pyridin wird bei einer Temperatur von 10 °C mit 2.3 ml (2.5 g, 20.8 mmol) 3-Mercaptopropionsäuremethylester versetzt und 14 h gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 150 ml Diethylether verdünnt, mit 20 ml Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Der Rückstand wird dreimal mit Toluol kodestilliert und anschließend in 50 ml THF gelöst. Bei 0 °C werden 950 mg (25.0 mmol) LiAlH₄ portionsweise zugegeben. Nach 2 h ist der Umsatz vollständig (DC Toluol/EE 15:1). Überschüssiges LiAlH₄ wird durch Zugabe von 10 ml Essigester zerstört. Anschließend wird mit 100 ml Diethylether verdünnt, mit 80 ml Wasser versetzt und 1 h gerührt. Die Suspension wird über *Hyflo* filtriert und mehrmals mit Diethylether nachgewaschen. Die org. Phase wird abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von den Lösungsmitteln befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Umkristallisieren aus 60 ml Petrolether/Essigester (4:1).

Ausbeute: 5.3 g (70 %); farblose Kristalle; R_f = 0.11 (Toluol/EE 15:1).

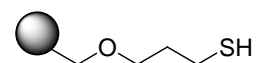
C₂₃H₂₄O₂S (364.15) [364.50].

²⁰⁶ J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3650

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.45-7.15 (m, 12H, H_{arom.}); 6.80 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, mH_{arom.}); 3.77 (s, 3H, MeO-); 3.55 (t, ³J = 6.3 Hz, 2H, -CH₂OH); 2.27 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H, -CH₂S-); 2.03 (s, 1H, -OH). 1.61 (tt, ³J = 6.3 Hz, ³J = 7.0 Hz, 2H, -CH₂-).

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 158.0 (MeO-C_{arom.}); 145.2 (C_{ipso}); 137.0 (C₁-Phenyl-OMe); 130.7, 129.5, 127.8, 126.6 (C_{arom.}); 113.1 (C_{3,5}-Phenyl-OMe); 66.1 (C_{quart.}); 61.7 (-CH₂-OH); 55.2 (O-Me); 31.5 (-CH₂-S); 28.5 (-CH₂-).

1-Mercapto-propan-3-ol-funktionalisiertes Polystyrolharz (106)²⁰⁶



Chlormethyliertes Polystyrolharz (1.5 g, 2.03 mmol) (*Rapp Polymere*, Beladungskapazität: 1.35 mmol/g, mesh 200-400, 1% Divinylbenzol) wird unter einer Argonatmosphäre in 20 ml entgastem THF vorgequollen und nacheinander mit 1.11 g (3.05 mmol, 1.5 Äquiv.) S-(Monomethoxytrityl)-1-thioprop-3-ol **108**, 0.61 g 15-Krone-5 (0.67 g, 3.05 mmol, 1.5 Äquiv.) und 74 mg entöltem NaH (3.05 mmol, 1.5 Äquiv.) versetzt. Man schüttelt 24 h bei 60 °C, filtert die Reaktionslösung ab und wäscht mehrmals abwechselnd mit Dichlormethan und DMF. Anschließend wird das Harz solange mit einer 5%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan gewaschen bis diese farblos bleibt. Das Harz wird wieder abwechselnd mit Dichlormethan und DMF gewaschen und i. Feinvak. getrocknet. Der mittels Elementaranalyse bestimmte Umsatz der Funktionalisierung beträgt 97 % entsprechend 1.31 mmol/g (Schwefelgehalt 3.92 %).

Allgemeine Vorschrift zur Glycosylierung der alkylthiol-funktionalisierten polymeren Träger mit dem Donor (80)

Das Harz **105** bzw. **106** wird unter Argon in einem Festphasenreaktor mit einer Lösung des Donors **80** (3-10 Äquiv.) in Dichlormethan (20 ml/g Harz) versetzt und 15 min geschüttelt. Dazu gibt man eine frisch hergestellte 0.5 M Lösung von TMSOTf in Dichlormethan und schüttelt (1 h – 48 h). Die Reaktionslösung wird abfiltriert, mehrmals abwechselnd mit Dichlormethan und THF gewaschen und i. Vak. getrocknet. Mittels Elementaranalyse wird der Umsatz der Reaktion bestimmt.

5.4 Festphasenglycopeptidsynthesen

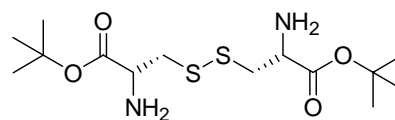
Allgemeines Protokoll der automatisierten Glycopeptidfestphasensynthese

Die automatisierten Peptidsynthesen werden in einem *Perkin-Elmer* ABI 433A Peptidsynthesizer der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Hierzu wird ein mit Fmoc-Ala-HMPB vorbeladener BHA-Polystyrol-Harze verwendet. In sich wiederholenden Synthesecyclen wird zunächst die temporäre Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung (3 x 2.5 min) des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) entfernt. Zur Kontrolle des Syntheseverlaufs wird die UV-Absorption des Addukts mit einem externen *Perkin-Elmer* Series 200 UV/Vis Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 301$ nm bestimmt. Die anschließenden sequentiellen Aminosäure-Kupplungen erfolgen jeweils mit einer Lösung von 1 mmol des Fmoc-geschützten Aminosäurebausteins, 1 mmol HBTU, 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol und 2 mmol *N*-Ethyldiisopropylamin (*Hünigs* Base) in DMF unter starkem Schütteln (Vortex, 20-30 min). Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung eventuell verbliebener freier Aminogruppen fünf Minuten mit einer Lösung aus 0.5 M Acetanhydrid, 0.125 M Ethyldiisopropylamin und 0.015 M 1-Hydroxy-benzotriazol in NMP (Capping-Reagenz) behandelt. Bei schwierigen Kupplungen kann eine automatische Doppelkupplung durchgeführt werden. Hierzu wird das Harz jeweils zweimal ohne zwischenzeitliche Acetylierung mit einer Lösung von 1 mmol der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäure, 1 mmol HBTU, 1 mmol 1-Hydroxybenzotriazol und 2 mmol *N*-Ethyldiisopropylamin in DMF behandelt. Das Harz wird nach jedem Teilschritt gründlich mit NMP gespült. Nach Beendigung der Synthese wird das Harz zusätzlich mit Dichlormethan gewaschen und in einem Stickstoffstrom getrocknet.

5.4.1 Synthesen zu Kapitel 3.4.2

L-Cystin-di-*tert*-butylester (117)²⁰⁷

(Cys-*Ot*Bu)₂



In 45.0 g 70%iger Perchlorsäure werden 15.0g (62.4 mmol) L-Cystin unter Eiskühlung gelöst. Man gibt 350 ml Essigsäure-*tert*-butylester hinzu und rührt die Mischung bei Raumtemp. Nach ca. einer Stunde bildet sich eine homogene Lösung. Diese wird 48 h

²⁰⁷ M. J. Amaral, M. A. Macedo, M. I. Oliveira, *J. Chem. Soc. [Perkin. 1]*. **1977**, 2, 205.

gerührt, wobei ein farbloser Niederschlag ausfällt. Die Mischung wird anschließend auf $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert und mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Perchlorat wird in wenig Wasser aufgeschlämmt und vorsichtig mit einer ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt bis ein pH-Wert von 8 erreicht ist. Anschließend wird dreimal mit je 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit 150 ml ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Man erhält ein leicht gelbliches Öl, das ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt eingesetzt wird.

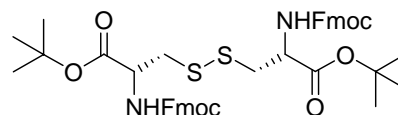
Ausbeute: 17.3 g (79 %); leicht gelbliches Öl.

$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (352.51) [352.15]

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 3.48 (t, 2H, $^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta} = 6.4\text{ Hz}$, H^α); 3.05-2.85 (m, 4H, CH_2^β); 1.88 (sb, 4H, $-\text{NH}_2$); 1.42 (s, 18H, *t*Bu).

***N,N'*-Bis-(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-cystin-di-*tert*-butylester (118)**²⁰⁸

(Fmoc-Cys-*Ot*Bu)₂



Zu einer Lösung aus 8.4 g (23.8 mmol) L-Cystin-di-*tert*-butylester **117** und 22.0 g (58.9 mmol; 1.2 Äquiv.) FmocOSu in 80 ml THF gibt man langsam 5.5 ml (5.1 g; 50.1 mmol) *N*-Methylmorpholin und rührt 5 h unter Argon. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in 200 ml Ethylacetat aufgenommen. Man wäscht zweimal mit je 50 ml einer 5%igen Zitronensäurelösung, trocknet über MgSO_4 und entfernt das Lösungsmittel i. Vak. Der Rückstand wird aus 300 ml Methanol/ CH_2Cl_2 4:1 umkristallisiert. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert, mit *tert*-Butanol/Isopropanol 1:1 gewaschen und i. Feinvak. getrocknet.

Ausbeute: 16.1 g (85 %); farbloser, kristalliner Feststoff; $R_f = 0.60$ (EE/ c Hex 3:1); Smp.: $148\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_D^{22} = -10.4$ ($c = 1$, CH_2Cl_2), Lit.:²⁰⁹ $[\alpha]_D^{22} = -6.4$ ($c = 0.56$, CHCl_3).

$\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ (796.99) [796.29]

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 7.72 (d, 4H, H4-, H5-Fmoc, $^3J_{\text{H}4,\text{H}3} = ^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 7.7\text{ Hz}$); 7.56 (d, 4H, H1-, H8-Fmoc, $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = ^3J_{\text{H}8,\text{H}7} = 7.7\text{ Hz}$); 7.36 (t, 4H, H3-, H6-Fmoc, $^3J_{\text{H}3,\text{H}4} = ^3J_{\text{H}3,\text{H}2} = ^3J_{\text{H}6,\text{H}7} = ^3J_{\text{H}6,\text{H}5} = 7.4\text{ Hz}$); 7.27 (t, 4H, H2-, H7-Fmoc, $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = ^3J_{\text{H}2,\text{H}3} = ^3J_{\text{H}7,\text{H}8} = ^3J_{\text{H}7,\text{H}6} = 7.5\text{ Hz}$); 5.73 (d, 2H, $-\text{NH}$, $^3J_{\text{NH},\text{C}\alpha} = 7.4\text{ Hz}$); 4.64-4.50 (m, 2H, H^α); 4.35

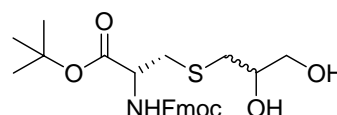
²⁰⁸ J. W. Metzger, K. H. Wiesmueller, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 38, 545

²⁰⁹ V. Swali, M. Matteucci, R. Eliot, M. Brandley, *Tetrahedron* **2002**, 58, 9101

(d, 4H, CH₂-Fmoc, ³J_{CH₂,CH} = 7.0 Hz); 4.18 (t, 2H, CH-Fmoc), ³J_{CH₂,CH} = 7.0 Hz); 3.25-3.05 (m, 4H, CH₂^β); 1.47 (s, 18H, *t*Bu).

ESI-MS (positiv) *m/z* : 835.1 ([M+K]⁺, ber.: 835.3); 819.2 ([M+Na]⁺, ber.: 819.3); 796.3 ([M+H]⁺, ber.: 796.3); 741.1([M-Isobuten+H]⁺, ber.: 741.2); 685.2([M-2xIsobuten+H]⁺, ber.: 685.2); 575.2 ([M-Fmoc+H]⁺, ber.: 575.24).

***N*-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (119)²¹⁰**



Eine Suspension aus 3.60 g (4.52 mmol) *N,N'*-Bis-(fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-L-cystin-di-*tert*-butylester **118** und 2.10 g (32.1 mmol, 7.1 Äquiv.) Zinkstaub in 40 ml entgastem Dichlormethan wird unter kräftigem Rühren mit 15 ml einer Lösung aus Methanol, konz. HCl und konz. H₂SO₄ (100:7:1) versetzt. Nach 20 min werden 3.40 g (45.9 mmol, 5 Äquiv.) (±)-Glycidol zugegeben, es wird auf 40 °C erwärmt und 5 h gerührt. Man engt die Reaktionsmischung i. Vak. auf die Hälfte des Volumens ein und versetzt mit 5 ml einer 5%igen KHSO₄-Lösung. Die Mischung wird 20 h bei -4 °C aufbewahrt und dann über *Hyflo* filtriert. Das Filtrat wird dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert, die org. Phasen zweimal mit je 20 ml einer ges. NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Öl wird i. Feinvak. getrocknet und ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 4.28 g (quant.); farbloses, hochviskoses Öl; *R_f* = 0.32 (°Hex/EE 3:1); [*α*]_D²² = 6.7 (c = 1, CH₂Cl₂).

C₂₅H₃₁NO₆S (473.58) [473.19]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{H4, H3} = ³J_{H5,H6} = 7.4 Hz); 7.58 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J_{H1,H2} = ³J_{H8,H7} = 7.0 Hz); 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, ³J_{H3,H4} = ³J_{H3,H2} = ³J_{H6,H7} = ³J_{H6,H5} = 7.4 Hz); 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, ³J_{H1,H2} = ³J_{H2,H3} = ³J_{H7,H8} = ³J_{H7,H6} = 7.2 Hz); 5.87 (m, 1H, NH); 4.57-4.30 (m, 3H, CH₂-Fmoc, H^α); 4.21 (t, 1H, CH-Fmoc, ³J_{CH,CH2} = 6.8 Hz); 3.83-3.70 (m, 1H, Glyceryl-CH); 3.60-3.45 (m, 2H, Glyceryl-OCH₂); 3.05-2.85 (m, 2H, CH₂^β); 2.82-2.70 (m, 1H, Glyceryl-SCH_a); 2.70-2.50 (m, 1H, Glyceryl-SCH_b); 1.47 (s, 9H, *t*Bu).

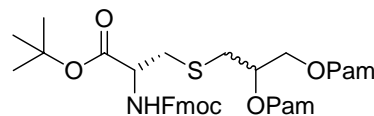
75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc); 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc); 127.7 (C3-, C6-Fmoc); 127.1 (C2-, C7-Fmoc); 125.0 (C1-, C8-Fmoc); 120.0 (C3-, C6-Fmoc); 83.1 (C_q-*t*Bu); 70.7, 70.5 (Glyceryl-CH)*; 67.2 (CH₂-Fmoc); 65.2, 65.1 (Glyceryl-

²¹⁰ F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hamalainen, M. C. Feiters, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989

CH₂)*; 54.5 (C^α); 47.1 (CH-Fmoc); 36.6, 36.5 (C^β)*; 35.8, 35.6 (-SCH₂-)*; 28.0 (3C, *t*Bu).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise Signalverdopplung (*) auf.

***N*-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (120)**²¹⁰



Eine Lösung von 4.1 g (8.7 mmol) *N*-(Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-*S*-[2,3-dihydroxy-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester **119**, 7.4 g (28.3 mmol, 1.6 Äquiv.) Palmitinsäure, 5.47 ml (35.3 mmol, 2.0 Äquiv.) DIC und 0.41 g (3.6 mmol) DMAP in 100 ml absol. THF wird 5 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Nach Zugabe von 4 ml Essigsäure wird das Produkt i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand aus Methanol/Dichlormethan 20:1 umkristallisiert.

Ausbeute: 7.50 g (91 %); farbloser, amorpher Feststoff; $R_f = 0.72$ (EE/^cHex 3:1), Schmp.: 42 °C, (Lit.: 38-42 °C).

C₅₇H₉₁NO₈S (950.40) [949.65]

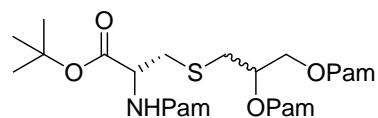
300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 7.74 (d, 2H, H4-, H5-Fmoc, ³J_{H4, H3} = ³J_{H5, H6} = 7.4 Hz); 7.59 (d, 2H, H1-, H8-Fmoc, ³J_{H1, H2} = ³J_{H8, H7} = 7.4 Hz); 7.38 (t, 2H, H3-, H6-Fmoc, ³J_{H3, H4} = ³J_{H3, H2} = ³J_{H6, H7} = ³J_{H6, H5} = 7.4 Hz); 7.29 (t, 2H, H2-, H7-Fmoc, ³J_{H1, H2} = ³J_{H2, H3} = ³J_{H7, H8} = ³J_{H7, H6} = 7.4 Hz); 5.75-5.60 (m, 1H, NH); 5.20-5.05 (m, 1H, Glyceryl-CH); 4.55-4.45 (m, 1H, H^α); 4.40-4.05 (m, 5H, CH₂-Fmoc, CH-Fmoc, Glyceryl-O-CH₂); 3.10-2.95 (m, 2H, CH₂^β); 2.74 (d, 2H, Glyceryl-SCH₂, ³J = 6.3 Hz); 2.26 (t, 4H, 2xCH₂^α-Pam, ³J = 7.2 Hz); 1.65-1.50 (m, 4H, 2xCH₂^β-Pam); 1.47 (s, 9H, *t*Bu); 1.23 (sb, 48 H, 2x(CH₂)₁₂-Pam); 0.86 (t, 6H, 2xCH₃-(Pam), ³J_{CH3, CH2} = 6.6 Hz)

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 173.3, 173.0, 172.97 (3C, -CH₂COO-); 155.7 (C-Urethan); 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc); 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc); 127.7 (C3-, C6-Fmoc); 127.1 (C2-, C7-Fmoc); 125.1 (C1-, C8-Fmoc); 120.0 (C3-, C6-Fmoc); 83.0 (C_q-*t*Bu); 70.3, 70.2 (Glyceryl-CH)*; 67.2 (CH₂-Fmoc); 63.4 (Glyceryl-CH₂); 54.3 (C^α); 47.1 (CH-Fmoc); 35.4, 35.3 (C^β)*; 34.2, 34.0, 33.3, 33.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 28.0, 24.9, 23.4, 22.7 (28C, CH₂-Pam) 33.3, 33.2 (-SCH₂-)*; 28.0 (3C, *t*Bu), 14.1 (3C, CH₃-Pam)

ESI-MS (positiv) m/z : 988.6 ([M+K]⁺, ber.: 988.6); 972.7 ([M+Na]⁺, ber.: 972.6); 950.6 ([M+H]⁺, ber.: 950.7); 894.5 ([M-Isobuten+H]⁺, ber.: 894.7); 728.5 ([M-Fmoc+H]⁺, ber.: 728.6).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise Signalverdopplung (*) auf.

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester (**121**)²¹⁰**
(Pam₃Cys-*Ot*Bu)



In 40 ml DMF/Morpholin (1:1) werden 3.60 g (3.78 mmol) *N*-(Fluoren-9-yl-methoxy-carbonyl)-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystin-*tert*-butylester **120** gelöst und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionsmischung wird i. Feinvak. von den Lösungsmitteln befreit und dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 50 ml Dichlormethan/DMF 5:2 aufgenommen, mit 1.93 g (7.56 mmol, 2.0 Äquiv.), 1.03 g (7.56 mmol, 2.0 Äquiv.) HOBt*H₂O und 0.96 g (7.56 mmol) DIC versetzt und 20 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und dreimal mit 50 ml ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit 50 ml Wasser gegengeschüttelt. Die org. Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. von Lösungsmitteln befreit. Der so erhaltene gelbliche Feststoff wird durch Umkristallisieren aus 50 ml Methanol/Chloroform 5:1 bei -20 °C gereinigt.

Ausbeute: 3.22 g (88 %); farbloser, kristalliner Feststoff; R_f = 0.55 (°Hex/EE 3:1).

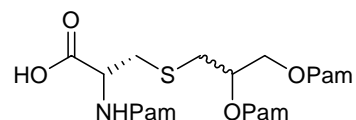
C₅₈H₁₁₁NO₇S (966.57) [965.81]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 6.40-6.25 (m, 1H, NH); 5.11 (dd, 1H, Glycerol-CH, ³J = 6.3 Hz, ³J = 3.7 Hz); 4.75-4.65 (m, 1H, H^α); 4.35-4.25 (m, Glycerol-O-CH_a); 4.15-4.05 (m, Glycerol-O-CH_b); 3.05-2.95 (m, 2H, CH₂^β); 2.71 (d, 2H, Glycerol-SCH₂, ³J = 6.3 Hz); 2.35-2.22 (m, 6H, 3xCH₂^α-Pam); 1.70-1.50 (m, 6H, 3xCH₂^β-Pam); 1.47 (s, 9H, CH₃-*t*Bu); 1.23 (s_b, 72 H, 3x(CH₂)₁₂-Pam); 0.85 (t, 9H, 3xCH₃-(Pam), ³J_{CH₃,CH₂} = 6.6 Hz)

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 173.3, 173.2, 173.0 (-CH₂COO-); 169.7 (-CH₂CONH-); 82.9 (C_q-*t*Bu); 70.3, 70.1 (Glycerol-CH)*; 63.5 (Glycerol-CH₂); 52.3 (C^α); 35.2 (C^β); 36.8, 34.3, 34.2, 32.9, 31.8, 29.7, 29.5, 29.4, 25.1, 22.7 (42C, CH₂-Pam) 33.2 (-SCH₂-); 28.0 (3C, *t*Bu), 14.1 (3C, CH₃-Pam).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise Signalverdopplung (*) auf.

***N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein (**122**)²¹⁰**
(Pam₃Cys-OH)



Eine Lösung aus 2.13 g (2.20 mmol) *N*-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein-*tert*-butylester **121** in 10 ml Dichlormethan wird mit 0.7 ml Anisol und 17 ml Trifluoressigsäure versetzt und 90 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 60 ml Toluol verdünnt und i. Vak. eingengt und dreimal mit

Toluol kodestilliert. Der Rückstand wird in 40 ml siedendem Petrolether/Chloroform (16:1) aufgenommen, heiß abfiltriert und bei -28 °C auskristallisiert.

Ausbeute: 1.64 g (82 %); farbloser, kristalliner Feststoff; $R_f = 0.51$ (EE/AcOH100:1); Schmp.: 58 °C; $[\alpha]_D^{22} = 14.7$ (c = 1, CHCl₃).

C₅₄H₁₀₃NO₇S (910.46) [909.75]

300 MHz-¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 6.60-6.45 (m, 1H, NH); 5.20-5.10 (dd, 1H, Glyceryl-CH); 4.85-4.65 (m, 1H, H^α); 4.40-4.25 (m, Glyceryl-O-CH_a); 4.15-4.05 (m, Glyceryl-O-CH_b); 3.15-3.00 (m, 2H, CH₂^β); 2.80-2.65 (d, 2H, Glyceryl-SCH₂, ³J = 6.3 Hz); 2.35-2.15 (m, 6H, 3xCH₂^α-Pam); 1.70-1.50 (m, 6H, 3xCH₂^β-Pam); 1.23 (s_b, 72 H, 3x(CH₂)₁₂-Pam); 0.86 (t, 9H, 3xCH₃-(Pam), ³J_{CH₃,CH₂} = 6.6 Hz)

75.5 MHz-¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] 173.7, 173.6, 173.5, 172.3 (CO), 70.2, 70.1 (CH-Glyceryl)*, 63.6 (CH₂(Glyceryl)), 52.1, 51.9 (C_a)*, 36.3 (C_β), 36.2, 34.3, 34.1, 32.9, 31.9, 29.7, 29.5, 29.3, 25.5, 24.9, 22.7 (42C, CH₂-(Pam), 33.8 (-SCH₂-), 14.1 (3C, 3xCH₃-Pam).

Durch das Vorliegen zweier Diastereomere tritt teilweise Signalverdopplung (*) auf.

L-Seryl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-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-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin

(Ser-NH(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)-αAc₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH) (125)

Die automatisierte Synthese erfolgt nach dem Standardprotokoll (s. S. 154) im Peptidsynthesizer. Hierzu werden 200 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-HMPB vorbeladenen BHA-Polystyrol-Harzes (Beladung: 0.5 mmol/g) verwendet. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des Fmoc-ST_N-Aminosäure-Konjugates **29** erfolgt nach einem modifizierten Protokoll ebenfalls im Peptidsynthesizer. Hierbei wird das deblockierte Harz mit einer Lösung aus 235 mg (0.2 mmol, 2 Äquiv.) Fmoc-Thr(αAc₄NeuNAcCOOBn-(2→6)-αAc₂GalNAc)-OH **29**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 Äquiv.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 Äquiv.) HOAt und 54.6 µl (5 mmol, 5 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 4 h stark geschüttelt (30 sec Vortex, 30 sec Stillstand). Danach wird abfiltriert, mit NMP und

abschließend mit Dichlormethan gewaschen. Die Waschrückstände werden gesammelt, um nicht umgesetztes Disaccharid zurückzugewinnwn. Evtl. verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplungen der beiden darauffolgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin erfolgen in einer Doppelkupplung. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppen wird durch 3 x 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP erreicht. Es wird mit NMP und anschließend mit Dichlormethan intensiv gewaschen. Das Harz wird aus dem Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers entnommen und in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt, worin es dreimal mit jeweils 20 ml Dichlormethan gewaschen wird. Anschließend wird das Harz in 10 ml abs. Dioxan/Benzylalkohol 1:1 gequollen, mit einer 0.1 M Lösung von Natriumbenzylat in Benzylalkohol auf einen pH-Wert von 9.0 eingestellt und 48 h unter einer Argonatmosphäre geschüttelt. Der pH-Wert wird zwischenzeitlich kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert. Das Harz wird anschließend mehrmals gründlich mit Dioxan, Dichlormethan und NMP gewaschen. Die Kupplung des Mitogens Pam₃Cys **122** erfolgt manuell im *Merrifield*-Festphasenreaktor. Hierbei wird das *N*-terminal deblockierte Harz mit einer Lösung von 455 mg (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) Pam₃Cys **122**, 195 mg (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) HATU, 66 mg (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) HOAt und 110 µl (1.0 mmol, 10.0 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 48 h stark geschüttelt. Danach wird abfiltriert, mit NMP und abschließend mit Dichlormethan gewaschen. Der polymere Träger wird mit einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml Wasser versetzt und 1.5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend wird die überstehende Lösung abfiltriert und das Harz noch zweimal mit jeweils 10 ml TFA gewaschen. Dieser Abspaltvorgang wird mit einer Mischung aus 15 ml Dichlormethan, 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triethylsilan und 0.9 ml Wasser wiederholt. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden i. Vak. konzentriert und anschließend viermal mit jeweils 15 ml Toluol i. Vak. kodestilliert.

Ausbeute: 46 mg (14 %) Rohprodukt; farbloser Feststoff.

C₁₅₃H₂₆₀N₂₄O₄₉S [3249.83] (3251.90)

ESI-MS (positiv), m/z: 1085.3 ([M(3*¹³C)+3H]³⁺; ber.: 1085.3), 1085.1 ([M(2*¹³C)+3H]³⁺; ber.:1085.0), 1084.8 ([M(1*¹³C)+3H]³⁺; ber.: 1084.6).

MALDI-TOF-MS (dhb, positiv) m/z: 3272.8 ([M+H]⁺, ber.: 3772.9).

5.4.2 Synthesen zu Kapitel 3.4.3

N-Acetyl-L-arginyl-L-seryl-L-isoleucyl-L-arginyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-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- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl}-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin

(Ac-Arg-Ser-Ile-Arg-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val-NH(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH) (126)

Die automatisierte Synthese erfolgt nach dem Standardprotokoll (s. S. 154) im Peptidsynthesizer. Hierzu werden 200 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-HMPB vorbeladenen BHA-Polystyrol-Harzes (Beladung: 0.5 mmol/g) verwendet. Die Kupplungszeit der Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) beträgt jeweils 20 min. Die Kupplung des *Fmoc*-ST_N-Aminosäure-Konjugates **29** erfolgt nach einem modifizierten Protokoll ebenfalls im Peptidsynthesizer. Hierbei wird das *N*-terminal deblockierte Harz mit einer Lösung von 235 mg (0.2 mmol, 2 Äquiv.) *Fmoc*-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOBn-(2 \rightarrow 6)- α Ac₂GalNAc)-OH **29**, 97.5 mg (0.25 mmol, 2.5 Äquiv.) HATU, 33 mg (0.25 mmol, 2.5 Äquiv.) HOAt und 54.6 μ l (5 mmol, 5 Äquiv.) NMM in 2 ml NMP versetzt und 4 h stark geschüttelt (30 sec Vortex, 30 sec Stillstand). Danach wird abfiltriert, mit NMP und abschließend mit Dichlormethan gewaschen. Die Waschrückstände werden gesammelt, um nicht umgesetztes Disaccharid zurückzugewinnwn. Evtl. verbliebene freie Aminogruppen werden mit Capping-Reagenz acetyliert. Die Kupplungen der beiden darauffolgenden Aminosäuren L-Valin und Glycin erfolgen in einer Doppelkupplung. Die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppen wird durch 3 x 2.5 min Behandlung des Harzes mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in NMP erreicht, und das entstehende freie Amin wird mit Capping-Reagenz acetyliert. Es wird mit NMP und anschließend mit Dichlormethan intensiv gewaschen. Das Harz wird aus dem Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers entnommen und in einen *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt, worin es dreimal mit jeweils 20 ml Dichlormethan gewaschen wird. Der polymere Träger wird mit einer Mischung aus 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml Wasser versetzt und 1.5 h bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend wird die überstehende

Lösung abfiltriert und das Harz noch zweimal mit jeweils 10 ml TFA gewaschen. Dieser Abspaltvorgang wird mit einer Mischung aus 15 ml Dichlormethan, 15 ml Trifluoressigsäure, 0.9 ml Triisopropylsilan und 0.9 ml Wasser wiederholt. Die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen werden i. Vak. konzentriert und anschließend viermal mit jeweils 15 ml Toluol i. Vak. kodestilliert. Das Produkt wird durch Zugabe von 10 ml eiskühlem (0 °C) Diethylether ausgefällt, zentrifugiert und dreimal mit je 15 ml Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt wird durch präparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad. (25:75)→(75:25), 25 min, 40 ml/min, $\lambda = 212$ nm, $R_t = 16.2$ min) gereinigt.

Ausbeute: 252 mg (58 %), farbloses Lyophilisat.

$C_{193}H_{296}N_{44}O_{70}$ [4350.10] (4352.67)

ESI-MS (positiv), m/z: 1451.8 ($[M(3*^{13}C)+3H]^{3+}$; ber.: 1451.7), 1451.5 ($[M(2*^{13}C)+3H]^{3+}$; ber.: 1451.4), 1451.0 ($[M(1*^{13}C)+3H]^{3+}$; ber.: 1451.0).

***N*-Acetyl-L-arginyl-L-seryl-L-isoleucyl-L-arginyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonsäure)- 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
(Ac-Arg-Ser-Ile-Arg-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val-NH(CH₂CH₂O)₃-CH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(α NeuNAcCOOH-(2→6)- α GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH) (127)**

1. Hydrierung: (Ac-Arg-Ser-Ile-Arg-Ser-Thr-Lys-Ile-Tyr-Ser-Tyr-Phe-Pro-Ser-Val-NH-(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Gly-Val-Thr(α Ac₄NeuNAcCOOH-(2→6)- α Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)

Eine Lösung von 112 mg (0.026 mmol) in 15 ml Methanol wird durch wiederholtes Anlegen eines Wasserstrahlvakuums und Belüften mit Argon von Sauerstoff befreit. Es werden zwei Spatelspitzen Pd/C (10%) zugegeben. Der Dreihalskolben wird fünfmal durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums evakuiert und anschließend mit Wasserstoff geflutet. Es wird 60 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wird über *Hyflo Super Cel* filtriert und der Filtrationsrückstand dreimal mit jeweils 25 ml Methanol gespült. Das Filtrat und die Waschlösungen werden vereinigt, und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt ist hinreichend rein (analyt. HPLC) und

wird ohne zusätzliche Aufarbeitung für die folgenden Deblockierungsschritte eingesetzt. (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad. (10:90)→(100:0), 40 min, $\lambda = 212$ nm, $R_t = 13.2$ min).

2. *Deacetylierung*: Die Lösung des debezylierten Glycopeptids in 40 ml Wasser wird tropfenweise mit einer 1 N NaOH-Lösung versetzt bis ein pH-Wert von 9 erreicht ist. Es wird 48 h bei Raumtemp. gerührt (Reaktionkontrolle mittels analytischer HPLC, Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad. (10:90)→(100:0), 40 min, $\lambda = 212$ nm, $R_t = 11.3$ min) und anschließend mit einem Tropfen Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert und der resultierende farblose Feststoff durch präparative HPLC (Phenomenex Luna C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Grad. (10:90)→(100:0), 80 min, $\lambda = 212$ nm, $R_t = 35.6$ min) gereinigt.

Ausbeute: 45 mg (44 % über zwei Stufen); farbloses Lyophilisat; $[\alpha]_D^{22} = -83.5$ (c = 0.7, H₂O).

C₁₇₄H₂₇₈N₄₄O₆₄ [4007.99] (4010.33)

400 MHz-¹H-NMR [COSY, TOCSY, HSQC] (DMSO-d₆): δ [ppm] 8.43 (d, ³J_{NH,H α} = 7.6 Hz, 1H, F(12)^{NH}), 8.31-8.25 (m, 2H, G^{NH} {8.29}, D(23)^{NH} {8.30}), 8.25-7.79 (m, 20H, 1*G^{NH} {8.21}, 2*A^{NH} {8.17}, K(7)^{NH} {8.13}, Linker^{NH} {8.09}, 2*T^{NH} {8.02}, I(3)^{NH} {8.02}, A^{NH} {8.00}, Y^{NH} {7.96}, V^{NH} {7.89}, 6*S^{NH} {7.86}, T^{NH} {7.84}, Y^{NH} {7.84}, I(8)^{NH} {7.81}, T^{NH} {7.80}), 7.79-7.70 (m, 5H, K(7)^{NH2} {7.74}, 3*R ^{δ NH} {7.74}), 7.69-7.55 (m, 5H, V^{NH} {7.68}, 4*P^{NH} {7.63}), 7.45-7.00 (m, 14H, 9*NH-R, 3*NHAc, 2*OH), 7.34-7.25 (m, 5H, F-H_{arom.}), 7.01 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, o-H), 6.95 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, o-H), 6.63 (d, ³J = 8.2 Hz, 4H, m-H), 5.23-5.05 (m, 5H, 4*S(OH)), 5.00-4.90 (sb, 3H, 3*T(OH)), 4.86-4.73 (m, 3H, H1 {4.79}, 2*S(OH)), 4.72-4.62 (m, 2H, F ^{α} {4.68}, -OH), 4.60-4.12 (m, 29H, D(23) ^{α} {4.58}, A ^{α} {4.51}, 2*V ^{α} {4.47}, 2*Y ^{α} {4.46}, T(19)^{* α} {4.48}, 4*P ^{α} {4.47, 4.34}, 6*S ^{α} {4.39, 4.32, 4.26}, 3*R ^{α} {4.39}, 3*T ^{α} {4.39, 4.33, 4.26}, K(7) ^{α} {4.36}, 2*A ^{α} {4.23}, T(19)^{* β} {4.20}, I(3) ^{α} {4.27}, I(8) ^{α} {4.17}), 4.12-4.04 (m, 2H, 2*T ^{β} {4.09}), 4.02-3.95 (m, 2H, H2 {3.99}, T ^{β} {4.00}), 3.89-3.72 (m, 6H, 2*G ^{α} {3.75}, H9a' {3.77}, H4' {3.89}), 3.71-3.49 (m, 31H (teilweise unter H₂O-Signal), 2*Y(OH), H6' {3.67}, H9b' {3.53}, H6a {3.65}, H3 {3.65}, 3-CH₂ {3.64}, H5 {3.59}, 5-, 6-, 8-, 9-CH₂ {3.57}, 3*P ^{δ} {3.55}, H7' {3.54}, 11-CH₂ {3.54}, 12-CH₂ {3.54}, H5' {3.51}, H6b {3.43}, P ^{δ} {3.43}, H8' {3.43}, H4 {3.38}), 3.18-3.07 (m, 6H, 3*R ^{δ} {3.12}), 3.07-2.98 (m, 1H, F(12) ^{β b}), 2.94-2.81 (m, 3H, 2*Y ^{β b} {2.89}, F(12) ^{β a} {2.84}), 2.81-2.73 (m, 3H, D(23) ^{β a} {2.77}, K(7) ^{ϵ} {2.77}), 2.73-2.63 (m, 2H, 2*Y ^{β a} {2.71}), 2.61-2.50 (m, 2H (teilweise unter DMSO-Signal), D(23) ^{β a} {2.58}, H3'eq. {2.54}), 2.42 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, 2-CH₂-Linker), 2.13-1.97 (m, 6H, 4*P ^{β b} {2.06}, 2*V ^{β} {2.03}), 1.95-1.80 (m, 17H, 3*CH₃CO- {1.92, 1.89}, 4*P ^{γ} {1.90}), 1.79-1.64 (m, 5H, 2*R ^{β b} {1.74}, I(3) ^{β} {1.73}, I(8) ^{β} {1.69}, K(7) ^{δ} {1.67}), 1.64-1.46 (m, 13H, 4*P ^{β a} {1.57},

$K(7)^{\beta}$ {1.55}, 2^*R^{γ} {1.53}, $K(7)^{\delta a}$ {1.51}, $H3^{ax}$ {1.53}, $2^*R^{\beta a}$ {1.56}), 1.46-1.42 (m, 1H, $I(3)^{\gamma b}$ {1.45}), 1.34-1.28 (m, 3H, $I(8)^{\gamma b}$ {1.33}, $K(7)^{\gamma}$ {1.31}) 1.30 (d, $^3J_{A\beta, A\alpha} = 7.2$ Hz, 3H, A^{β}), 1.23 (d, $^3J_{A\beta, A\alpha} = 6.8$ Hz, 6H, 2^*A^{β}) 1.16 (d, $^3J_{T\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, 3H, $T(19)^{* \gamma}$), 1.15-1.12 ($I(3)^{\gamma a}$ {1.13}), 1.11-1.01 (m, 10H, 3^*T^{γ} , $I(8)^{\gamma a}$ {1.02}), 0.95-0.81 (m, 18H, $I(3)^{\delta}$ {0.85}, $I(3)^{CH_3\gamma}$ {0.86}, V^a {0.87}, V^b {0.92}), 0.8-0.71 (m, 6H, $I(8)^{\delta}$ {0.78}, $I(8)^{CH_3\gamma}$ {0.75}).

100.6 MHz- ^{13}C -NMR [chemische Verschiebung aus ^{13}C -HSQC entnommen] (DMSO- d_6): δ [ppm] 131.1, 131.2 (C2, C6, arom. Y), 130.3, 129.2, 127.3 ($C_{arom.}$ F), 115.5 (C3, C5 arom. Y), 99.7 (C1), 76.4 ($T(19)^{* \beta}$), 74.4 (C4), 72.2 (C3), 71.5 (C7'), 70.8 (C4'), 70.8 (11-CH₂), 69.5 (C6'), 67.9 (3-CH₂), 67.5 (C5), 67.3 (3^*T^{β}), 65.5 (C8'), 64.8 (C9'), 64.0 (C6), 62.6 (3-, 5-, 6-, 8-, 9-CH₂, 6^*S^{β}), 60.3 (4^*P^{α}), 59.9 (3^*T^{α}), 58.2 (2^*V^{α}), 58.2 (T^{α}), 57.4 (2^*I^{α}), 55.9 (6^*S^{α}), 55.2 (A^{α}), 55.0 (2^*A^{α}), 54.6 ($K(7)^{\alpha}$), 53.2 ($C5^{ax}$), 53.0 (3^*R^{α}), 52.8 (F^{α}), 52.6 (D^{α}), 52.2 (2^*Y^{α}), 47.2 (4^*P^{δ}), 47.5 (12-CH₂), 42.8 (2^*G^{α}), 41.5 (C3'), 41.2 (3^*R^{ϵ}), 39.6 ($K(7)^{\epsilon}$), 37.7 ($F(12)^{\beta}$), 37.6 (2^*Y^{β}), 37.5 (2^*I^{β}), 36.8 (2-CH₂-Linker), 36.6 (2^*I^{β}), 36.5 (D^{β}), 32.1 ($K(7)^{\delta}$), 31.8 (2^*V^{β}), 30.0 (4^*P^{β}), 29.7 (2^*R^{β}), 27.6 ($K(7)^{\beta}$), 25.9 (2^*R^{γ}), 25.4 (4^*P^{γ} , $I(3)^{\gamma}$), 24.9 ($I(8)^{\gamma}$), 23.7 (3^*CH_3CO-), 23.2 ($K(7)^{\gamma}$), 20.3 (3^*T^{γ}), 19.9 (T^{γ}), 19.4 ($T(19)^{* \gamma}$), 18.5 (2^*V^{γ}), 18.2 (A^{β}), 17.5 (2^*A^{β}), 16.5 ($I(3)^{CH_3\gamma}$), 16.2 ($I(8)^{CH_3\gamma}$), 12.0 ($I(8)^{\delta}$, $I(3)^{\delta}$).

HR-ESI-TOF-MS (positiv), m/z: 2025.60 ($[M(3^*^{13}C)+2H]^{2+}$; ber.: 2025.50), 2025.05 ($[M(2^*^{13}C)+2H]^{2+}$; ber.: 2025.00), 2024.61 ($[M(1^*^{13}C)+2H]^{2+}$; ber.: 2024.50), 1350.73 ($[M(3^*^{13}C)+3H]^{3+}$; ber.: 1350.67), 1350.40 ($[M(2^*^{13}C)+3H]^{3+}$; ber.: 1350.34), 1350.06 ($[M(1^*^{13}C)+3H]^{3+}$; ber.: 1350.00), 1013.30 ($[M(3^*^{13}C)+4H]^{4+}$; ber.: 1013.26), 1013.05 ($[M(2^*^{13}C)+4H]^{4+}$; ber.: 1013.00), 1012.80 ($[M(1^*^{13}C)+4H]^{4+}$; ber.: 1012.75).

6 Literaturverzeichnis

- ¹ P. Sears, C.-H. Wong, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 223
- ² A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97
- ³ T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532
- ⁴ N. Sharon, H. Lis, *Essays Biochem.* **1995**, *30*, 59
- ⁵ W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441
- ⁶ P. M. Rudd, T. Elliot, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370
- ⁷ A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2357
- ⁸ R. A. Laine, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759
- ⁹ M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281
- ¹⁰ R. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 799
- ¹¹ R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149
- ¹² P. Sears, C.-H. Wong, *Science* **2001**, *291*, 2344
- ¹³ B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ, *Carbohydrates in Chemistry and Biology* WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2000**
- ¹⁴ J. M. Fréchet, C. J. Schuerch, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 492
- ¹⁵ J. Rademann, A. Geyer, R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1241
- ¹⁶ E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, *3*, 3
- ¹⁷ J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem* **1997**, *62*, 3650
- ¹⁸ H. Shimizu, Y. Ito, O. Kanie, T. Ogawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2841
- ¹⁹ P. H. Seeberger, W.-C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *24*, 799
- ²⁰ W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957
- ²¹ H. Paulson, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184
- ²² R. R. Schmidt, W. Kinzey, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21
- ²³ R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, *274*, 1520
- ²⁴ T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6123
- ²⁵ S. Hashimoto, T. Honda, S. Ikegami, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1989**, *11*, 685
- ²⁶ R. J. Ferrier, R. W. Hay, N. Vethaviasar, *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 55
- ²⁷ S. J. Danishefski, K. F. McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, *260*, 1307
- ²⁸ R. U. Lemieux, K. B. Hendrix, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056
- ²⁹ S. H. Khan, R. A. O'Neil, *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis* **1996**, Harwood Academics, Amsterdam
- ³⁰ (a) G. Hummel, O. Hindsgaul, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1782, (b) B. Yan, H. Yan, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 78
- ³¹ O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1253
- ³² J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200
- ³³ S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882

- ³⁴ J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, I. M. Belyakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, J. C. Morris, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1515
- ³⁵ I. Espinoza-Delgado, *Oncologist* **2002**, *7*(3), 20
- ³⁶ E. Jager, D. Jager, A. Knuth, *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 817
- ³⁷ P. Moingeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305
- ³⁸ Eine regelmässig aktualisierte Liste identifizierter, tumorassoziierter Antigen findet sich auf der Homepage des Istituto Nazionale Tumori unter "www.istitutotumori.mi.it"
- ³⁹ T. Renno, S. Lebecque, N. Renard, S. Saeland, A. Vicari, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 1296
- ⁴⁰ M. L. Disis, K. H. Grabstein, P. R. Sleath, M. A. Cheever, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1289
- ⁴¹ I. Brockhausen, *Bba-Gen Subjects* **1999**, *1473*, 67
- ⁴² S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836
- ⁴³ J. R. Gum Jr., *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 795
- ⁴⁴ I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25*, 214
- ⁴⁵ A. P. Singh, S. C. Chauhan, S. Bafna, S. L. Johansson, L. M. Smith, N. Moniaux, M.-F. Lin, S. K. Batra, *Prostate* **2006**, *66*(4), 421
- ⁴⁶ J. Dekker, J. W. A. Rossen, H. A. Buller, A. W. C. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 126
- ⁴⁷ S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. M. Burchell, L. Pemberton, E. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286
- ⁴⁸ F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439
- ⁴⁹ J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 301
- ⁵⁰ J. Hilkens, M. J. Ligtenberg, H. L. Vos, S. V. Litvinov, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 359
- ⁵¹ S. Zotter, P. C. Hageman, A. Lossnitzer, J. van den Tweel, J. Hilkens, W. J. Mooi, J. Hilgers, *Int. J. Cancer* **1988**, *3*, 38
- ⁵² M. J. L. Ligtenberg, F. Buijs, H. L. Vos, J. Hilkens, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2318
- ⁵³ I. Brockhausen, J. M. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607
- ⁵⁴ I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconj. J.* **1998**, *15*, 595
- ⁵⁵ Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. Itzkowitz, T. Tsuda, S. I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1213
- ⁵⁶ F.-G. Hanisch, T. R. E. Stadie, F. Deutzmann, J. Peter-Katalinic, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 318
- ⁵⁷ V. Shankaran, H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Nature* **2001**, *410*, 1107
- ⁵⁸ G. P. Dunn, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 329
- ⁵⁹ L. Zhang et al., *N. Eng. J. Med.* **2003**, *203*, 348
- ⁶⁰ J. Taylor-Papadimitriou, M. Burchell Joy, T. Plunkett, R. Graham, I. Correa, D. Miles, M. Smith, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2002**, *7*, 209
- ⁶¹ F. M. Marincola, E. M. Jaffee, D. J. Hicklin, S. Ferrone, *Adv. Immunol.* **2000**, *74*, 181

- ⁶² V. Groh, J. Wu, C. Yee, T. Spies, *Nature* **2002**, *419*, 734
- ⁶³ D. I. Gabrilovich et al., *Nature Med.* **1996**, *2*, 1096
- ⁶⁴ E. Y. Woo et al., *J. Immunol.* **2002**, *168*, 4272
- ⁶⁵ V. H. Engelhard, T. N. Bullock, T. A. Colella, S. L. Sheasley, D. W. Mullins, *Immunol. Rev.* **2002**, *188*, 136
- ⁶⁶ K. Takeda, T. Kaisho, S. Akira, *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 335
- ⁶⁷ S. E. Street et al., *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 879
- ⁶⁸ D. Jager, C. Taverna, A. Zippelius, A. Knuth, *Cancer Immunol. Immunother.* **2004**, *53*, 144
- ⁶⁹ S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630
- ⁷⁰ M. Wagner, H. Kunz, *Deutsche Patentanmeldung 10116252.9*, **2001**
- ⁷¹ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161
- ⁷² C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246
- ⁷³ J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35
- ⁷⁴ B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 618
- ⁷⁵ B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8777
- ⁷⁶ R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244
- ⁷⁷ J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129
- ⁷⁸ A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976
- ⁷⁹ H. Kunz in *Preparative Carbohydrate Chemistry*; (Ed.: S. Hanessian), Marcel Dekker: New York, **1997**, p 265.
- ⁸⁰ E. Vowinkel, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16
- ⁸¹ E. Schmidt, F. Moosmüller, *Liebigs Ann. Chem.* **1955**, *597(3)*, 235
- ⁸² H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89
- ⁸³ E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 985
- ⁸⁴ G. Zemplen, A. Kuntz, *Chem. Ber.* **1923**, *56*, 1705
- ⁸⁵ S. Wittrock, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz **2006**
- ⁸⁶ A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35
- ⁸⁷ F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C13
- ⁸⁸ V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1702
- ⁸⁹ P. Fugedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, *149*, C9
- ⁹⁰ A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 303
- ⁹¹ P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313
- ⁹² G. H. Veeneman, S. H. Van Leeuwen, J. H. Van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331
- ⁹³ U. Greilich, R. Brescello, K. H. Jung, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 663
- ⁹⁴ H. Loenn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115
- ⁹⁵ R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, 694
- ⁹⁶ I. Braccini, C. Derouet, J. Esnault, C. H. du Penhoat, J. M. Mallet, V. Michon, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 2

- ⁹⁷ H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, *125*, 47
- ⁹⁸ K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5229
- ⁹⁹ K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5233
- ¹⁰⁰ U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4637
- ¹⁰¹ H. van Halbeek, L. Dorland, J. F. G. Vliegthart, R. Pfeil, R. Schauer, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *122*, 305
- ¹⁰² K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 637
- ¹⁰³ R. Christian, G. Schulz, *Carbohydr. Res.* **1987**, *162*, 1
- ¹⁰⁴ M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870
- ¹⁰⁵ M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11
- ¹⁰⁶ S. Keil, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2000**
- ¹⁰⁷ O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813
- ¹⁰⁸ O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901
- ¹⁰⁹ (a) M. Wagner, H. Kunz, *Z. Naturforsch.* **2002**, *57b*, 928 (b) M. Wagner, H. Kunz, *Synlett* **2000**, 400
- ¹¹⁰ W. Bernhard, I. Flemming, *J. Organomet. Chem.* **1984**, *271*, 281
- ¹¹¹ (a) M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 315 (b) M. Wagner, S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 6018.
- ¹¹² (a) J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2615 (b) J. J. Eisch, J. E. Galle, *J. Organomet. Chem.* **1988**, *341*, 293 (c) N. E. Schore, M. C. Croudace, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5356.
- ¹¹³ M. Miyashita, A. Yoshikoshi, P. A. Grieco, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3772
- ¹¹⁴ (a) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213 (b) R. R. Schmidt, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1257 (c) E. Eichler, H. J. Jennings, M. Gilbert, D. M. Whitefield, *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 1
- ¹¹⁵ K. Groh, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2003**
- ¹¹⁶ W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957
- ¹¹⁷ B. Helferich, K. Weiss, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 314
- ¹¹⁸ (a) H. Waldmann, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1985**;
(b) M. Honda, H. Morita, I. Nagakura, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8932
- ¹¹⁹ <http://www.rapp-polymere.com/>
- ¹²⁰ P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.* **1982**, *108*, 97
- ¹²¹ M. P. DeNinno, J. P. Etienne, K. C. Duplatier, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 669
- ¹²² E. Kaiser, R. L. Colecott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595
- ¹²³ B. F. Gisin, *Analytica Chim. Acta.* **1972**, *58*, 248
- ¹²⁴ C. Gioeli, J. B. Chattopadhyaya, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 672
- ¹²⁵ M. Adinolfi, G. Barone, L. Guariniello, A. Iadonisi, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9305
- ¹²⁶ J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 4875.
- ¹²⁷ M. Wagner, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2001**
- ¹²⁸ R. L. Letsinger, M. H. Caruthers, P. S. Miller, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7146

- ¹²⁹ (a) T. Zhu, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2382; (b) K. Routenberg Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 602
- ¹³⁰ G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1331
- ¹³¹ M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5547
- ¹³² H. Paulson, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 289
- ¹³³ F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 31
- ¹³⁴ A. I. Meyen, D. L. Comins, D. M. Roland, R. Henning, K. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7104
- ¹³⁵ T. Oberhauser, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4505
- ¹³⁶ (a) M. Abarbi, J. Thiobonnet, L. Bérillon, F. Dehmel, M. Rottländer, P. Knochel, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4618; (b) A. Inoue, K. Kitagawa, H. Shinokubo, K. Oshima, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4333
- ¹³⁷ H. Shimizu, Y. Ito, O. Kanie, T. Ogawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2841
- ¹³⁸ (a) J. Rademann, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3989 (b) J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3650
- ¹³⁹ M. Ono, H. Miyake, T. Saiko, A. Kaji, *Synthesis* **1980**, 952
- ¹⁴⁰ H. Kunz, M. Schultz, in *Glycopeptides and Related Compounds* (Eds.: D. G. Large, C. D. Warren), M. Dekker, Inc., New York, **1997**
- ¹⁴¹ J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X.-T. Chen, D. Sames, P. W. Glunz, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2662
- ¹⁴² R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951
- ¹⁴³ S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328
- ¹⁴⁴ M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4005
- ¹⁴⁵ M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 317
- ¹⁴⁶ O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 803
- ¹⁴⁷ W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295
- ¹⁴⁸ D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 610
- ¹⁴⁹ M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192
- ¹⁵⁰ F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4686
- ¹⁵¹ G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180
- ¹⁵² C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246
- ¹⁵³ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748
- ¹⁵⁴ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404
- ¹⁵⁵ B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1939
- ¹⁵⁶ P. Schultheiss-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64
- ¹⁵⁷ D. Kahn et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7529
- ¹⁵⁸ N. Sewald, H. D. Jakubke, *"Peptides: Chemistry and Biology"*, 1. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim **2002**
- ¹⁵⁹ L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268
- ¹⁶⁰ B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219

- ¹⁶¹ 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
- ¹⁶² L. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201
- ¹⁶³ R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927
- ¹⁶⁴ V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269
- ¹⁶⁵ L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441
- ¹⁶⁶ W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788
- ¹⁶⁷ L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397
- ¹⁶⁸ M. Rothe, J. Mazánek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *11*, 293
- ¹⁶⁹ M. Rothe, J. Mazánek, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, *3*, 439
- ¹⁷⁰ Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thornqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9689
- ¹⁷¹ E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1915**, *48*, 93
- ¹⁷² R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353
- ¹⁷³ C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, "Immunologie", 5. Aufl., *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg* **2002**
- ¹⁷⁴ D. C. Parker, *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, *11*, 331
- ¹⁷⁵ R. Medzhitov, P. Preston-Hurburt, C. A. Janeway Jr., *Nature* **1997**, *388*, 394
- ¹⁷⁶ M. Nishiguchi, M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, N. A. Begum, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima, T. Seya, *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2610
- ¹⁷⁷ H. D. Brightbill, D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R.-B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, *Science* **1999**, *285*, 732
- ¹⁷⁸ A. O. Aliprantis, R.-B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, A. Zychlinsky, *Science* **1999**, *285*, 736
- ¹⁷⁹ M. Hirschfeld, C. J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J. H. Weis, R. M. Wooten, J. J. Weis, *J. Immunol.* **1999**, *16*, 2382
- ¹⁸⁰ G. Jung, C. Carrera, H. Brueckner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1608
- ¹⁸¹ J. Metzger, G. Jung, W. G. Bessler, P. Hoffmann, M. Strecker, A. Lieberknecht, U. Schmidt, *J. Med. Chem.* **1991**, *34* (7), 1969
- ¹⁸² F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hamalainen, M. C. Feiters, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7989
- ¹⁸³ C. Petrarca, A. Rughetti, H. Rahimi, F. D'Agostini, V. Turchi, C. Apollonj Ghetti, G. Scambia, L. Frati, M. Nuti, *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 2155
- ¹⁸⁴ T. Becker, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2006**
- ¹⁸⁵ 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
- ¹⁸⁶ D. D. Perrin, E. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals, Vol. 3rd ed.* Pergamon Press, Oxford, **1988**

- ¹⁸⁷ J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis der Organischen Chemie*, VCH, Weinheim, **1996**
- ¹⁸⁸ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923
- ¹⁸⁹ International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry, *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 595
- ¹⁹⁰ F. Shafizadeh, *Methods in carbohydrate Chemistry, Vol 2.*, New York, **1963**, 409
- ¹⁹¹ S. Birnbach, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1985**
- ¹⁹² G. Braum, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1991**.
- ¹⁹³ B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473.
- ¹⁹⁴ S. Dziadek, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2005**.
- ¹⁹⁵ O. Seitz, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**.
- ¹⁹⁶ M. Wagner, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2001**
- ¹⁹⁷ J. Zhang, P. Kovác, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 461
- ¹⁹⁸ S. Sato, Y. Ito, T. Nukada, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 197
- ¹⁹⁹ R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763
- ²⁰⁰ A. Burgard, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **1995**
- ²⁰¹ S. Houdier, P. M. Vottero, *Carbohydr. Res.* **1993**, *248*, 377
- ²⁰² T. Nakagawa, K. Ueno, M. Kashiwa, J. Watanabe, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1921
- ²⁰³ W. A. Boomer, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3372
- ²⁰⁴ P. A. Levene, R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.* **1931**, *90*, 89
- ²⁰⁵ F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 31
- ²⁰⁶ J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3650
- ²⁰⁷ M. J. Amaral, M. A. Macedo, M. I. Oliveira, *J. Chem. Soc. [Perkin. 1]*. **1977**, *2*, 205.
- ²⁰⁸ J. W. Metzger, K. H. Wiesmueller, G. Jung, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 545
- ²⁰⁹ V. Swali, M. Matteucci, R. Eliot, M. Brandley, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9101
- ²¹⁰ F. Reichel, A. M. Roelofsen, H. P. M. Geurts, T. I. Hamalainen, M. C. Feiters, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 798

7 Spektrenanhang

7.1 Übersicht zum Spektrenanhang

7.1.1 ¹H-NMR-Spektrum des ST_N-Derivates (27)

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

7.1.2 ¹H-NMR-Spektrum des ST_N-Bausteins (29)

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

7.1.3 ¹H-NMR-Spektrum des Triethylenglycolspacers (35)

N-(Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure

7.1.4 ¹H-NMR-Spektrum des Bausteins (50)

4-[2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure

7.1.5 ¹H-HR-MAS-NMR-Festkörperspektrum der Verbindung (51)

PTMSEL-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid an Tentagel

7.1.6 ¹H-HR-MAS-NMR-Festkörperspektrum der Verbindung (54)

PTMSEL-2,3-di-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzyliden- β -D-glucopyranosid an Tentagel

7.1.7 ¹H-HR-MAS-NMR-Festkörperspektrum der Verbindung (55)

PTMSEL-2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-glucopyranosid an Tentagel

7.1.8 ¹H-NMR-Spektrum des 4,6-*O*-Benzylidenacetals (64)

Ethyl-4,6-*O*-benzyliden-1-thio- β -D-glucopyranosid

7.1.9 ¹H-NMR-Spektrum des Glycosyldonors (60)

2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-4-*O*-lävulinoyl- α -D-glucopyranosyltrichloracetimidat

7.1.10 ¹H-NMR-Spektrum des Bausteins (69)

4-[2-(2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-4-*O*-lävulinoyl- β -D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure

7.1.11 ¹H-HR-MAS-NMR-Festkörperspektrum der Verbindung (72)

4-[2-(2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure an Tentagel

7.1.12 ¹H-NMR-Spektrum des Trichloracetimidatdonors (79)

2,3-Di-*O*-acetyl-4-*O*-benzyl-6-*O*-lävulinoyl-α-D-glucopyranosyl-trichloracetimidat

7.1.13 ¹H-NMR-Spektrum des Donors (80)

2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-β-D-mannopyranosyl-trichloracetimidat

7.1.14 ¹H-NMR-Spektrum des Anker-gebundenen Mannosebausteins (99)

p-(2-*O*-Acetyl-3,4,6-tri-*O*-benzyl-α-D-mannopyranosyloxymethyl)-phenoxyessigsäureallylester

7.1.15 ¹H-NMR-Spektrum des Anker-gebundenen Glucosebausteins (100)

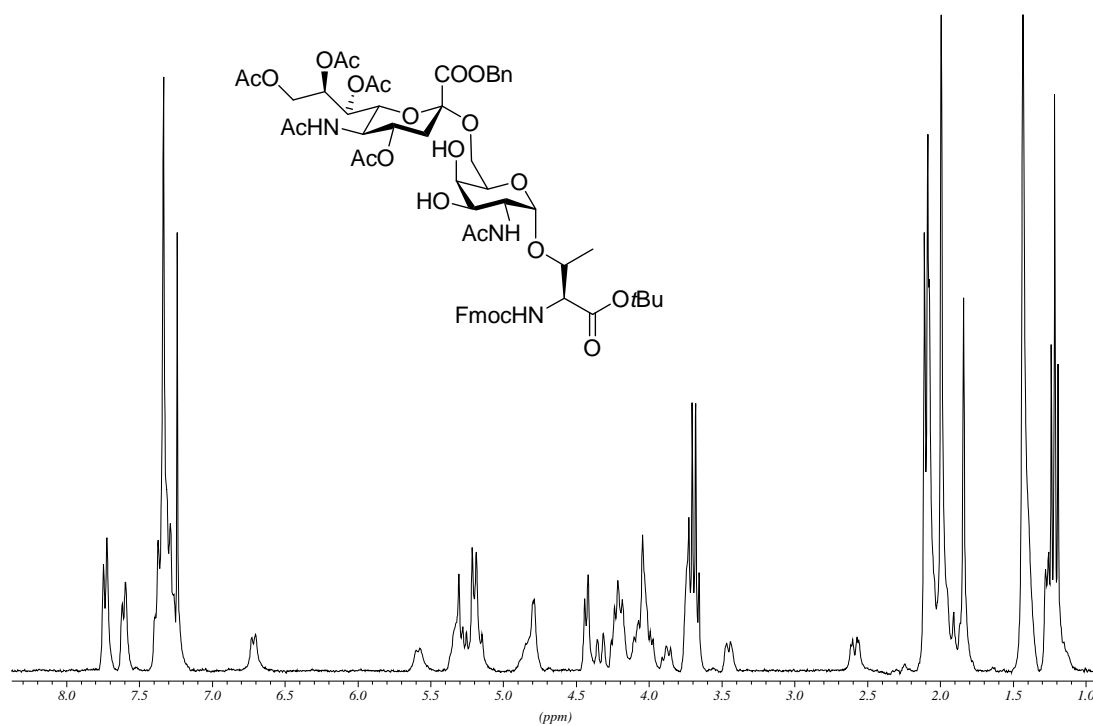
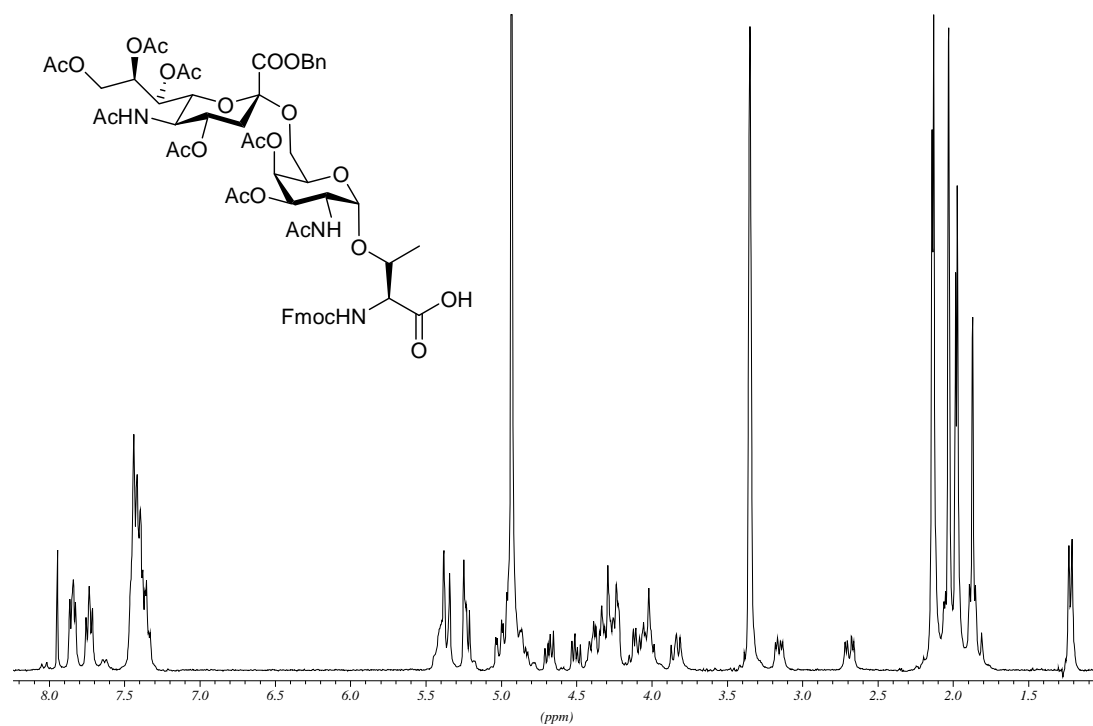
p-(2,3-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-4-*O*-lävulinoyl-β-D-glucopyranosyloxymethyl)-phenoxyessigsäureallylester

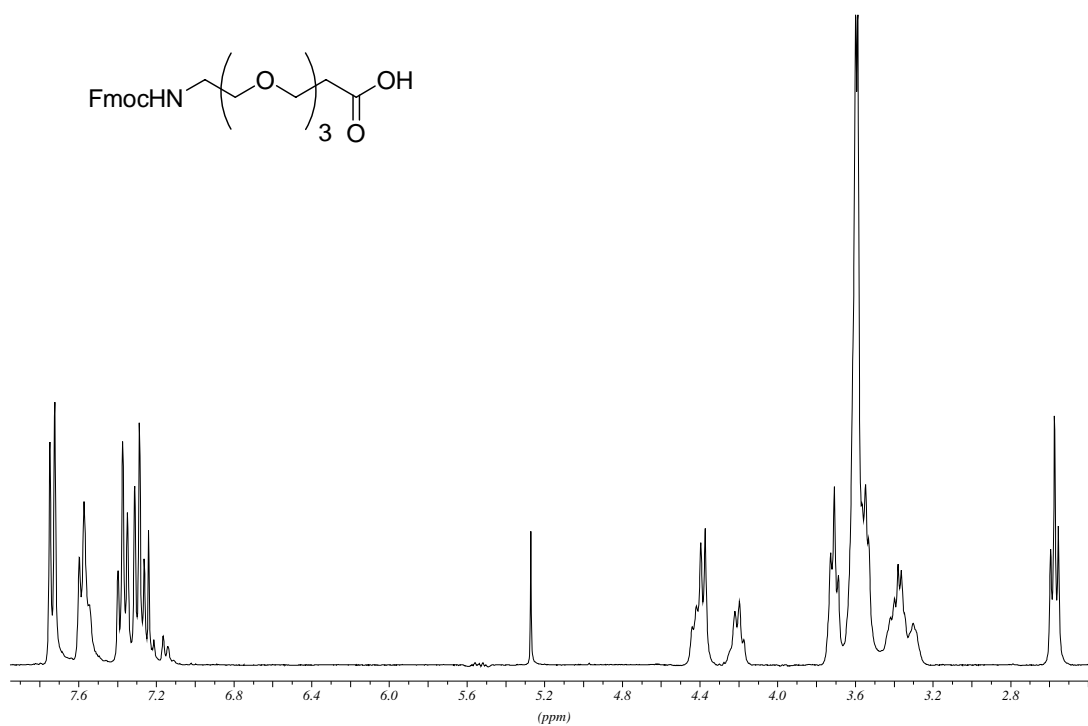
7.1.16 ¹H-NMR-Spektrum des Mitogens Pam₃Cys (122)

N-Palmitoyl-*S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(*R,S*)-propyl]-(*R*)-cystein

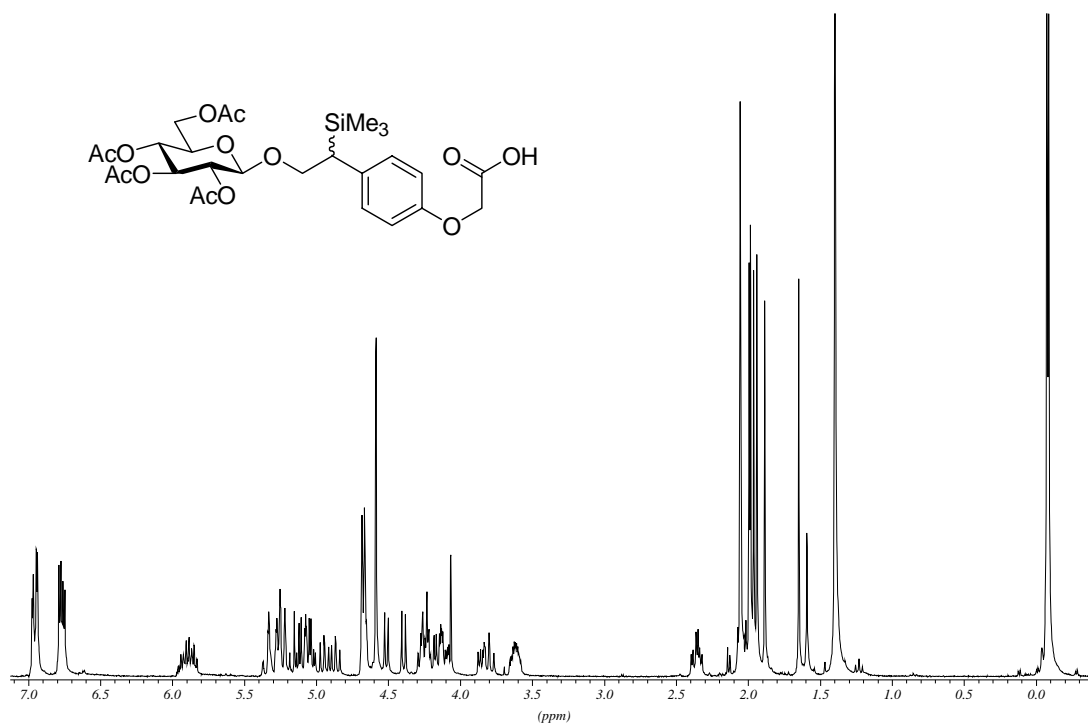
7.1.17 Spektren des Glycopeptides (127)

N-Acetyl-L-arginyl-L-seryl-L-isoleucyl-L-arginyl-L-seryl-L-threonyl-L-lysyl-L-isoleucyl-L-tyrosyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-phenylalanyl-L-prolyl-L-seryl-L-valyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-glycyl-L-valyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulopyranosonsäure)-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

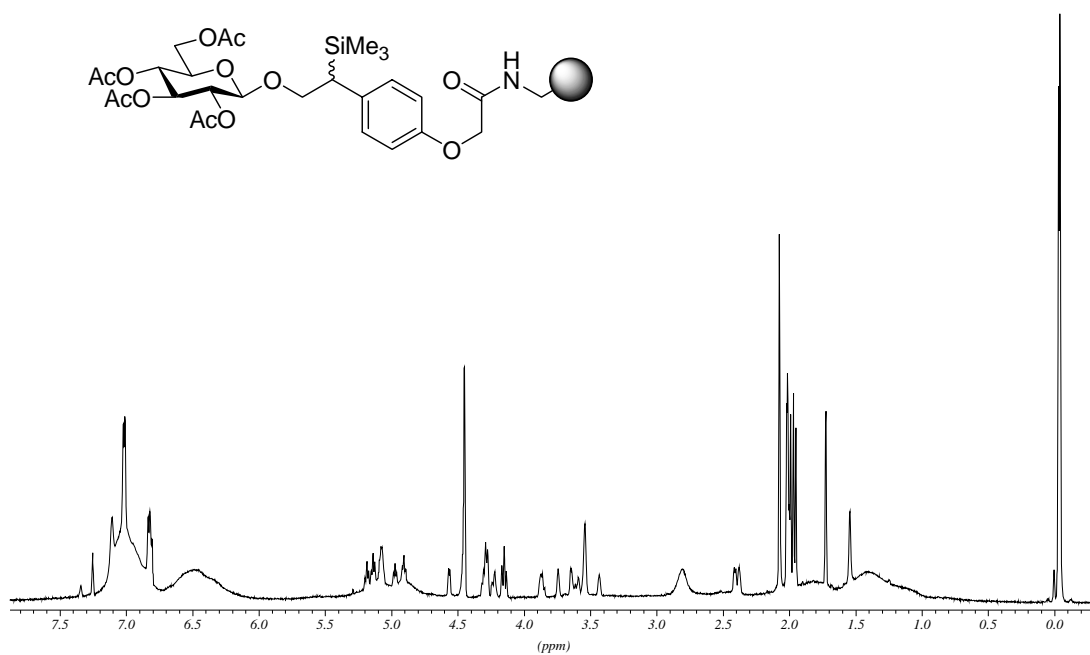
400 MHz- 1H -NMR-Spektrum ($CDCl_3$) des ST_N -Derivates **27**300 MHz- 1H -NMR-Spektrum ($MeOH-d_4$) des ST_N -Bausteins **29**



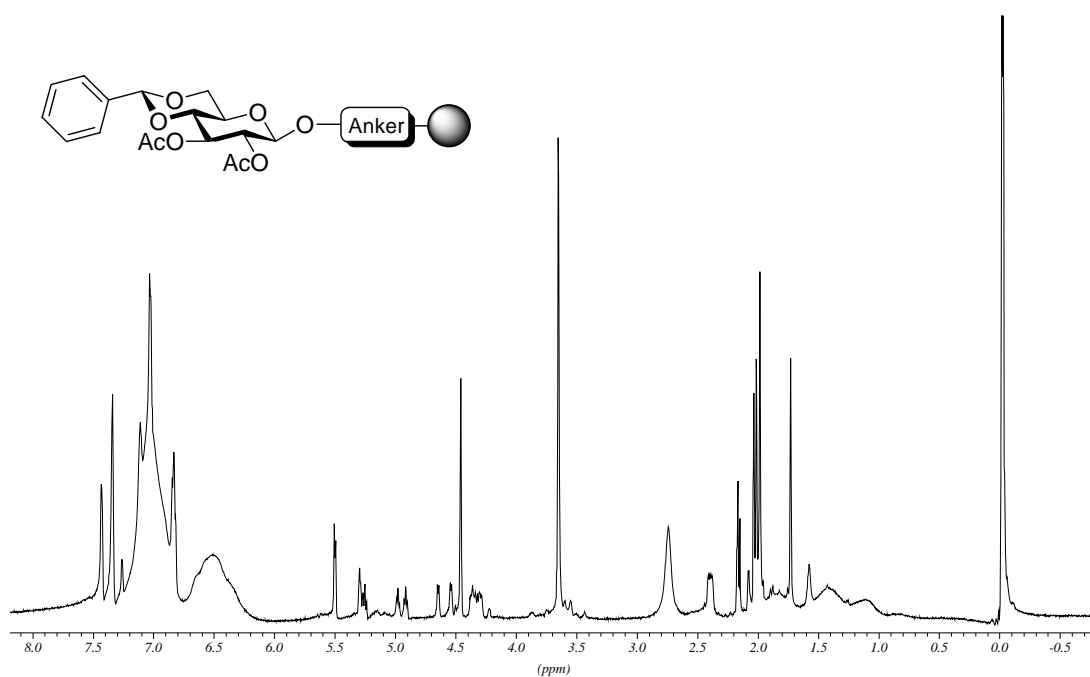
300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des Triethylglycolspacers **35**



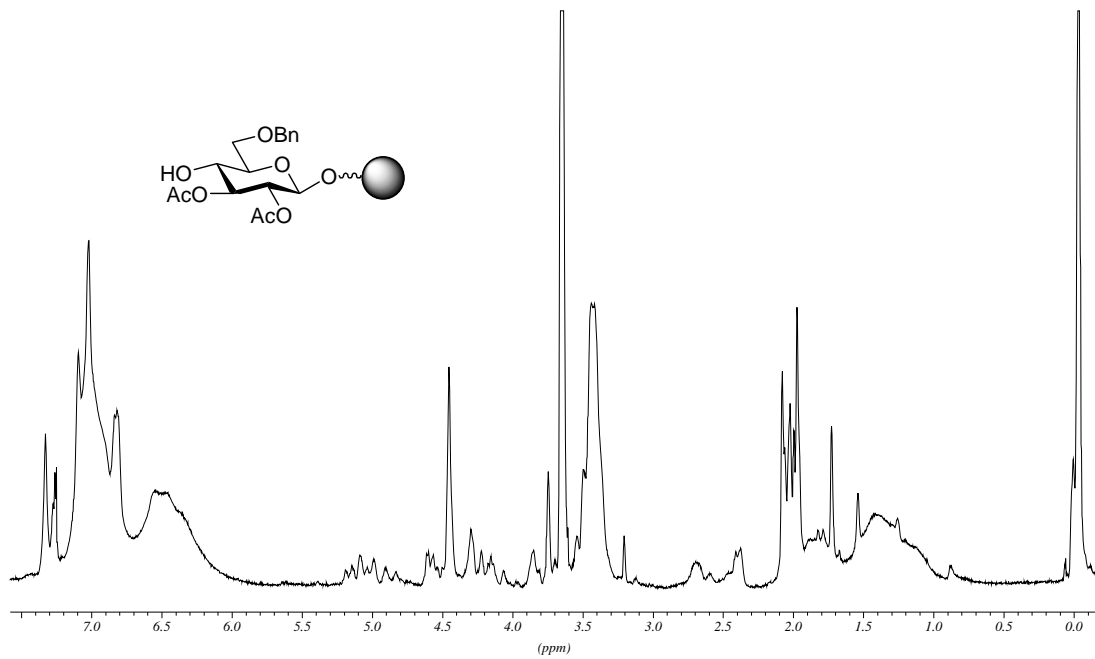
300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des Bausteins **50**



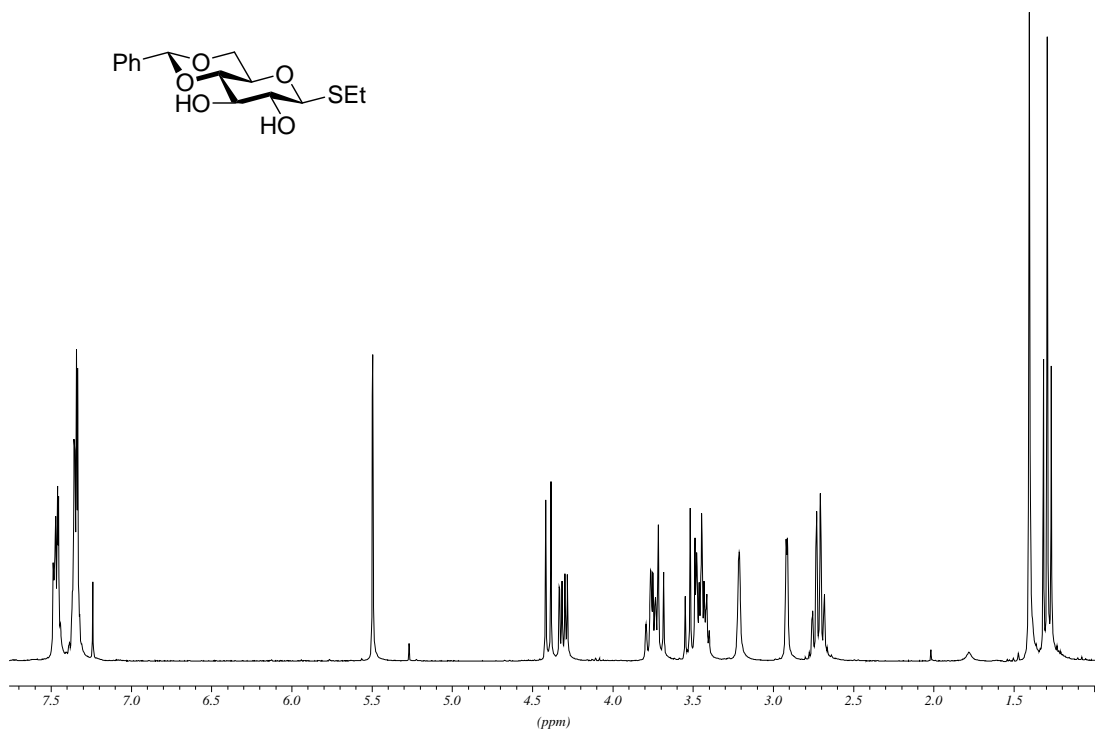
700 MHz- ^1H -HR-MAS-Festkörper-NMR (CDCl₃) der Verbindung **51**



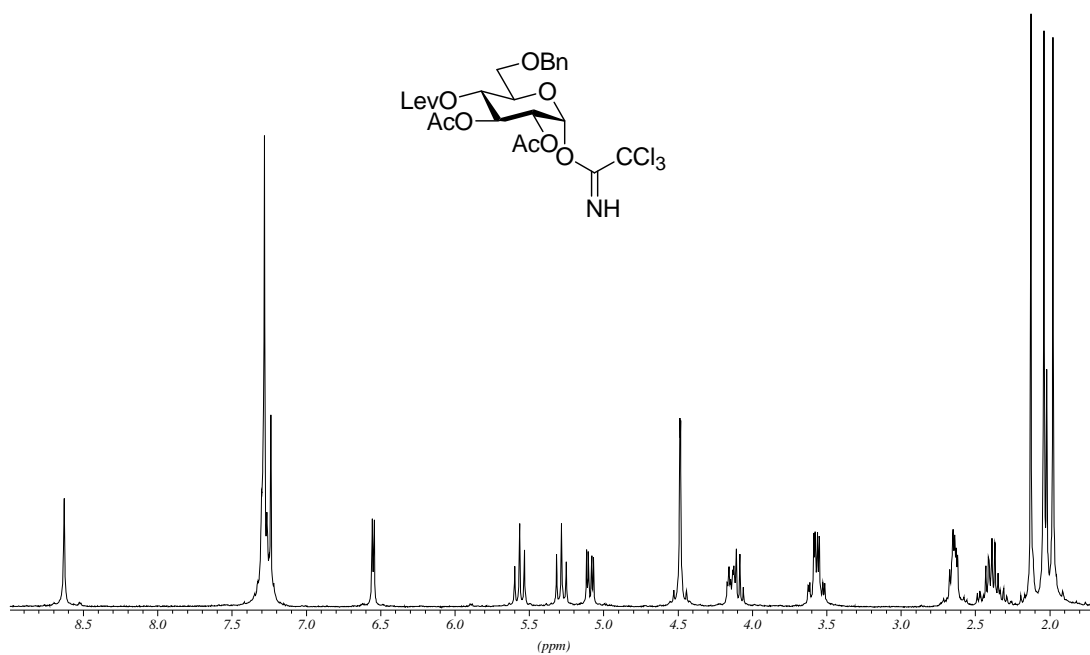
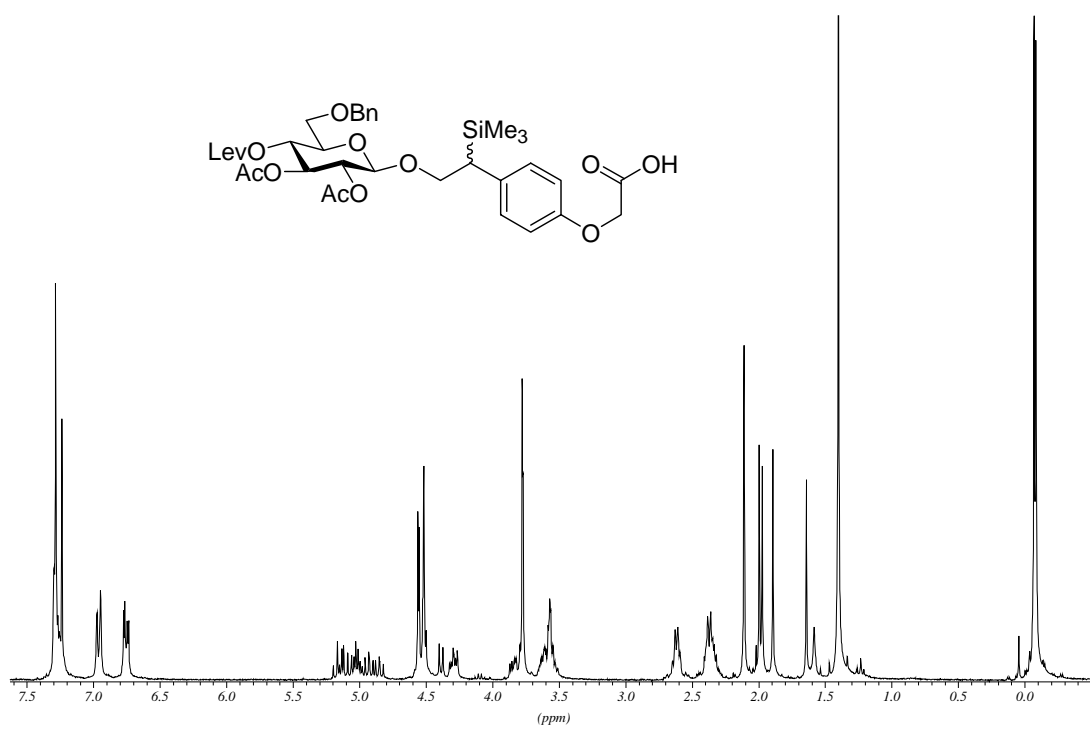
700 MHz- ^1H -HR-MAS-Festkörper-NMR (CDCl₃) der Verbindung **54**

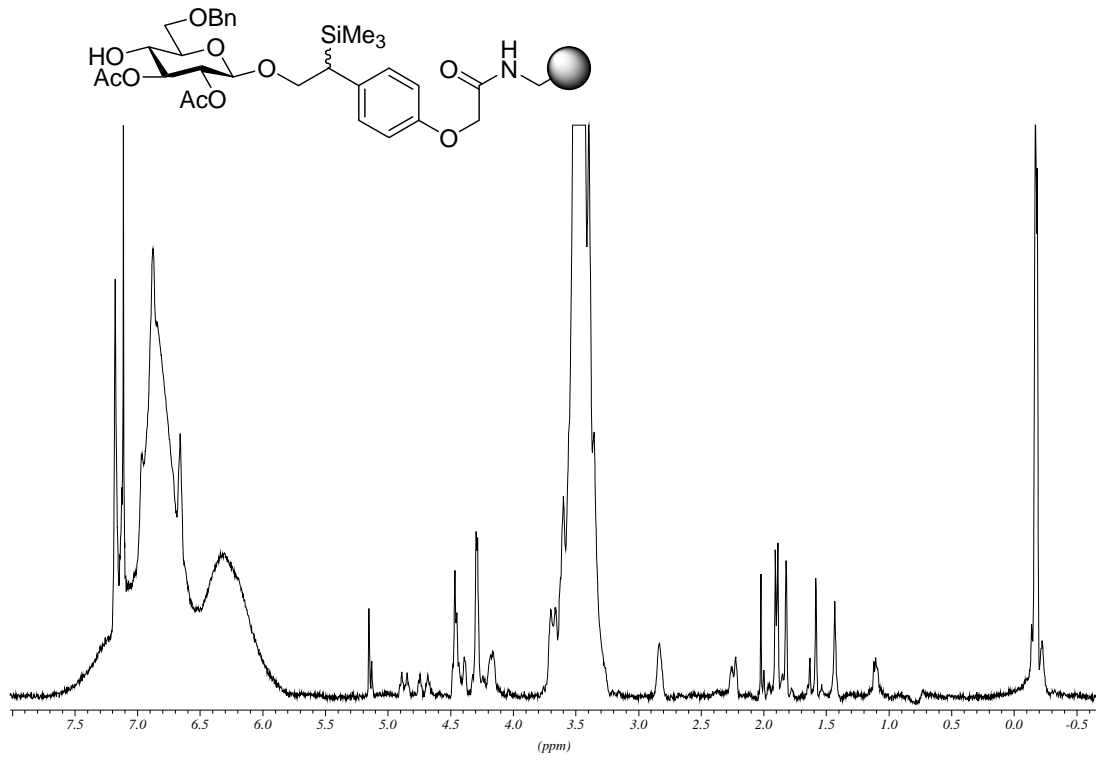


700 MHz-¹H-HR-MAS-Festkörper-NMR (CDCl₃) der Verbindung **55**

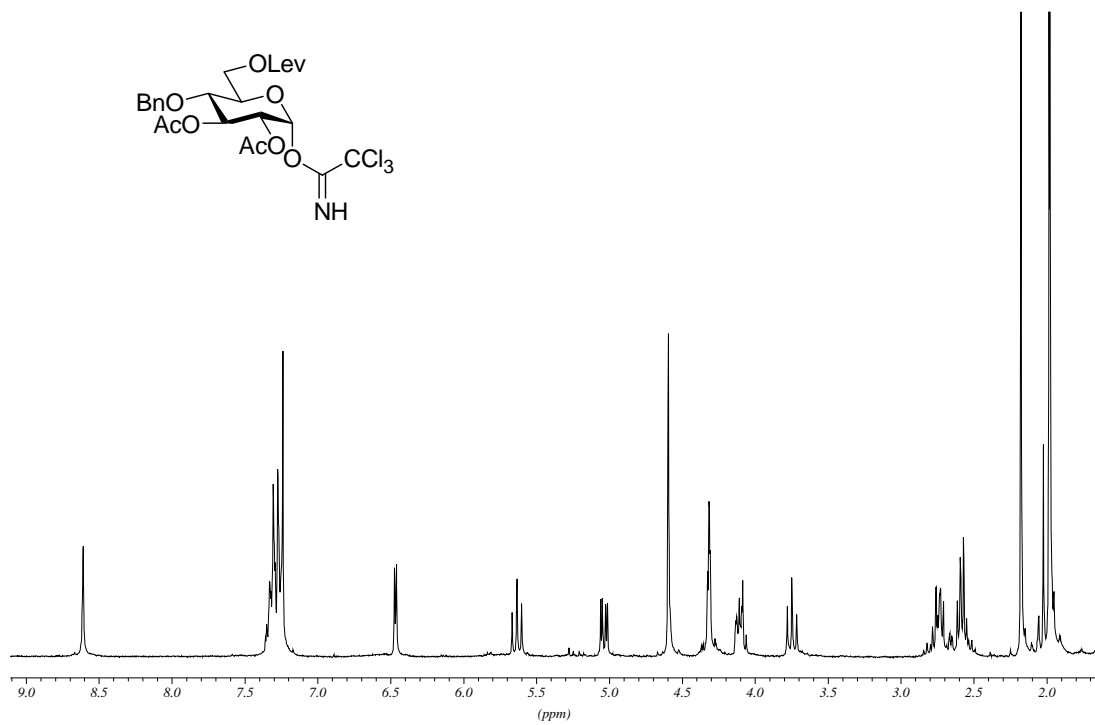


300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des 4,6-*O*-Benzyldenacetals **64**

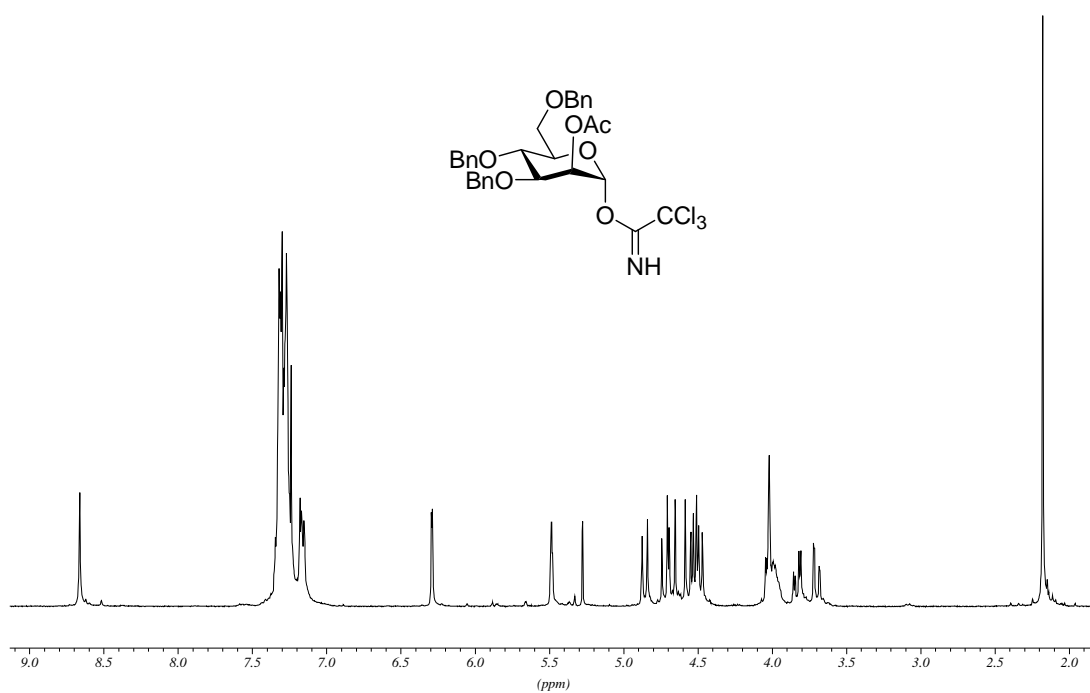
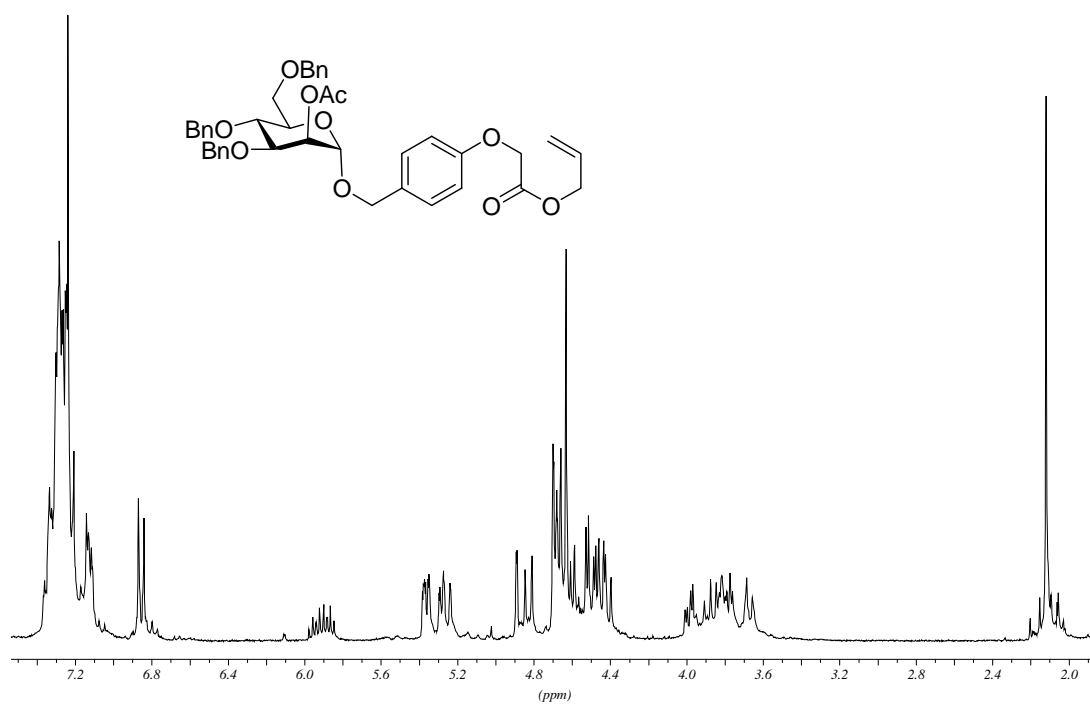
300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des Glycosyldonors **60**300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des Bausteins **69**

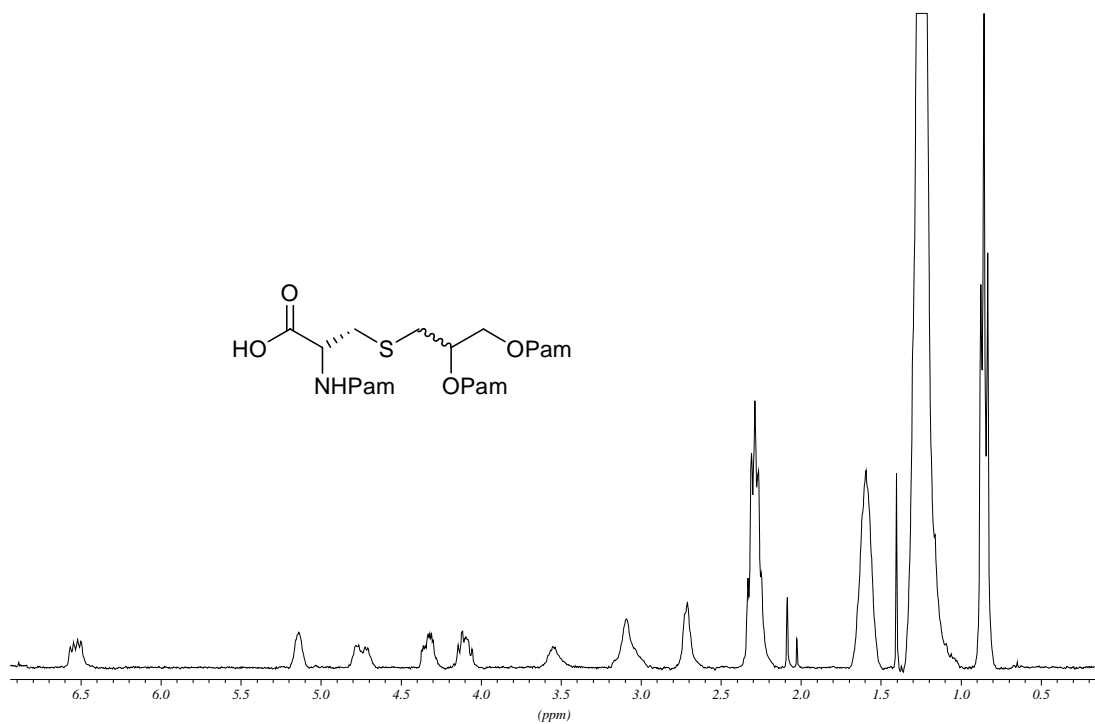
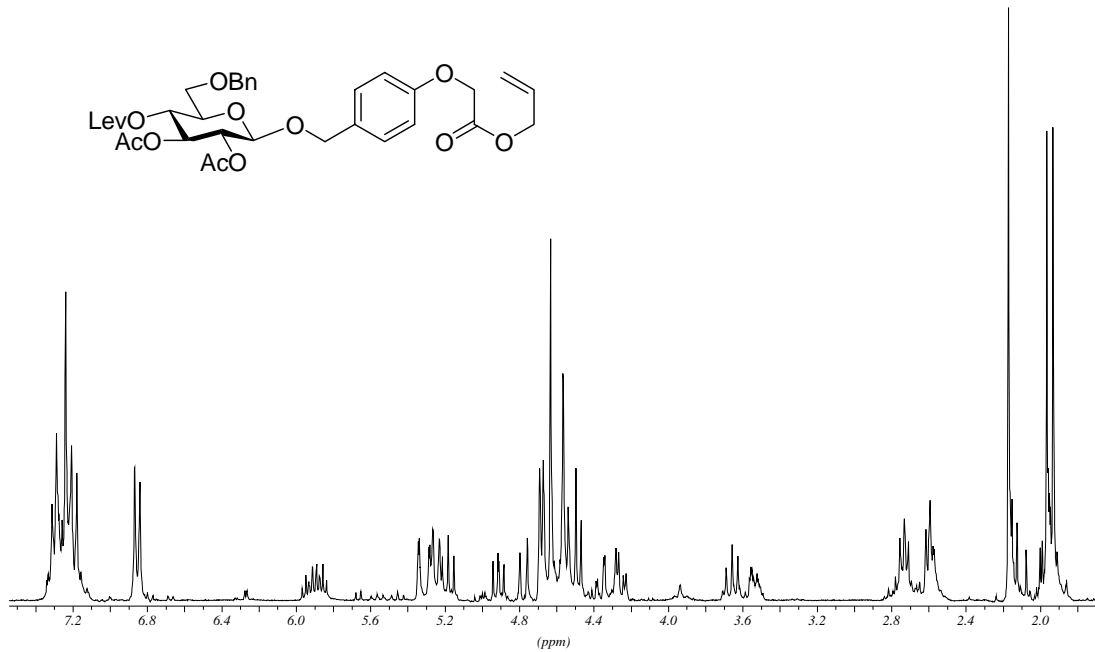


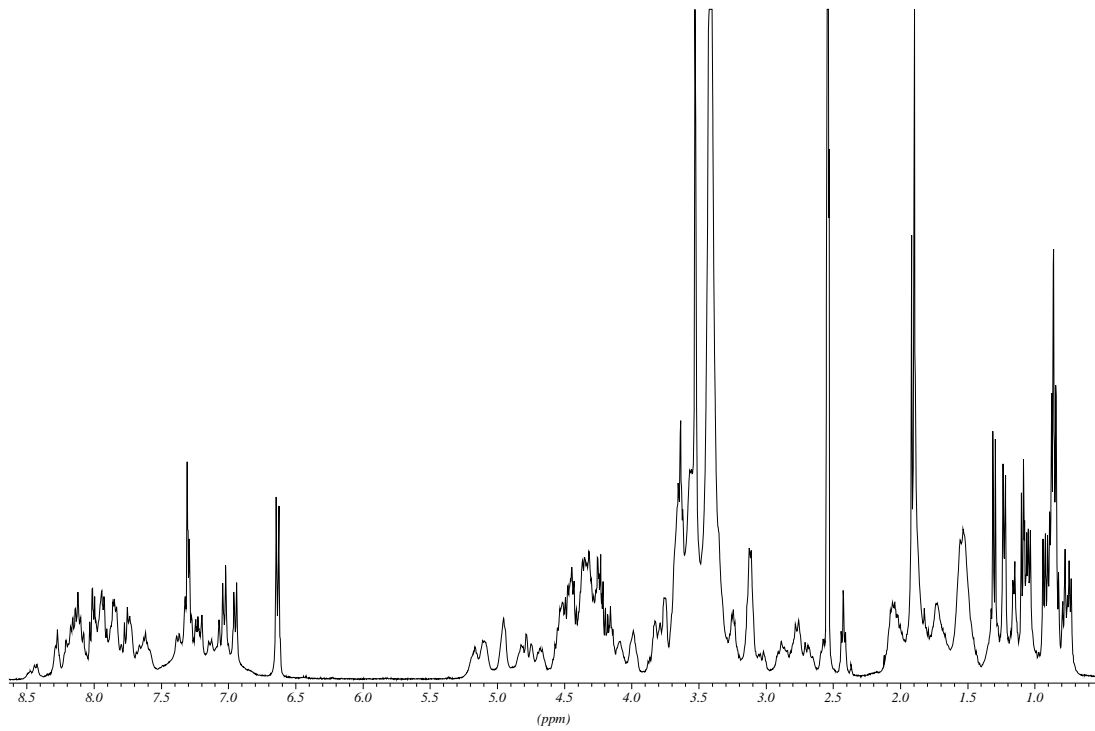
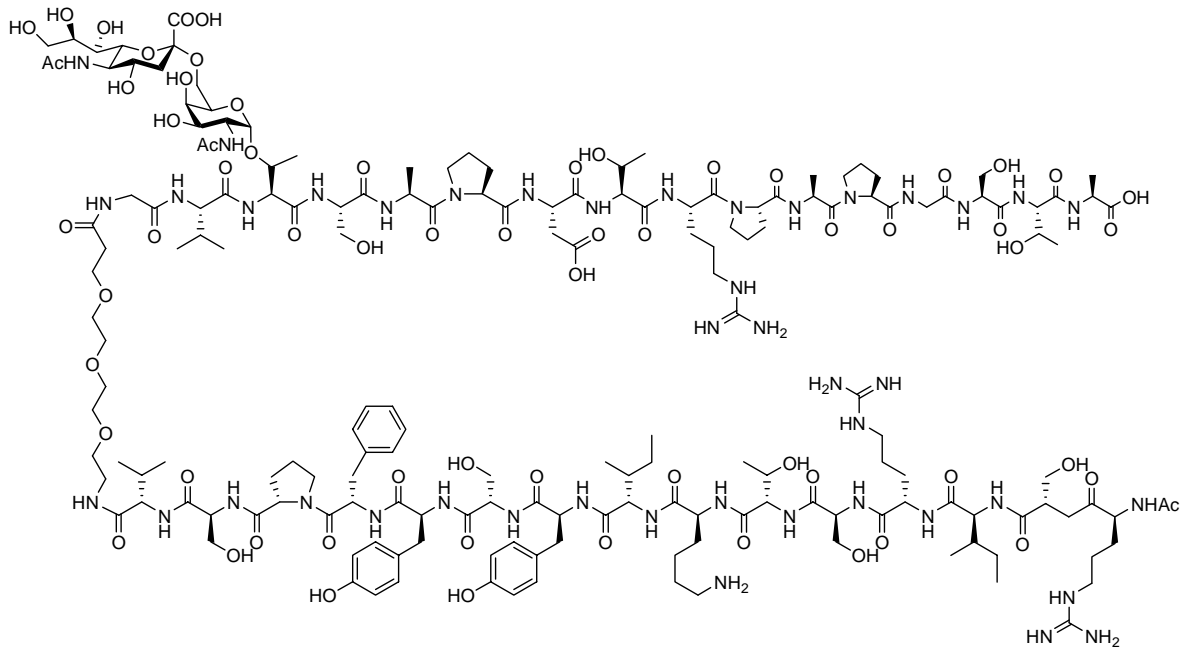
700 MHz-¹H-HR-MAS-NMR-Festkörperspektrum (CDCl₃) der Verbindung **72**

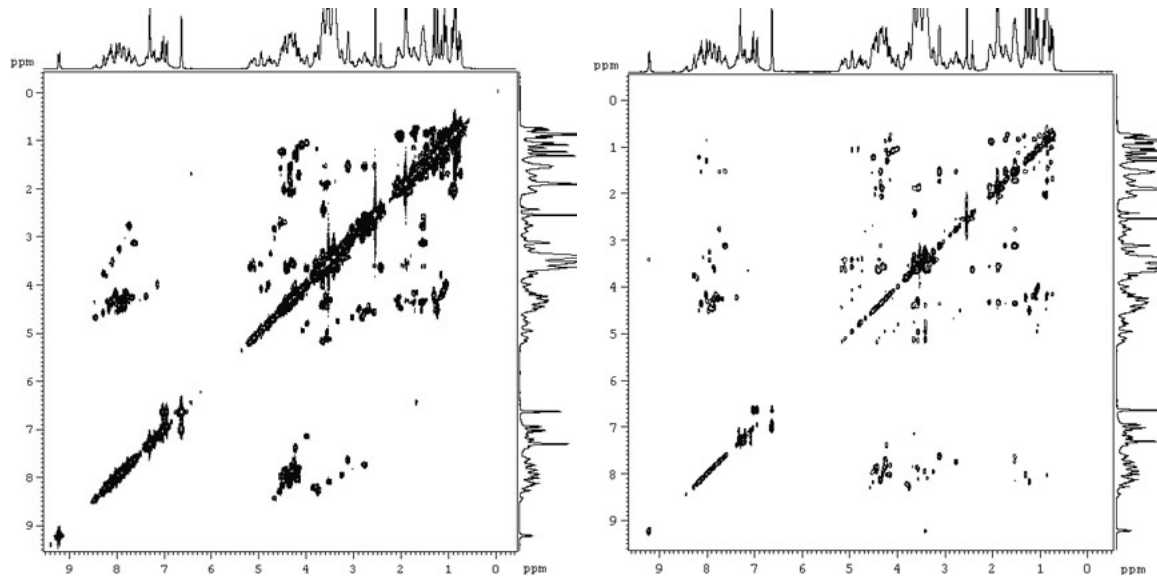


300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des Trichloracetimidatdonors **79**

300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des Donors **80**300 MHz-¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃) des *p*-Alkoxybenzylanker-gebundenen
Mannosebausteins **99**

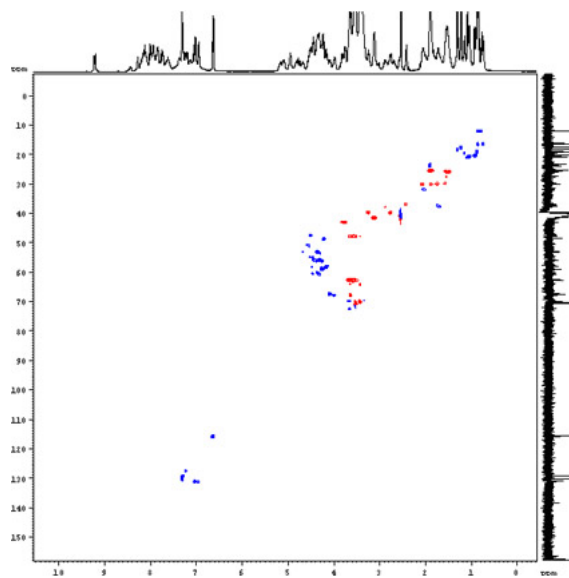


400 MHz-¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆) des Glycopeptides **127**



COSY-Spektrum des Glycopeptides 127

TOCSY-Spektrum des Glycopeptides 127



HSQC-Spektrum des Glycopeptides 127

