

**Glycopeptidliganden von Zelladhäsionsrezeptoren  
mit sulfatierter Arabino-Lewis<sup>a</sup>-Struktur**

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

Alexander Rösch  
geboren in Worms

Mainz, im Juni 2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
1.1 Zelladhäsion	1
1.2 Adhäsionsmoleküle	2
1.2.1 Integrine	3
1.2.2 Selektine	4
1.3 Strukturelle Studien der Selektin-Liganden Sialyl-Lewis <sup>a/x</sup>	10
1.4 Pathologische Expression	13
<b>2 Zielsetzung</b>	14
<b>3 Allgemeiner Teil</b>	17
3.1 Synthese der Monosaccharidbausteine	17
3.1.1 Synthese des N-Acetylglucosaminbausteins	18
3.1.2 Synthese des Galactosebausteins	18
3.1.3 Synthese des Arabinosbausteins	21
3.1.4 Synthese der Neuraminsäuredonoren	22
3.2 Synthese des Disaccharids	24
3.3 Synthese des Trisaccharids Lewis <sup>a</sup>	27
3.4 Synthese des Tetrasaccharids Arabino-Sialyl-Lewis <sup>a</sup>	29
3.5 Synthese von Arabino-3'-Sulfo-Lewis <sup>a</sup>	34
3.6 Das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese	40
3.6.1 Strategien für die Festphasenpeptidsynthese	41
3.6.2 Problematische Nebenreaktionen in der SPPS	44
3.7 Synthese von Glycosylaminosäuren für die Festphasensynthese	45
3.7.1 Reduktion der Azidofunktion zum Amin	46
3.7.2 Kupplung zur Glycosylaminosäure	48
3.8 Glycopeptidsynthesen	54
3.8.1 Synthese von Aminosäuren und Anker-molekülen	55
3.8.2 Synthese von Glycopeptiden aus der Sequenz des ESL-1	61

<b>4 Zusammenfassung</b>	72
<b>5 Experimenteller Teil</b>	79
5.1 Allgemeines und Messgeräte	79
5.2 Synthesen zu Kapitel 3.1	83
5.3 Synthesen zu Kapitel 3.2	95
5.4 Synthesen zu Kapitel 3.3	98
5.5 Synthesen zu Kapitel 3.4	100
5.6 Synthesen zu Kapitel 3.5	103
5.7 Synthesen zu Kapitel 3.7	105
5.8 Synthesen zu Kapitel 3.8	115
<b>6 Spektroskopischer Anhang</b>	139

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
absol.	Absolut
Ac	Acetyl
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Äquiv.	Äquivalente
Ala, A	Alanin
All	Allyl
$\alpha$	spezifischer Drehwert
AMPS	Aminomethylpolystyrol
Ar	Aryl
arom.	Aromatisch
Ara	D-Arabinose
Arg, R	L-Arginin
Asn, D	L-Asparaginsäureamid
Ausb.	Ausbeute
Ber.	Berechnet
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
Bn	Benzyl
Bzn	Benzyliden
c	Konzentration
COSY	Correlated Spectroscopy
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
d	Dublett, Tage
$\delta$	chemische Verschiebung
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
dd	doppeltes dublett
dhb	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
engl.	Englisch

Et	Ethyl
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FD	Field Desorption
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fuc	L-Fucose
Gal	D-Galactose
Gef.	Gefunden
gem	Geminal
ges.	Gesättigt
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
Glu, E	L-Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
GlyCAM	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
h	Stunde
HATU	(O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	(O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
i. Hochvak.	im Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
J	Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
konz.	Konzentriert
λ	Wellenlänge
Leu, L	L-Leucin
Le <sup>a</sup>	Lewis <sup>a</sup>
Le <sup>x</sup>	Lewis <sup>x</sup>
Lit.	Literaturangabe
m	Multipllett
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrum
NeuAc	N-Acetyl-D-neuraminsäure
NIS	N-Iodsuccinimid

NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OBn	Benzylether
OtBu	tert.-butylether
OTf	Trifluormethansulfonat
PE	Petrolether
pos.	positiv
ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
PTMSEL	2-Phenyl-2-trimetylsilylethyl-linker
PTSA	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
q	Quartett
quant.	Quantitativ
Raumtemp.	Raumtemperatur
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RP	Reversed Phase
s	Singulett
s <sub>b</sub>	breites Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
SCR	Short Consensus Repeat
Sdp.	Siedepunkt
sLe <sup>a</sup>	Sialyl-Lewis <sup>a</sup>
sLe <sup>x</sup>	Sialyl-Lewis <sup>x</sup>
Ser, S	L-Serin
T	Triplett
TBTU	(O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
tBu	<i>tert.</i> -Butyl
Tentagel	Polyethylenglycol-Polystyrol-Copolymer
tert.	Tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr	L-Threonin
UV	Ultraviolett
vic	vicinal
Z	Benzyloxycarbonyl



# 1 Einleitung

## 1.1 Zelladhäsion

Für die Existenz eines Organismus ist die molekulare Kommunikation zwischen den Zellen unabdingbar. So sind z. B. die Embryogenese, die Wundheilung und die Immunreaktion hochkomplexe Prozesse, bei denen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte eine entscheidende Rolle spielen.<sup>1</sup> Zu den membranständigen Adhäsionsmolekülen, die solche Prozesse vermitteln, gehören die Cadherine, die Integrine, die Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie sowie die Selektine.<sup>2,3</sup>

Die morphologische Entwicklung wird schon im frühen embryonalen Stadium zum einen durch Zellteilung und -wachstum, zum anderen durch die Adhäsion der Zellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix gesteuert. Im Falle von Verletzungen sind Proteine der extrazellulären Matrix in der Lage, Blutplättchen an die Wundränder anzuheften, durch Aggregation einen Blutpfropf zu bilden, um dadurch die Wunde zu verschließen, und die Blutung zu unterbinden.

Die Abwehr des Organismus gegen Krankheitserreger wird in hochkomplexen Regelkreisen durch das Immunsystem organisiert. Tritt in der Peripherie des Körpers eine Infektion auf, so nehmen Phagozyten große Mengen des Antigens auf, wandern vom Infektionsherd zu den lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, Schleimhäute) und präsentieren diese dort den Lymphozyten. Die Lymphozyten patrouillieren ansonsten durch das Blutsystem, können aber auf Grund von „Homing“-Adhäsionsmolekülen wieder in die Lymphknoten eintreten. Haben die Lymphozyten eine Proliferations- und Differenzierungsphase durchlaufen, verlassen sie die lymphatischen Organe wieder und begeben sich in der Blutbahn auf die Suche nach antigenträgenden Strukturen. Finden die B-Zellen eine solche Struktur, so kommt es zur Bildung eines nicht-kovalent gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes und im späteren Verlauf zur Freisetzung löslicher Antikörper.

Der Mechanismus, über den native T-Zellen in die lymphatischen Organe eintreten findet auch im Verlauf inflammatorischer Prozesse statt. Nach einer Schädigung des Gewebes kommt es zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Histamin oder auch Thrombin, welche die typischen Erscheinungen wie Vasodilatation und Exsudation bewirken. Die

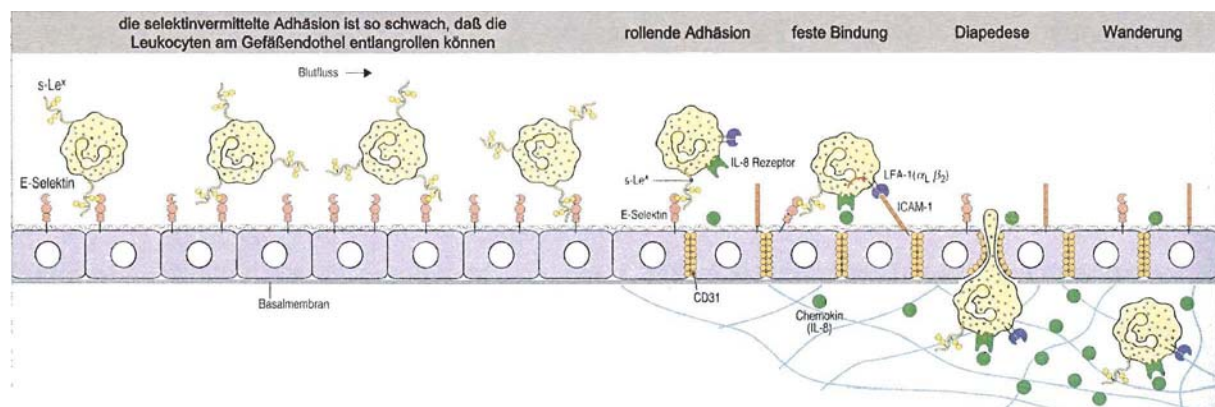
---

<sup>1</sup> R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.*, **109** (1997), 1440-1456

<sup>2</sup> K. Vlemmckx, R. Kemler, *BioEssays*, **21** (1999), 211-220

<sup>3</sup> A. Giannis, *Angew. Chem.*, **106** (1994), 188-191

ebenfalls sezernierten Zytokine wie z.B. Interleukin-1/IL-1, Interferone/INF oder Tumornekrosefaktor/TNF- $\alpha$ <sup>4</sup> regen die Endothelzellen zur Ausbildung von spezifischen Adhäsionsrezeptoren, den Selektinen, an und versetzen das Endothel in einen „pro-adhäsiven“ Zustand. Es folgt eine Reihe von aufeinander aufbauenden Ereignissen, die auch als Adhäsionskaskade beschrieben werden. Begünstigt durch die Erweiterung der Blutgefäße kommt es zu einer Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit der Leukozyten in der Blutbahn, gleichzeitig bewegen sie sich von der Mitte des Blutgefäßes auf das Epithel zu. Dort kommt es nun zu einer ersten Annäherung zwischen den exprimierten Selektinen und den entsprechenden Liganden auf den Leukozyten. Die schwachaffinen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen werden durch Dissoziation leicht gelöst, und die Leukozyten durch die Zellströmung weitertransportiert. Durch eine schnelle Abfolge dieser Assoziations-Dissoziations-Ereignisse werden die Leukozyten abgebremst, und es kommt zu einer Rollbewegung am Gefäßendothel. In einem nächsten Schritt können die akkumulierten Leukozyten durch endothelial freigesetzte Chemokine oder den plättchenaggregierenden Faktor in einen aktivierten Zustand überführt werden, in dem sie Rezeptoren der Integrinfamilie exprimieren.<sup>5,6</sup> Durch die Anbindung der entsprechenden Liganden der Integrin-Superfamilie an diese Rezeptoren kommt es zum festen Anheften der Leukozyten an das Endothel, so daß eine Emigration durch die interzellulären Zwischenräume in das entzündete Gewebe stattfinden kann.<sup>7</sup>



**Abb1.1** Adhäsionskaskade, aus: C. A. Janeway, P. Travers: *Immunologie*, Spektrum, 2. Aufl., (1997)

<sup>4</sup> M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Sinhai, S. I. Hakamori, J. C. Paulsen, *Science*, **250** (1990), 1130

<sup>5</sup> M. Baggiolini, B. Derwald, B. Moser, *Annu. Rev. Immunol.*, **15** (1997), 675-705

<sup>6</sup> G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, *J. Clin. Invest.*, **98** (1997), 1699-1701

<sup>7</sup> C. W. Smith, S.D. Marlin, R. Rothlein, C. Toman, D. C. Anderson, *J. Clin. Invest.*, **83** (1989), 2008-2017

## 1.2 Adhäsionsmoleküle

### 1.2.1 Integrine

Integrine sind transmembrane, heterodimere Zelloberflächenproteine, die aus nicht-kovalent gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten bestehen. Beide Untereinheiten weisen eine kurze membranständige Region (20-30 Aminosäuren) sowie eine kurze cytoplasmatische Domäne (20-50 Aminosäuren) auf, wohingegen der extrazelluläre Bereich eine Anzahl von 800-1400 Aminosäuren umfassen kann. Ein kurzer Abschnitt in der Nähe des N-Terminus bildet die Kontaktstelle für extrazelluläre Liganden. Über intrazelluläre Proteine wie Talin<sup>8</sup>, Vinculin<sup>9,10</sup> und  $\alpha$ -Actinin<sup>11</sup> ist der C-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit mit den Actinfilamenten des Cytoskeletts verbunden, eine Signaltransduktion in das Zellinnere ist somit gewährleistet. Aufgrund von strukturellen Abweichungen der  $\beta$ -Kette sind die Integrine in acht Gruppen unterteilt, was sich auch in ihrer Funktion widerspiegelt.

Eine zentrale Rolle in der Gewebeorganisation bilden die  $\beta_1$ -Integrine, da sie an der Bindung von Zellen an Moleküle der extrazellulären Matrix in Muskeln, im Nervensystem sowie in Endothel- und Epithelialschichten beteiligt sind. Man bezeichnet sie auch als *very-late-activation*-Antigen (VLA-Antigen), da sie erst nach Antigenaktivierung der T-Zellen exprimiert werden.

Spezifisch für aktivierte Leukozyten sind die  $\beta_2$ -Integrine, die auch als *Leucocyte Cell Adhesion Molecules* (LeuCAM) bezeichnet werden. Sie werden auf Leukozyten als  $\alpha_L\beta_2$ , (Lymphocyte Function associated Antigen-1, LFA-1) bzw. auf Granulozyten und Monozyten als  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1) nachgewiesen. Liganden für LFA-1 bzw. Mac-1 sind die entweder konstitutiv vorhandenen oder durch vorherige Aktivierung exprimierten interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM1/2/3 der Endothelzellen.<sup>12,13</sup> Wie bereits erwähnt, verursacht die feste Anbindung der Leukozyten am Endothel eine strukturelle und molekulare Veränderung des Cytoskeletts was wiederum zu einer Formveränderung der Zelle führt und die Ausbildung interzellulärer Lücken fördert. Dadurch wird die Wanderung der Leukozyten durch das Endothel in das entzündete Zielgewebe ermöglicht.

---

<sup>8</sup> D. J. Rees, S. E. Ades, S. J. Singer, R. O. Hynes, *Nature*, **347**, 685-689

<sup>9</sup> A. P. Gilmore, K. Burridge, *Nature*, **373** (1995), 197

<sup>10</sup> R. P. Johnson, S.W. Craig, *Nature*, **373** (1995), 261-264

<sup>11</sup> C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burridge, *J. Cell. Biolo.*, **111** (1990), 721-729

<sup>12</sup> M. A. Arnaout, *Blood*, **75** (1990), 1037-1050

<sup>13</sup> A. R. DeFougerolles, T. A. Springer, *J. Exp. Med.*, **175** (1992), 185-190

### 1.2.2 Selektine

L-, P- und E-Selektin bilden eine Familie von Zelladhäsionsrezeptoren, die den ersten, lockeren Kontakt zwischen Leukozyten und im Entzündungsbereich liegenden Endothelzellen bzw. lymphatischem Gewebe herstellen. Ihr Vorkommen ist beschränkt auf das vaskuläre System, und ihre Nomenklatur richtet sich nach dem Zelltyp der Erstbeschreibung. L-Selektin findet sich auf Leukozyten, E- und P-Selektin auf der äußeren Membran von Endothelzellen, und P-Selektin wird zusätzlich auf Blutplättchen (engl.: *platelets*) nachgewiesen.

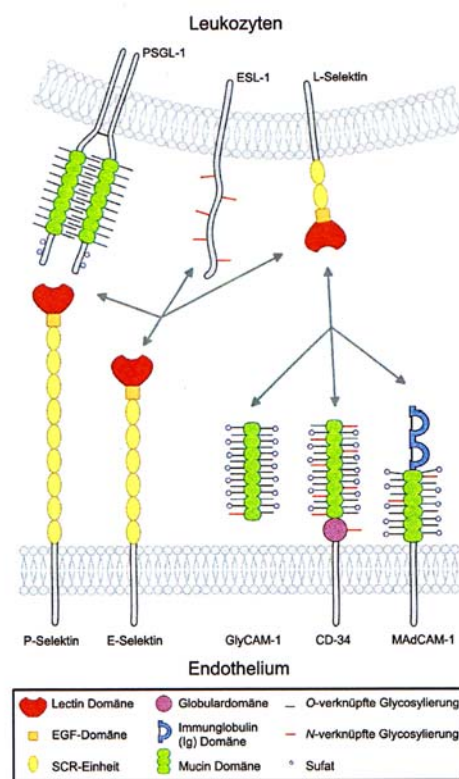


Abb. 1.2 Aufbau der Selektine und Ort der Expression

Alle drei Selektine weisen eine hohe Strukturhomologie auf: am N-Terminus befindet sich eine  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Lectin-Domäne (*carbohydrate recognition domain, CRD*), an welche sich ein dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor, EGF*) ähnlicher Bereich anschließt. Die extrazelluläre Ausdehnung wird durch eine, bei den einzelnen Selektinen voneinander verschiedene Anzahl an Wiederholungseinheiten (*short consensus repeat, SCR*) bestimmt. Über eine Transmembrandomäne reichen die Selektine in das Cytoplasma hinein.

Von einer Vielzahl hoch- und niedermolekularer Glycane<sup>14</sup>, die befähigt sind, an die Selektine zu binden, wurde als physiologisch wichtigstes das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis<sup>x</sup> **1** bzw. das Regioisomer Sialyl-Lewis<sup>a</sup> **2** identifiziert.<sup>15</sup>

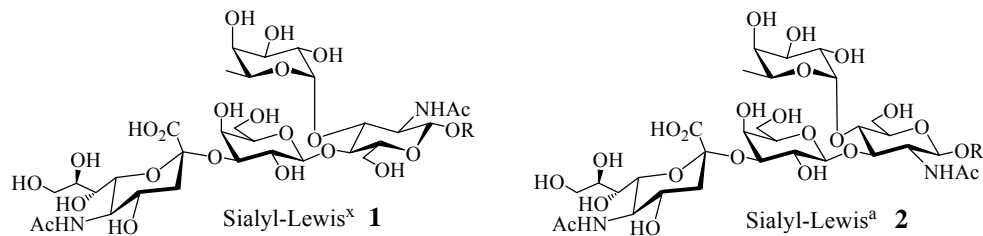


Abb. 1.3 Natürliche Liganden der Selektine

Im folgenden sollen die funktionellen Gruppen der Kohlenhydrateinheiten durch Apostrophe gekennzeichnet werden. Die Galactose wird einfach ('), die Fucose doppelte (") und die N-Acetylneuraminsäure dreifach (""') gekennzeichnet. Das N-Acetylglucosamin erhält keine Kennzeichnung.

### 1.2.2.1 L-Selektin

1983 konnten Gallatin, Weissman und Butcher<sup>16</sup> mit Hilfe monoklonaler Antikörper die Existenz von L-Selektin auf der Oberfläche von Lymphozyten nachweisen. Es ist am Wiedereintritt der Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten beteiligt, ermöglicht aber auch die Rekrutierung von Leukozyten an entzündetem Gewebe.<sup>17</sup>

Die endogenen Liganden des L-Selektin, CD34 und GlyCAM-1, sind sulfatierte Glycoproteine Mucin-ähnlichen Typs, deren Kohlenhydratseitenketten O-verbrückt vorliegen. Man findet sie auf der Oberfläche von Endothelzellen hochendothelialer Venolen.<sup>18</sup> Durch umfangreiche Untersuchungen (enzymatischer Abbau radiomarkierter Liganden, Anionen-Austauschchromatographie) konnte der Kohlenhydrateinheit eine sulfatierte Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Struktur zugeordnet werden.

<sup>14</sup> A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91** (1994), 7390-7397

<sup>15</sup> C. Foxall, S. R. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. A. Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa, B. K. Bradley, *J. Cell. Biol.*, **117** (1992), 895-902

<sup>16</sup> W. M. Gallatin, I. L. Weissman, E. C. Butcher, *Nature*, **304** (1983), 30-34

<sup>17</sup> S. R. Watson, C. Fennie, L. A. Lasky, *Nature*, **349** (1991), 164-167

<sup>18</sup> Y. Imai, M. S. Singer, C. Fennie, L. A. Lasky, S. D. Rosen, *J. Cell. Biol.*, **113** (1991), 1213-1221

### 1.2.2.2 P-Selektin

Das P-Selektin (ältere Bezeichnung: GMP-140, PADGEM) konnten von *McEver* und *Martin*<sup>19</sup> sowie von *Furie*<sup>20</sup> 1984 auf der Oberfläche menschlicher Blutplättchen nachgewiesen werden, nachdem solche Zellen Thrombin und/oder Histamin ausgesetzt waren. P-Selektin ist normalerweise in internen Granula gespeichert, kann aber innerhalb von Minuten nach Aktivierung durch Verschmelzen der Granula mit der extrazellulären Matrix freigesetzt werden. 1987 konnte nachgewiesen werden, daß es auch in Weibel-Palade-Körpern vaskulärer Endothelzellen gespeichert wird.<sup>21</sup> Nach Expression wird es schnell wieder durch Endozytose internalisiert und, reguliert durch komplexe Signalmechanismen, entweder in die Speicher zurückgeführt oder im Lysosom abgebaut.<sup>22</sup>

Die Strukturanalyse des natürlichen P-Selektin-glycoprotein-Liganden (PSGL-1) ergab, dass es sich um ein disulfidverbrücktes Homodimer mit einer relativen Molekülmasse von 120 KDa handelt, welches neben drei N-verknüpften zahlreiche sialylierte O-verknüpfte Glycane trägt. Durch gezielte enzymatische Abbaureaktionen konnte zudem gezeigt werden, daß zur P-Selektinerkennung nur die O-Glycane notwendig sind.<sup>23</sup> Für die Ligandenbindung existenziell sind ebenfalls sulfatierte Tyrosinreste am (anionischen) N-Terminus des Polypeptids.<sup>24</sup>

### 1.2.2.3 E-Selektin

Chemotaktische Reize wie Interleukin-1, Lymphotoxin, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  oder Lipopolysaccharide bewirken mit einer zeitlichen Verzögerung von vier bis sechs Stunden an Endothelzellen die Expression eines weiteren Zelloberflächenglycoproteins. Im Gegensatz zu P-Selektin hat dieses eine deutlich verlangsamte Reaktionskinetik, denn es muß innerhalb dieser Zeitspanne erst durch eine transkriptionelle *de novo*-mRNA-Synthese dargestellt

---

<sup>19</sup> R. P. McEver, M. N. Martin, *J. Biol. Chem.*, **259** (1984), 9799-9804

<sup>20</sup> C. L. Berman, E. L. Yeo, J. D. Wencel-Drake, B. C. Furie, M. H. Ginsberg, B. Furie, *J. Clin. Invest.* **78** (1986), 130-137

<sup>21</sup> P. E. Sternberg, R. P. McEver, M. A. Shuman, Y. V. Jacques, D. F. Bainton, *J. Cell. Biol.*, **101** (1985), 880-886

<sup>22</sup> H. Setiadi et al., *J. Biol. Chem.*, **270** (1995), 26818-26826

<sup>23</sup> P. P. Wilkins, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **271** (1996), 18732-18742

<sup>24</sup> T. Pouyani, B. Seed, *Cell*, **83** (1995), 333-343

werden. 1985 wurde für das vermittelnde Rezeptormolekül der Begriff „endothelial leukocyte adhesion molecule-1“ (ELAM-1) eingeführt, heute wird es als E-Selektin bezeichnet.<sup>25</sup> Auch E-Selektin wird nach Aktivierung endozytotisch von der Zelloberfläche entfernt und im Lysosom abgebaut. 1989 waren *Bevilacqua et al.* in der Lage, cDNA von E-Selektin und in Folge auch E-Selektin selbst zu erhalten<sup>26</sup>, und *Vestweber* gelang 1991 durch Liganden-Affinitätschromatographie die Isolierung des E-Selektin-Liganden-1 (ESL-1).<sup>27</sup> Dieses Glycoprotein besteht aus 1148 Aminosäuren und weist innerhalb dieser Sequenz fünf potentielle N-Glycosylierungsstellen auf. Massenspektroskopische Untersuchungen an mit Endoglycosidase F N-deglykosylierten ESL-1 und an der unglykosylierten Peptidsequenz lassen vermuten, daß keine O-glycosidisch verknüpften Kohlenhydrate vorliegen.<sup>28</sup>

Durch die von Entzündungsmediatoren induzierte Selektinexpression wird die Dauer und Intensität des Leukozytenrollens gesteuert, gleichzeitig kommen den verschiedenen Selektinen unterschiedliche Aufgaben zu. Während in der Anfangsphase der Entzündung das langgestreckte P-Selektin in Kombination mit L-Selektin das Zellrollen vermittelt, ist E-Selektin durch seine langsamere Expressionskinetik für die Überleitung zur festen Adhäsion der Leukozyten verantwortlich.

#### 1.2.2.4 E-Selektin-Ligand-Wechselwirkung

Der Kohlenhydrat-erkennende Bereich der Selektine umfasst ca. 120 Aminosäuren und ist am N-Terminus der endogenen Rezeptoren lokalisiert. Die Sequenz liegt hochkonserviert in einer Vielzahl  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Lektine vor und ist anscheinend essentiell für eine approbate Faltung einer Sekundärstruktur.<sup>29,30</sup>

---

<sup>25</sup> M. P. Bevilacqua, E. Butcher, Ba. Furie, Br. Furie, M. Gallatin, M. Gimbrone, J. Harlan, K. Kishimoto, L. Lasky, R. McEver, J. Paulson, S. Rosen, B. Seed, M. Siegelman, T. Springer, L. Stoolman, T. Tedder, A. Varki, D. Wagner, I. Weissman, G. Zimmerman, *Cell*, **67** (1991), 233

<sup>26</sup> M. P. Bevilacqua, S. Stengelin, M. A. Gimbrone, Jr., B. Seed, *Science*, **243** (1989), 1160-1165

<sup>27</sup> A. Levinovitz, J. Mühlhoff, S. Isenman, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **121** (1993), 449-459

<sup>28</sup> M. Lenter, A. Levinovitz, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.*, **125** (1994), 471-481

<sup>29</sup> K. Driekhamer, *J. Biol. Chem.*, **263** (1988), 9557-9560

<sup>30</sup> M. S. Quesenberry, K. Driekhamer, *J. Biol. Chem.*, **267** (1992), 10831-10841

Von *Lasky et al.* konnten durch Punktmutationsstudien die für die Kohlenhydraterkennung wichtigen Bereiche innerhalb der CRD lokalisiert werden.<sup>31</sup>

Um die bioaktive Konformation des Kohlenhydratliganden im E-Selektin zu bestimmen, können verschiedene Methoden angewendet werden. Durch transfer-NOE-Experimente werden intramolekulare Abstände des gebundenen Liganden zum Rezeptor ermittelt und durch molecular modelling-Studien diejenigen Konformationen erfasst, die die gegebenen Beschränkungen erfüllen. *Peters*<sup>32</sup> verwendete dafür eine rekombinante Chimäre aus E-Selektin und humanem IgG, wobei die CRD-, die EGF- und sechs SCR-Domänen des E-Selektins die Antigenbindungsstellen in IgG ersetzen.

Die simultane Messung von Bindungslängen und -winkeln geschieht durch Röntgenkristallographie. Die Cokristallisation von P-Selektin und E-Selektin mit dem Tetrasaccharidliganden Sialyl-Lewis<sup>x</sup> **1** gelang *Camphausen*<sup>33</sup>. Durch Röntgenstrukturanalyse dieser Komplexe konnte festgestellt werden, daß die Bindung beider Selektine zum Ligand nahezu identisch ist (s. Abb. 1.4).

Die Ca<sup>2+</sup>-gestützte Bindung der Selektine wird über die Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren Glu<sup>80</sup>, Asn<sup>82</sup>, Asn<sup>105</sup>, Asp<sup>106</sup> sowie den Carbonylsauerstoff von Asp<sup>106</sup> vermittelt. Im Gegensatz zu einem früheren Vorschlag<sup>34</sup> konnte gezeigt werden, daß die Ligandenbindung auf der Verdrängung je eines Calcium-gebundenen Wassermoleküls durch die 3''-OH und 4''-OH-Funktion statt der 2''-OH und 3''-OH-Funktion der Fucose basiert. Beide Gruppen müssen zusätzliche Bindungsenergie aufbringen, um die Aminosäureseitenkette von Asn<sup>82</sup> und Glu<sup>80</sup> (4''-OH) bzw. Asn<sup>105</sup> (3''-OH) des Rezeptors zu stabilisieren. Die Galactosyl-Einheit nimmt über die primäre Hydroxyfunktion (Wasserstoffbindung an Glu<sup>92</sup>) bzw. die 4'-OH Gruppe (Wasserstoffbindung an Tyr<sup>94</sup>) an der Komplexierung teil. Die Neuraminsäure bindet einzig mit der Säurefunktion wahrscheinlich an Arg<sup>97</sup>.

---

<sup>31</sup> D. V. Erbe, B. A. Wolitzky, L. G. Presta, C. r. Norton, R. J. Ramos, D. K. Burns, J. M. Rumberger, B. N. N. Rao, C. Foxall, B. K. Bradley, L. A. Lasky, *J. Cell. Biol.*, **119** (1992), 215-227

<sup>32</sup> K. Scheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J. L. Magnani, W. T. Wang, R. Weisenmann, T. Peters, *Angew. Chem.*, **107** (1995), 2034-2037

<sup>33</sup> W. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell*, **103** (2000), 467-479

<sup>34</sup> C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.*, **2** (1995), 703-708

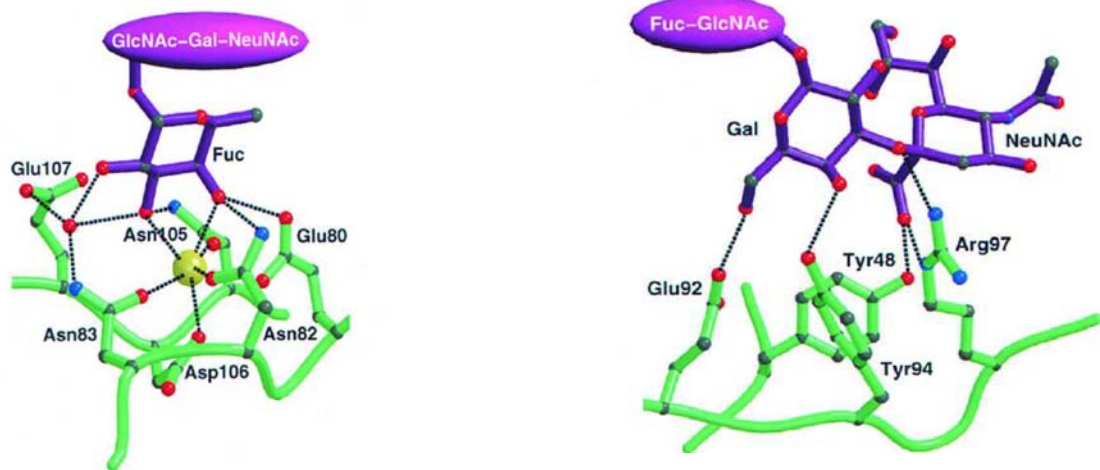


Abb. 1.4 Bindungsverhältnisse von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> an E- und P-Selektin (Camphausen<sup>33</sup>, 2000)

Zusammenfassend lassen sich anhand von NMR- und Röntgenstrukturuntersuchungen die 2-, 3-, und 4-ständige Hydroxygruppe der Fucose sowie die 4- und 6-ständige Hydroxygruppe der Galactose als essentielle Strukturmerkmale für eine direkte Bindung an den Rezeptor nachweisen: Weiterhin nimmt die Carboxylfunktion der Neuraminsäure an der aktiven Bindung teil, die komplette N-Acetylglucosamineinheit trägt nicht zur Bindungsfähigkeit bei.

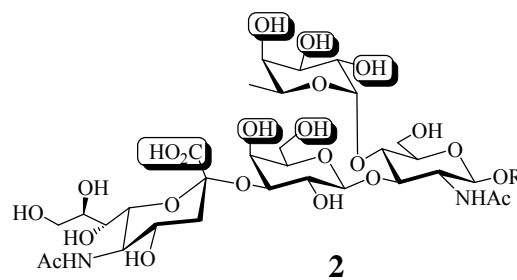


Abb. 1.5 Für die Rezeptorbindung essentielle Strukturmerkmale

### 1.3 Strukturelle Studien der Selektin-Liganden Sialyl-Lewis<sup>a/x</sup>

Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis<sup>a/x</sup> dient aufgrund seiner positiven Bindungseigenschaften gegenüber allen drei Selektinen als Leitsubstanz für die Suche nach Antagonisten dieser Rezeptoren. Unter Beibehaltung der für die Bindung notwendigen Funktionalitäten, erhofft man sich, durch Modifikationen des restlichen Gerüsts zu besser bindenden Selektininhibitoren auf der Grundlage von Kohlenhydraten zu gelangen. Darüber hinaus können diese Ergebnisse wiederum zu einem verbesserten Verständnis von Konformation und Wirkungsmechanismen beitragen.<sup>35,36</sup>

Da der chemische Aufbau glycosidischer Inhibitoren komplexe Syntheserouten über viele Stufen erfordert und solche Substanzen eine hohe Hydrolyseanfälligkeit der glycosidischen Bindungen aufweisen, wurden von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Vorgehensweisen zum Erhalt von mimetischen Antagonisten gewählt. Unter Beibehaltung der essentiellen Strukturmerkmale werden einzelne Kohlenhydrate im Laufe der Synthese durch nichtsaccharidische Moleküle ersetzt, um so leichter zu stabileren Inhibitoren zu gelangen.<sup>37</sup>

Da der Bindungsbeitrag der Neuraminsäure von der Säurefunktion ausgeht, scheint an dieser Stelle lediglich eine unter physiologischen Bedingungen präsente negative Ladung notwendig zu sein. Die einfachste Abwandlung besteht im Ersatz der Neuraminsäure durch eine negativ geladene Gruppierung an Position 3' der Galactose.

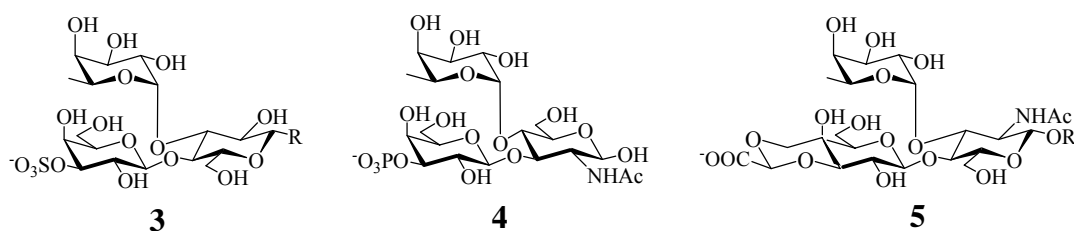


Abb. 1.6 Trisaccharide als Mimetika für sLe<sup>a/x</sup>

<sup>35</sup> B. K. Brandley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivasatava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology*, **3** (1993), 633-641

<sup>36</sup> J. Y. Ramphal, Z.-L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S- A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, *J. Med. Chem.*, **37** (1994), 3459-3463

<sup>37</sup> E. E. Simanek, J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C. H. Wong, *Chem. Rev.*, **98** (1998), 833-862

Die von *Hasegawa* und *Kondo*<sup>38</sup> synthetisierten Verbindungen wie z. B. **3** weisen ähnliche Bindungseigenschaften wie die endogenen Liganden auf; durch eine Phosphorylierung der Galactose zu **4** konnte *Kiessling* hingegen die Affinität von Le<sup>a</sup> an E-Selektin um das 20-fache steigern.<sup>39</sup> Die Fixierung eines Carboxylatanions wie an Verbindung **5** führt jedoch zu einem kompletten Aktivitätsverlust.<sup>40</sup>

Besonders gute Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn gleichzeitig die N-Acetylglucosamin-einheit gegen ein vicinales Diol ausgetauscht wird. Das in Abbildung 1.7 gezeigte Cyclohexandiol scheint am besten die Form und Starrheit des Pyranoserings zu imitieren. Die Affinität des alkylierten Carboxylats **6** gegenüber E-Selektin ist um den Faktor 8 höher als die des endogenen Liganden sLe<sup>x</sup>.<sup>41</sup>

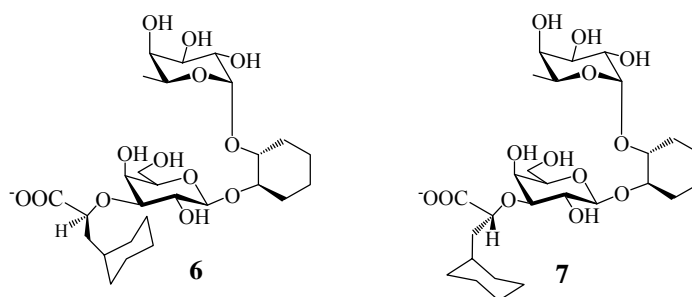


Abb. 1.7 1,2 *trans*-Cyclohexandiol als Ersatz der Glucose

Im diastereomeren (*R*)-Cyclohexylmilchsäurederivat **7** liegt die Säuregruppe für eine Wasserstoffbrücke zum Rezeptor zu weit entfernt und eine natürliche Konformation kann nicht eingenommen werden. Ein völliger Aktivitätsverlust ist die Folge.<sup>42</sup>

<sup>38</sup> H. Ohmoto, K. Nakamura, N. Kondo, Y. Inoue, K. Yoshino, H. Kondo, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Med. Chem.*, **39** (1996), 1339-1343

<sup>39</sup> D. D. Manning, C. R. Bertozzi, S. D. Rosen, L. L. Kiessling, *Tetrahedron Lett.*, **37** (1996), 1953-1956

<sup>40</sup> G. Thoma, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler, *J. Org. Chem.*, **61** (1996), 514-524

<sup>41</sup> R. Banteli, B. Ernst, *Tetrahedron Lett.*, **38** (1997), 4059-4062

<sup>42</sup> D- Henrichsen, B. Ernst, J. L. Magnani, W.-T. Wang, B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.*, **111** (1999), 106-110

Der Ansatz, mit Ausnahme der Fucose alle Kohlenhydrate zu ersetzen, führt in einigen Fällen zu einer leichten Steigerung der Bindungsaffinität gegenüber den Selektinen.<sup>43</sup> Die *turn*-Region der Glucose wird durch verschiedene Dirole bzw. Amide, die 4'-OH und 6'-OH-Gruppe der Galactose durch funktionalisierte Aminosäuren ersetzt. Auf diese Weise ist eine Vielzahl unterschiedlicher Fucosylaminosäuren zugänglich, die jedoch in ihrer Bindungsfähigkeit am E-Selektin stark differieren.

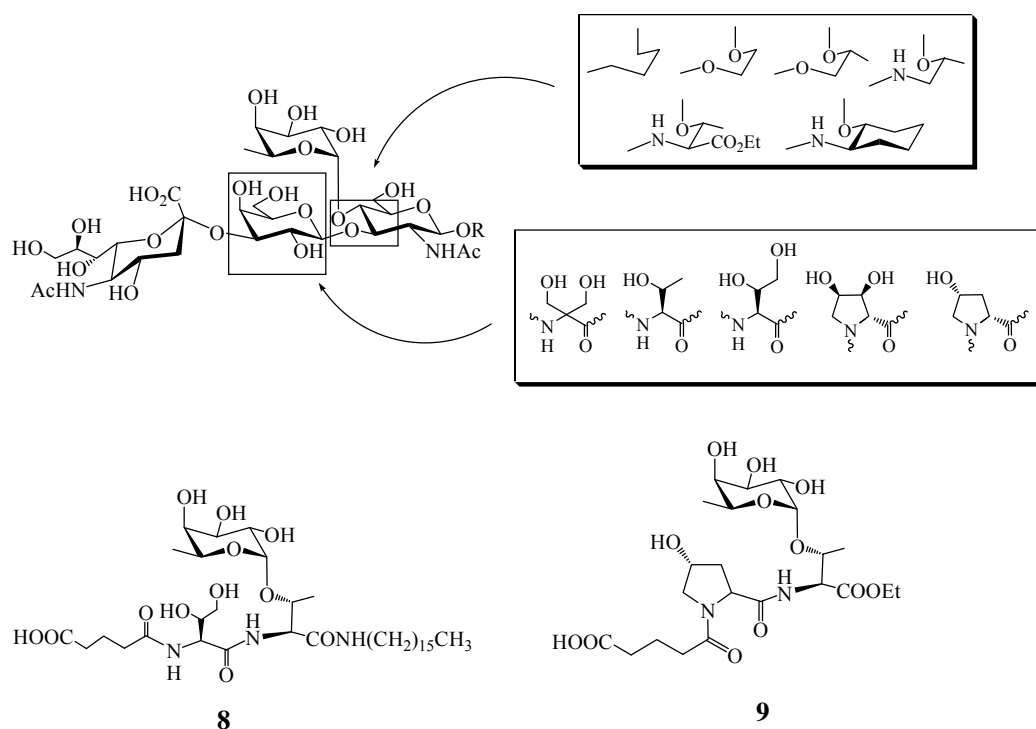


Abb. 1.8 Substitution der GlcNAc- und Gal-Einheit

<sup>43</sup> C. H Wong, F. Moris-Varas, S. C. Hung, T. G. Marron, C. C. Lin, K. W. Gong, G. Weiz-Schmidt, *J. Amer. Chem. Soc.*, **119** (1996), 8152-8158

## 1.4 Pathologische Expression

Selektine sind im Verlauf inflammatorischer Reaktionen verantwortlich für die Adhäsion und Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe. Eine starke Überexpression von Selektinen kann bei einer Anzahl entzündlicher Erkrankungen beobachtet werden und Auslöser für Autoimmunkrankheiten sein.

Bei einer myokardialen Ischämie kann es nach der Wiederherstellung der Gefäßdurchblutung (Reperfusion) zu einer starken Einwanderung von Leukozyten in das betroffene Gewebe kommen. Da das Ziel nach einem Infarkt die schnellstmögliche Beseitigung der Thromben ist, müssen zur Risikominimierung Entzündungsprozesse in den geschädigten Arealen unterdrückt werden. Durch die gezielte Blockierung der Selektine soll dies erreicht werden.<sup>44</sup>

Die Selektine spielen weiterhin eine wichtige Rolle bei diabetischen Gefäßschäden (Angiopathie). Eine dauerhaft erhöhte Glucosekonzentration führt zu oxidativem Stress der Endothelzellen und schließlich zur Expression von E-Selektin und anderen Adhäsionsrezeptoren. In einer vorangegangenen, irreversiblen Reaktion bilden sich aus Glucose und Aminogruppen von Proteinen die sog. Advanced Glycation Endproducts (AGE), die, gebunden an spezielle Oberflächenrezeptoren, den Transkriptionsfaktor  $\kappa$ B aktivieren und dadurch die Bildung von Selektinen auslösen.<sup>45</sup> Die ungebremste Invasion von Monozyten in umliegendes Gewebe ist die Folge.

Auch wird eine Behandlung von Krebs durch Inhibierung von Selektinen diskutiert, da die Selektine die Bindung metastasierender Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel und damit die Invasion in gesundes Gewebe vermitteln.<sup>46</sup> Obwohl die Bindungsmechanismen noch nicht geklärt sind und eine Vielzahl unterschiedlicher Krebsarten auf diese Weise Sekundärtumore ausbilden, scheinen die auf den Krebszellen vorkommenden glykosylierten Strukturen Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und Sialyl-Lewis<sup>a</sup> als Liganden zu fungieren.<sup>47,48</sup>

---

<sup>44</sup> T. Murohara, *Cardiovasc. Res.*, **30** (1995), 965-974

<sup>45</sup> M. Morigi, *J. Clin. Invest.*, **101** (1998), 1905-1915

<sup>46</sup> L. Biancone et al., *J. Exp. Med.*, **183** (1996), 581-587

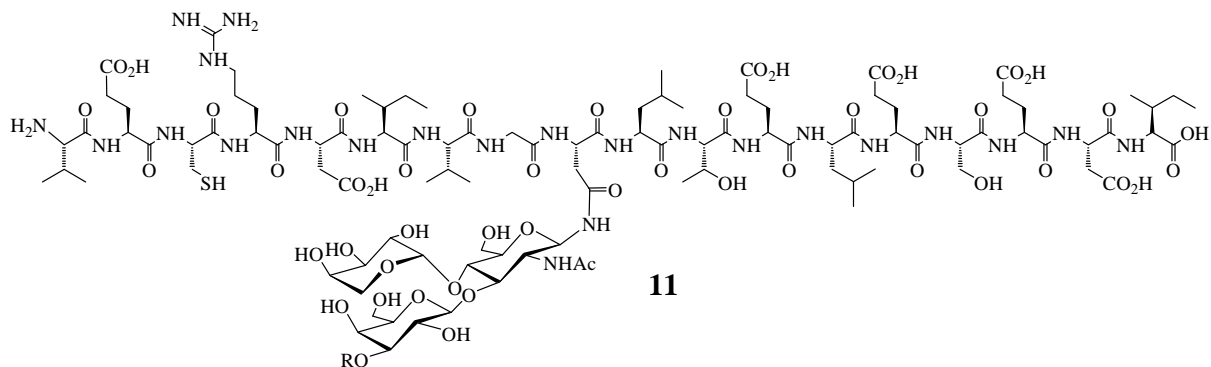
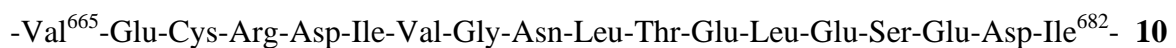
<sup>47</sup> M. Sato et al., *Anticancer Res.*, **17** (1997), 3505-3512

<sup>48</sup> T. Krause, G. A. Turner, *Clin. Exp. Metastasis*, **17** (1999), 183-192

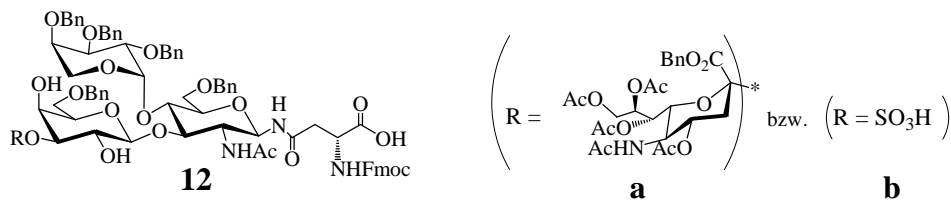
## 2 Zielsetzung

Selektine nehmen im Rahmen inflammatorischer Prozesse eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten ein. Durch vielfältige Kohlenhydrat-Proteinwechselwirkungen der Adhäsionsmoleküle mit ihren Kohlenhydratstrukturen-tragenden Liganden kommt es zum Anheften von Leukozyten am Gefäßendothel und in Folge weiterer biochemischer Prozesse zur Internalisierung dieser Leukozyten in entzündetes Gewebe. Pathogene Veränderungen des Immunsystems führen zu gesteigerter Expression von Selektinen und als Konsequenz zur Ausbildung verschiedener Krankheiten wie rheumatoider Arthritis oder auch zur Abstoßung transplanterter Organe. Es wird deshalb versucht, die Adhäsion endogener Liganden an ihre Rezeptoren vom Selektin-Typ durch die Gabe synthetischer Oligosaccharide bzw. davon abgeleiteter nichtsaccharidischer Mimetika zu unterdrücken. Diese Strukturen (vgl. Einleitung) binden bisher jedoch nur mit einer geringen Affinität an L-, P- und E-Selektin und werden deshalb nicht als Antiadhäsiva eingesetzt.

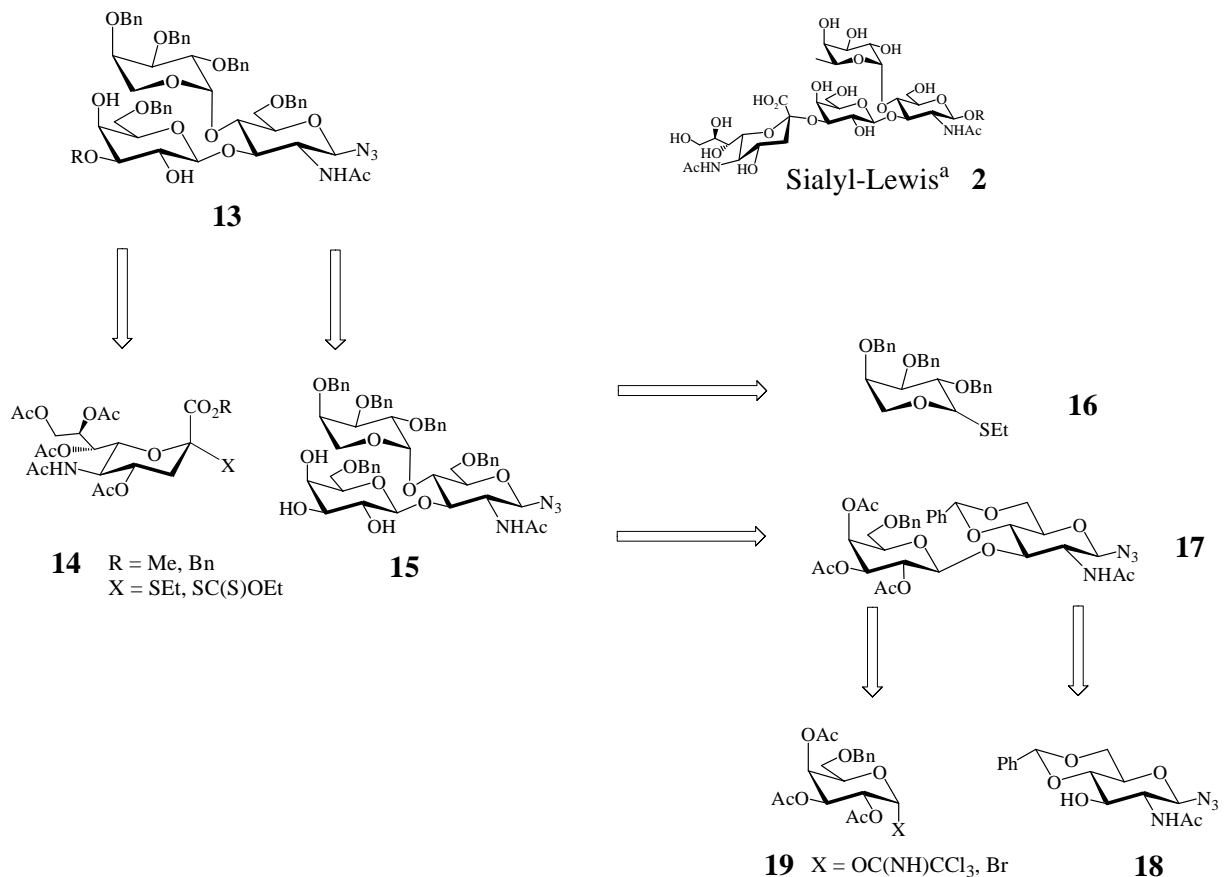
Die Partialsequenz 664-684 des E-Selektin-Liganden-1 (ESL-1) **10** liegt in den Glycoproteinen MG-160 (Ratte/Mensch) und CRF (Huhn) hochkonserviert vor. Da diese Sequenz zudem eine der fünf potentiellen N-Glycosylierungsstellen aufweist, zählt sie wahrscheinlich zu den biologisch aktiven Teilen des Liganden und sollte zu einer Rezeptorbindung entscheidend beitragen. Deshalb wird diese Sequenz zum Aufbau des komplexen Glycooctadecapeptids **11** ausgewählt.



Die Bereitstellung von **11** soll durch eine automatisierte Peptidsynthese mit einer N-Glycosylaminosäure **12** durchgeführt werden.



Dazu soll im ersten Teil der Arbeit ein Syntheseweg ausgearbeitet werden, um diese der Leitstruktur **2** verwandte Struktur **12** im Multigrammaßstab aus den Monosaccharidbausteinen **14**, **16**, **18** und **19** zu synthetisieren. Als Alternative zur Sialylierung (**12a**) wird die regioselektive Sulfatierung des Bausteins **13** an Position 3' angestrebt (**12b**).

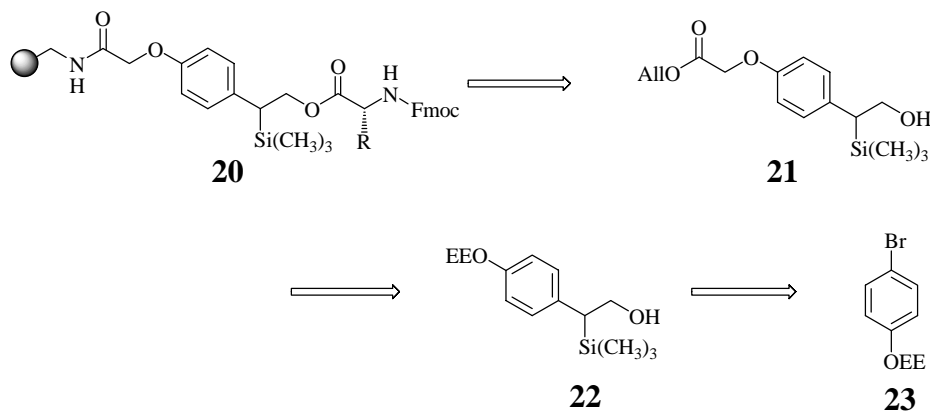


Nach erfolgreicher Darstellung der Vorstufe **13** soll das anomere Azid unter Beibehalt aller Benzyletherschutzgruppen schonend und stereoselektiv reduziert und mit einem Asparaginsäurederivat zu der Glycosylaminosäure **12** verknüpft werden.

Eine regioselektiv sulfatierte Glycosylaminosäure wie **12b** und ihr Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden

Um das Zielmolekül als potentiellen Antagonisten der Zelladhäsion gegen enzymatische Hydrolyse zu schützen, wird die im endogenen Liganden vorkommende L-Fucose gegen D-Arabinose ausgetauscht. Diese weist die gleiche Konformation wie L-Fucose auf, kommt im Gegensatz zu dieser im Säugetierorganismus jedoch nicht vor.

Die Verwendung der extrem säurelabilen Sulfatgruppe und der ebenfalls acidolytisch spaltbaren Arabinosid-Bindung verbieten den Gebrauch säureempfindlicher Schutzgruppen und Ankersysteme. Für diesen Zweck soll daher das in der Arbeitsgruppe Kunz entwickelte fluoridlabile PTMSEL-Ankersystem **20** ausgehend von **23** in einer mehrstufigen Synthese dargestellt werden und als Linker in der Festphasenpeptidsynthese Verwendung finden.



### 3 Allgemeiner Teil

#### 3.1 Synthese der Monosaccharidbausteine

Die Darstellung des Arabino-Sialyl-Lewis<sup>a</sup> **13a** bzw. des Arabino-Sulfo-Lewis<sup>a</sup> **13b** wird auf linearem Weg aus den orthogonal geschützten Monosaccharidbausteinen **14**, **16**, **18** und **19** angestrebt. Die Synthesestrategie wird so gewählt, daß das Oligosaccharid **12** durch maximal zwei zueinander orthogonale Schutzgruppenarten blockiert wird, was die Deblockierung der Zielstruktur **24** vereinfacht.<sup>49,50,51</sup>

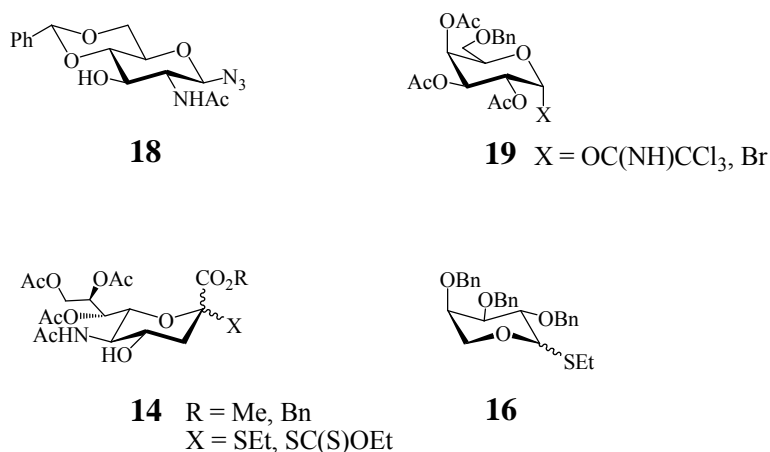


Abb. 3.1 Monosaccharidbausteine

In den Kapiteln **3.1.1** bis **3.1.4** wird die Synthese der Monosaccharidbausteine **14**, **16**, **18** und **19** aus den ungeschützten Kohlenhydraten D-Neuraminsäure, D-Arabinose, L-Glucose und L-Galactose beschrieben.

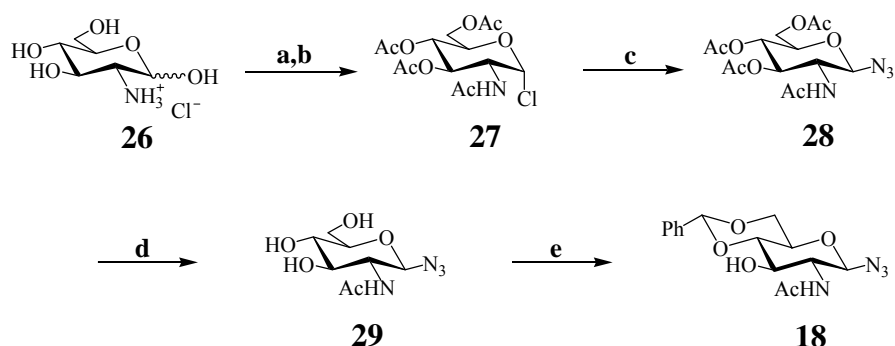
<sup>49</sup> W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **106** (1994), 2186

<sup>50</sup> U. Sprengard, G. Kretzschmar, E. Bartik, C. Hüls, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **107** (1995), 1104

<sup>51</sup> M. Rösch, H. Herzner, W. Dippold, M. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **113** (2001), 3954-3957

### 3.1.1 Synthese des Glucosaminbausteins

Ausgehend von Glucosaminhydrochlorid **26** wird mit Natriummethanolat das Amin freigesetzt und anschließend mit Acetanhydrid selektiv N-acetyliert.<sup>52</sup> Die Acetylierung der weniger reaktiven Hydroxygruppen gelingt mit Acetylchlorid, wobei sich unter Einfluß des *in situ* gebildeten Chlorwasserstoffs die  $\alpha$ -Halogenose **27** bildet.<sup>53</sup> In einer Phasentransferreaktion wird mit einem geeigneten Katalysator (Aliquat<sup>®</sup> 336) und Natriumazid das Chlorid gegen Azid ausgetauscht.<sup>54,55,56</sup> Nach Entfernen aller Acetylschutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen<sup>57</sup> werden anschließend selektiv die 4- und 6-Position als Benzylidenacetal<sup>58</sup> blockiert. Die Reaktionen laufen unter hohen Ausbeuten ab. Nach Chromatographie an Kieselgel erhält man den Glucosebaustein **18**. Alle Zwischenverbindungen können durch Umkristallisation problemlos gereinigt werden.



**Abb. 3.2** Darstellung des *N*-Acetylglucosaminbausteins **18**

**a)** NaOMe/MeOH, Ac<sub>2</sub>O, 20°C, 77%; **b)** AcCl/HCl, 20°C, 61%; **c)** NaN<sub>3</sub>, Aliquat<sup>®</sup> 336, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O, 20°C, 2d, 81%; **d)** NaOMe/MeOH, 20°C, quant; **e)** *p*Tos-OH, Benzaldehyddimethylacetal / MeOH, 20°C, 98%

### 3.1.2 Synthese des Galactosebausteins

Ausgehend von  $\alpha,\beta$ -D-Galactose **27** wird die in Abbildung 3.3 schematisch dargestellte Syntheseroute gewählt. Hierzu werden die zueinander cis-ständigen Hydroxygruppen 1'- und

<sup>52</sup> Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka, S. Hirano, *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956), 4722-4724

<sup>53</sup> D. Horton, A. L. Johnson, B. C. McKusik, *Org. Synth.*, **46** (1966), 1-5

<sup>54</sup> H. Kunz, H. Waldmann, J. März, *Liebigs Ann. Chem.*, **111** (1989), 45-49

<sup>55</sup> K. von dem Bruch, *Dissertation*, (1993), Universität Mainz

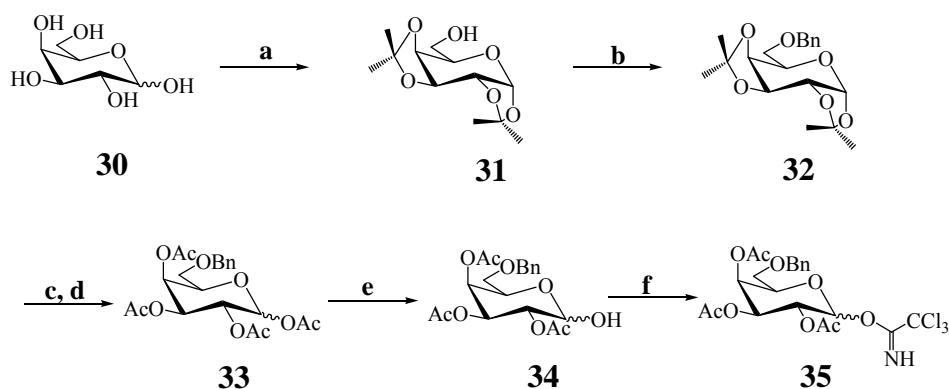
<sup>56</sup> L. Szilágyi, Z. Györgydeák, *Carbohydr. Res.*, **143** (1985), 21-41

<sup>57</sup> G. Zemplén, A. Kunz, *Chem. Ber.*, **56** (1923), 1705

<sup>58</sup> M. Shaban, R. W. Jeanlosz, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **54** (1981), 3570-3576

2' bzw. 3'- und 4' mit Hilfe von Aceton und  $\text{CuSO}_4$  als Isopropylidenacetale geschützt.<sup>59</sup> Für eine schnellere Reinigung ist eine Hochvakuumdestillation der Säulenchromatographie vorzuziehen. Dabei hat sich eine Crigée-Apparatur mit Normschliff 29/32 sowie ein schnell aufheizbarer Heizpilz bewährt. Wird der Kolben, z.B. in einem Ölbad, zu langsam erhitzt, verringert sich die Ausbeute auf Grund von Zersetzungsreaktionen merklich.<sup>60</sup>

Nach Deprotonieren mit Natriumhydrid kann die Position 6' des Galactosebausteins mit Benzylbromid zu **32** alkyliert und das Produkt anschließend ebenfalls destillativ gereinigt werden (70%). Das Entfernen der Isopropylidenschutzgruppen gelingt quantitativ durch Erhitzen von **32** in 60%iger Essigsäure innerhalb von zwei Tagen.<sup>61</sup> Ohne weitere Reinigung lassen sich nach dem Einengen der Reaktionslösung die sekundären Hydroxygruppen in Pyridin mit Acetanhydrid unter Steglich-Bedingungen acetylieren. Verbindung **35** kann so über zwei Stufen in einer Ausbeute von 79% erhalten werden.



**Abb. 3.3** Darstellung des *Galactosetrichloracetimidats 35*

a) Aceton /  $\text{CuSO}_4$ , 20°C, quant; b) 1. NaH, DMF, 20°C, 30min, 2. BnBr, 20°C, 2d, 70%; c) 60% AcOH, reflux, 1d; d) Pyridin,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , DMAP, 2h, 20°C, 79% (2 Stufen); e)  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ , DMF, 45°C, 50% ; f)  $\text{CCl}_3\text{CN}$ , DBU, DCM, 50°C, 57%

Zur Synthese des Galactosyltrichloracetimidates **35** wird mittels Hydrazinacetat in DMF<sup>62</sup> selektiv die anomere Position des Galactosylderivates **33** freigesetzt, und anschließend basenkatalysiert das elektronenarme Trichloracetonitril<sup>63</sup> an das intermediär entstehende Alkoholat von **34** addiert. Beide Reaktionen gelingen nur in mäßigen Ausbeuten von 50% bzw. 57%.

<sup>59</sup> O. T. Schmitt: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **II**, (1963), 318

<sup>60</sup> H. Herzner, Dissertation Universität Mainz, 2001

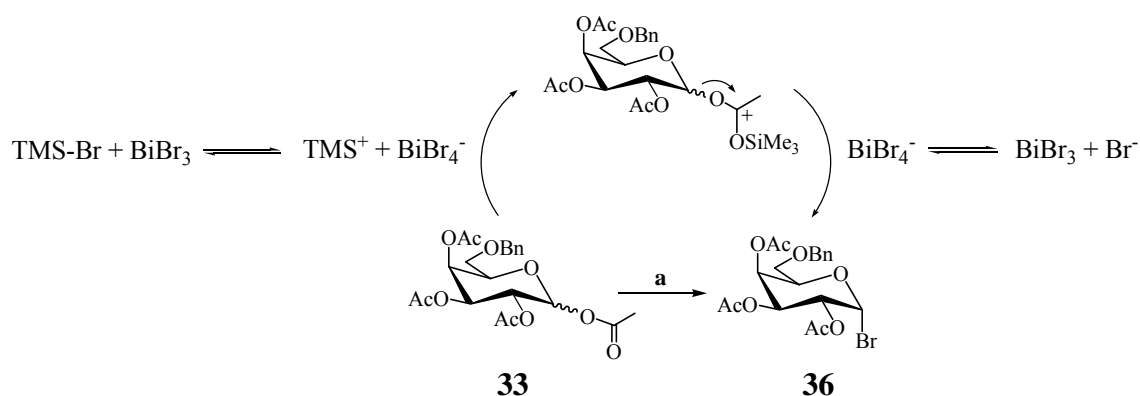
<sup>61</sup> E. F. L. Anet, *Carbohydr. Res.*, **7** (1968), 84-90

<sup>62</sup> A. Lubineau, Y. Queneau, *Tetrahedron*, **45** (1989), 21, 6697-6712

<sup>63</sup> K. H. Jung, M. Hock, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.*, (1989), 1099-1106

Aufgrund der unzureichenden Ausbeuten der Schritte **e** und **f**, wurde nach einer Alternative gesucht, einen Galaktosyldonor auf einfache Weise in ausreichender Menge darzustellen. In vorangegangenen Arbeiten<sup>64</sup> wurde das Galactosylbromid **36** durch Umsetzung des anomeren Acetats **33** mit Titan-tetrabromid<sup>65</sup> in einem Dichlormethan/Essigester-Gemisch erhalten, zugleich aber auch auf dessen hohe Hydrolyseempfindlichkeit verwiesen. Eine Einführung des Bromids in die 1'-Position durch den Einsatz von Bromwasserstoffsäure in Eisessig ist zwar möglich, wegen der Säurelabilität der 6'-Benzyletherschutzgruppe wird eine Ausbeute von 60% jedoch selten überschritten.

In dieser Arbeit wird die Darstellung der Halogenose analog einer literaturbekannten Vorschrift von *Montero*<sup>66</sup> und *Matta*<sup>67</sup> durchgeführt. Die an der anomeren Position acetylierte Galactose **33** wird bei Raumtemperatur unter einer Argon-Atmosphäre mit vier Äquivalenten Trimethylsilylbromid und 5 mol% Bismuth(III)bromid versetzt und drei Stunden gerührt (s. Abb. 3.4). Die Lewis-Säure  $\text{BiBr}_3$  erzeugt dabei durch Abstraktion eines Bromids des  $\text{TMSBr}$  ein Trimethylsilylkation. Dieses greift elektrophil am Carbonylsauerstoff der anomeren Acetylgruppe an, führt zu deren Austritt, und erzeugt dadurch am C1' eine positive Ladung. Durch die Rückbildung des Katalysators steht ein Bromid zur Verfügung, welches durch nukleophilen Angriff die Halogenose **36** bildet. Nach wässriger Aufarbeitung erhält man den Galactosylbaustein in reproduzierbar sehr hoher Ausbeute von 97%.



**Abb. 3.4** Synthese des Galactosylbromids **36**

a)  $\text{TMSBr}$ ,  $\text{BiBr}_3$  (5 mol%),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 20°C, 6d, 97%

<sup>64</sup> K. Peilstöcker, *Diplomarbeit* (1995), Universität Mainz

<sup>65</sup> H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.*, (1988), 75

<sup>66</sup> J. L. Montero, J. Y. Winum, A. Leydet, M. Kamal, A. A. Pavia, J. P. Roque, *Carbohydr. Res.*, **297** (1997), 175-180

<sup>67</sup> J. Xia, T. Srikrishnan, J. L. Alderfer, R. K. Jain, C. F. Piskorz, K. L. Matta, *Carbohydr. Res.*, **329** (2000), 561-577

### 3.1.3 Synthese des Arabinosebausteins

Um die Stabilität des Sialyl-Lewis<sup>a</sup>-Bausteins unter physiologischen Bedingungen zu erhöhen, wird die im nativen Liganden vorkommende L-Fucose durch die konfiguratив und konformativ weitgehend ähnliche D-Arabinopyranose ersetzt. Analog zu einer Vorschrift von Lönn<sup>68</sup> lässt sich D-Arabinose **37** in Pyridin unter langsamer Zugabe von Acetanhydrid quantitativ zu **38** acetylieren. Zur Einführung des Ethylthioglycosids muss aufgrund der Säurelabilität der Arabinose strikt auf die Einhaltung gewisser Reaktionsbedingungen geachtet werden.<sup>69</sup> In Anwesenheit von Ethanthiol wird die anomere Position mit Bortrifluoridetherat in Dichlormethan bei -15°C aktiviert. Steigt die Temperatur auf Raumtemperatur an, treten vermehrt Nebenprodukte auf. Sehr wichtig ist ebenfalls die Neutralisation des noch kalten Reaktionsansatzes mit zum eingesetzten Bortrifluoridetherat äquimolaren Mengen an Triethylamin. Trotz einer sehr genauen Kontrolle der Reaktionsbedingungen wird das Thioarabinosid **39** nur in einer mäßigen Ausbeute von 28% erhalten.

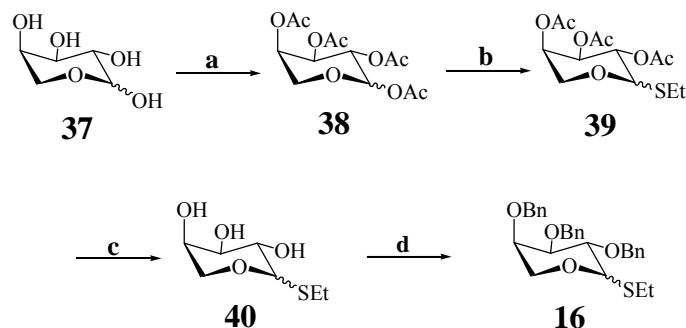


Abb. 3.5 Synthese des Arabinosebausteins **16**

a) Pyridin, Ac<sub>2</sub>O, 20°C, 3h, quant.; b) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtSH, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, -15°C, 5d, 28%; c) NaOMe / MeOH, Amberlyst15, 20h, 20°C, quant.; d) NaH, DMF, 0°C→20°C, BnBr, 6h, 20°C, 93% (2 Stufen)

Die anschließende Deblockierung unter Zemplén-Bedingungen liefert quantitativ das Ethylthioarabinosid **40** für die nachfolgende Veretherung der 2"-, 3"- und 4"-Position mit Natriumhydrid und Benzylbromid. Nach einer abschließenden Chromatographie erhält man die 1-Ethylthio-2,3,4-tri-O-benzyl-α,β-D-arabinopyranose **16** in einer Gesamtausbeute von 26%.

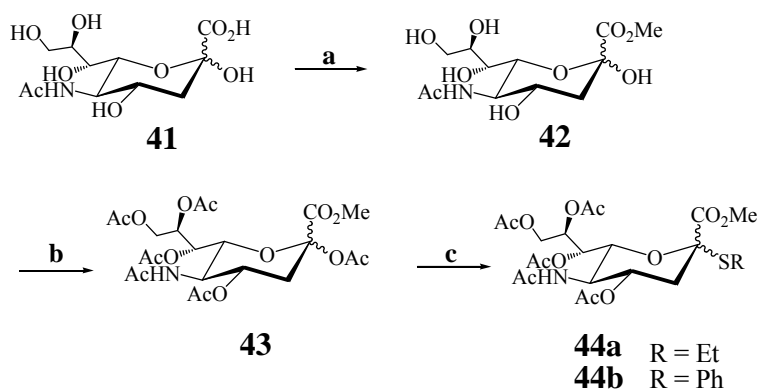
<sup>68</sup> H. Lönn, *Carbohydr. Res.*, **139** (1985),105-113

<sup>69</sup> M. Rösch, *Diplomarbeit* (1996), Universität Mainz

### 3.1.4 Synthese der Neuraminsäuredonoren

Für die direkte chemische Sialylierung existiert eine Reihe unterschiedlichster Donor-Promotorsysteme.<sup>70</sup> Die für Glykosylierungen oft verwendeten Bromide, Fluoride und Trichloracetimide spielen hierbei jedoch nur eine untergeordnete Rolle; vielmehr finden anomere Thioether und Ethoxydithiocarbonate (Ethylxanthogenate) bevorzugt Anwendung.

Die Synthese der 2-Thio- $\alpha,\beta$ -D-neuraminsäurederivate **44a,b** fußt auf Arbeiten von *A. Marra* und *P. Sinaÿ*.<sup>71</sup> Ausgehend von kommerziell erhältlicher N-Acetyl-D-neuraminsäure **41** lässt sich die freie Säurefunktion mit katalytischen Mengen saurem Ionenaustauscher in Methanol quantitativ zum Methyl ester umsetzen. Die anschließende Acetylierung der freien Hydroxygruppen unter Standardbedingungen zu Verbindung **43** gelingt glatt. Die Einführung der Thioabgangsgruppe mit Bortrifluoridetherat und dem entsprechenden Mercaptan verläuft in durchweg guten Ausbeuten.<sup>72</sup>



**Abb. 3.6** Synthese der Neuraminsäurederivate **44**

a) Dowex WX50, MeOH, 20°C, 8h, quant.; b) Pyridin, Ac<sub>2</sub>O, 20°C, 17h quant.; c) BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20°C, EtSH, 81% (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SH, 83%)

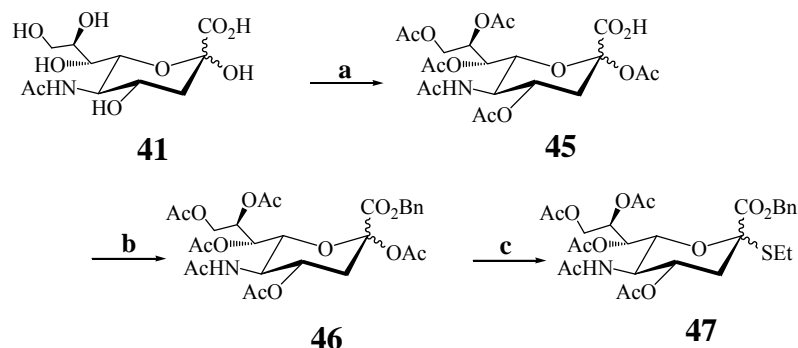
Wählt man als permanente Schutzgruppe der Säurefunktion einen hydrogenolytisch spaltbaren Benzylester, so muß die Synthese modifiziert werden (vgl. Abb. 3.7). Es werden zunächst alle Hydroxylfunktionen der N-Acetyl-D-neuraminsäure **41** mit Acetanhydrid in Pyridin (1:3) zu **45** acetyliert und dann die verbleibende Säurefunktion mit Cäsiumcarbonat in Ethanol in das entsprechende Salz überführt. Nach Wechsel des Lösemittels zu Dimethylformamid kann das Carboxylat in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit

<sup>70</sup> K. Okamoto, T. Goto, *Tetrahedron*, **46** (1990), 5835-5857

<sup>71</sup> A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.*, **187** (1989), 35-42

<sup>72</sup> S. Cao, S. J. Meunier, F. O. Andersson, M. Letellier, R. Roy, *Tetrah. Assym.*, **5** (1994), 2303-2312

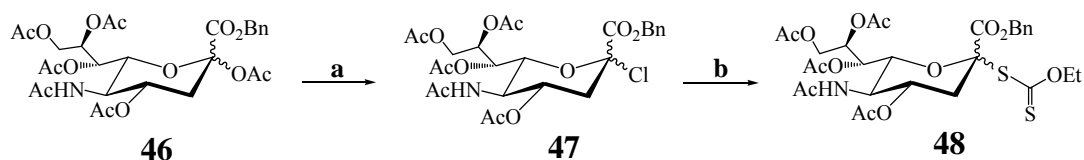
Benzylbromid zum Benzylester **46** reagieren.<sup>73</sup> Der Thioether **47** lässt sich über eine von  $\text{BF}_3$ \*Etherat vermittelte Substitutionsreaktion darstellen (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7** Synthese des Neuraminsäuredonors **47**

a) Pyridin,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 19h, quant.; b) 1.  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , EtOH,  $20^\circ\text{C}$ , 10 min; 2. BnBr, DMF,  $20^\circ\text{C}$ , 4h, 73%; c)  $\text{BF}_3$ \* OEt<sub>2</sub>, DCM, EtSH,  $20^\circ\text{C}$ , 78%

Von *Sinaÿ et al.*<sup>74,75,76</sup> wurden Xanthogenate als Donoren zur Glycosylierung primärer Hydroxygruppen verwendet. Das hier vorgestellte O-Ethylxanthogenat **48** erwies sich auch bei Sialylierungen zum Aufbau tumorassoziierter Antigene als geeignet.<sup>77</sup>



**Abb3.8** Synthese des Neuraminsäuredonors **48**

a)  $\text{AcCl}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 14h, quant.; b)  $\text{KSC}(\text{S})\text{OEt}$ , Aceton,  $20^\circ\text{C}$ , 60%

Ausgehend von dem bekannten peracetylierten Sialinsäurebenzylester **46** wird durch 20 stündiges Rühren in Acetylchlorid mit wenigen Tropfen Wasser das anomere Chlorid **47** dargestellt.<sup>78</sup> Durch eine einfache Substitutionsreaktion mit *Kalium-ethoxy-dithiocarbonat* als Nukleophil in Aceton erhält man das Xanthogenat **48** in einer akzeptablen Ausbeute von 60%.

<sup>73</sup> P. V. Nikrad, M. A. Kashum, K. B. Vlasishutz, G. Alton, A. P. Venot, *Carbohydr.Res.*, **250** (1993), 145-151

<sup>74</sup> A. Marra, L. K. Shishun, F. Gauffeny, P. Sinaÿ, *Synlett*, **8** (1990), 445-449

<sup>75</sup> P. Sinaÿ, *Pure Appl. Chem.*, **63** (1991), 519-528

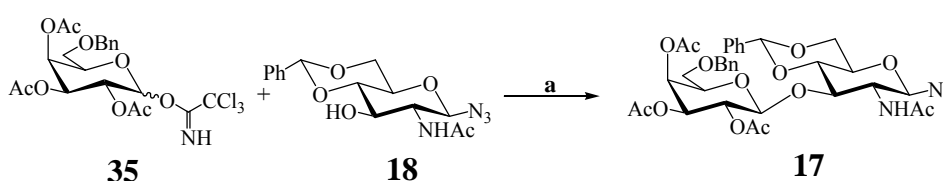
<sup>76</sup> A. Marra, F. Gauffeny, P. Sinaÿ, *Tetrahedron*, **47** (1991), 5149

<sup>77</sup> C. Brocke, *Dissertation* (2003), Universität Mainz

<sup>78</sup> V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, **61** (1996), 1702-1706

### 3.2 Lactosaminsynthese

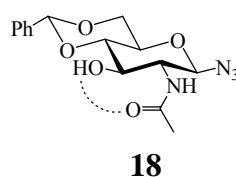
In ersten Versuchen wurde die Synthese des Lactosamindisaccharids **17** nach der Trichloracetimidatmethode angestrebt. Der Galactosyldonor **35** wird hierbei in eineinhalbfachem Überschuß zusammen mit dem Akzeptormolekül **18** in Dichlormethan gelöst. Man kühlt auf  $-15^{\circ}\text{C}$  ab und versetzt die Mischung tropfenweise mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure (TMS-Triflat).<sup>69</sup> Die Umsetzung verläuft sehr langsam.



**Abb. 3.9** Darstellung des Disaccharids Gal $\beta$ (1→3)GlcNAc **17** nach Schmitt

a) TMSOTf, DCM,  $-15^{\circ}\text{C}$ , 6d, 30%

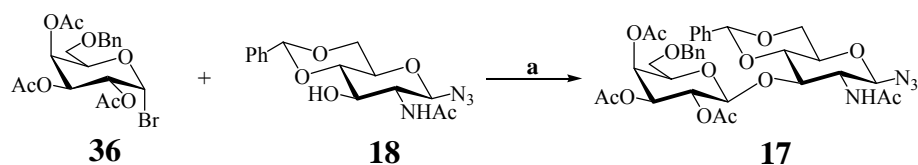
Wahrscheinlich bildet die freie Hydroxylgruppe des Glycosylakzeptors eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zur N-Acetylgruppe aus, was sowohl für die schlechte Löslichkeit in Dichlormethan als auch für die geschwächte Nucleophilie des Akzeptors verantwortlich sein könnte.<sup>64</sup>



**Abb. 3.10** Reaktivitätsminderung aufgrund einer intramolekularen Wasserstoffbrücke

Nach einer Reaktionszeit von insgesamt sechs Tagen wird neben dem gewünschten Zielmolekül auch die Bildung zahlreicher Nebenprodukte (Eliminierung von Essigsäure, Anhydridbildung) beobachtet. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung erhält man so in mäßigen Ausbeuten von 30% das vollständig geschützte Lactosaminderivat **17**.

Eine Alternative zur Trichloracetimidatmethode stellt das von *Koenigs* und *Knorr*<sup>79</sup> beschriebene Glykosylierungsverfahren dar. Allgemein versteht man darunter die Aktivierung von Halogenosen (Glykosylchloride und -bromide) mit Schwermetallsalzen wie Silber(I)oxid, oder Silber(I)carbonat. Nach zahlreichen Versuchen zur Optimierung wird diese Synthese unter *Helferich*-Bedingungen<sup>80</sup> mit Quecksilber(II)cyanid als Promotor in einem Gemisch aus Dichlormethan und Dichlorethan (1:1) durchgeführt. Den Galactosyldonor **36** erhält man, wie unter Kapitel 3.1.2 beschrieben, in nahezu quantitativen Ausbeuten. Der Glycosylakzeptor **18** wird mit ca. drei Äquivalenten Galactosylbromid **36** in dem genannten Lösemittelgemisch suspendiert, mit einer zum Donor äquimolaren Menge an  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  versetzt und unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluss 6 Tage gerührt. Gegenüber anderen Promotoren wie den erwähnten Silbersalzen hat Quecksilbercyanid den Vorteil, während der Synthese anstatt Wasser leicht flüchtige Blausäure freizusetzen, welche den Fortgang der Reaktion nicht behindert.



**Abb. 3.11** Darstellung des *Disaccharids* Galβ(1→3)GlcNAc **17** nach *Helferich*

a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$  (1:1),  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ , 20°C, 6d, 97%

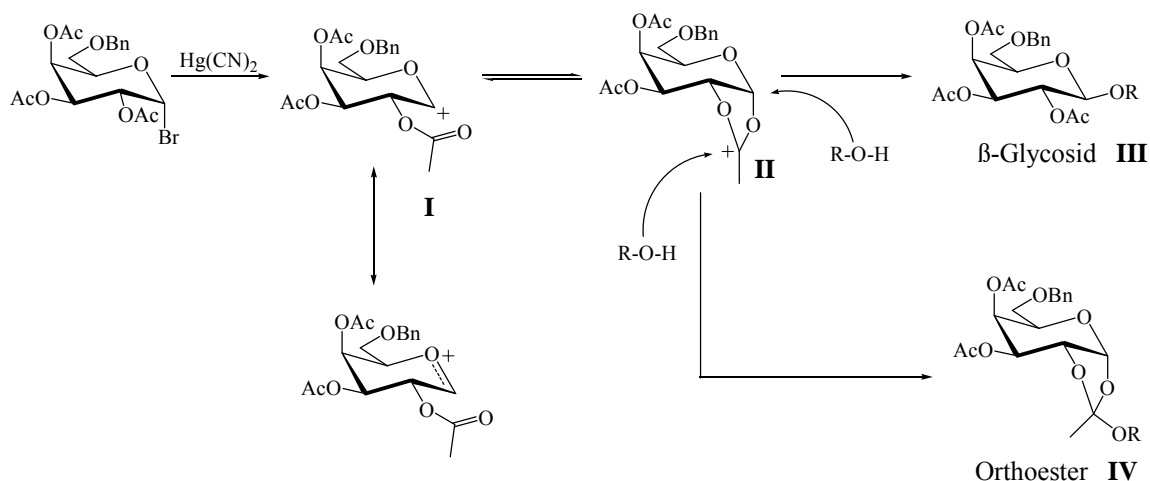
Durch die Verwendung von 1,2-Dichlorethan als Co-Solvens kann die Effizienz dieser Reaktion deutlich gesteigert werden. In dem sonst üblichen Dichlormethan/Nitromethan Gemisch werden lediglich Ausbeuten von 65% erreicht.<sup>64</sup>

Die ausschließliche Bildung der β-glykosidischen Bindung wird durch die nachbargruppenaktive Acetylschutzgruppe in 2-Position des Donors erreicht (vgl. Schema 3.1). Nach dem vom Promotor vermittelten Abgang der Fluchtgruppe greift die Ester-carbonylgruppe das gebildete Oxycarbeniumion **I** von der Unterseite her an, was zu einem Acyloxoniumion-Intermediat **II** führt. Dem Alkohol bleibt zum nukleophilen Angriff

<sup>79</sup> W. Koenigs, E. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Gesell.*, **34** (1901), 957-981

<sup>80</sup> B. Helferich, K. F. Wedemeyer, *Liebigs Ann. Chem.*, **563** (1949), 139

auf das anomere Zentrum aus sterischen Gründen bevorzugt die nichtabgeschirmte Oberseite, und nach Öffnung des cyclischen Acetals entsteht das 1,2-trans-orientierte  $\beta$ -Glykosid **III**. Greift die Alkoholkomponente am Dioxoleniumkohlenstoff an, so hat dies die Bildung des entsprechenden Orthoesters **IV** zur Folge.

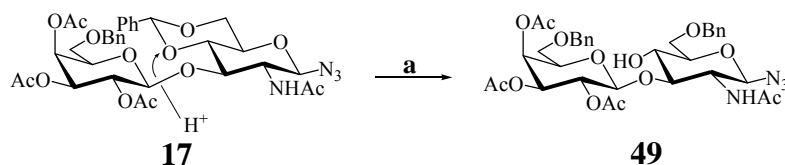


**Schema 3.1** Mechanismus der  $\beta$ -Glykosylierung und Orthoesterbildung

Die selektive  $\beta$ -Glykosylierung unter Bildung von **17** konnte durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Die diaxiale Kopplungskonstante der vicinalen Protonen H-1' und H-2' beträgt 7.72 Hz und ist damit deutlich größer als die für den Fall eines  $\alpha$ -Glycosids zu erwartende axial-äquatoriale Kopplung ( $J_{1,2} \sim 3\text{-}4$  Hz). Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung erhält man das Disaccharid in einer Ausbeute von 97%.

Die nachfolgende Öffnung des Benzylidenacetals<sup>81</sup> wird acidolytisch mit einer gesättigten Lösung von HCl in Ether und einem großen Überschuss (12 Äquivalente) an Natriumcyanoborhydrid durchgeführt. Der Chlorwasserstoff greift den sterisch abgeschirmten, aber basischeren sekundären Sauerstoff der 4-Position an und lenkt die Ringöffnung thermodynamisch zum 6-O-Benzyletherprodukt. Die Reaktion ist dabei so schonend, daß die anomere Azidogruppe nicht angegriffen wird. Um zu saure Bedingungen zu vermeiden, muss die Reaktion dünnschichtchromatographisch kontrolliert werden. Wird keine Umsatzsteigerung mehr beobachtet, neutralisiert man den Ansatz mit festem Natriumhydrogencarbonat und wäscht anschließend sorgfältig mit einer 5%igen Ethanolaminlösung.

<sup>81</sup> P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.*, **108** (1982), 97-101



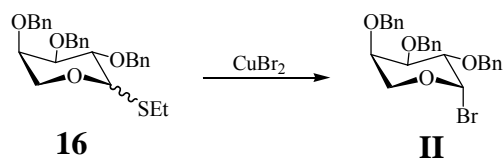
**Abb 3.12** Regioselektive Ringöffnung

a) HCl-Ether, NaCNBH<sub>3</sub>, THF, 0°C, 2d, 62%

Es ist auf dieser Stufe sehr wichtig, eventuell vorhandene borhaltige Verunreinigungen zu entfernen, da diese sich an die freien Hydroxygruppen anlagern und nachfolgende Glykosylierungen beeinträchtigen können. Nach zweifacher Chromatographie an Kieselgel kann das Produkt **49** in einer Ausbeute von 62% isoliert werden.

### 3.3 Synthese des Trisaccharids Lewis<sup>a</sup>

Zum regioselektiven Aufbau des Lewis<sup>a</sup>-Bausteins wird das perbenzylierte Ethylthioarabinosid **16** mit Kupfer(II)bromid und Tetrabutylammoniumbromid aktiviert. Nach einer Methode von *Ogawa*<sup>82</sup> können durch Zusatz von CuBr<sub>2</sub> stabile Thioglycoside in die reaktiveren Glycosylbromide überführt werden. Besonders bei großen Ansätzen hat sich diese indirekte Vorgehensweise im Vergleich zum Einsatz der instabileren Bromide bewährt.



**Schema 3.2** Bromierung nach *Ogawa*

Um den stereochemischen Ausgang der Glykosylierung in Richtung des gewünschten axialen Produkts zu lenken, wird das *in situ*-Anomerisierungsverfahren nach *Lemieux*<sup>83,84</sup> angewendet (s. Abb. 3.13). Das axiale Pyranosylhalogenid **II** liegt in einem durch Tetrabutyl-

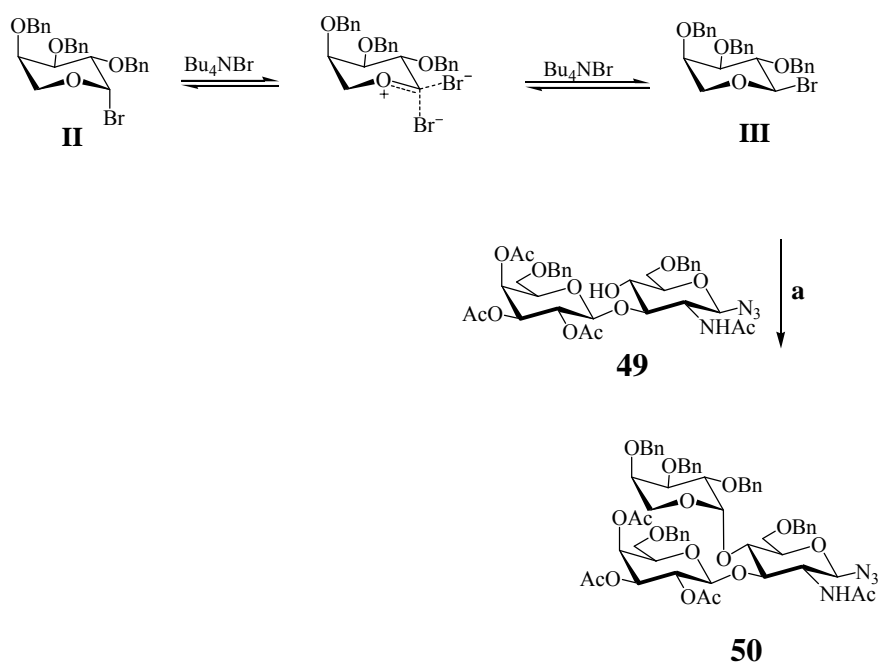
<sup>82</sup> S. Sato, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, **155** (1986), c6-c10

<sup>83</sup> R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **97** (1975), 4056-4062

<sup>84</sup> R. U. Lemieux, J. I. Haymi, *Can. J. Chem.*, **43** (1965), 2162-2173

ammoniumbromid vermittelten Gleichgewicht mit seinem reaktiveren  $\beta$ -Anomeren **III** vor. Letzteres reagiert sofort mit dem Disaccharidaktzeptor **49** unter Bildung einer neuen  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) arabinosidischen Bindung und wird dem Gleichgewicht entzogen.

Aufgrund der sterischen Hinderung an Position 4 des Glucosamins durch den Galactosylbaustein an Position 3 und den Benzylether an Position 6 wird die ohnehin geringe Reaktivität der äquatorialen Position 4 weiter gemindert. Der Arabinosebaustein **16** wird deshalb in dreieinhalbfachem Überschuß in die Synthese eingebracht.



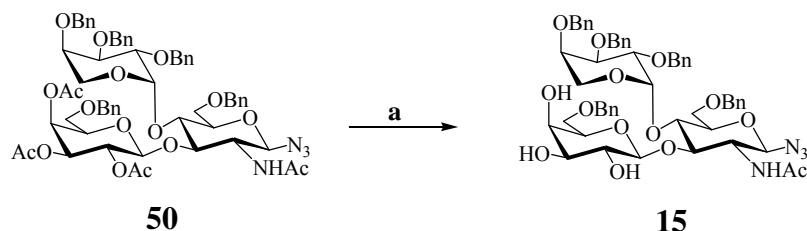
**Abb 3.13** Darstellung des vollständig geschützten *Arabino-Lewis<sup>a</sup>-Azid 50*

a)  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ , 20°C, 6d, 84%

Nach einer Reaktionsdauer von 6 Tagen wird die Reaktion abgebrochen und das blockierte Trisaccharid **50** in einer Ausbeute von 84% erhalten.

Da eine nachbargruppenaktive Schutzgruppe wie Acetyl oder Pivaloyl an C-2'' der Arabinose fehlt, bildet sich bevorzugt das  $\alpha$ -Glykosid. Die Kopplungskonstante der benachbarten Arabinosylprotonen H-1'' und H-2'' beträgt 3.6 Hz was, auf eine axial-äquatoriale Stellung der Protonen schließen lässt.

Um das Trisaccharid **50** weiter zu funktionalisieren, werden unter Zemplén-Umesterungsbedingungen die acetylichen Schutzgruppen der Positionen 2', 3' und 4' der Galactose entfernt. Anschließend kann die Sialinsäure regioselektiv eingeführt werden.

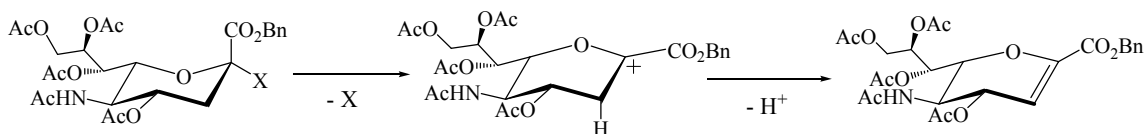


**Abb. 3.14** Entfernung der Acetylschutzgruppen nach Zemplén

a) NaOMe / MeOH, 20°C, 3h, 93%

### 3.4 Synthese des Tetrasaccharids *Arabino-Sialyl-Lewis<sup>a</sup>*

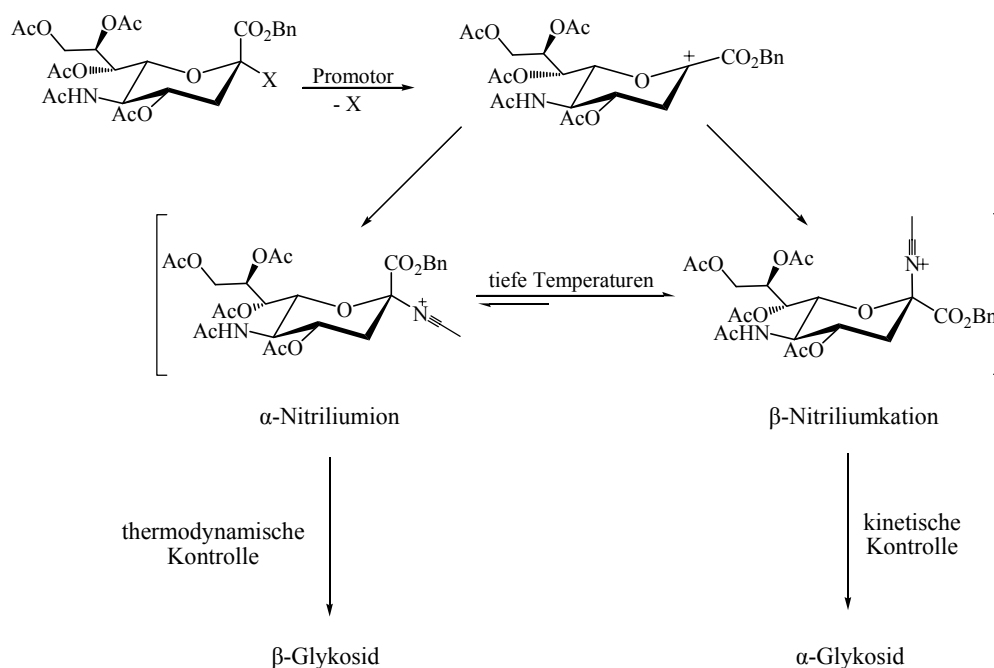
Das anomere Zentrum der Sialinsäure befindet sich in direkter Nachbarschaft zu einer Estergruppe. Dieser Ester, der als freie Carbonsäure einen großen Beitrag zur Wirksamkeit des Pharmakophors leistet, reduziert durch elektronische (-M/-I)-Effekte die Stabilität des nach Aktivierung gebildeten Glykosylkations und erleichtert dadurch die Bildung von Eliminierungsprodukten.



**Schema 3.3** Dehydroglycalbildung als Nebenreaktion nach Aktivierung

Um trotz dieser Nebenreaktion während der Glykosylierung ausreichende Äquivalente an Sialinsäuredonor zur Verfügung zu stellen, muß der wertvolle Baustein in zwei- bis dreifachem Überschuß eingesetzt werden. Ein weiteres Problem bei der Umsetzung der N-Acetyl-D-neuraminsäure ist das Fehlen eines dirigierenden Substituenten in 3"-Position des Kohlenhydratgerüsts, der durch Nachbargruppeneffekte die Bildung des  $\alpha$ -Anomeren bevorzugen könnte.

Die Steuerung der Reaktion in Richtung der gewünschten  $\alpha$ -Stereoselektivität kann jedoch durch die Wahl des Lösemittels und des Temperaturverlaufs entscheidend beeinflusst werden. Nach Aktivierung und Abspaltung der Abgangsgruppe X kann das entstandene Glykosylkation durch ein Lösemittelmolekül (Alkylnitril) koordiniert werden, wobei sowohl ein axiales als auch ein äquatoriales Nitriliumkonjugat gebildet wird. Senkt man die Temperatur unter  $-45^{\circ}\text{C}$  ab, so verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des kinetisch begünstigten  $\beta$ -Nitriliumions, welches schneller mit dem zu glycosylierenden Alkohol reagiert als das thermodynamisch stabilere  $\alpha$ -Nitriliumion. Durch diesen sogenannten *Nitril-Effekt*<sup>85,86</sup> können auch ohne Unterstützung dirigierender Nachbargruppen die gewünschten  $\alpha$ -Sialoside dargestellt werden.



**Schema 3.4** Stereoselektive Reaktionsführung der Sialylierung

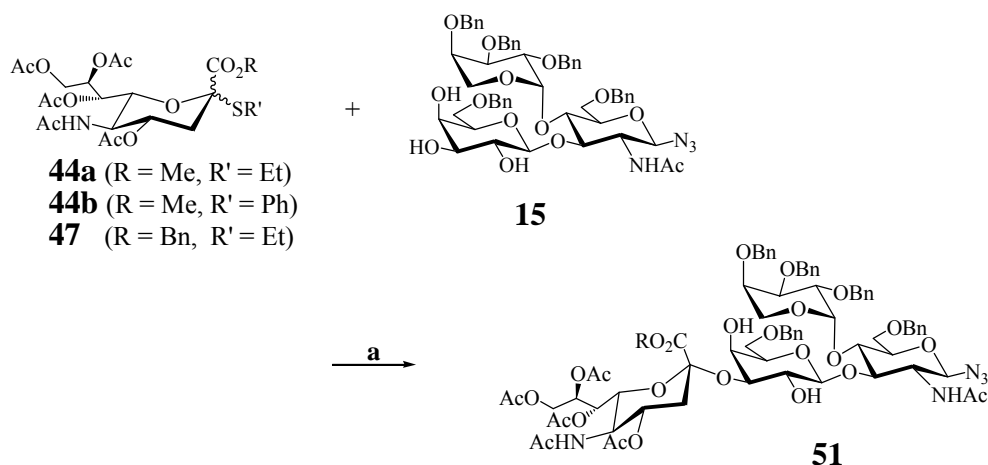
Die regioselektive Glykosylierung gelingt ohne weitere Schutzgruppenmanipulationen am Akzeptormolekül **15**, da die Reaktivität der 3'-Hydroxygruppe wesentlich höher ist als die der OH-Gruppen in den Positionen 2'- und 4'. Letztgenannte werden zusätzlich durch sterische Behinderung durch die Substituenten an Position 6' und 1' in ihrer Aktivität geschwächt.

<sup>85</sup> T. Murase, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.*, **184** (1988), c1-c4; *ibid.*, **188** (1989), 71-80

<sup>86</sup> A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.*, **10** (1991), 493

Die hier verwendeten Thioglykoside und Xanthogenate der Neuraminsäure finden aus mehreren Gründen Anwendung in der Kohlenhydratchemie. Sie sind in wenigen Stufen leicht zugänglich, bei Raumtemperatur stabil und zudem leicht zu handhaben. Die Aktivierung mit den Systemen N-Iodsuccinimid/Trifluormethansulfonsäure bzw. mit Methylsulfenylbromid / Silbertriflat hat sich als erfolgreich herausgestellt.<sup>87</sup>

Zur Synthese wird der überschüssige Thiodonor zusammen mit dem deacetylierten Trisaccharid unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss in absolutem Acetonitril gelöst und für eine Stunde über ausgeheiztem Molekularsieb gerührt. Nach Abkühlen auf  $-45^{\circ}\text{C}$  wird N-Iodsuccinimid in die Lösung eingebracht und vorsichtig mit Trifluormethansulfonsäure versetzt. Durch säureinduzierte Freisetzung von Iodkationen kommt es zum bevorzugten Angriff dieses weichen Elektrophils auf den ebenfalls weichen Schwefel und zur Erzeugung des gewünschten Glycosylkations. Der nukleophile Angriff der 3'-OH Position führt zur Bildung des geschützten Tetrasaccharids Arabino-Sialyl-Lewis<sup>a</sup> **51**.



**Abb. 3.15** Aufbau des *Arabino-Sialyl-Lewis<sup>a</sup>* über Thioglykoside

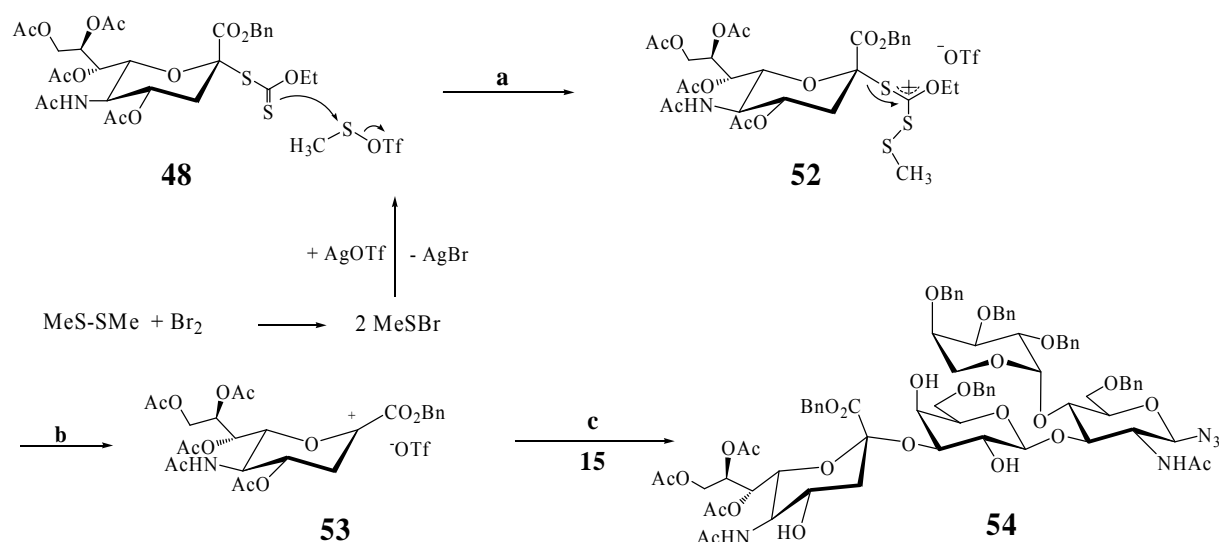
a)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $-45^{\circ}\text{C}$ , MS 3Å, NIS, TfOH, 3d, 14%-23%

Die für ähnliche Sialylierungen beobachteten Ausbeuten von 40-60% konnten für diesen speziellen Fall trotz umfangreicher Optimierungsversuche nicht erzielt werden. Nach Zugabe der Säure kann Produktbildung zwar beobachtet werden, die Reaktion bleibt jedoch ab einem gewissen Grad 'stehen' und lässt sich weder durch Erhöhen der Donor- noch der Akzeptorkonzentration weiter vorantreiben. Die Verwendung von höheren Säurekonzentrationen führt ebenso wie die Erhöhung der Reaktionstemperatur von  $-50^{\circ}\text{C}$  auf

<sup>87</sup> R. K. Jain, R. Vig, R. Rampal, E. V. Chandrasekrana, K. L. Matta, *J. Am. Chem. Soc.*, **116** (1994), 12123-12124

$-20^{\circ}\text{C}$ , zur Zersetzung des Donors. Das System aus Thioglykosiddonoren und Aktivierung durch Säure führte zu verlässlichen aber unbefriedigenden Ausbeuten von bis zu 23%, unabhängig von Abgangsgruppe (Thioethyl-, Thiophenyl-) oder Schutz der Säurefunktion (Methylester, Benzylester).

Mit Xanthogenaten als Alternative zu den Thioglycosiddonoren **44/47** kann die Sialinsäure in höheren Ausbeuten in die 3'-Position des Trisaccharids eingeführt werden. Zu den gängigen Aktivierungsreagenzien dieser Verbindungsklasse gehören thiophile Systeme wie z.B. NIS/TfOH, Dimethyl(methylthio)sulfonium-trifluormethansulfonat (DMTST) oder auch Methylsulfenyltriflat (MST). Wegen der höheren Effektivität in Bezug auf Ausbeute und  $\alpha$ -Stereoselektivität wird Methylsulfenyltriflat<sup>88</sup> zur Aktivierung dem DMTST vorgezogen. Die Vorstufe des Promotors MST, das Methylsulfenylbromid, wird *in situ* aus äquimolaren Mengen Dimethyldisulfid und Brom durch einfaches Rühren in absol. 1,2-Dichlorethan unter Lichtausschluss hergestellt und im Anschluss mit Silbertriflat zum Methylsulfenyltriflat umgesetzt. Durch die Ausbildung eines Disulfids mit dem Dithiocarbonat-Schwefelatom erzeugt das Methylsulfenyltriflat eine positive Ladung am Carbonylkohlenstoff, die letztlich in einer starken Polarisierung der C-2'''-S-Bindung und der Bildung eines intermediären Kations **53** resultiert. Der anschließende nukleophile Angriff des Alkohols **15** führt zur Bildung des Tetrasaccharids **54** (vgl. Abb. 3.16).



**Abb. 3.16** Aufbau des *Arabino-Sialyl-Lewis<sup>x</sup>* **54** über Neuraminsäurexanthogenat **48**

a)  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $-65^{\circ}\text{C}$ , MS 3 Å,  $\text{AgOTf}$ ,  $\text{MeSBr}$ , 3h, 23% - 37%

<sup>88</sup> F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.*, **177** (1988), c13-c17

Zur Synthese wird der Sialinsäuredonor zusammen mit dem Akzeptor in einem Gemisch aus Dichlormethan und Acetonitril (1:1.5) gelöst und in einem Kolben mit frisch ausgeheiztem Molekularsieb (3Å) bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Unter einem leichten Argon-Strom wird dann das Silbetriflat hinzugegeben und der Ansatz auf  $-65^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Im letzten Schritt wird die frisch hergestellte Methylsulphenylbromidlösung zugegeben. Der Verlauf der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und bereits nach drei Stunden kann die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden. Durch Zugabe von Hünigs Base wird der Ansatz neutralisiert. Nach Chromatographie konnte lediglich in einem Fall eine annehmbare Ausbeute von 37% erhalten werden, in zahlreichen, analogen Versuchen konnte die Ausbeute hingegen nie über 23% gesteigert werden.

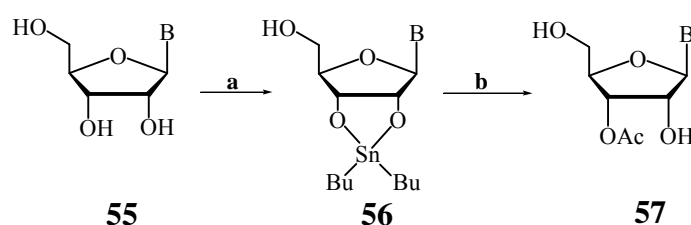
Da sich die Polarität des Neuraminsäureedukts **48**, des Produkts **54** sowie des als Nebenprodukt gebildeten Neuraminsäureglycals kaum unterscheiden und das Trisaccharid **15** zudem nicht komplett umgesetzt wird, muß der diffizilen Reaktionsführung eine umfangreiche Reinigung folgen. Durch eine erste Flash-Chromatographie mit Toluol/Methanol (10:1) als Eluens werden polare Nebenprodukte abgetrennt, das Produkt erhält man im Anschluss durch Schwerkraftchromatographie mit einem Laufmittelgemisch aus Methylenchlorid/Methanol (40:1). Im Falle des Benzylesters wird auf der Kieselgelsäule eine säurekatalysierte Esterspaltung und anschließende intramolekulare Lactonisierung mit den 2'- bzw. 4'- Hydroxygruppen beobachtet. Da das Lacton in einem Gleichgewicht mit der offenen Säurefunktion vorliegt, muß es mit polaren Lösemitteln (Methanol) von der Säule gewaschen werden.

Die Synthese des Arabino-Sialyl-Lewis<sup>a</sup>-Tetrasaccharids kann zwar durchgeführt werden, eine zufriedenstellende Ausbeute lässt sich unter den in anderen Fällen erfolgreichen Glykosylierungsbedingungen jedoch nicht erreichen. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Art des Neuraminsäuredonors. Der pharmakophore Beitrag der Sialinsäure zur Wirkung beruht auf der unter physiologischen Bedingungen deprotonierten Carbonsäurefunktion. Die Bereitstellung einer negativen Ladung durch  $\text{SO}_3^-$  oder  $\text{PO}_3^-$  sollte in biologischen Tests zu ähnlichen oder sogar besseren Bindungseigenschaften führen. Aus diesen Gründen wird als Alternative zur Sialylierung die Sulfatierung des Arabino-Lewis<sup>a</sup>-Trisaccharids **15** angestrebt.

### 3.5 Synthese von Arabino-3'-Sulfo-Lewis<sup>a</sup>

Die Einführung einer Sulfatgruppe an Stelle der Sialinsäure gestaltet sich, da auf die Stereoselektivität nicht geachtet werden muß, per se einfacher. Es bieten sich mehrere Möglichkeiten der Reaktionsführung an: An einfachen Zuckerbausteinen gelingt die Sulfatierung mit gebräuchlichen Reagenzien wie Sulfurylchlorid, Chlorsulfonsäure oder Schwefelsäure, man erhält bei mehreren freien Hydroxygruppen jedoch Mischungen aus ein- und mehrfachsulfatierten Produkten. Zudem wird auch von Zersetzungsreaktionen berichtet.<sup>89</sup> Eine schonendere Methode besteht im Einsatz von Schwefeltrioxid/Amin-Komplexen in Pyridin oder N,N-Dimethylformamid als Lösemittel. Zersetzungsprodukte treten nicht auf, doch gibt es widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Regioselektivität und Mehrfachsubstitutionen. *Matta*<sup>90</sup> berichtet von der selektiven Sulfatierung der 3'-OH-Position der Galactose in Lewis<sup>a</sup>- und Lewis<sup>x</sup>-Strukturen mit bis zu 10 Äquivalenten SO<sub>3</sub>/Pyridin-Komplex, ohne daß Mehrfachsulfatierungen auftreten. Genau diese Mehrfachsulfatierungen konnten aber von *Kunz et al.*<sup>91,92</sup> mit einer geringeren SO<sub>3</sub>/Pyridin-Konzentration an vergleichbaren Strukturen nachgewiesen werden.

Die Lösung dieses Problems bietet sich in Form der *Stannylene-Methode* an. Um Nucleoside selektiv zu acetylieren, setzte *Moffat*<sup>93</sup> bereits 1974 zur Aktivierung vicinaler Hydroxygruppen Dibutylzinnoxid ein. Dieses reagiert unter Wasserabspaltung zu einem cyclischen 2-Stannan-1,3-dioxolan **56**, und es zeigt sich, daß nach dieser Behandlung eine der beiden „geschützten“ OH-Gruppen bevorzugt acetyliert wird. Auch die selektive Alkylierung mit Benzylhalogeniden oder die Bildung von Sulfonylen mit *p*-Toluolsulfonsäure ist auf diese Weise möglich (vgl. Abb. 3.17).



**Abb. 3.17** Aktivierung von Nucleosiden durch Dibutylzinnoxid

a) Bu<sub>2</sub>SnO, MeOH, 65°C, 30 min; b) Ac<sub>2</sub>O, DMF, 0°C, 4h, 54%

<sup>89</sup> J. R. Turvey, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **20** (1965), 183-218

<sup>90</sup> R. K. Jain, R. Vig, R. D. Lock, A. Mohamad, K. L. Matta, *J. Chem. Comm.*, (1996), 65-67

<sup>91</sup> W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretschmar, D. W. Schmidt, H. Kunz, *J. prakt. Chem.*, **337** (1995), 441-445

<sup>92</sup> O. Knöll, *Dissertation*, (2004), Universität Mainz

<sup>93</sup> D. Wagner, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffat, *J. Org. Chem.*, **39** (1974), 24-30

Bereits zwei Jahre später wurde die Methode für die regioselektive Benzylierung von 1,2-cis-Diolen verwendet und auf Kohlenhydrate übertragen.<sup>94a-d</sup> Die Kombination aus Aktivierung mit Dibutylzinnoxid und anschließender Sulfatierung gelang 1994 unabhängig voneinander *Flitsch*<sup>95</sup> und *Lubineau*<sup>96</sup>. Analog zu den Ergebnissen aus diesen Veröffentlichungen ist eine 3'-OH-Sulfatierung des Arabinosyl-Lewis<sup>a</sup>-Bausteins **15** in sehr guten Ausbeuten und einer exzellenten Regioselektivität möglich (vgl. Abb. 3.19). Nach Bildung des 1,3-Dioxostannans **58** entfernt man das Lösemittel im Vakuum, codestilliert zweimal mit Toluol, um letzte Wasserspuren zu entfernen, und setzt das Stannylenacetal ohne weitere Reinigung mit 1.1 Äquivalenten SO<sub>3</sub>/NMe<sub>3</sub>-Komplex in N,N-Dimethylformamid bei Raumtemperatur um. Nach 14 Stunden Rühren unter Schutzgas wird das Lösemittel entfernt und das Intermediat mit Methanol und Essigester hydrolysiert. Eine anschließende Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (15:1) liefert das Produkt in sehr guten Ausbeuten.

Der genaue Mechanismus der Aktivierung konnte bisher noch nicht geklärt werden, doch Röntgenstrukturuntersuchungen deuten darauf hin, daß die Komplexierung durch Zinn zur Bildung von Dimeren trigonal-bipyramidaler Struktur führt, in denen die Butylgruppen die äquatorialen Positionen besetzen (s. Abb. 3.18).<sup>97</sup>

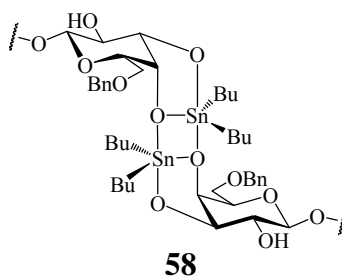


Abb. 3.18 Postulierte Dimerstruktur des Stannylenacetals

Der elektroneivere der beiden Sauerstoffe steht an der Spitze der Bipyramide und ist nur an ein Zinn-Zentrum koordiniert, wohingegen der weniger elektronegative 4'-Sauerstoff in eine

<sup>94</sup> a) C. Augé, S. David, A. Veyrières, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1976), 375-376

b) R. M. Munavu, H. H. Szmant, *J. Org. Chem.*, **41** (1976), 1832-1836

c) M. A. Nashed, L. Anderson, *Tetrahedron Lett.*, (1976), 3503-3506

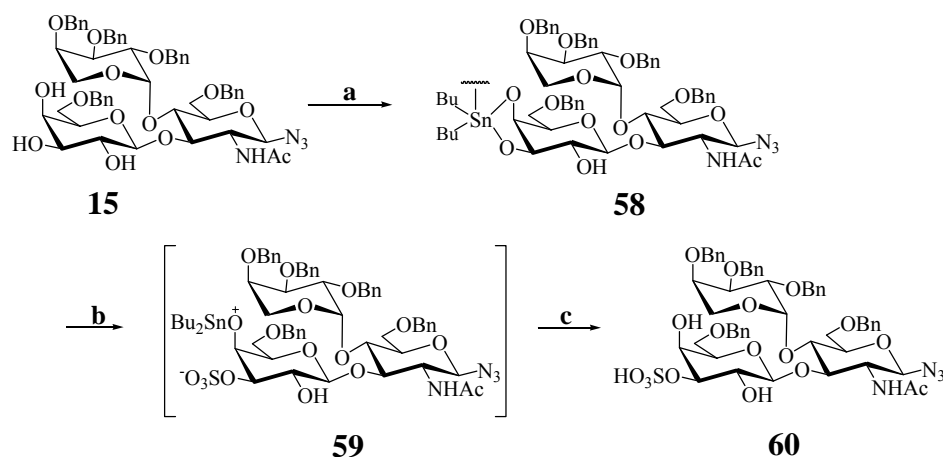
d) M. A. Nashed, L. Anderson, *Carbohydr. Res.*, **56** (1977), 325-329

<sup>95</sup> B. Guilbert, N. J. Davis, S. L. Flitsch, *Tetrahed. Lett.*, **35** (1994), 6563-6566

<sup>96</sup> A. Lubineau, R. Lemoine, *Tetrahedron. Lett.*, **35** (1994), 8795-8796

<sup>97</sup> S. J. Blunden, P.A. Cusack, P. J. Smith, *J. Organomet. Chem.*, **325** (1987), 141-152

$\text{Sn}_2\text{O}_2$ -Brücke eingebunden ist.<sup>98</sup> Die intrinsisch höhere Reaktivität der 3'-Position wird durch die Koordination bestimmt.

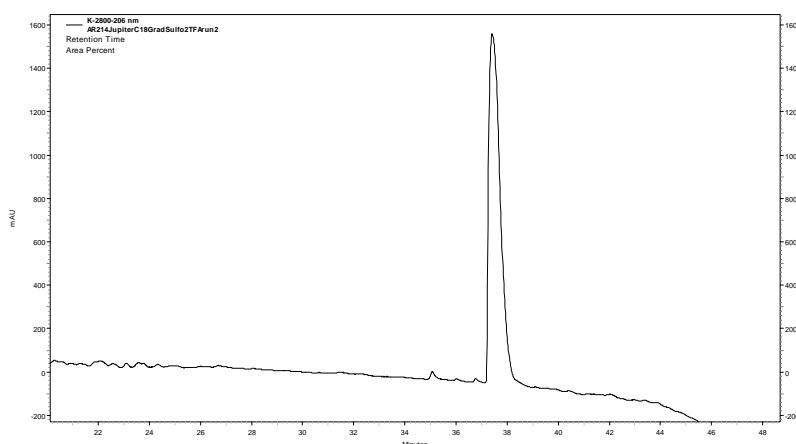


**Abb. 3.19** Regioselektive Sulfatierung und Synthese von **60**

a)  $\text{SnBu}_2\text{O}$ , MeOH, 65°C, 4h; b)  $\text{SO}_3/\text{NMe}_3$ , DMF, 20°C, 14h; c) MeOH / EE, 20°C, 91%

Wahrscheinlich reicht die Säurestärke des Kieselgels bereits aus, um die an dem Schwefelsäureanion komplexierte Base gegen ein Proton auszutauschen

Abbildung 3.20 zeigt das HPLC-Chromatogramm des sulfatierten Arabino-Lewis<sup>a</sup> **60** und belegt überzeugend den Nutzen der vorherigen Komplexierung durch Dibutylzinnoxid. Nach Flash-Chromatographie kann nur ein einziges Produkt nachgewiesen werden. Ein zusätzliches monosulfatiertes Regioisomer dieser Verbindung wäre chromatographisch nicht abtrennbar, es müsste durch analytische HPLC aber nachzuweisen sein.



**Abb. 3.20** Analytische HPLC von **60** (JupiterC18, Gradient B);  $R_t = 38.3$  min

<sup>98</sup> S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron*, **41** (1985), 643-663

Die Charakterisierung des 3'-Sulfo-Arabinosyl-Lewis<sup>a</sup>-Azids **60** geschieht auf der Grundlage einer genauen Zuordnung der NMR-Signale der Ausgangsverbindung **15**. Da das dreifach deblockierte Trisaccharid **15** sehr starke Tendenzen zur Bildung inter- und intramolekularer Wasserstoffbrücken zeigt, lässt sich mit Dimethylsulfoxid-*d*<sub>6</sub> als Lösemittel die beste Auflösung der kernmagnetischen Resonanz erzielen. Durch Wechselwirkungen mit den Lösemittelmolekülen wird der Protonenaustausch so stark verlangsamt, daß sogar Kopplungen der OH-Protonen zu  $\alpha$ -ständigen Protonen beobachtet werden können. (In diesem Falle beträgt die Kopplung  ${}^3J_{2'OH,H2'}=2.48\text{Hz}$ ). Durch korrelierte HMQC-, ROESY- und NOESY-Experimente ist die genaue Strukturaufklärung der Ausgangsverbindung möglich.

Beim Vergleich der NMR-Spektren von Lewis<sup>a</sup> **15** und 3'-Sulfo-Lewis<sup>a</sup> **60** wird erwartet, dass der stark elektronenziehende Substituent  $SO_3^-$  die magnetische Abschirmung an dem  $\alpha$ -CH in 3'-Position stark herabsetzt und dadurch die chemische Verschiebung für dieses C-Atom um mehrere ppm zunehmen wird. Die chemische Verschiebung der Signale der nachbarständigen Kohlenstoffatome sollte hingegen kaum zunehmen. Wie aus Tabelle 3.1 ersichtlich, kann diese Vorhersage bestätigt werden. Die Signale des C-3' wird um 6 ppm zu höheren  $\delta$ -Werten verschoben, die  $\delta$ -Werte der Signale der Nachbaratome C-2' und C-4' nehmen sogar leicht ab. Für die Protonenresonanzen sollten die gleichen Tendenzen gelten, wenn auch in abgeschwächter Form. Die experimentell gefundenen Daten für die chemische Verschiebung des unmittelbar am  $\alpha$ -Kohlenstoff gebundenen Protons und der Nachbarprotonen stützen die theoretischen Überlegungen.

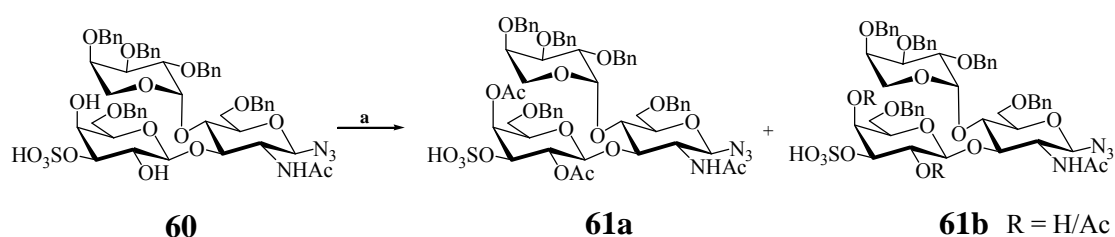
Galactose	<b>15</b>		<b>60</b>		<b>61</b>	
	<sup>13</sup> C [ppm]	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>13</sup> C [ppm]	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>13</sup> C [ppm]	<sup>1</sup> H [ppm]
Pos. 2'	70.34	3.35	69.09	3.51	69.23	4.77
Pos. 3'	73.20	3.28	79.20	3.80	73.70	4.19
Pos. 4'	68.01	3.61	66.29	3.85	69.23	5.40

**Tab. 3.1** Chemische Verschiebung der <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Signale an den Galactosylresten von Verbindung **15**, **60** und **61**  
600 MHz <sup>1</sup>H-NMR / 150.9 MHz <sup>13</sup>C-NMR; DMSO-*d*<sub>6</sub>

Um weitere Rückschlüsse auf die Struktur von **60** ziehen zu können, ist es von Vorteil, die Verbindung zu modifizieren. Der Eingriff in das Molekül darf aber nicht zu groß sein, und deshalb hat sich in der Kohlenhydratchemie neben dem H/D-Austausch die Acetylierung freier OH-Gruppen bewährt.<sup>99</sup>

Die Acetylierung unter Standardbedingungen zeigt bei dünnschichtchromatographischer Analyse zunächst einen quantitativen Verlauf der Reaktion an, doch können durch analytische HPLC zwei Produkte mit sehr ähnlichen Retentionszeiten detektiert werden. Durch ESI-Massenspektroskopie lassen sich diesen beiden Produkten die Massen des di- und die des monoacetylierten Kohlenhydrates **61a** bzw. **61b** zuweisen (s. Abb. 3.21). Das Verhältnis beider Verbindungen zueinander wird durch analytische HPLC zu 5:1 bestimmt.

Für die Acetylierung der freien OH-Gruppen an C-2' und C-4' gelten im Prinzip dieselben Überlegungen wie bereits im Falle des Sulfats beschrieben, nur dass aufgrund des geringeren -I-Effektes des Acetylrestes die elektromagnetische Abschirmung nicht ganz so ausgeprägt sein sollte wie im sulfatierten Molekül **60**. Diese Prognose wird ebenfalls bestätigt, die  $\delta$ -Werte der Signale nehmen um 0.15 bzw. 3 ppm zu. Bemerkenswert ist auch in diesem Fall die Abnahme der chemischen Verschiebung des direkten Nachbaratoms C-3', diese fällt annähernd auf den ursprünglichen Wert von 73.20 ppm zurück ( $\delta = 73.70$  ppm).



**Abb. 3.21** Acetylierung von **60**

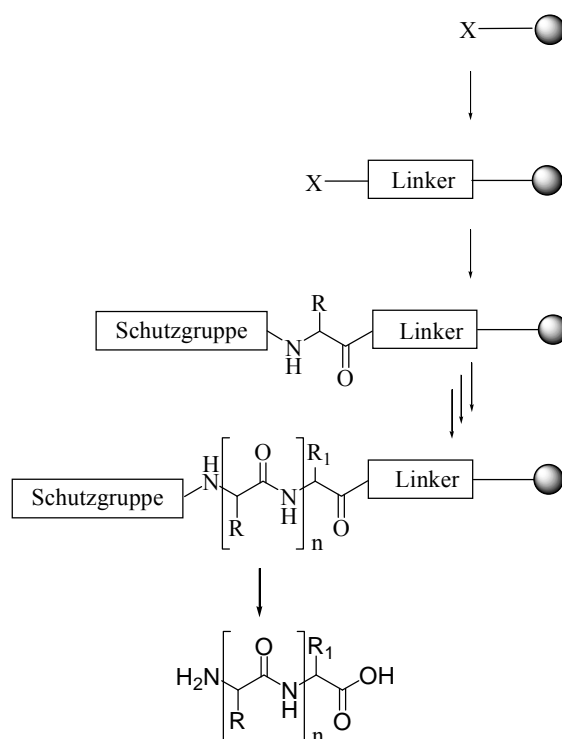
a) Pyridin/Ac<sub>2</sub>O, 20°C, 15h, 95%, (a:b) ≈ (5:1)

<sup>99</sup> H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, **3. Auflage**, Weinheim, Wiley-VCH, (1999)

Da bisher keinerlei Erfahrung im Umgang mit solch komplexen Kohlenhydraten besteht und eine Wanderung der Sulfatgruppe auf die benachbarten Hydroxyfunktionen nicht auszuschließen ist, wurde der temporäre Schutz der Hydroxylgruppen durch Acetylierung für die nachfolgenden Umsetzungen, besonders während der Festphasensynthese, erwogen. Aus früheren Arbeiten ist jedoch bekannt, daß die Entfernung acetylischer Schutzgruppen an den Positionen 2' und 4' der Galactose in Gegenwart eines 6'-Benzylethers sehr problematisch ist und nicht immer vollständig abläuft. Aus diesen Gründen wird auf den temporären Schutz der 2'-OH- und 4'-OH-Gruppen von **60** durch Acetylierung verzichtet.

### 3.6 Das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese

Für die chemische Synthese so komplexer Moleküle, wie es das Zielmolekül **11** verkörpert, wird das Prinzip der Festphasensynthese nach Merrifield<sup>100</sup> angewendet. Die Reaktionen werden dabei nicht in Lösung, sondern an einem Polymerharz, der sogenannten festen Phase, durchgeführt. Eine N-terminal blockierte Aminosäure wird über ihre Carboxylgruppe an ein unlösliches, leicht filtrierbares Polymer geknüpft. Die Anbindung geschieht nicht direkt, sondern wird über einen definierten Anker (engl.: *linker*) und ggf. einen Spacer erreicht. Es folgt die selektive Entfernung der N<sup>α</sup>-Aminoschutzgruppe und die Umsetzung des resultierenden <sup>α</sup>Aminoacyl-Polymers mit der nächsten N<sup>α</sup>-geschützten Aminosäure. Um Deletionssequenzen innerhalb des Peptids zu vermeiden, werden nichtumgesetzte Aminofunktionen acetyliert und so weiteren Reaktionen entzogen. Durch eine repetitive Vorgehensweise erhält man ein vollständig geschütztes, an den polymeren Träger gebundenes Peptid, das abschließend durch geeignete Abspaltung des Ankers vom polymeren Träger gelöst wird. Durch einfache Filtration trennt man das Polymer ab und erhält das geschützte Peptid. Die Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionalitäten können entweder vor, simultan zu oder nach der Abspaltung entfernt werden.



**Schema 3.5** Prinzip der Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield

<sup>100</sup> R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (1963), 2149

Durch die Immobilisierung des "wachsenden" Peptids auf dem polymeren Träger entfällt die aufwendige Reinigung der Zwischenstufen. Hohe Ausbeuten können durch den Einsatz großer Überschüsse an den meist einfachen Aminosäurebausteinen und Kupplungsreagenzien erzielt werden, zumal überschüssige Reagenzien und etwaige Nebenprodukte durch einfache Waschschrte entfernt werden. Die simplen Operationen erlauben es zudem, den kompletten Prozess zu automatisieren.

### 3.6.1 Strategien für die Festphasenpeptidsynthese

Zum Aufbau (komplexer) Peptidstrukturen wurden in den letzten 40 Jahren zwei komplementäre Ansätze entwickelt.

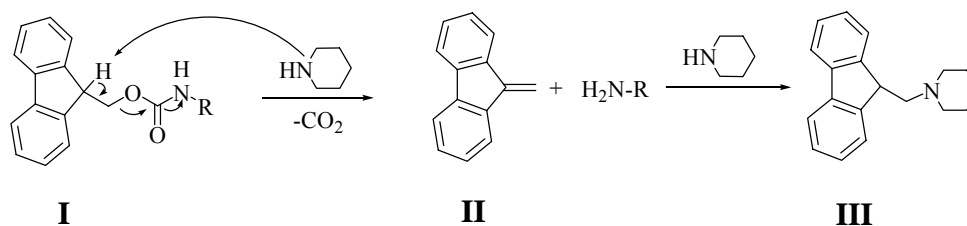
Die *Boc*-Strategie beruht auf der unterschiedlichen Säureempfindlichkeit der N-terminal verwendeten *Butyloxycarbonyl*gruppe und den Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionen. Unter den Bedingungen der wiederholten acidolytischen Abspaltung der Boc-Gruppe (50-95% TFA) müssen die temporären Schutzgruppen stabil bleiben. Da die Abspaltbedingungen sehr harsch sind, wird von dieser Methode jedoch immer weniger Gebrauch gemacht.

Eine mildere und zudem zweidimensional orthogonale Vorgehensweise wird nach der *Fmoc*-Strategie<sup>101</sup> verfolgt. Die N-terminale *Fluorenylmethoxycarbonyl*gruppe kann durch sekundäre Basen wie Morpholin<sup>102</sup> oder Piperidin<sup>103</sup> abgespalten werden, säurelabile Schutzgruppen (*tert.*-Butyl, Trityl) oder hydrogenolytisch spaltbare Schutzgruppen (Benzylester, -ether) bleiben unter diesen Bedingungen hingegen stabil und werden erst während bzw. nach der Synthese gezielt abgespalten. Die Vorgehensweise ist in Schema 3.6 gezeigt: die Abspaltung des CH-aciden Wasserstoffatoms an Position 9 des Fluorenylgerüsts **I** resultiert in der Bildung eines stabilen Dibenzofulven-Basen Adduktes **III**. Die UV-Absorption des tertiären Amins wird während der Reaktion zur Kontrolle der vorhergehenden Kupplung verwendet.

<sup>101</sup> L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **92** (1970), 5748-5749

<sup>102</sup> P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **22** (1983), 62-63

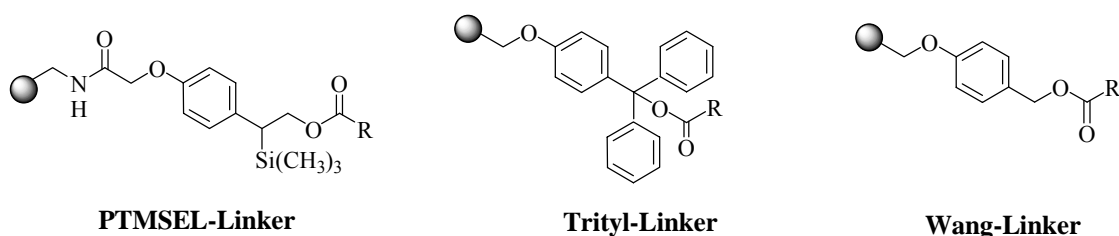
<sup>103</sup> B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron*, **41** (1985), 1939-1943



**Schema 3.6** Baseninduzierte Abspaltung der Fmoc-Gruppe

Für die Fmoc-Strategie ist ein basenstabiler Anker eine entscheidende Voraussetzung. Es haben sich dafür die kommerziell erhältlichen Wang-Harze etabliert, deren Anker durch 50-95% Trifluoressigsäure gespalten werden. Alle säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten werden bei der Spaltung dieses Ankers ebenfalls entfernt.<sup>104</sup> Der deutlich labilere Tritylanker erlaubt dagegen das Abspalten vom Harz unter Beibehaltung der weniger säurelabilen Schutzgruppen (vgl. Abb. 3.22).<sup>105</sup>

Ein weiterer basenstabiler Anker steht in dem fluoridlabilen PTMSEL-Anker<sup>106</sup> zur Verfügung. Nach erfolgreicher Synthese wird der Anker unter nahezu neutralen Bedingungen mit Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat in Dichlormethan schonend abgespalten. Nach wässriger Aufarbeitung wird das Glycopeptid erhalten.



**Abb. 3.22** Verschiedene Ankersysteme für die Festphasensynthese

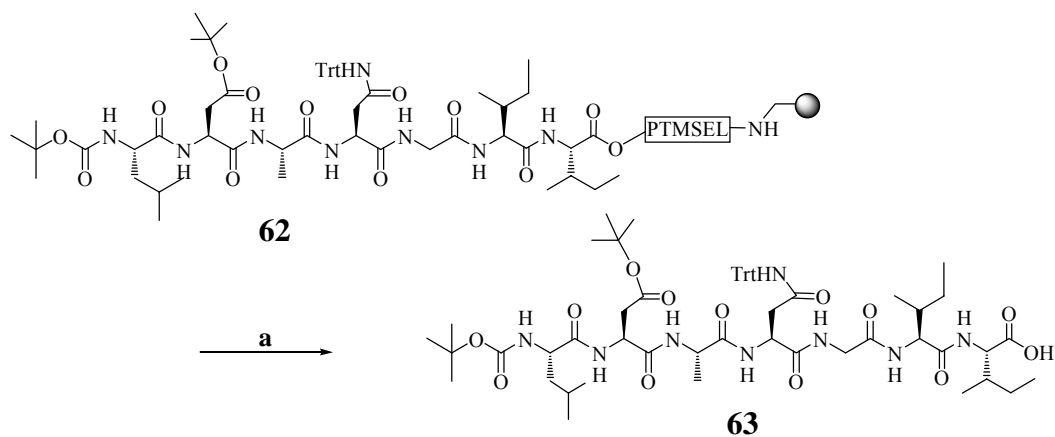
Mit dem PTMSEL-Ankersystem ist eine orthogonale, dreidimensionale Schutzgruppenstrategie möglich, da alle in der Peptidchemie gebräuchlichen Schutzgruppen wie Fmoc, Boc, Alloc, *tert.*Butyl, Benzyl, Allyl, Trityl und Acetyl unter den herrschenden Bedingungen der fluoridinduzierten Abspaltung stabil sind. Der Nutzen dieses Ankers konnte bereits bei kleineren Oligopeptiden und einfachen N-Glycopeptiden unter Beweis gestellt werden.<sup>107</sup>

<sup>104</sup> S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (1973), 1328-1333

<sup>105</sup> K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37** (1991), 513-520

<sup>106</sup> M. Wagner, H. Kunz, *Angew. Chem.*, **114** (2002), 315-319

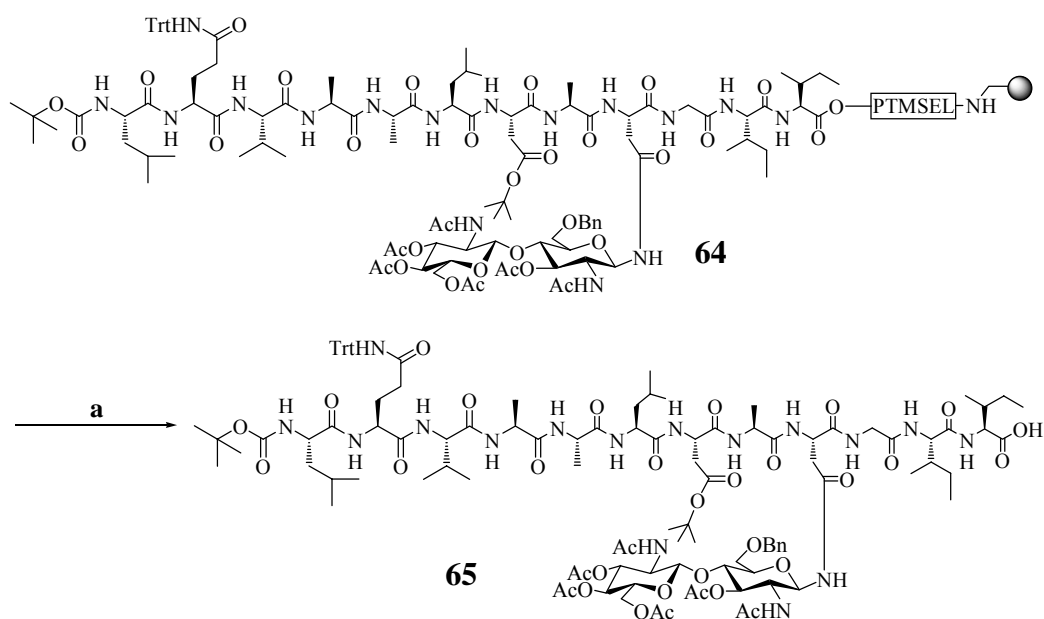
<sup>107</sup> M. Wagner, *Dissertation*, (2001) Universität Mainz



**Abb. 3.23** Abspaltung eines Heptapeptids **63** vom PTMSEL-Linker<sup>107</sup>

a) TBAF+3H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20°C, 15 min, 90%

In sehr guten Ausbeuten konnte mit diesem Ankersystem beispielsweise das komplett geschützte Heptapeptid **63** dargestellt werden, zumal die Bildung von Nebenprodukten wie Aspartimiden oder Diketopiperazinen sehr effektiv unterdrückt wird (s. auch 3.6.2).



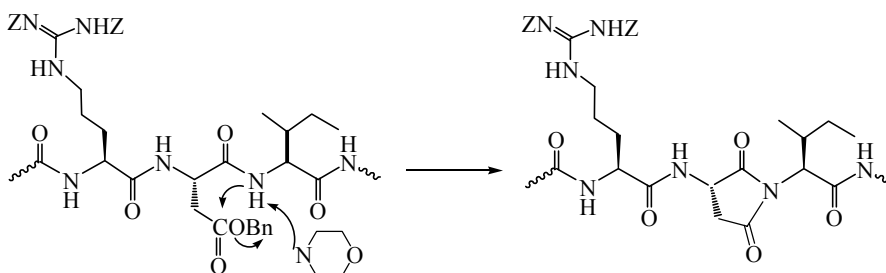
**Abb. 3.24** Abspaltung des Glycododecapeptids **65** vom PTMSEL-Linker<sup>107</sup>

a) TBAF+3H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20°C, 15 min, 29%

### 3.6.2 Problematische Nebenreaktionen in der Peptidsynthese

#### 3.6.2.1 Aspartimidbildung

Zu den am häufigsten beobachteten Nebenreaktionen bei Peptidsynthesen mit Asparaginsäurederivaten gehört die Aspartimidbildung (vgl. Schema 3.7). Während der baseninduzierten Fmoc-Abspaltung kann die Base ein Proton vom C-terminal gebundenen Amid-Stickstoff abstrahieren, der dann den Carbonylkohlenstoff der Asparaginsäureseitenkette nukleophil angreift. Unter Austritt der Schutzgruppe als Alkoholat bildet sich das Aspartimid, das auch unter den Bedingungen der Festphasensynthese weiter stabil bleibt. Da der Angriff des Nucleophils auf den  $\beta$ -Carbonylkohlenstoff eine bestimmte Konformation voraussetzt, ist diese Nebenreaktion sequenzabhängig. Sequenzen wie Asp-Gly, Asp-Ser, Asp-Asn(Trt), Asp-Thr(OtBu) und Asp-Ala sind besonders anfällig.<sup>108</sup>



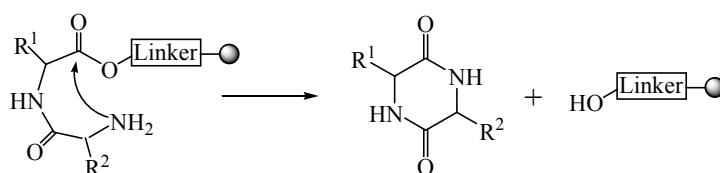
Schema 3.7 Baseninduzierte Aspartimidbildung

#### 3.6.2.2 Diketopiperazinbildung

Eine weitere bei der Peptidsynthese häufig auftretende Nebenreaktion ist die Diketopiperazinbildung (vgl. Schema 3.8). Auf der Stufe des am polymeren Träger gebundenen Dipeptids kann eine Aminolyse stattfinden, indem das von der Schutzgruppe befreite terminale Amin den Carboxyterminus nukleophil angreift, wodurch sich das Dipeptid unter Ausbildung eines Diketopiperazins vom Harz ablöst. Die Anknüpfungen weitere Aminosäuren wird dadurch unterbunden. Begünstigt wird die Diketopiperazinbildung zum einen durch sterisch weniger anspruchsvolle Ankergruppen, zum anderen aber auch durch Startaminoacids wie Prolin und Glycin. Vor allem Dipeptide des Typs Pro-Gly, Tyr-Pro, und

<sup>108</sup> Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thörnquist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.*, **35** (1994), 9689

Pro-Pro gelten als besonders anfällig. Eine Unterdrückung der Diketopiperazinbildung wird durch die Verwendung einer Boc-geschützten Aminosäure (als zweite Aminosäure) angestrebt. Ist dies wegen säurelabiler Schutzgruppen bzw. Anker nicht möglich, werden die zweite und dritte Aminosäure gleichzeitig als Dipeptid angeknüpft. Über den Einsatz sterisch anspruchsvoller Ankergruppen vom Trityl- oder PTMSEL-Typ kann die Diketopiperazinbildung ebenfalls sehr wirkungsvoll unterdrückt werden.



**Schema 3.8** Diketopiperazinbildung auf der Stufe des Dipeptids

### 3.7 Synthese von Glycosylaminosäuren für die Festphasensynthese

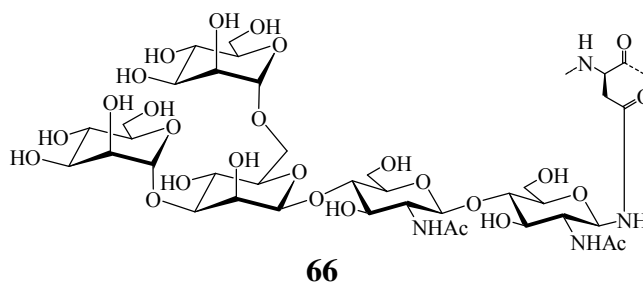
Glycopeptide sind an vielen regulatorischen Prozessen, wie dem Zellwachstum, der intrazellulären Kommunikation und der Zellmetastase beteiligt. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Zelladhäsions-Molekülen haben Glycopeptide auch für Untersuchungen an tumorassoziierten Antigenen oder Blutgruppenderminanten Bedeutung.<sup>109,110</sup>

Vornehmlich lassen sich zwei Arten der Glycosylierung bei Glycopeptiden unterscheiden. In den *O-Glycopeptiden* werden die Kohlenhydratseitenketten kovalent an ein Serin oder Threonin gebunden. Die *N-glykosidische* Bindung in N-Glycoproteinen findet ausschließlich an Asparaginsäure und innerhalb einer charakteristischen Aminosäuresequenz vom Typ *-Asn-Xaa-Ser/Thr-* (*Xaa* ≠ Pro) statt. In der Natur wird die Asparaginsäure  $\beta$ -ständig an ein N-Acetylglucosamin geknüpft, welches selbst Teil einer weitverzweigten Oligosaccharidstruktur

<sup>109</sup> H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.*, **218** (1993), 1

<sup>110</sup> R.A. Dwek, *Chem Rev*, **96** (1996), 683-720

**66** ist (s. Abb. 3.25). Zum Aufbau synthetischer N-Glycopeptide wird deshalb häufig eine N-Acetylglucosamineinheit als Saccharidbaustein verwendet.<sup>111</sup>



**Abb. 3.25** Mannotriosid-di-N-acetyl-chitobiose (core)-Einheit

Um die saccharidische Erkennungsstruktur über eine N-Glycosylaminosäure in ein Peptid einbringen zu können, hat es sich bewährt, die temporäre Azidschutzgruppe selektiv zum Amin zu reduzieren und anschließend an die Seitenkette eines Asparaginsäurederivates anzuknüpfen. Im Kapitel **3.7.1** werden die genauen Reaktionsbedingungen für eine erfolgreiche Reduktion der Azidokomponente beschrieben, das nachfolgende Kapitel **3.7.2** zeigt den Aufbau eines für die Festphasensynthese geeigneten Asparaginsäurederivates und die Synthese der Glycosylaminosäuren.

### 3.7.1 Reduktion der Azidofunktion zum Amin

Wegen der Polyfunktionalität des Lewis<sup>a</sup>-Azids müssen die Reaktionsbedingungen der Reduktion der Azidogruppe sehr genau eingehalten werden. Die Reduktion sollte möglichst quantitativ verlaufen, damit die wegen ihrer Halbaminalstruktur sehr empfindlichen Amine nicht einem zusätzlichen Reinigungsschritt unterworfen werden müssen. Einer Acylwanderung auf das Amin ist durch eine möglichst kurze Reaktionsdauer entgegenzuwirken. Die Bedingungen sollten so mild sein, daß nur das Azid, nicht aber die Benzylethergruppen angegriffen werden. Nicht zuletzt muß die Reaktion anomerisierungsfrei ablaufen, um ausschließlich die in natürlichen N-Glycopeptiden vorkommende  $\beta$ -glykosidische Bindung zu erhalten.<sup>112</sup> Es sind eine Reihe von Reduktionsverfahren in der Literatur beschrieben, welche die geforderten Bedingungen erfüllen, so z.B. die Umsetzung

<sup>111</sup> G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron Assym.*, **10** (1999), 3045-3094

<sup>112</sup> H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.*, **100** (2000), 4495-4537

mit Propandithiol/Triethylamin<sup>113</sup>, Trialkylphosphinen<sup>114</sup>, polymergebundenen Triphenylphosphinen<sup>115</sup>, Natriumborhydrid<sup>116</sup> oder mit Wasserstoff/Raney-Nickel.<sup>117</sup>

Letzteres hat sich als erfolgreichste Methode für die anomerisierungsfreie Reduktion durchgesetzt, wobei der Erfolg jedoch stark von der Aktivität des verwendeten Katalysators abhängt. Die komplikationslose Reduktion unter Beibehalt aller Benzylschutzgruppen gelingt in guten bis sehr guten Ausbeuten mit handelsüblichem Raney-Nickel der Fa. Acros, das unmittelbar vor der Reaktion durch Waschen mit entionisiertem Wasser auf einen neutralen pH von 6.5 eingestellt wird.

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die Reduktion des sulfatierten Arabino-Lewis<sup>a</sup>-Bausteins zu ermitteln, wird die Reaktion zuerst an dem peracetylierten Glucosaminbaustein **28**, danach an dem benzylethergeschützten Trisaccharid **15** getestet. Die folgenden Reaktionsbedingungen haben sich als optimal herausgestellt. Man löst das Kohlenhydrat in einem Isopropanol/Wasser - Gemisch (9:1), gibt frisch gewaschenes Raney-Nickel hinzu und leitet mit einer Edelstahlkanüle unter ständiger dünnschicht-chromatographischer Kontrolle einen konstanten Wasserstoffstrom durch die gut gerührte Lösung. Um die beschriebenen Nebenreaktionen zu vermeiden, sollte die Reduktion möglichst schnell ablaufen. Dafür hat sich eine nicht-katalytische Menge an Raney-Nickel als vorteilhaft herausgestellt. Ist die Reaktion abgeschlossen, filtriert man den Ansatz über eine Glasfritte mit einer dünnen Schicht Hyflo-Supercel<sup>®</sup> und wäscht gründlich mit Isopropanol und Methanol nach, um evtl. am Katalysatormaterial anhaftendes Produkt zu eluieren.

---

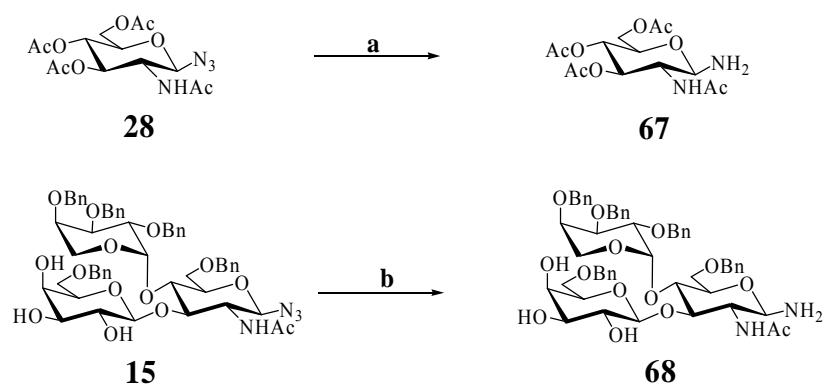
<sup>113</sup> H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.*, **19** (1978), 3633-3634

<sup>114</sup> M. Mizuno, I. Muramoto, K. Kobayashi, H. Yaginuma, T. Inazu, *Synthesis*, **1** (1999), 162-165

<sup>115</sup> T. Holletz, D. Cech, *Synthesis*, (1994), 789-791

<sup>116</sup> M. A. El-Monem Shaban, R. W. Jeanloz, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **54** (1981), 3570-3576

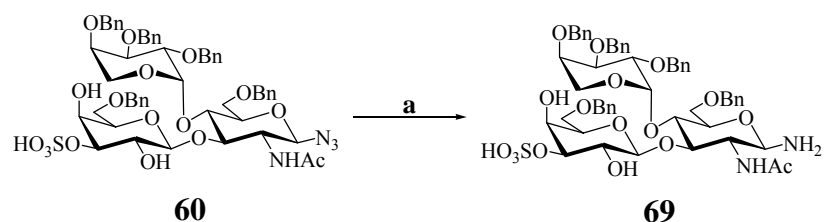
<sup>117</sup> H. Kunz, C. Unverzagt, *J. prakt. Chem.*, **334** (1992), 579-583



**Abb. 3.26** Reduktion der Glycosylazide **28**, **15**

**a)** Raney-Nickel, H<sub>2</sub>, 2-Propanol/Wasser (9:1), 20°C, 2h, 92%; **b)** Raney-Nickel, H<sub>2</sub>, 2-Propanol/Wasser (9:1), 20°C, 5h, quant.

Auch die Reaktion des sulfatierten Bausteins **60** verläuft ohne Probleme, der Schwefel bewirkt keinerlei Aktivitätsminderung des Katalysators.



**Abb.3.27** Reduktion des Glycosylazids **60**

**a)** Raney-Nickel, H<sub>2</sub>, 2-Propanol/Wasser (9:1), 20°C, 3.5 h, quant.

### 3.7.2 Kupplung zur Glycosylaminosäure

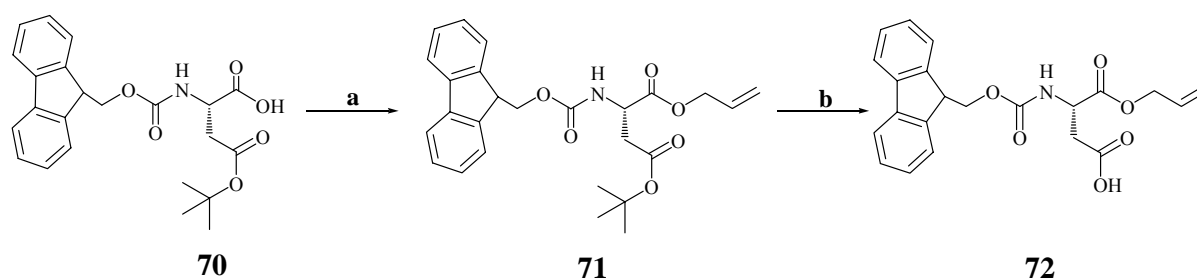
Ein für die Anbindung an Glycosylamine geeigneter Asparaginsäurebaustein muß ein orthogonales Schutzgruppenmuster aufweisen. In zahlreichen Arbeiten hat sich dafür die Synthese des <sup>α</sup>N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure- $\alpha$ -allylester- $\beta$ -*tert*butylesters **71** bewährt.<sup>118,119</sup>

Zur Synthese wird aus kommerziell erhältlichem Fmoc-Asparaginsäure- $\beta$ -*tert*-butylester mit einem halben Äquivalent Cäsiumcarbonat in Methanol das entsprechende Carboxylat erzeugt. Nach dem Wechseln des Lösemittels zu DMF und dem Absenken der Temperatur auf 0°C

<sup>118</sup> H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.*, **97** (1985), 885

<sup>119</sup> H. Kunz, H. Waldmann, J. März, *Liebigs Ann. Chem.*, (1989), 54-49

wird ein zweieinhalbfacher Überschuss an Allylbromid langsam in die Lösung getropft. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur kann von ausgefallenem Cäsiumbromid abfiltriert und der vollständig orthogonal geschützte Diester **71** quantitativ durch Chromatographie erhalten werden.<sup>120</sup> Die Deblockierung der  $\beta$ -Carboxylfunktion<sup>121</sup> gelingt acidolytisch in einer Mischung aus TFA und Wasser als Abfangnucleophil (95:5) und führt zu dem Fmoc-Aminosäurebaustein **72** in einer Ausbeute von 91%.



**Abb. 3.28** Darstellung von *Fmoc-Asp(OH)-OAllyl* **72**

**a)** 1. Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 20°C, 5 min; 2. AllylBr, DMF, 0°C → 20°C, 2h, quant.; **b)** TFA/H<sub>2</sub>O (95:5), 20°C, 2h, 91%

Zur Anknüpfung der Glycosylamine an die freie  $\beta$ -Carboxylfunktion bestehen prinzipiell mehrere Möglichkeiten wie die Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)<sup>122</sup>, Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder Dihydrochinolinen (EEDQ / IIDQ). Nachteile der Carbodiimidmethode sind die Schwerlöslichkeit der entstehenden Harnstoffe und die Racemisierungsanfälligkeit der gebildeten Aktivester. Es hat sich gezeigt<sup>123</sup>, daß zur Acylierung von anomeren Glycosylaminen die Aktivierung mit Uroniumsalzen<sup>124</sup> wie HBTU<sup>125</sup>, TBTU<sup>126</sup>, PyBOP<sup>127</sup> oder HATU<sup>128</sup> allen anderen gängigen Kupplungsmethoden überlegen ist. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen und die Racemisierungsanfälligkeit zu senken, werden vor der Kupplung mit HBTU (*O*-Benzotriazolyl-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat) äquimolare Mengen an

<sup>120</sup> S. A. Kales, S. B. Daniels, F. Alberico, *Anal. Biochem.*, **212** (1993), 208-310

<sup>121</sup> A. Trezeziak, W. Bannwarth, *Tetrahedr. Lett.*, **33** (1992), 4557-4560

<sup>122</sup> J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **77** (1955), 1067-1068

<sup>123</sup> U. Sprengard, *Dissertation*, Universität Mainz (1995)

<sup>124</sup> L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C.

Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41** (2002), 441

<sup>125</sup> a) V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.*, (1978), 1269

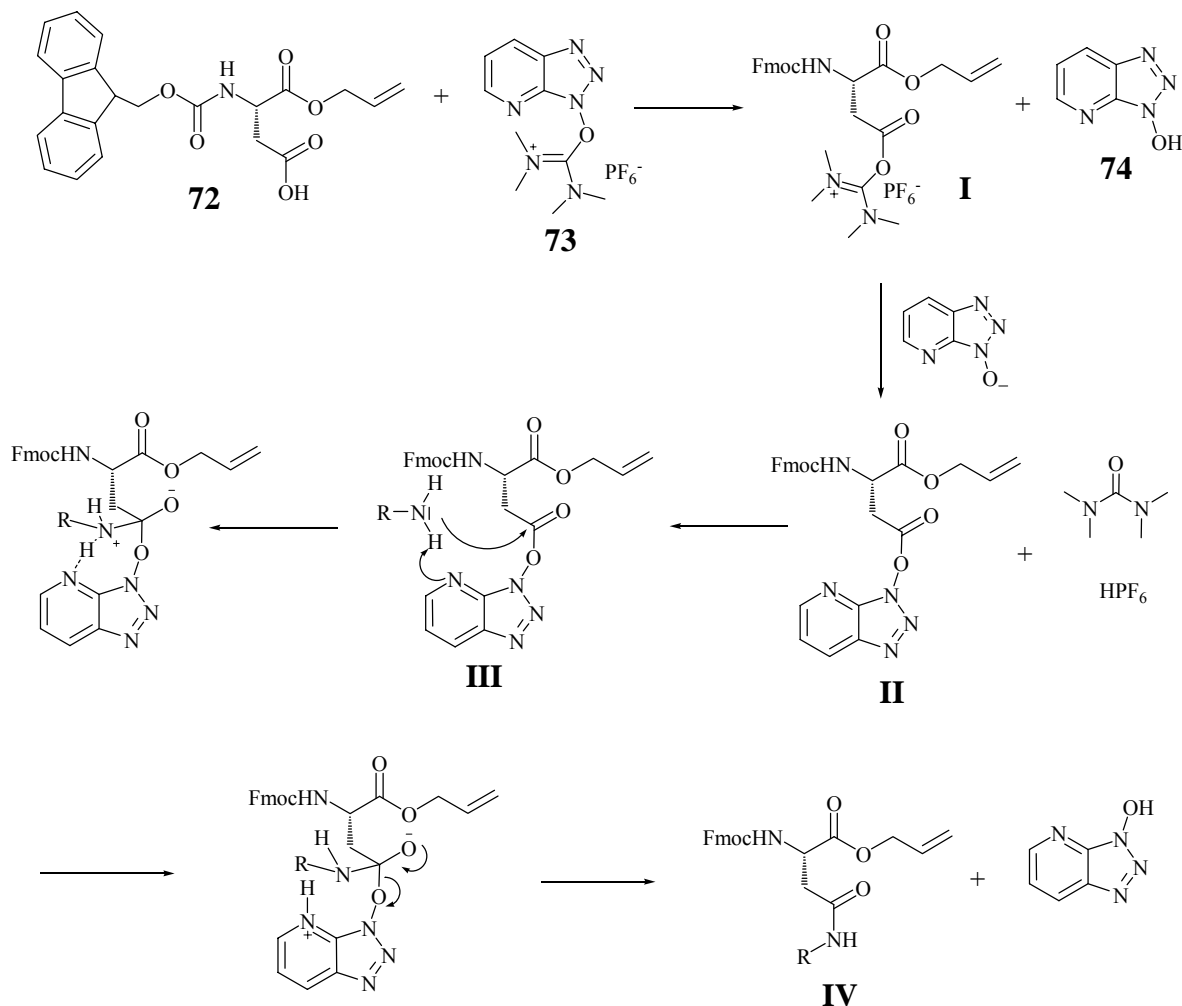
b) V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis*, (1984), 572

<sup>126</sup> R. Knorr, A. Trezeziak, W. Bannwarth, D. Gillesen, *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989), 1927

<sup>127</sup> J. Martinez et. al., *J. Med. Chem.*, **28** (1985), 1874-1879

<sup>128</sup> L. A. Carpino, A. El-Faham, C. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **18** (1994), 201-203

HOBT (*Hydroxybenzotriazol*)<sup>129</sup> bzw. bei der Verwendung von HATU (*O-Azabenzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat*) **73** äquimolare Mengen an HOAt (*Hydroxyazabenzotriazol*)<sup>130</sup> **74** zugesetzt.



**Schema 3.9** Kupplung des Aminosäurebausteins Fmoc-Asp-OAll mit HATU / HOAt

Die Vorgehensweise ist bei allen Kupplungsschritten gleich (vgl. Schema 3.8). Man löst die Carbonsäurekomponente und das Additiv in absolutem, aminfreiem DMF und deprotoniert mit zwei Äquivalenten Hünigs-Base. Gleich darauf wird, in wenig DMF gelöst, die Kupplungskomponente HATU **73** hinzugegeben und das Gemisch 10 min vorreagieren lassen. Es kommt zur Bildung des O-Acylasparaginsäureuroniumester **I** und zum Austritt von HOAt **74**, welches mit **I** zum O-Acyl-hydroxyaza-benzotriazolaktivester **II** weiterreagiert. Als letztes wird langsam die Aminkomponente in DMF hinzugeetropt. Diese greift nukleophil den

<sup>129</sup> W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103** (1970), 788

<sup>130</sup> L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993), 4397-4398

Carbonylsauerstoff des Aktivesters **II** an und führt zur Ausbildung der Zwischenstufe **III**. Die Amidolyse zum Säureamid **IV** gelingt unter einer Argonatmosphäre innerhalb von 14 Stunden.

Bei der Kupplung mit HATU /HOAt wirken sich zwei Eigenschaften positiv auf die Reaktivität und die Racemisierungsneigung aus. Durch den Stickstoff des Azabenzotriazols ist das System verglichen mit HBTU elektronenärmer und bildet daher leichter den O-Acylisoharnstoff **I**. Nach der Reaktion zu **II** stellt HOAt ( $pK_s \approx 3.3$ ) die deutlich bessere Abgangsgruppe (HOBt:  $pK_s \approx 4.6$ ) dar. Durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke des Pyridylstickstoffs an den Wasserstoff des Amins sorgt HOAt zusätzlich für eine gezielte Koordination des nukleophilen Agens und senkt dadurch die Racemisierungsgefahr deutlich.

Die Kupplung wurde zunächst an einem einfachen Baustein, dem peracetylierten Glucosaminylamin **67**, getestet. Nach Chromatographie erhält man den anomenreinen Glucosaminylasparaginsäureester **75** in reproduzierbarer Ausbeute von 88%. Die für die Festphasensynthese notwendige Deblockierung des C-Terminus gelingt Palladium(0) katalysiert in absolutem THF mit N-Methylanilin als Allylfänger in einer Ausbeute von 49%.

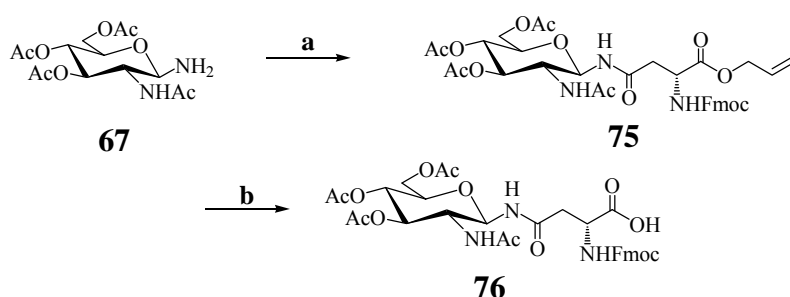


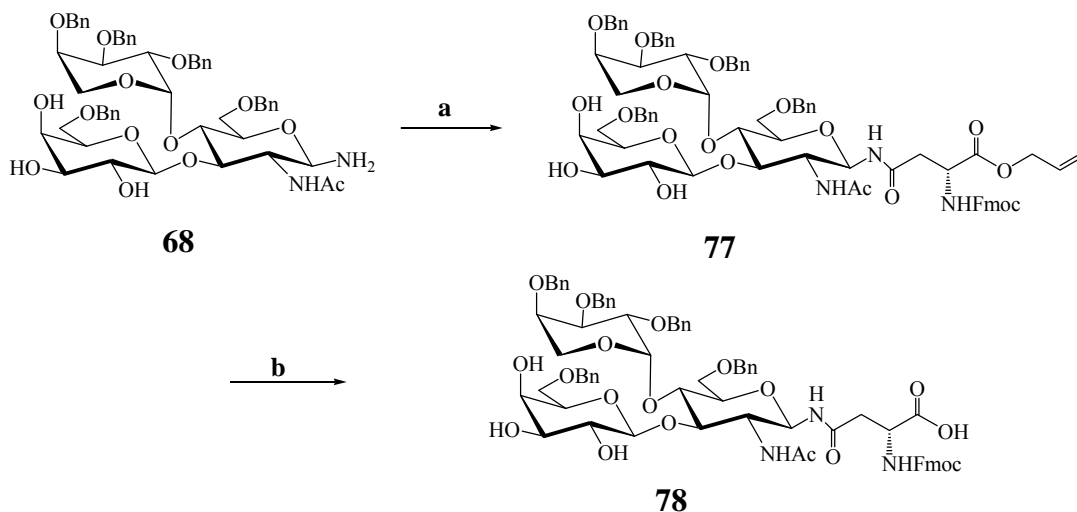
Abb. 3.29 Synthese des Festphasenbausteins **76**

a) Fmoc-Asp-OAll, HATU / HOAt, DMF, 20°C, 14 h, 88%; b) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, NMA, THF, 20°C, 20 h, 49%

Unter den gewählten Bedingungen wird die N-terminale Fmoc-Gruppe wegen der zu geringen Basizität des N-Methylanilins nicht angegriffen. Man entfernt das (N-Allyl,N-Methyl)-Anilin durch Ausschütteln mit 0.1 N wässriger HCl.

Die Acylierung des komplexeren Trisaccharidamins Lewis<sup>a</sup> **68** gelingt in einer guten Ausbeute von 82% nach Chromatographie. Nach der Abspaltung des Allylestere und der sauren Aufarbeitung kann Verbindung **78** in einer Ausbeute von 70% erhalten werden. Wahrscheinlich kommt es wegen der stark säurelabilen  $\alpha$ -arabinosidischen Bindung zur

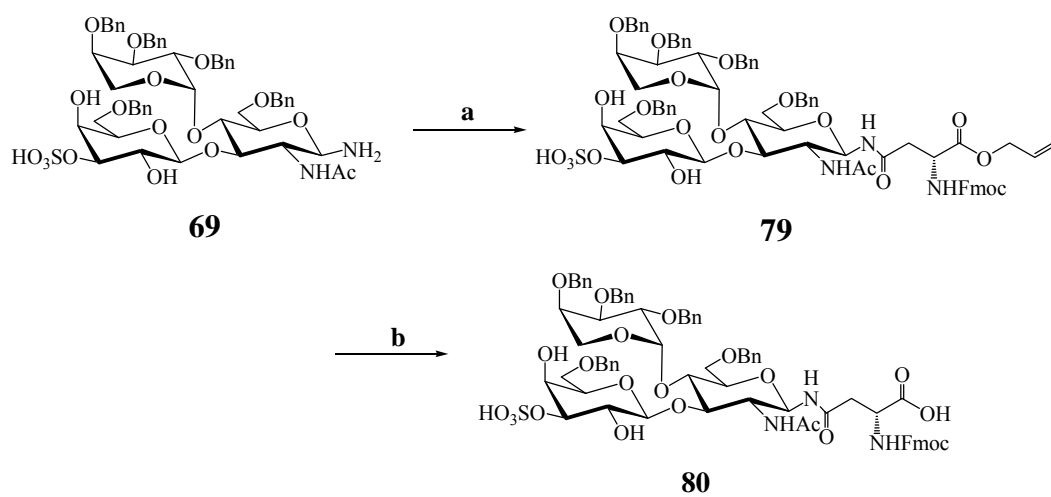
teilweisen Abspaltung der Arabinose und dadurch zu einer leichten Abnahme der Ausbeute. Wechselt man zu *p*-Toluolsulfinsäure-Natriumsalz als Abfangnukleophil und wäscht anschließend lediglich mit Wasser, kann die Ausbeute auf 74% gesteigert werden.



**Abb. 3.30** Synthese des Festphasenbausteins *Fmoc-Asn-(Ara-Le<sup>α</sup>(OH)<sub>3</sub>-OH* **78**

**a)** Fmoc-Asp-OAll, HATU / HOAt, DMF, 20°C, 14 h, 82%; **b)** Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, *p*-TSA, THF, 20°C, 20 h, 74%

Das sulfatierte Analogon **80** läßt sich nach dem gleichen Vorgehen mit einer immer noch guten Ausbeute von 66% isolieren. Aufgrund der extremen Säureempfindlichkeit der Sulfatgruppe wird bei der darauffolgenden Allylabsplattung wiederum N-Methylanilin verwendet und der Rohansatz einer präparativen Dünnschichtchromatographie unterzogen. Dadurch wird nicht umgesetztes Edukt abgetrennt, und die tertiäre Base bleibt während des Eluierens des Produkts mit Chloroform/Methanol 5:1 auf dem sauren Kieselgel zurück. Auf diese Weise ist es möglich, die sulfatierte Glycosylaminosäure in einer sehr guten Ausbeute von 92% zu erhalten. Durch die Aufnahme korrelierter Spektren ist die exakte Zuordnung aller <sup>13</sup>C-Signale möglich und ein genauer Vergleich mit Verbindung **60** zeigt, daß die chemische Verschiebung des 2'-, 3'- und 4'-Kohlenstoffs sowohl bei dem Allylester **79** als auch bei der freien Säure **80** annähernd beibehalten wird. Eine unter den Bedingungen der Azidreduktion mit anschließender Kupplung zur Glycosylaminosäure mögliche Wanderung der Sulfatgruppe wird nicht beobachtet.



**Abb. 3.30** Synthese des Festphasenbausteins *Fmoc-Asn-(Ara-Sulfo-Le<sup>s</sup>(OH)<sub>2</sub>)-OH* **80**

**a)** Fmoc-Asp-OAll, HATU / HOAt, DMF, 20°C, 14 h, 66%; **b)** Pd(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, NMA, THF, 20°C, 5 h, 92%

### 3.8 Glycopeptidsynthesen

E-Selektin wird auf cytokinaktivierten Endothelzellen exprimiert und steuert mit L- und P-Selektin die Anlagerung unstimulierter Leukozyten an das Endothel, in deren Folge eine Einwanderung der Leukozyten in entzündetes Gewebe stattfinden kann. Als endogene Liganden dieses Zelladhäsionsrezeptors konnten ESL-1 (E-Selektin-Ligand-1) und weitere Sialoglycoproteine identifiziert werden. Dazu gehören CFR, ein den Fibroblast-Wachstumsfaktor bindendes Protein aus Hühnermembranen und MG160 aus Rattenhirnmembranen. Eine Sequenzanalyse dieser Proteine zeigt eine hohe Übereinstimmung, so daß von unterschiedlichen Varianten des gleichen Moleküls ausgegangen werden kann. Die Sequenz 665-682 **10** liegt in allen drei endogenen Liganden hochkonserviert vor und weist zudem eine der fünf potentiellen Glycosylbindungsstellen auf. Dieser Sequenz kommt möglicherweise eine hohe biologische Bedeutung zu, und sie wird aus diesem Grund für die Synthese eines artifiziellen Glycoproteins **11** ausgewählt

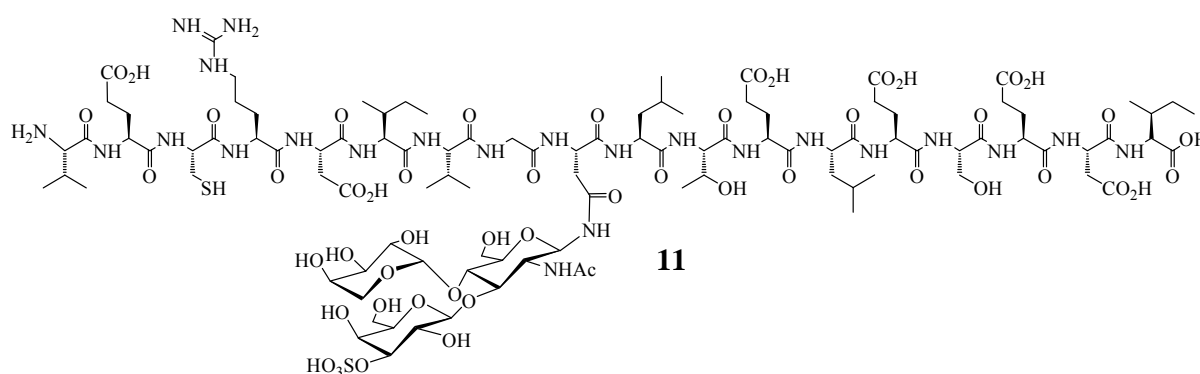


Abb 3.32 Zielsequenz des ESL-1 und Zielmolekül

Das Glycooctadecapeptid **11** soll in einer Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Strategie aufgebaut werden. Der Unterschied zum endogenen Glycoproteinliganden des ESL-1 besteht in der Art der saccharidischen Erkennungsstruktur. Anstatt eines größeren Oligosaccharidepitops wird das sulfatierte Trisaccharid **80** als Glycosylaminosäure eingebracht.

### 3.8.1 Synthesen von Aminosäuren und Anker molekülen

Da sowohl die D-Arabinose als auch die Sulfatgruppe an Sacchariden sehr säureempfindlich sind, werden säurelabile Schutzgruppen und Ankersysteme von der Synthese ausgeschlossen.

Deshalb sind bis auf Cystein, alle verwendeten Aminosäurebausteine durch hydrogenolytisch spaltbare Schutzgruppen blockiert. Im Falle des Arginins tragen jedoch alle kommerziell erhältlichen Fmoc-Bausteine eine säurelabile Seitenschutzgruppe und können deshalb nicht verwendet werden. In Kapitel 3.8.8.1 ist die Synthese eines Fmoc-Argininderivates mit hydrogenolytisch spaltbarem Schutz der Guanidinfunktion gezeigt.

Ein für diese Zwecke geeigneter Anker scheint das von M. Wagner und H. Kunz entwickelte PTMSEL-System zu sein. Der fluoridlabile Anker erlaubt nach Synthese des Glycopeptids unter milden, nahezu neutralen Bedingungen die Abspaltung vom polymeren Träger. Die säurelabilen Bereiche des Kohlenhydrateils sollten nicht beeinflusst werden. Die mehrstufige Synthese des PTMSEL-Ankers ist in Kapitel 3.8.1.2 beschrieben.

#### 3.8.1.1 Synthese von Fmoc-Arg-(di-benzyloxycarbonyl)-OH

Einen bequemen Zugang zu einem mit Fmoc- und Z-Gruppe<sup>131</sup> orthogonal geschützten Argininderivat zeigt Abbildung 3.33. Von handelsüblichem N-*tert.*-Butyl-N',N''-di-(benzyloxycarbonyl)-L-arginin **81** ausgehend, wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure und Triisopropylsilan als *tert.*-Butylfänger das primäre Amin **82** erzeugt und dieses mit 1.1 Äquivalenten Chlorameisensäure-[1-(9-fluorenyl)-methylester] **83** in das Fluorenylcarbamat überführt. Das Produkt fällt durch Überschichten mit kaltem Wasser aus und kann abfiltriert werden.<sup>132,133</sup>

<sup>131</sup> M. Bergmann, L. Zervas, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **65** (1932), 1192

<sup>132</sup> L. Zervas, M. Winitz, J. P. Greenstein, *J. Org. Chem.*, **22** (1957), 1515-1521

<sup>133</sup> L. A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.*, **37** (1972), 3404-3409

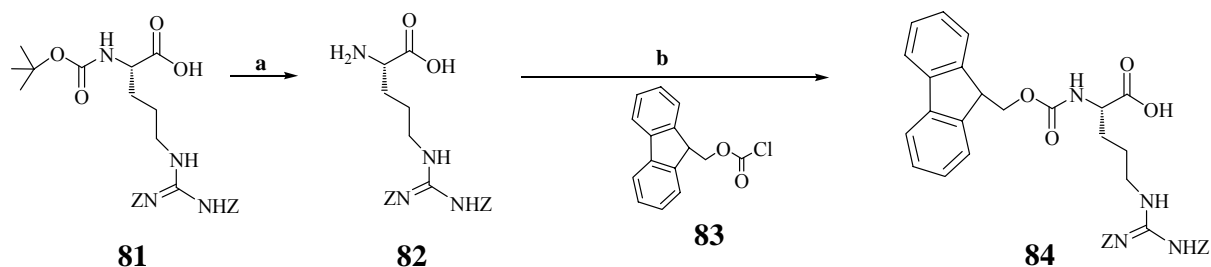


Abb. 3.33 Synthese von *Fmoc-Arg(di-Z)OH* **84** nach Zervas

a) TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS, 20°C, 2 h, quant.; b) Dioxan, 0°C, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, **83**, 3 h, 43%

Eine Alternative bietet eine von *Goodman*<sup>134</sup> ausgearbeitete Methode zur Guanidinylierung primärer Amine. Guanidiniumhydrochlorid **85** wird bei 0°C in 2.5 M Natronlauge gelöst und mit 80 ml Dichlormethan versetzt. Nach Deprotonieren erhält man durch Zugabe von Benzylloxycarbonylchlorid („Z-Chlorid“) das zweifach Z-geschützte Guanidino-Derivat **86**. Diese Verbindung wird mit der starken Base Natriumhydrid am Imin-Stickstoff deprotoniert und mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid in das dreifach blockierte N-Trifluormethansulfonyl-N',N''-(di-benzylloxycarbonyl)-guanidin **87** überführt (65% über 2 Stufen). Beide Verbindungen kristallisieren sehr gut und bedürfen keiner weiteren Reinigung.

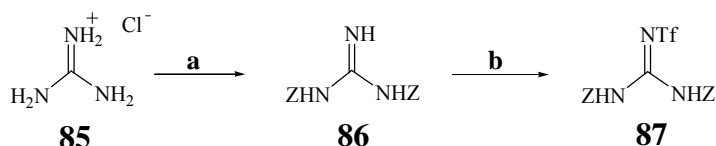


Abb. 3.34 Synthese des dreifach geschützten *Guanidinobausteins* **87**

a) NaOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, Z-Cl, 18h, 83%; b) Chlorbenzol, 1. NaH, 0°C, 1h; 2. -40°C, Tf<sub>2</sub>O, 18h, 78%

Ein für diese Synthese von **84** geeignetes Amin stellt das Ornithinderivat **89** dar (s. Abbildung 3.35). Man erhält es durch Behandlung von kommerziell erhältlichem N<sup>α</sup>-Fmoc-N<sup>δ</sup>-*tert.*-butyl-L-ornithin **88** mit 95%iger Trifluoressigsäure und Wasser als Abfangnukleophil. Durch Umsetzung mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid wird die in organischen Lösemitteln unlösliche Säure **89** in den löslichen Silylester **90** überführt. Ohne weitere Reinigung kann das Amin anschließend unter Basenkatalyse in Dichlormethan mit dem

<sup>134</sup> K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.*, **63** (1998), 3804-3805

Guanidinobaustein **87** in das orthogonal geschützte Argininderivat **84** überführt werden. Das Produkt fällt bei 4°C aus Dichlormethan aus.

Um zu überprüfen, ob die Benzyloxycarbonylschutzgruppe auch wieder entfernt werden kann, wird die Aminosäure **84** mit Palladium auf Kohle und Wasserstoff hydriert. Unter Beibehalt der Fmoc-Gruppe wird das deblockierte Argininderivat **91** in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten (s. Abbildung 3.35).

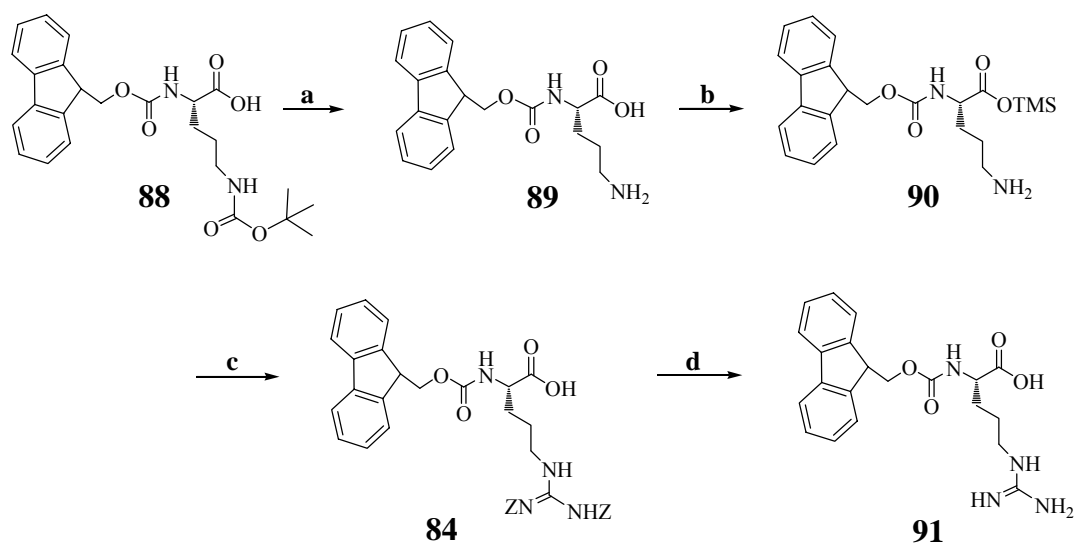
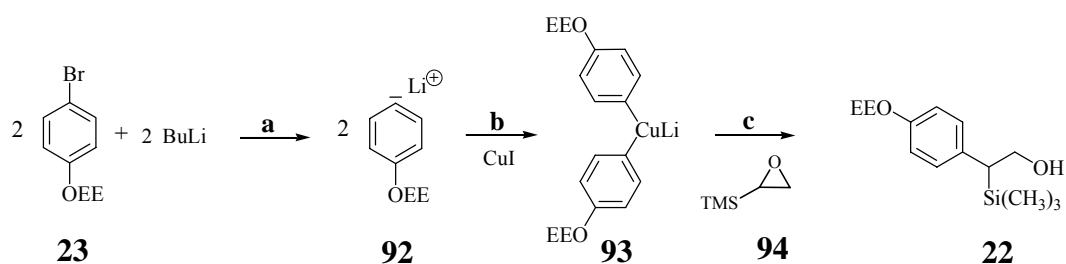


Abb. 3.34 Synthese von Fmoc-Arg(di-Z)OH **84** nach Goodmann<sup>134</sup>

a) TFA/H<sub>2</sub>O, TIPS, 20°C, 45min, quant.; b) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MSTFA, reflux, 1.5 h ; c) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, **87**, NEt<sub>3</sub>, 20°C, 2d, 84%; d) MeOH, Pd/C, H<sub>2</sub>, 20°C, 30h, 98%

### 3.8.1.2 Synthese des PTMSEL-Ankers zur Festphasensynthese<sup>135</sup>

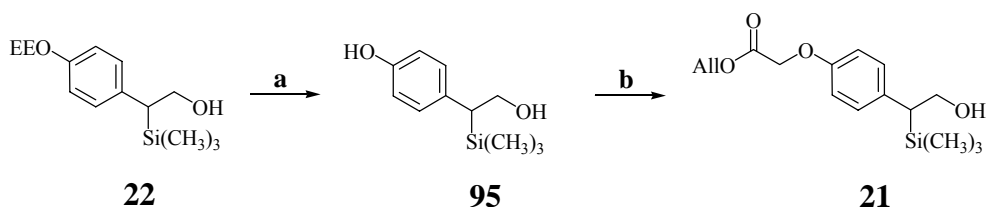
1-(4-Bromophenoxy)-1-ethoxyethan **23** wird mit *n*-Buthyllithium in absolutem Ether bei -40°C lithiiert. Die anschließende Umsetzung mit Kupfer(I)iodid<sup>136</sup> liefert das Lithium-di(*p*-ethoxyethoxyphenyl)cuprat **92**, welches das Trimethylsilyloxiran<sup>137</sup> **94** in einer ausgezeichneten Regioselektivität und einer Gesamtausbeute von 32% zu [2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **22** öffnet.



**Schema 3.36** Synthese von [2-(*p*-Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **22**

a) Et<sub>2</sub>O, -40°C (1h) → 10°C (2h); b) Et<sub>2</sub>O, Cu(I)I, 0°C, 1.5 h; c) Et<sub>2</sub>O, -50°C (4h) → -20°C (15h), 32% (3Stufen)

Von diesem wird die Ethoxyethylschutzgruppe mit Hilfe von 2.5 mol% Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) abgespalten, so daß [2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **95** in 90% isoliert werden kann.



**Schema 3.37** Synthese von 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure-allylester **21**

a) MeOH, 20°C, PPTS (2.5 mol%), 0.5h, 90%; b) Aceton, 20°C 1. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, 2. ClCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>All, 36h, 20°C, 76%

Die Dihydroxy-Verbindung **95** wird aufgrund der geringeren Acidität der aliphatischen OH-Funktion in Gegenwart von Kaliumcarbonat und Kaliumjodid regioselektiv an der phenolischen OH-Gruppe mit Chloressigsäureallylester verethert (76%). Unter Steglich-Bedingungen erfolgt die Kupplung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure (hier: *Fmoc-Isoleucin*, *Fmoc-Glycin*) an die verbleibende OH-Gruppe und führt zu den Allylester-

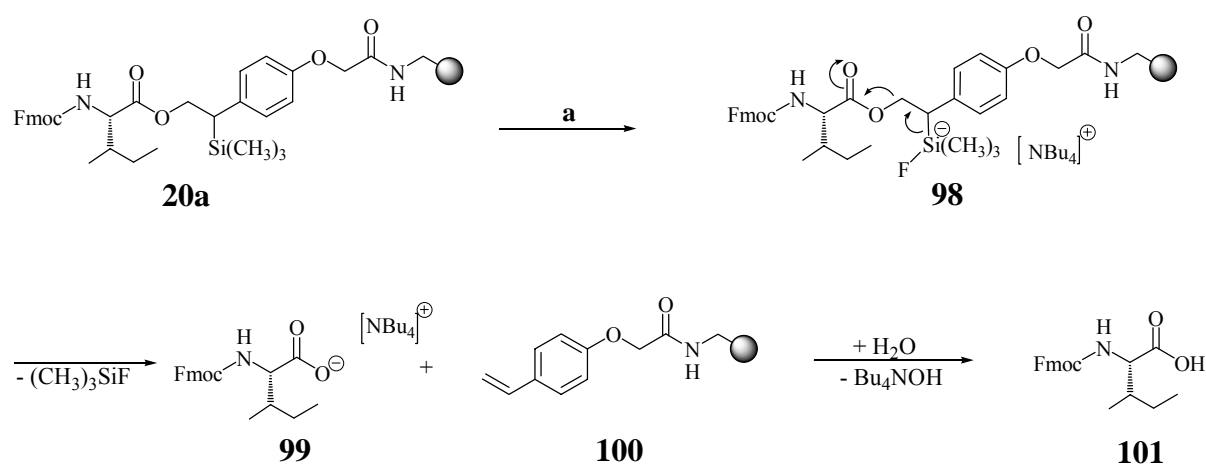
<sup>135</sup> M. Wagner, H. Kunz, *Deutsche Patentanmeldung* 10116252.9, (2001)

<sup>136</sup> F. Hayakawa, S. Watanabe, N. Shimizu, Y. Tsuno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66** (1993), 153

<sup>137</sup> Diese Verbindung wurde mir freundlicherweise von Herrn S. Heider zur Verfügung gestellt.



Durch ein leichtes Vakuum entfernt man das Lösemittel und wäscht das Polymer dreimal mit je 15 ml Dichlormethan. Man wiederholt den gesamten Vorgang noch einmal, vereinigt die organischen Phasen und wäscht diese zweimal mit je 35 ml entionisiertem Wasser. Nach Trocknen der organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  wird das Lösemittel im Vakuum entfernt und die C-terminal freie Aminosäure **101** in einer sehr guten Ausbeute erhalten (85%).



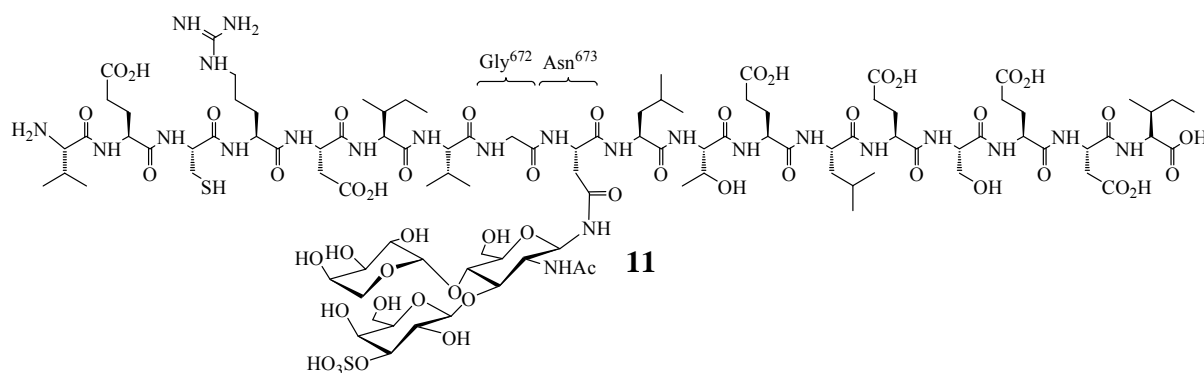
**Abb. 3.39** Durch Fluorid induzierte Spaltung des *PTMSEL*-Linker

a)  $\text{TBAF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , DCM, 2 x 20 min, 20°C, 85%

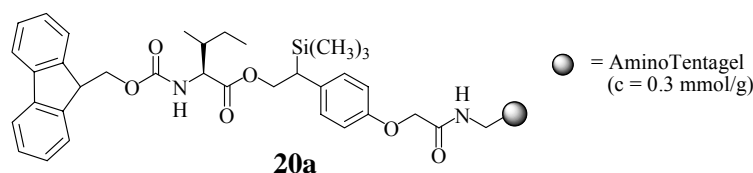
Die Hydrolyse des eingesetzten TBAF gelingt nicht vollständig, ein Umstand, der auch in allen folgenden Abspaltungen zu beobachten ist. Zur Entfernung überschüssigen Ammoniumsalzes wird das Rohprodukt daher in 10 ml Acetonitril suspendiert und durch Filtration über eine C18-Kartusche gereinigt. Trotzdem bleiben noch Reste an TBAF zurück.

### 3.8.2 Synthese von Glycopeptiden aus der Sequenz des ESL-1

Prinzipiell bestehen für die Synthese komplexer Glycopeptide zwei Möglichkeiten der Durchführung. In einem linearen Ansatz wird die komplette Sequenz durch das sukzessive Anknüpfen einer weiteren Aminosäure an die vorherige aufgebaut (vgl. Kap. 3.7). Nach vollendeter Synthese wird das Peptid vom polymeren Träger gelöst, und es werden simultan dazu oder anschließend die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten bzw. des Kohlenhydrats entfernt. Die zweite Möglichkeit besteht in der Fragmentkondensation zweier unabhängig voneinander synthetisierter Teilfragmente. Teure oder chemisch labile Moleküle können so am Ende einer Partialsequenz eingeführt werden um damit möglichst kurz den Reaktionsbedingungen ausgesetzt zu sein.



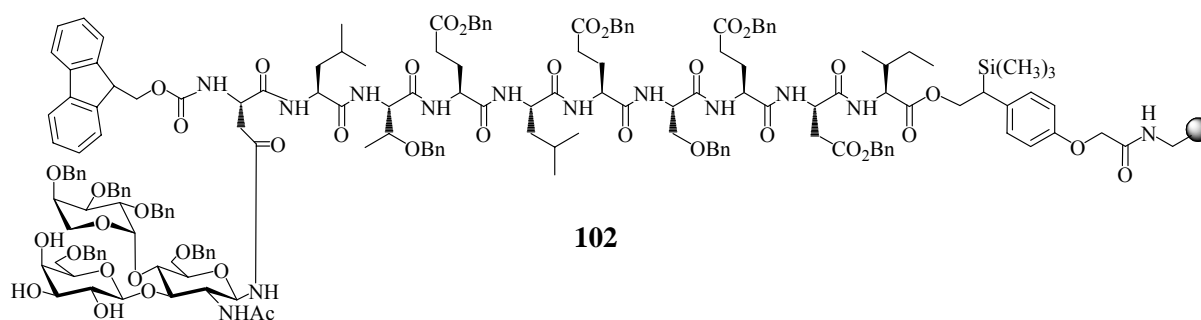
In diesem Falle soll das Zielmolekül **11** zwischen Glycin<sup>672</sup> und Asparaginsäureamid<sup>673</sup> in zwei Partialsequenzen geschnitten und diese in einer Fragmentkondensation zusammengefügt werden. Die Synthese beider Teilfragmente wird mit den funktionalisierten Tentagelharzen **20a** und **20b** durchgeführt. Um die Reaktionsbedingungen ggf. zu optimieren, wird die Bereitstellung der ersten Teilsequenz mit dem Asparaginsäurebaustein Lewis<sup>a</sup> **78** getestet. Während der Synthese werden die Fmoc-Abspaltungen in vier bis fünf 4-Minuten-Zyklen mit Piperidin (30% in NMP) vorgenommen. Die Kupplung erfolgt mit je 10 Äquivalenten an Fmoc-Aminosäure und Kupplungsreagenzien (HBTU, HOBt, DIPEA) innerhalb von ca. 45 min. Nach jeder Kupplung werden mit einer Mischung aus Acetanhydrid /DIPEA/HOBt in NMP die nichtumgesetzten Aminofunktionen acetyliert (vgl. Abb. 3.40).

automatisierte Synthese

- 1) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Asp(OBn)-OH; Capping;
- 2) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH; Capping;
- 3) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Ser(OBn)-OH; Capping;
- 4) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH; Capping;
- 5) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Leu-OH; Capping;
- 6) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH; Capping;
- 7) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Thr(OBn)-OH; Capping;
- 8) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Leu-OH; Capping;

manuelle Kupplung mit

- 1.6 Äquivalenten Fmoc-Asn(Ara-Le<sup>a</sup>)-OH **78**
- 1.8 Äquivalenten HATU/HOAt in NMP

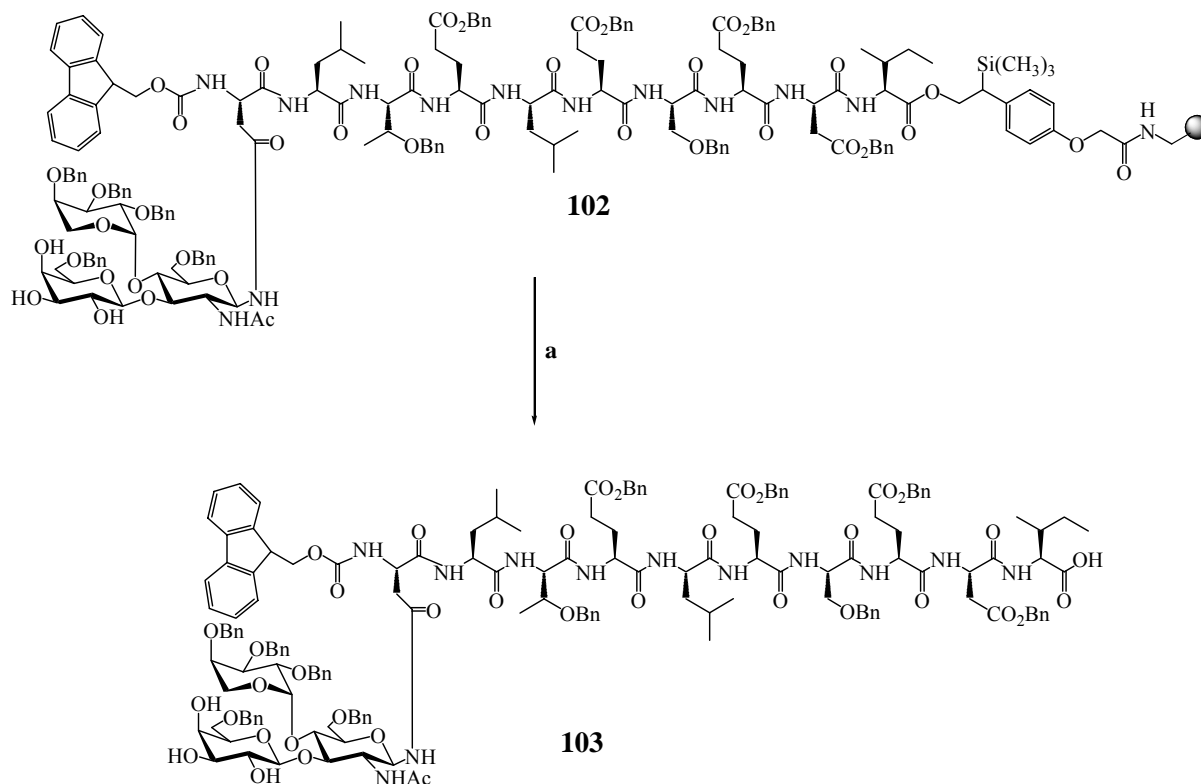


Fmoc-Asn(Ara-Le<sup>a</sup>)-Leu-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Leu-Glu(OBn)-Ser(OBn)-Glu(OBn)-Asp(OBn)-Ile-PTMSEL

**Abb. 3.40** Synthese des polymergebundenen Glycodecapeptids **102**

Der Glycosylaminosäurebaustein **78** wird im letzten Kupplungsschritt manuell in NMP gelöst, in die Reaktionskartusche gegeben und mit den Kupplungsreagenzien versetzt. Um Nebenreaktionen zu vermeiden wird erst ganz zum Schluß Hünigs-Base hinzugesetzt. Die Kondensation mit dem bereits synthetisierten Peptid erfolgt im Synthesizer mit den reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt und wird auf fünf Stunden ausgedehnt, da lediglich 1.6 Äquivalente der Glycosylaminosäure zur Kupplung bereitstehen. Nach abgeschlossener Synthese wird noch im Synthesizer gründlich mit NMP und anschließend mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen, um die bereits erläuterte Nebenreaktionen durch polare Lösemittel zu verhindern.

Die Abspaltung und Aufarbeitung des Glycodecapeptids erfolgt analog zu der der Startaminosäure (s. Abbildung 3.39) und führt nach Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie zum Glycodecapeptid **103** in einer Gesamtausbeute von 43%.



**Abb. 3.41** Abspaltung des Glycodecapeptids **102** unter Standardbedingungen

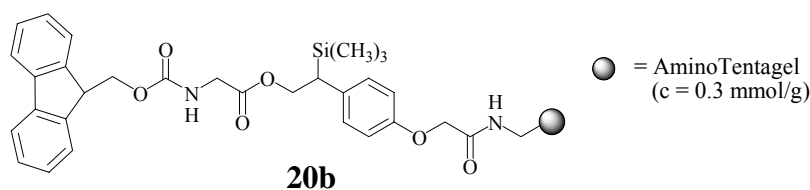
a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , TBAF \*  $3\text{H}_2\text{O}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 2 x 20 min, 43%

Durch MALDI-Massenspektroskopie ist nur die Masse des Produktes zu detektieren, Deletionssequenzen werden nicht festgestellt. Korrelierte NMR-Spektren in  $\text{DMSO}-d_6$  belegen die Struktur von **103**. Da sich das Produkt jedoch nur in DMSO löst, kann über die Reinheit durch analytische HPLC keine Aussage getroffen werden

Die Entfernung der Benzylether- und Benzylesterschutzgruppen durch Palladium-katalysierte Hydrierung mit Wasserstoff kann dünnschichtchromatographisch verfolgt werden, eine Bestätigung durch MALDI-MS schlägt aufgrund einer zu geringen Signalintensität fehl.

Zur Synthese der zweiten Partialsequenz wird ein mit der Startaminosäure Glycin funktionalisierter PTMSEL-Anker **20b** bereitgestellt. Ausgehend von dieser Verbindung wird die Synthese von *Fmoc-Val-Glu(OBn)-Cys(Acm)-Arg(di-Z)-Asp(OBn)-Ile-Val-Gly-OH* **104** manuell mit den Fmoc-Aminosäuren und den Kupplungsreagenzien TBTU/HOBt in DMF durchgeführt. Im Gegensatz zur automatisierten Synthese wird dabei die Kupplungszeit pro Aminosäure auf 12 - 14 Stunden ausgedehnt (s. Abbildung 3.43).

Leider zeigt sich an dieser Stelle ein entscheidender Nachteil des PTMSEL-Ankersystems. TBTU ist unter den herrschenden Reaktionsbedingungen instabil und setzt Fluoridionen frei. Dadurch, und begünstigt durch die lange Reaktionsdauer, kommt es verstärkt zur Abspaltung des fluoridlabilen PTMSEL-Ankers vom polymeren Träger. Im darauffolgenden Waschschrift wird neben den Kupplungsreagenzien auch das wachsende Peptid entfernt. Die Ankerspaltung als Nebenreaktion im Syntheseverlauf konnte nur bei der Verwendung von TBTU, nicht jedoch bei der Verwendung von HBTU festgestellt werden.



automatisierte Synthese

- 1) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Val-OH; Capping;
- 2) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Ile-OH; Capping;
- 3) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Asp(OBn)-OH; Capping;
- 4) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Arg(di-Z)-OH; Capping;
- 5) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Cys(Acm)-OH; Capping;
- 6) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH; Capping;
- 7) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Val-OH; Capping;

manuelle Kupplung:

- 4 Äquivalente Fmoc-AS-OH  
4 Äquivalente TBTU/HOBt in DMF, 8 Äquivalent DIPEA

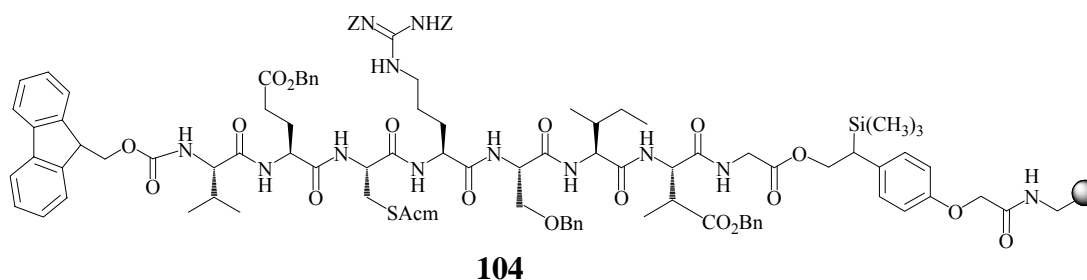


Abb. 3.42 Versuchte manuelle Synthese des Octapeptids **104**

Es ist daher streng darauf zu achten, bei PTMSEL-Systemen uroniumgestützte Kupplungsreagenzien mit dem Gegenionen  $PF_6^-$  anstatt  $BF_4^-$  (beispielsweise PyBOP, HATU, HAPyU, BOP) zu verwenden. Einen Ersatz stellt auch das Kupplungsreagenz 3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DEBPT) dar.<sup>141,142,143</sup> Dieser Phosphonsäureester vermittelt die Amidbindung ohne Zusatz von Gegenionen mit einer geringen Racemisierungsgefahr.

Verbindung **104** kann auch mit dem säurelabilen Wang-Harz synthetisiert werden. Dafür wird ein mit Glycin funktionalisiertes Harz der Fa. Rapp-Polymere (*Tentagel S PHB Gly-Fmoc*, Beladung 0.29 mmol/g) für die manuelle Synthese eingesetzt. Um Diketopiperazinbildung an dem sterisch wenig anspruchsvollen Anker zu unterbinden, werden die nächsten zwei Aminosäuren in Form des Fmoc-geschützten Dipeptids **109** an das Harz angeknüpft.

Die Synthese des Dipeptids ist in Abbildung 3.43 gezeigt. In einer von TBTU/HOBt vermittelten Reaktion wird Fmoc-Ile-OH **106** mit  $H_2N$ -Val-OAll\**p*TosOH **107** zum vollständig orthogonal geschützten Dipeptid Fmoc-Ile-Val-OAll **108** kondensiert. Durch einen anschließenden, Palladium-katalysierten Allyltransfer auf *p*-Toluolsulfinsäure-Natriumsalz gelingt die Darstellung der freien Säure **109** in guter Ausbeute.

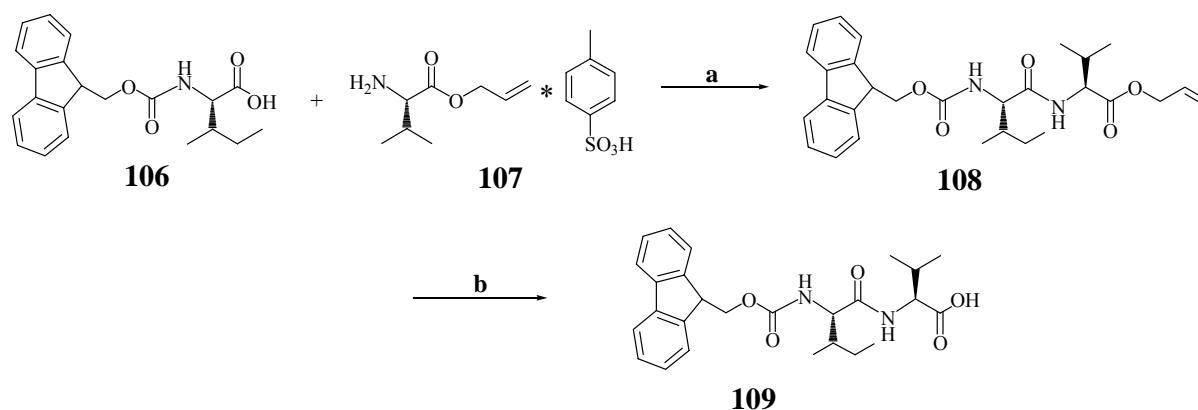


Abb. 3.43 Synthese des Dipeptids *Fmoc-Ile-Val-OH* **109**

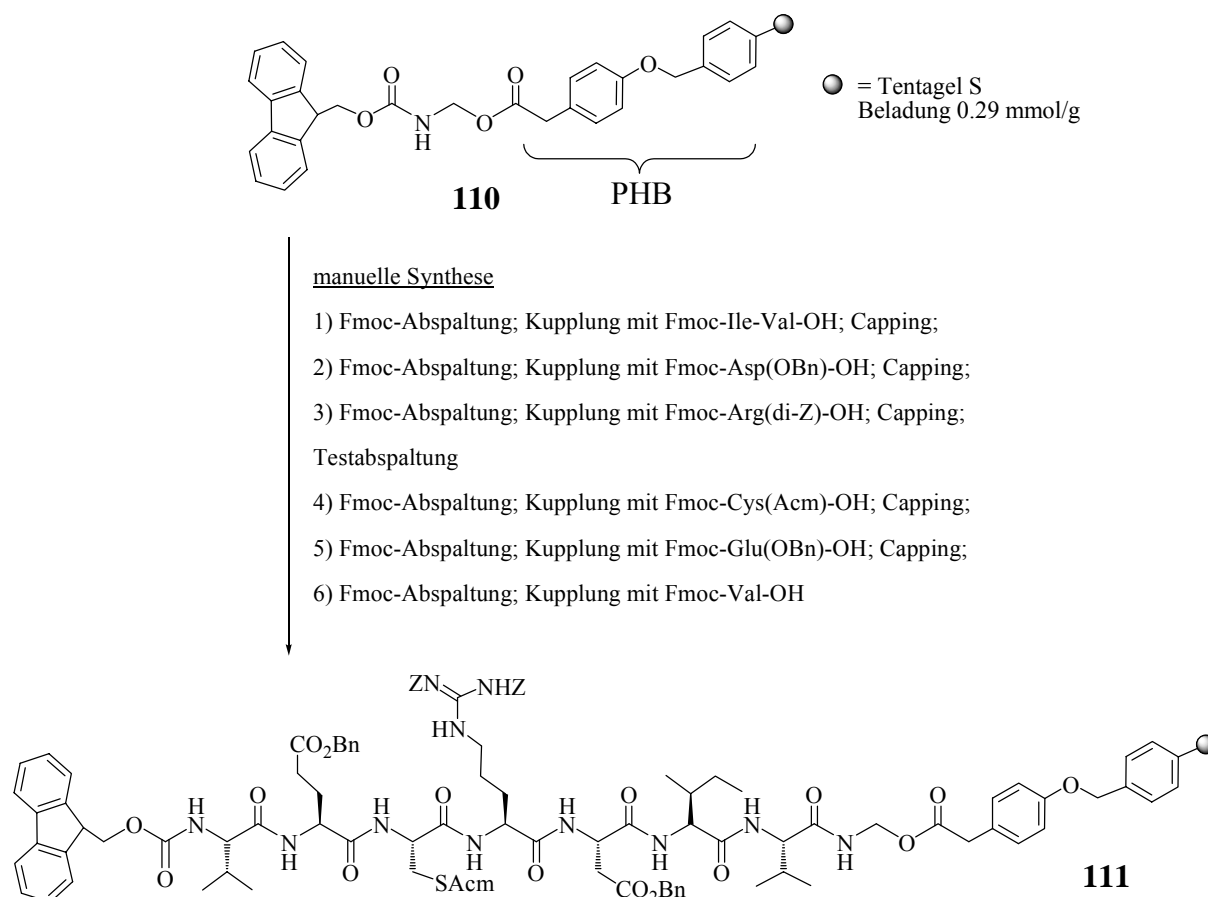
a) DMF, TBTU/HOBt/DIPEA, 14 h, 20°C, 87%; b) THF, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, *p*TSANa, 3d, 20°C, 82%

Dieses Dipeptid wird nach Fmoc-Abspaltung manuell an die erste Aminosäure geknüpft.

<sup>141</sup> L. A. Carpino, J. Xia, A. El-Faham, *J. Org. Chem.*, **69** (2004), 54-61

<sup>142</sup> M. H. Jakobson, O. Burchardt, A. Holm, M. Meldal, *Synthesis*, (1990), 1008-1010

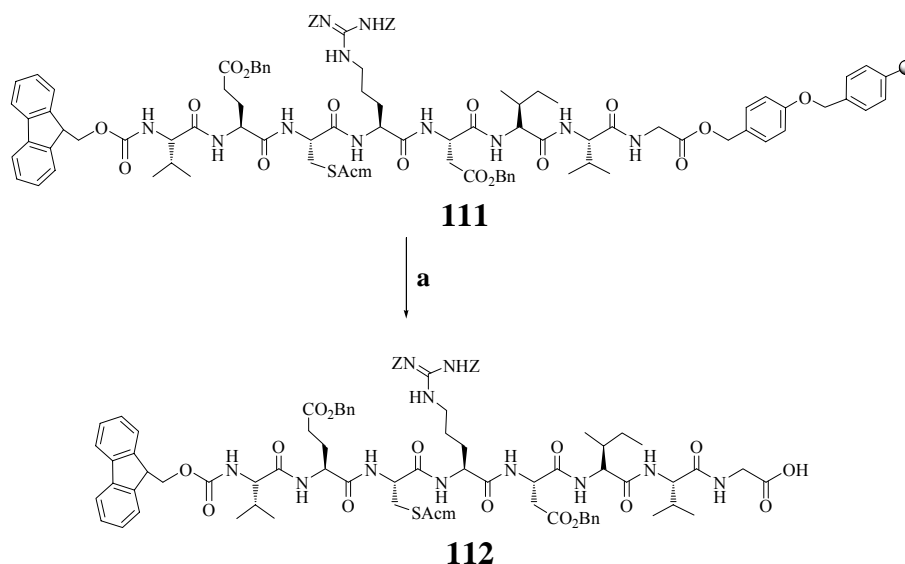
<sup>143</sup> H. Li, X. Jiang, Y. H. Ye, C. Fan, T. Romoff, M. Goodman, *Org. Lett.*, **1** (1999), 91-93



**Abb. 3.44** Manuelle Synthese des Octapeptids **111** an einem Glycin funktionalisierten Wang-Harz

Nach Anbindung von Fmoc-Arg(di-Z)-OH wird an einer kleinen Menge (150 mg) des Harzes eine Testabspaltung durchgeführt. Dabei sollte vor allem geklärt werden, ob es unter den basischen Bedingungen der Fmoc-Abspaltung zu Aspartimidumlagerung kommt.

Das ESI-Massenspektrum weist keinerlei Anzeichen für eine Aspartimidbildung auf. Zurückzuführen ist dies zum einen auf die nicht anfällige Sequenz Asn-Ile, zum anderen auf die Verwendung des vergleichsweise weniger basischen Morpholin als Abspaltungsreagenz. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird das Octapeptid mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure/Dichlormethan (1:1) versetzt und 2 Stunden geschüttelt. Danach wird das Lösemittel im Vakuum entfernt und durch die gleiche Menge an Wasser ersetzt, um den pH-Wert der Lösung konstant zu halten. Nach dem Entfernen aller organischen Lösemittel fällt das Rohprodukt **112** aus Wasser aus. Um letzte Säurereste zu entfernen, schlämmt man den farblosen Feststoff in Wasser auf und trennt ihn anschließend durch Zentrifugieren ab. Man wiederholt diesen Vorgang so lange bis die überstehende Lösung neutral reagiert.

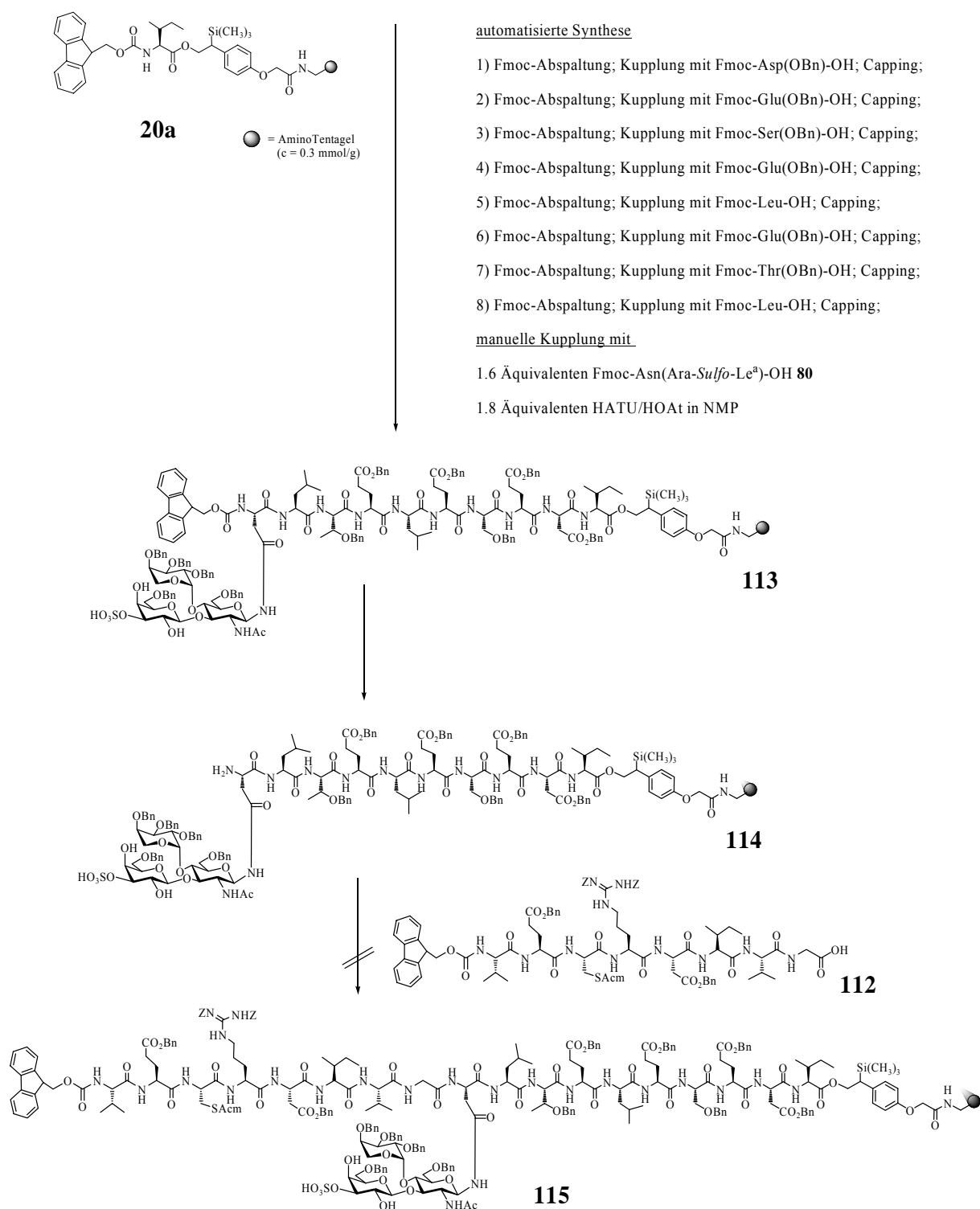


**Abb. 3.45** Abspaltung des Octapeptids **112** vom Wang-Harz

a) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), 20°C, 2h, 63%

Das Peptid läßt sich in einer Ausbeute von 63% bezogen auf die Anfangsbeladung des funktionalisierten Harzes isolieren. Da es bis auf Dimethylsulfoxid in allen Lösemitteln unlöslich ist, kann über die Reinheit mittels analytischer HPLC keine Aussage getroffen werden. Durch hochaufgelöste ESI-Massenspektroskopie und zweidimensionale NMR-Untersuchungen kann die Struktur aber eindeutig nachgewiesen werden.

Um das Zielmolekül **11** über eine Fragmentkondensation zugänglich zu machen, wird zuerst das zu **102** analoge sulfatierte Glycodecapeptid **113** wie in Abbildung 3.40 beschrieben dargestellt (s. Abb. 3.46). Die anschließende Freisetzung des primären Amins **114** kann über die Bildung des Dibenzofulven-Basenadduktes am Synthesizer detektiert werden. Die anschließende Kupplung mit dem Octapeptid **112** wurde auf 4 Stunden ausgedehnt und mit den reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt durchgeführt. Das Glycopeptid wird anschließend gründlich mit Dichlormethan gewaschen und einer Standardabspaltung mit TBAF·3H<sub>2</sub>O in Dichlormethan unterworfen.



**Abb 3.46** Fragmentkondensation zum geschützten Glycooctadecapeptid **115**

a) NMP/Piperidin, 20°C, 20min; b) **112**, HATU/HOAt/DIPEA, NMP, 20°C, 4h

Durch eine anschließende MALDI-MS-Untersuchung kann jedoch lediglich die Masse des glycosylierten Decapeptids **116** nachgewiesen werden. Eine Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie ist nicht möglich, da die Probe hauptsächlich aus quartären Ammoniumsalzen besteht.

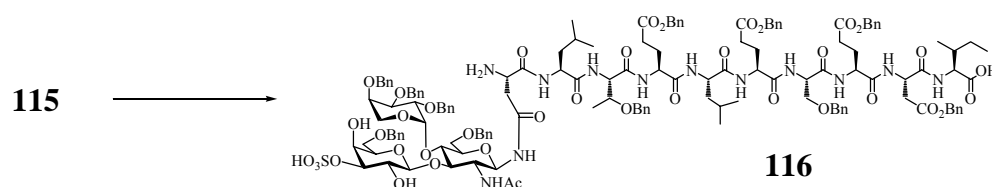
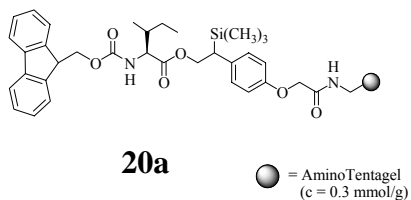


Abb. 3.47 Abspaltung des Glycodecapeptids **116**

Aus diesem Grunde wird die Synthese der Struktur **11** auf linearem Wege angestrebt. Ausgehend vom bekannten funktionalisierten Polymerharz **20a** werden die automatisierten Peptidkupplungen bis zur Kupplung von Val<sup>674</sup> problemlos durchgeführt. Die Kupplung der sulfatierten Glycosylaminosäure **80** wird wiederum auf 4 Stunden ausgedehnt und mit den reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt durchgeführt. Auch die anschließenden Peptidkupplungen mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ile-OH und Fmoc-Asp(OBn)-OH erfolgen laut Fmoc-Monitoring ohne Probleme. Die nachfolgende Aminosäure, das zweifach Z-geschützte Argininderivat **84**, kann jedoch aufgrund zu geringer Löslichkeit in NMP vom Synthesizer nicht eingezogen werden und steht damit für den darauffolgenden Kupplungsschritt nicht zur Verfügung. Da sich direkt danach ein Cappingschritt anschließt, wird das Glycopeptid ab dieser Stelle den weiteren Umsetzungen entzogen (vgl. Abb. 3.48).

Nach einer Standardabspaltung mit 1.5 Äquivalenten TBAF\*3H<sub>2</sub>O in Dichlormethan wird durch MALDI-MS anstatt der gesuchten Masse des Glycotetradecapeptids die eines um eine Aminosäure verkürzte Glycotridecapeptids **118** gefunden. Es ist deshalb anzunehmen, daß schon die Kupplung des Fmoc-geschützten Asparaginsäurebausteins nicht stattfand hat und deshalb Verbindung **118** erhalten wird (vgl. Abb. 3.48).

automatisierte Synthese

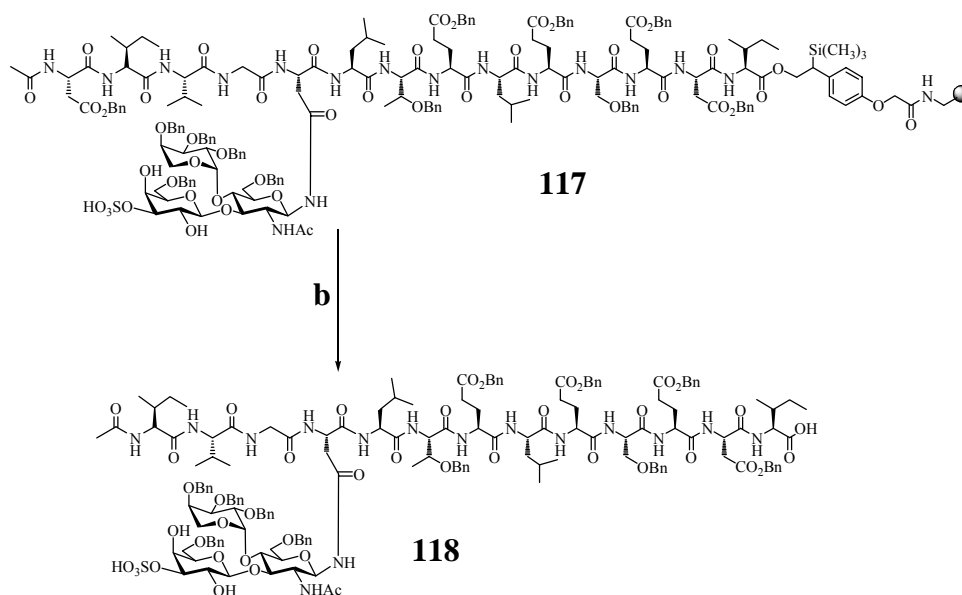
- 1) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Asp(OBn)-OH; Capping;
- 2) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH; Capping;
- 3) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Ser(OBn)-OH; Capping;
- 4) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH; Capping;
- 5) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Leu-OH; Capping;
- 6) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH; Capping;
- 7) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Thr(OBn)-OH; Capping;
- 8) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Leu-OH; Capping;

**a**manuelle Kupplung mit1.6 Äquivalenten Fmoc-Asn(Ara-Sulfo-Le<sup>8</sup>)-OH **80**

1.8 Äquivalenten HATU/HOAt in NMP

automatisierte Synthese

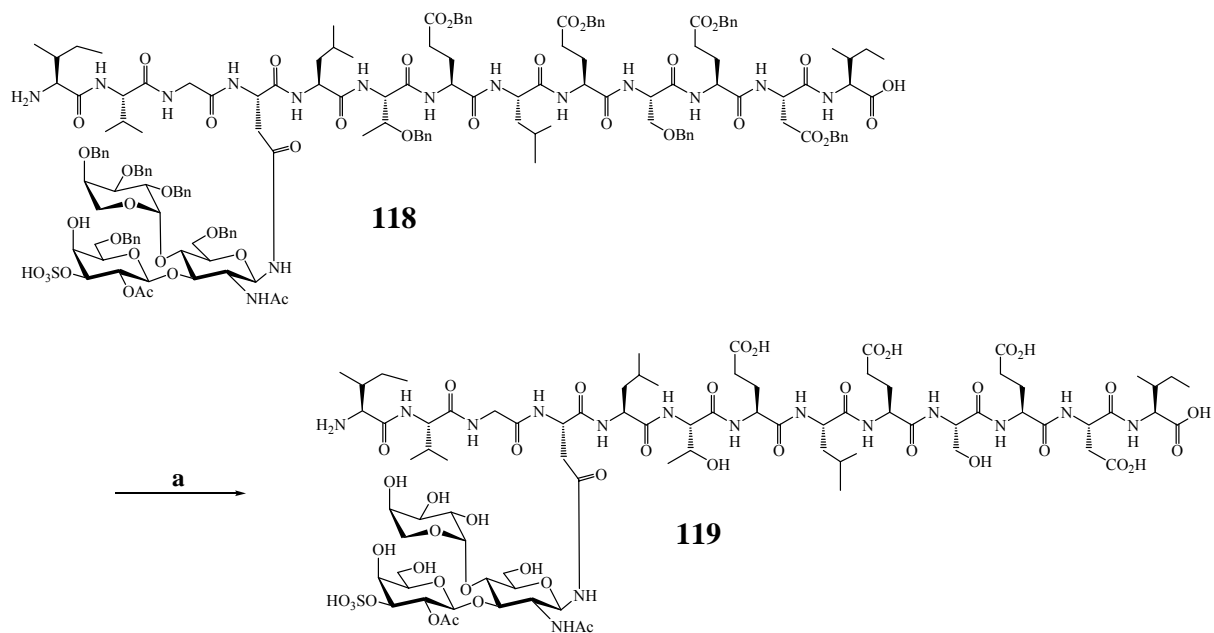
- 9) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Gly-OH; Capping;
- 10) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Val-OH; Capping;
- 11) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Ile-OH; Capping;
- 12) Fmoc-Abspaltung; Kupplung mit Fmoc-Asp(OBn)-OH; Capping;
- 13) Fmoc-Abspaltung; Capping

**Abb. 3.48** Synthese des Glycotetradecapeptids **118**a) Automatisierte und manuelle Synthese am Peptidsynthesizer; b) 1.5 Äquiv. TBAF\*3H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 min, 20°C, 15%

Generell ist anzumerken, daß die mit TBAF\*3H<sub>2</sub>O vom polymeren Träger abgespaltenen Glycopeptide in jedem Falle Reste des quartären Ammoniums Salzes enthalten. Diese Reste reichen aus, um im positiven Meßmodus von ESI- und MALDI-MS einzig den Wert 242.16 zu detektieren (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>). Bei den sulfatierten Strukturen kommt hinzu, daß die stark saure Sulfatgruppe das Tetrabutylammoniumkation salzartig binden kann und es deshalb durch

waschen nicht zu entfernen ist. Durch eine Filtration über  $\text{Na}^+$ -beladenen Ionentauscher sollte es hingegen möglich sein, letzte Reste an Ammoniumkationen zu entfernen.

Die simultane Deblockierung der Peptid- und Kohlenhydratschutzgruppen gelingt mit Palladiumhydroxid auf Kohle und Wasserstoff in einer Mischung aus Methanol/Dioxan (1:1) innerhalb von drei Tagen quantitativ.



**Abb. 3.49** Deblockierung des Glycotridecapeptids **118**

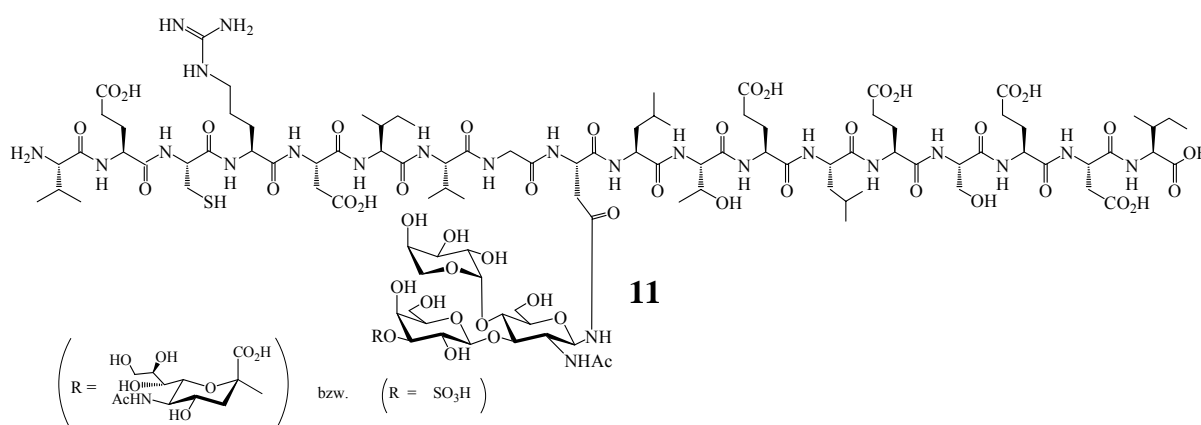
a) MeOH/Dioxan (1:1),  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ,  $\text{H}_2$ , 3d, quant.

Auch hier war eine Strukturaufklärung durch NMR nicht möglich, da die Signale des Abspaltungsreagenz die des Glycopeptids **119** um ein vielfaches übertreffen.

## 4 Zusammenfassung

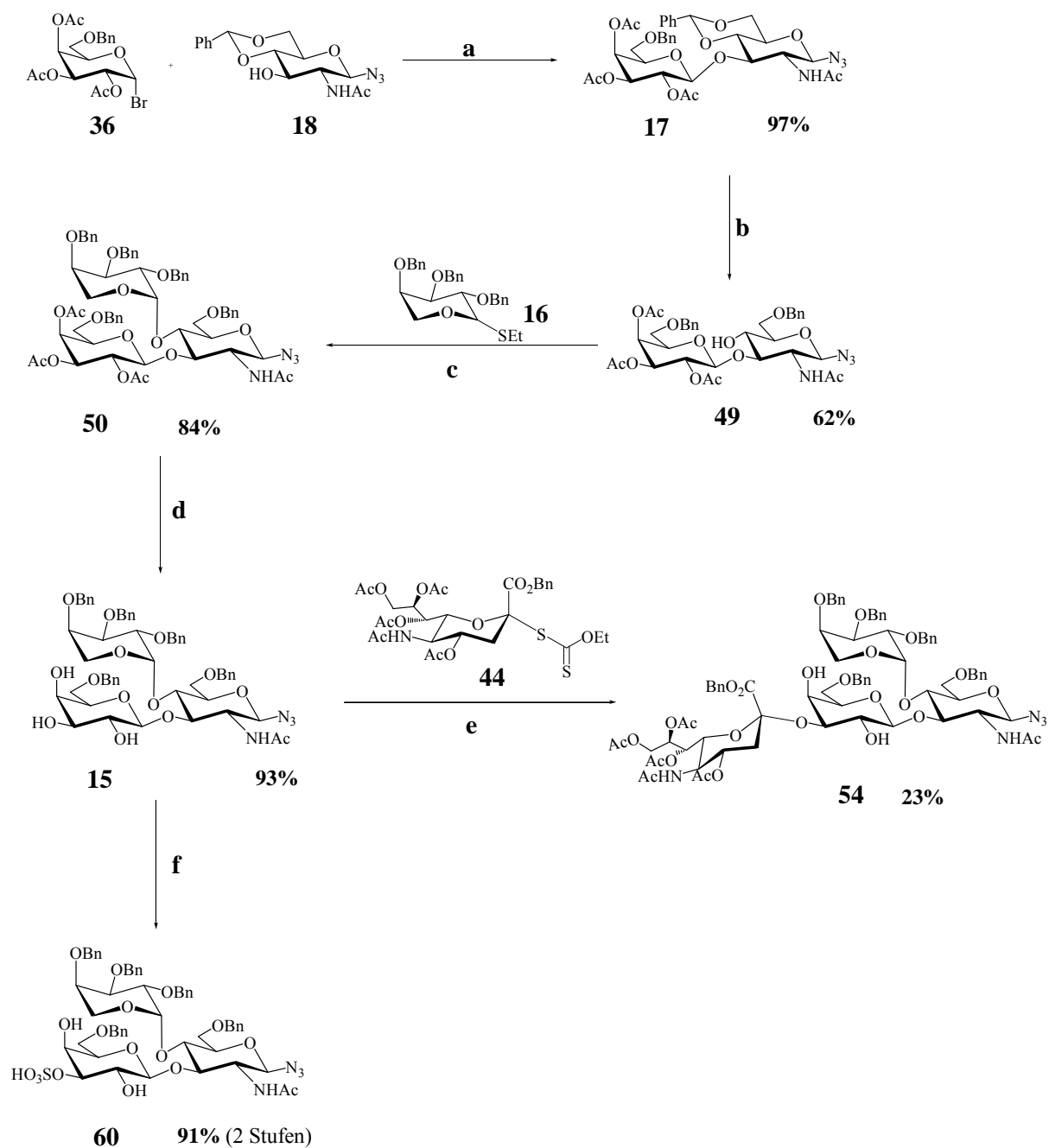
Im Verlauf inflammatorischer Prozesse vermitteln Selektine und ihre Liganden den ersten Zellkontakt zwischen Endothel und Leukozyten. Sie schaffen so die Grundlage für die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe. Eine übermäßig gesteigerte Expression von Selektinen auf den Endothelzellen bzw. Leukozyten kann aber auch bei einer Reihe von Krankheiten wie Angiopathie, myokardialer Ischämie oder Krebs beobachtet werden. Eine Therapiemöglichkeit dieser Erkrankungen besteht darin, einen Antagonisten zur gezielten Blockade der Selektine einzusetzen und damit die komplette Adhäsionskaskade von Beginn an zu unterbinden.

Ziel dieser Arbeit war die festphasengestützte Synthese einer glycosylierten Peptidsequenz **11** aus der N-terminalen Domäne des E-Selektin-Liganden-1.



Um den Kohlenhydratliganden vor enzymatischer Hydrolyse bei einem späteren therapeutischen Einsatz zu schützen, wird die im endogenen Liganden vorkommende L-Fucose gegen D-Arabinose ausgetauscht.

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde durch lineare Synthese aus den Monosaccharidbausteinen **16**, **18** und **36** ein wirksamer Aufbau des Trisaccharids Lewis<sup>a</sup> im Multigrammmaßstab erreicht (vgl. Abb 4.1). Das Galactosylbromid **36**, das benzylidengeschützte Glucosylaminderivat **18**, das Thioarabinosid **15** und das N-Acetylneuraminsäurexanthogenat **44** wurden in mehrstufigen Synthesen dargestellt.



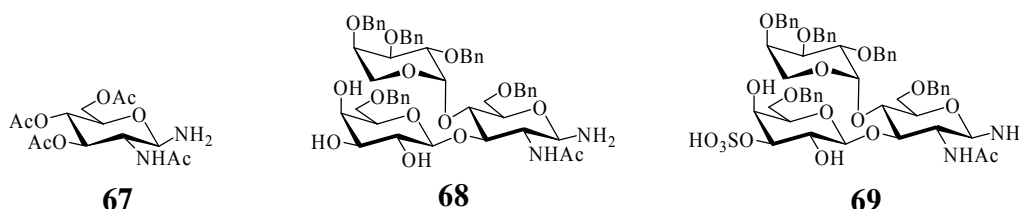
**Abb. 4.1** Synthese der Glycosylazide **54** und **60**

**a)**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$  (1:1),  $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 6d, 97%; **b)**  $\text{HCl}$ -Ether,  $\text{NaCNBH}_3$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ , 2d, 62%; **c)**  $\text{Bu}_4\text{NBr}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 6d, 84%; **d)**  $\text{NaOMe} / \text{MeOH}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 3h, 93%; **e)**  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $-65^\circ\text{C}$ , MS 3Å,  $\text{AgOTf}$ ,  $\text{MeSBr}$ , 3h, 23%; **f)** 1.  $\text{SnBu}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $65^\circ\text{C}$ , 4h; 2.  $\text{SO}_3/\text{NMe}_3$ ,  $\text{DMF}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 14h;  $\text{MeOH} / \text{EE}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 91%

Das Disaccharid **17** ließ sich aus dem Galactosylbromid **36** und dem benzylidengeschützten Glycosylaminakzeptor **18** nach *Helferich* in einer hohen Ausbeute von 97% gewinnen, wobei die Verwendung von Dichlorethan als Cosolvens zu Dichlormethan entscheidend ertragssteigernd wirkt. Die regioselektive Ringöffnung des Acetals **17** mit

Natriumcyanoborhydrid und HCl in Ether lieferte das Lactosamin **49** als neuen Akzeptor in guter Ausbeute. Nach dem modifizierten *in situ*-Anomerisierungsverfahren nach *Lemieux* konnte aus **49** und dem Thiofucosiddonor **16** das vollständig geschützte Trisaccharid Arabino-Lewis<sup>a</sup> **14** in einer Ausbeute von 84% erhalten werden. Nach Abspaltung aller acetylischen Schutzgruppen des Galactosylrestes durch Umesterung in Methanol nach *Zemplén* erhielt man das Ausgangsprodukt für die Sialylierung zum Tetrasaccharid-azid **54**. Die letztgenannte Reaktion gestaltete sich schwierig, trotz umfangreicher Optimierungsversuche konnte eine Ausbeute von über 23% reproduzierbar nicht erreicht werden. Da die pharmakophore Wirkung der Neuraminsäureeinheit hauptsächlich auf der unter physiologischen Bedingungen vorhandenen negativen Ladung des Carboxylatrestes beruht, stellt die Sulfatierung in 3'-Position des Galactosylrestes eine sinnvolle Alternative zur Sialylierung dar. Die regioselektive Sulfatierung gelang durch vorherige Komplexbildung der 3'- und 4'-Hydroxyfunktion des Galactosylteils mit Dibutylzinnoxid und anschließende Umsetzung mit Schwefeltrioxid/Trimethylaminkomplex in sehr guten Ausbeuten. Es konnte nur ein Regioisomer nachgewiesen werden. Weil die Sialylierung an dem Arabinosyl-Lewis<sup>a</sup>-Baustein **15** nur in mäßigen Ausbeuten zu erreichen war und mit der Sulfatierung eine in hohen Ausbeuten und exzellenter Regioselektivität verlaufende Alternative vorlag, wurde auf die Synthese des Tetrasaccharids Arabino-Sialyl-Lewis<sup>a</sup>-Azid verzichtet. Die weiteren Umsetzungen wurden nun mit dem sulfatierten Baustein **50** vorgenommen.

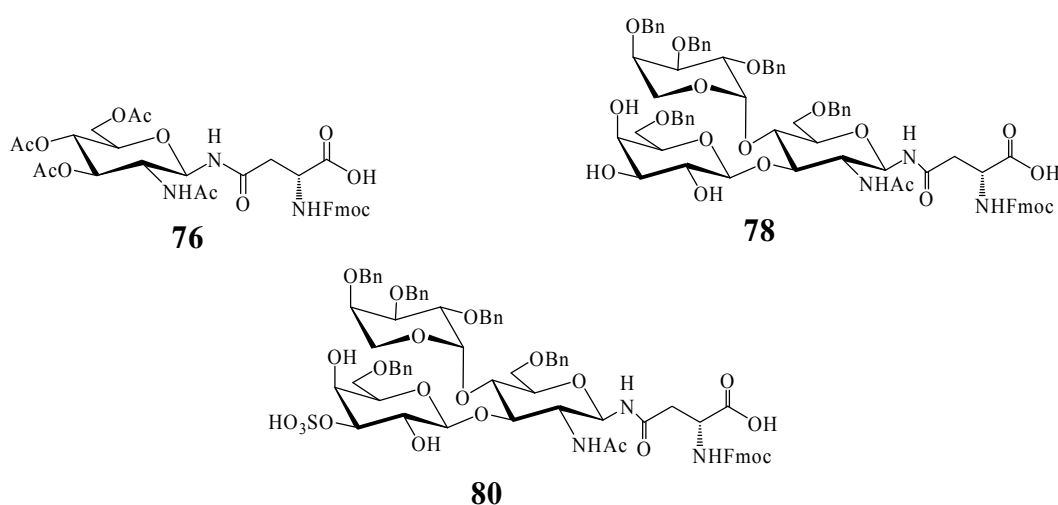
Im zweiten Teil sollte das Zielmolekül **11** in einer Festphasensynthese aufgebaut werden. Für die Synthese von N-Glycokonjugaten wurde die anomere Azidoschutzgruppe des Glucosaminteils schonend und anomerisierungsfrei zur Glycosylamin-Funktion reduziert.



Die Hydrierung der anomeren Azide **28**, **15** und **60** mit neutrale gewaschenem Raney-Nickel und Wasserstoff lieferte die entsprechenden Glycosylamine **67**, **68** und **69** in nahezu quantitativen Ausbeuten, ohne dass dabei Benzyletherschutzgruppen hydrogenolytisch gespalten wurden. Diese Glycosylamine ließen sich durch Uroniumsalze wie TBTU (2-(1H-

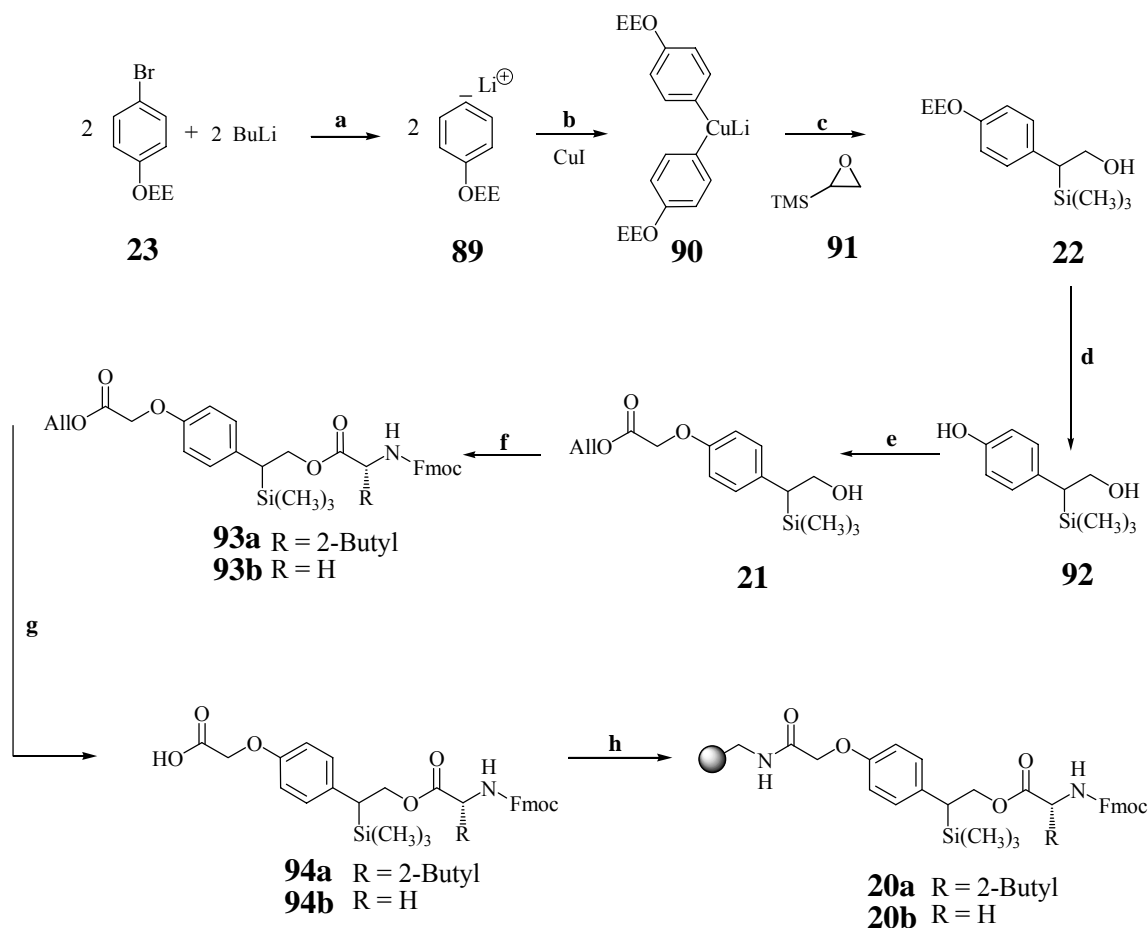
Benzotriazo-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat) oder HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazo-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) als Kupplungsreagenzien und dem Asparaginsäurederivat Fmoc-Asp-OAll anomerisierungsfrei zu den Glycosylaminosäuren **76**, **78** und **80** verknüpfen.

Nach erfolgreicher Kupplung an die anomere Aminogruppe wurde durch Palladium(0)-katalysierten Allyltransfer auf N-Methylanilin die Allylester-Schutzgruppe entfernt und die freie Säure erhalten.



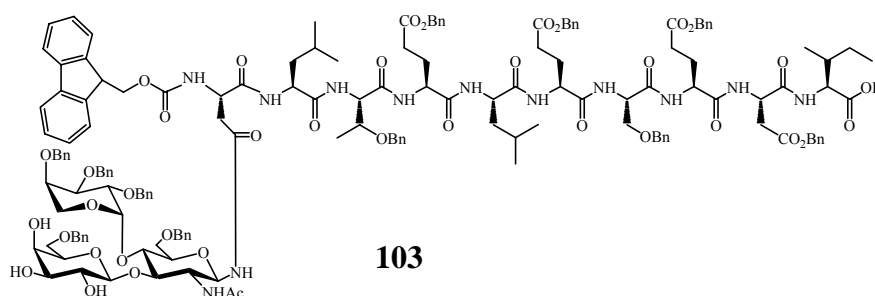
Die so gewonnenen Glycosylaminosäuren **78** und **80** ließen sich in Festphasensynthesen in eine Peptidsequenz einbringen. Da sowohl die Arabinose als auch die Sulfatgruppe sehr säurelabil sind, mußte auf den Einsatz sauer abspaltbarer Schutzgruppen und Ankersysteme verzichtet werden. Als Alternative bot sich der durch Fluoridionen spaltbare PTMSEL- Anker **20** an.

Ausgehend von 1-(4-Bromophenoxy)-1-ethoxyethan **23** wurde in einer mehrstufigen Synthese das mit der Fmoc-geschützten Startaminosäure und dem PTMSEL-Anker beladene Tentagelharz dargestellt.



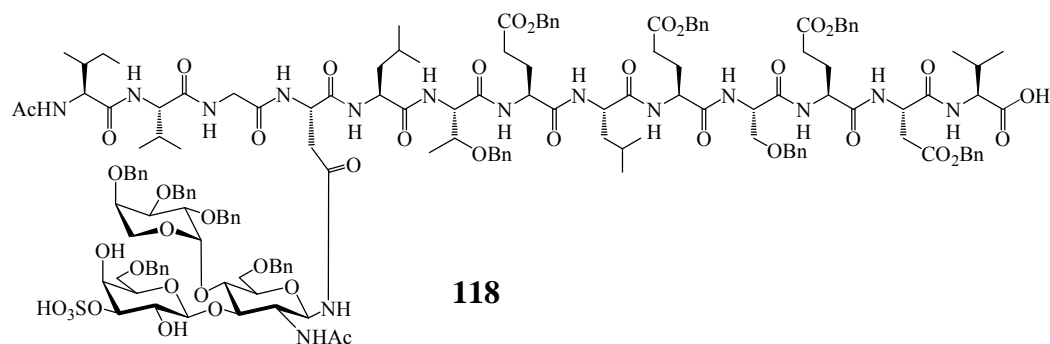
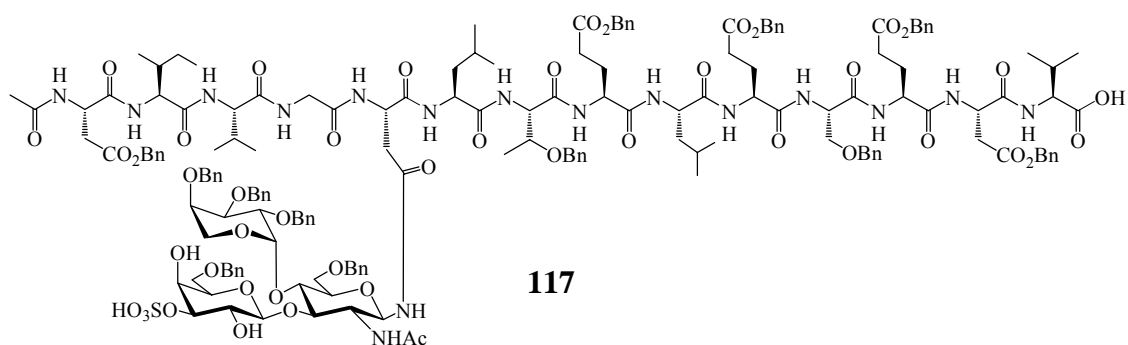
**a)** Et<sub>2</sub>O, -40°C (1h) → 10°C (2h); **b)** Et<sub>2</sub>O, Cu(I)I, 0°C, 1.5 h; **c)** Et<sub>2</sub>O, -50°C (4h) → -20°C (15h), 32% (3Stufen); **d)** MeOH, 20°C, PPTS (2.5 mo%), 0.5h, 90%; **e)** Aceton, 20°C *l.* K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KJ, **2**, ClCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>All, 36h, 20°C, 76%; **f)** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, Fmoc-AS-OH, DCC/DMAP, 12h, 71% (Ile), 64% (Gly); **g)** THF/MeOH, 20°C, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, *p*TSA-Na, quant. (Ile), 94% (Gly); **h)** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF, 20°C, NovaSynTG<sup>®</sup> HL, HBTU/HOBt/NMM, 98% (Ile), 87%(Gly)

Die Eignung des Arabino-Lewis<sup>a</sup>-Asparaginsäurebausteins **78** zum Aufbau komplexer N-Glycopeptide konnte am Beispiel der Festphasensynthese einer Partialsequenz des E-Selektinliganden ESL-1 gezeigt werden. Die Festphasensynthese des geschützten Glycodecapeptids wurde nach der Fmoc-Strategie unter Verwendung der fluoridlabilen PTMSEL-Ankergruppierung an Tentagelharz durchgeführt. Die Aktivierung der ersten acht Aminosäurebausteine erfolgte mit HBTU/HOBt, die Kupplung des folgenden Festphasenbausteins **78** wurde aufgrund höherer Aktivität mit HATU/HOAt durchgeführt.

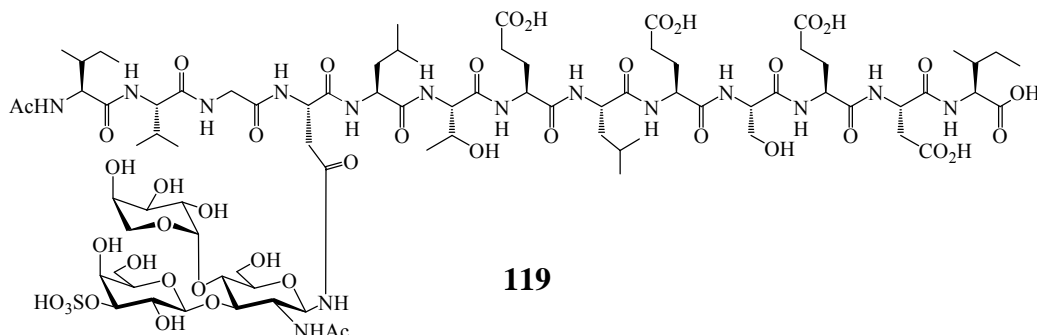


Nach Abspaltung des Ankers vom polymeren Träger mit TBAF\*3H<sub>2</sub>O in Dichlormethan konnte das Glycopeptid in einer Ausbeute von 43% rein isoliert werden. Durch MALDI-MS und korrelierte NMR-Spektroskopie wurde die Struktur **103** belegt. Eine reduktive Abspaltung der Benzylschutzgruppen und der Fmoc-Gruppe mit Palladium auf Kohle in Methanol/DMSO ergab eine Substanz, deren Massen- und NMR-spektroskopische Untersuchung bisher kein eindeutiges Ergebnis lieferte.

Der Aufbau der glycosylierten Zielsequenz **11** wurde ebenfalls in einer Festphasensynthese an dem mit der Startaminosäure funktionalisierten Tentagelharz **20a** angestrebt. Die Anknüpfung der ersten acht Aminosäurebausteine erfolgte mit den Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt, die sulfatierte Glycosylaminosäure **80** konnte durch die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU/HOAt eingebracht werden. Auch die Einführung der nächsten vier Aminosäurebausteine gelang gut, doch wurde der darauffolgende Argininbaustein Fmoc-Arg(di-Z)-OH **84** nur unzureichend in N-Methylpyrrolidon gelöst und stand deshalb für die Kupplung nicht zur Verfügung. Die Peptidsequenz wurde im anschließenden Cappingschritt der weiteren Synthese entzogen. Nach Eliminierung des Anker-moleküls mit TBAF\*3H<sub>2</sub>O konnte statt des Glycotetradecapeptids **117** nur das um eine Aminosäure verkürzte Glycotridecapeptid **118** massenspektroskopisch nachgewiesen werden.



Die nachfolgende hydrogenolytische Spaltung der Schutzgruppen mit  $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2$  in Methanol und Dioxan gelang glatt, die Verbindung **119** konnte massenspektroskopisch charakterisiert werden.



In dieser Arbeit wurde eine Syntheseroute entwickelt, nach der die Verwendung hydrolyseempfindlicher sulfatierter Glycosylaminosäuren in einer Festphasenglycopeptidsynthese möglich ist. Dadurch können N-Acetylneuraminsäuren in Sialoglycopeptidstrukturen ersetzt werden. Der 2-Phenyl-2-trimethylsilyl-ethyl-linker (PTMSEL) ermöglicht eine Abspaltung unter nahezu neutralen Bedingungen vom polymeren Träger unter Erhalt sowohl der sehr säurelabilen Arabinosid-Bindung als auch der O-Sulfatgruppe. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieses Ankersystem zum Aufbau ausschließlich durch Benzylether geschützter Glycopeptide geeignet ist. Es wird jedoch auch darauf hingewiesen, daß Reste an Abspaltungsreagenz die Charakterisierung der Substanzen sehr erschweren und ein Protokoll zu ihrer Entfernung gefunden werden muß. Diese Erkenntnisse können insbesondere im Hinblick auf die biologische Evaluierung der gewonnen Substanzen zum Aufbau weiterer sulfatierter Glycopeptide genutzt werden.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeines und Meßgeräte

Absolute Lösemittel wurden nach literaturbekannten Verfahren<sup>141</sup> gewonnen und frisch destilliert eingesetzt.

Säulenchromatographie: Zur Säulenchromatographie unter Normaldruck wurde Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm) der Fa. Baker verwendet. Für Flash-Chromatographien wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 0.04-0.063 der Fa. Merck verwendet.

Dünnschichtchromatographie: Zur Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigplatten mit und ohne Konzentrierungszone der Fa. Merck verwendet. Die Beschichtung bestand aus Kieselgel 60F<sub>254</sub> bzw. RP-C18<sub>254</sub>. Die Detektion der Produkte erfolgte durch:

- UV-Licht der Wellenlänge 254 nm
- Methoxyphenol-Reagenz (1:1-Mischung aus 0.2%-iger ethanolischer Methoxyphenol-Lösung und 2N ethanolischer Schwefelsäure). Die Entwicklung erfolgt durch Wärmeeinwirkung.
- Seebach-Reagenz (1g Cer-(IV)-sulfat-Tetrahydrat und 2.5g Molybdato-phosphorsäure in einer Mischung aus 94 ml entionisiertem Wasser und 6 ml konz. Schwefelsäure). Die Entwicklung erfolgt durch Wärmeeinwirkung.
- Ninhydrin-Reagenz (1.5 g Ninhydrin in einer Mischung aus 15 ml Essigsäure und 500 ml Methanol). Die Entwicklung erfolgt durch Wärmeeinwirkung.

NMR-Spektroskopie: Die Kennzeichnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Signale in der Interpretation der Saccharid-NMR-Spektren erfolgte nach folgendem Schema:

N-Acetyl-D-glucosamin	ohne Apostroph
D-Galactose	'
D-Arabinose	"
N-Acetyl-D-Neuraminsäure	'''

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

- Bruker WT-200: 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR und 75.3 MHz <sup>13</sup>C-NMR
- Bruker AM-400: 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR und 100.6 MHz <sup>13</sup>C-NMR
- Bruker DRX-600: 600 MHz <sup>1</sup>H-NMR und 150.9 MHz <sup>13</sup>C-NMR

---

<sup>141</sup> D. D. Perrin, W. L. F. Amarego, Purification of Laboratory Chemicals, 3. Aufl., Pergamon Press, Oxford, 1988

Das jeweilige Lösemittel wurde als Standard verwendet.

Elementaranalyse: Die Elementaranalyse wurden im Mikroanalytischen Labor des Instituts für Organische Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt

Schmelzpunkte: Sämtlich Schmelzpunkte wurden an einer Büchi-Schmelzpunktapparatur nach Dr. Tottoli bestimmt und sind unkorrigiert.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 bestimmt, wobei auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert wurde. Lösemittel, Konzentration und Temperatur sind bei den einzelnen Verbindungen vermerkt.

Massenspektrometrie:

FD-Massenspektren wurden am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg – Universität mit einem Finnigan MAT-95 aufgenommen.

ESI-Massenspektren wurden auf einem Navigator-Instrument (Fa. ThermoQuest) in einem Massenbereich von 200 – 1600 (m/z) unter Verwendung von Acetonitril / Wasser 70:30, einer Flußrate von 0.75 ml / min, einer variablen cone voltage und einem N<sub>2</sub>-Strom von ca. 300 l/h aufgenommen. Zur Probeninjektion wurde ein Basic Marathon Autosampler der Fa. Spark mit einer 20 µl – Probenschleife (Probenkonzentration 0.1 g/l) verwendet.

MALDI-TOF-Spektren wurden mit einem Todspect E-Gerät der Fa. Micromass, Eschborn, aufgenommen. Als Matrix wurden 4-Hydroxy- $\alpha$ -cyano-zimtsäure (cca) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (dhb) verwendet.

Peptidsynthese: Manuelle Reaktionen am polymeren Träger wurden in einem dem Merrifieldschen Festphasenreaktor nachempfundenen Reaktionsgefäß durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen 100 ml Rundkolben mit Hülse NS 29/32, in dessen Boden eine Glasfritte eingelassen ist. Daran angesetzt ist ein Vakuumvorstoß mit PTFE-Hahn, ein Schlauchleitungsanschluß mit Gewinde GL18 und ein Kernschliff NS 28/32, so daß es möglich ist, die Reaktionslösung durch Anschluß des Reaktors an eine Membranpumpe in einen Auffangkolben zu filtrieren. Während der Reaktion wird der Reaktor auf einem Kreisschüttler 3015 der Fa. GLF angebracht und mit 200 U/min geschüttelt. Die automatisierte Peptidsynthese wurde an einem Peptidsynthesizer ABI 433A der Fa. Applied

Biosystems durchgeführt. Die Synthese wird anhand eines Leitfähigkeitsmonitorings verfolgt, welches den Verlauf der einzelnen Fmoc-Abspaltungen und somit der gesamten Peptidsynthese widerspiegeln soll. Es kann allerdings nach erfolgter Kupplung der neuen Aminosäure eine höhere Beladung (>10%) als theoretisch möglich angezeigt werden, so daß dies nur einen Richtwert darstellt.

Die Beladungsbestimmung erfolgt photometrisch anhand der UV-Absorption des Fluorenylmethyl-Piperidin-Adduktes, das durch Versetzen von 20 mg des mit einer Fmoc-Aminosäure beladenen Harzes mit Piperidin entsteht. Ein detailliertes Protokoll dieser Prozedur findet sich im Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry (1998), S. 330.

#### HPLC:

Analytische HPLC wurde mit einer Maxistar K1000-Gradientenpumpe, einem 4-Kanal-Entgaser sowie einem Diodenarraydetektor DAD 2062 (Fa. Knauer) durchgeführt. Als Eluentien dienten frisch entgaste Wasser-Acetonitril-Gemische (Fa. Fischer) bei einer Flußrate von 1 ml/min, wobei den Mischungen z. T. 0.1% TFA zugesetzt wurde. Die Detektion erfolgte bei 200-214 nm. Folgende Säulen wurden als stationäre Phasen verwendet:

Phenomenex LUNA C18 5 $\mu$ , 250 x 4.6 mm

Phenomenex Jupiter 300A C18 5 $\mu$ , 250 x 4.6 mm

Knauer Eurosphere C8 5 $\mu$ , 250 x 4 mm

Als Eluentien wurden folgende Wasser-Acetonitril-Gemische verwendet:

#### Gradient A:

	0	40	45	60
H <sub>2</sub> O	60	10	0	0
CH <sub>3</sub> CN	40	90	100	100

#### Gradient B: (Enthält 0.1% TFA)

	0	5	20	40	45	60
H <sub>2</sub> O	80	80	50	20	0	0
CH <sub>3</sub> CN	20	20	50	80	100	100

Gradient C: (Enthält 0.1% TFA)

	0	10	15	25
H <sub>2</sub> O	80	80	0	0
CH <sub>3</sub> CN	20	20	100	100

Gradient D: (Enthält 0.1% TFA)

	0	5	15	25
H <sub>2</sub> O	50	10	0	0
CH <sub>3</sub> CN	50	90	100	100

Semipräparative HPLC und präparative HPLC wurde mit einem Knauer Ministar K 500 Pumpe und einem variablen Wellenlängenmonitor von Knauer durchgeführt. Bei der semipräparativen HPLC wurde mit einer Flussrate von 10 ml / min, bei der präparativen HPLC mit einer Flussrate von 20 ml /min gearbeitet. Die Detektion erfolgte bei  $\lambda = 215$  bzw. 254 nm.

Folgende Säule wurde als stationäre Phase verwendet.

Phenomenex Jupiter C18

Phenomenex LUNA C18

Der verwendete Gradient und wird bei der Versuchsbeschreibung aufgeführt.

Bei den Molmassen in runden Klammern wurde die natürliche Isotopenverteilung eingerechnet. Bei den Molmassen in eckigen Klammern wurden die Massen der reinen Isotopen <sup>1</sup>H, <sup>12</sup>C, <sup>14</sup>N, <sup>16</sup>O und <sup>32</sup>S zugrundegelegt.

## 5.2 Synthesen zu Kapitel 3.1

### 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-glucoopyranosyl-chlorid<sup>52,53</sup> 27

215 g (1 mol) Glucosaminhydrochlorid **26** werden in 1 l absol. MeOH vorgelegt und langsam mit 1.2 g (0.05 mol) Na in kleinen Stücken versetzt, so daß die Lösung gelinde siedet. Nach Abkühlen auf Raumtemp. werden innerhalb von 2 h 125 ml Acetanhydrid hinzugegeben und 1 d gerührt. Das Produkt fällt bei 4°C aus, wird mit 100 ml Ethanol und 200 ml Ether gewaschen und i. Hochvak. getrocknet. 161 g (0.77 mol) des so erhaltenen N-Acetylglucosamins werden unter kräftigem Rühren in 500 ml Acetylchlorid gelöst und mit 2 ml konz. HCl versetzt. Die Lösung beginnt nach 10 min zu sieden. Man läßt nach 1 h auf Raumtemp. abkühlen und 14 h bei dieser Temperatur rühren. Das Lösemittel wird anschließend i. Hochvak entfernt, der braune Rückstand in 400 ml Dichlormethan aufgenommen und vorsichtig mit je 400 ml Eiswasser und 10%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. versetzt. Man gibt unter kräftigem Rühren so viel festes Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zu, bis die Lösung einen pH-Wert von 9.5 aufweist. Die organ. Phase wird abgetrennt, mit 500 ml Wasser gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Man erhält das Produkt durch chromatographische Reinigung an 300 g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (1:3).

Ausb.: 243 g (0.67 mol, 67% d. Th.; Lit.<sup>142</sup>: 79%); brauner amorpher Feststoff;  $R_f = 0.26$  (PE/EE 1:3);

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>8</sub>Cl

(365.09)

FD-MS (m/z) = 365.7 [M+H]<sup>+</sup>

### 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-glucoopyranosyl-azid<sup>54,56</sup> 28

Es werden 150 g (0.41 mol) des N-Acetamidglycopyranosylchlorids **27** in 500 ml Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit 50 g (0.76 mol, 1.9 Äquiv.) Natriumazid, gelöst in 300 ml Wasser, versetzt. Als Phasentransferkatalysator werden 3 g Aliquat336<sup>®</sup> in 20 ml Dichlormethan hinzugegeben. Man rührt 2 d, trennt die wässr. Phase ab und extrahiert diese zweimal mit je 150 ml Dichlormethan. Die vereinigten organ. Phasen werden dreimal mit je 200 ml 10%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg und viermal mit je 200 ml Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Das Produkt fällt in kaltem Petrolether aus. Ausb.: 123 g (0.33 mol, 81% d. Th.; Lit.<sup>56</sup>: 88%); farbloser Feststoff; Schmp. 165°C, Lit.<sup>56</sup>:

<sup>142</sup> B. R. Baker, J. P. Joseph, R. E. Schaub, J. H. Williams, *J. Org. Chem.*, **19** (1954), 1786-1792

166-167°C;  $R_f = 0.32$  (PE/EE 1:3);  $[\alpha]_D^{22} = -42.01$  ( $c = 1.0, \text{CHCl}_3$ ), Lit.<sup>69</sup>:  $-45.01$  ( $c = 1.0, \text{CHCl}_3$ );

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8$

(372.12)

FD-MS ( $m/z$ ) = 373.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 2-Acetamido-2-desoxy- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranosyl-azid<sup>55,56</sup> 29

Es werden 39.5 g (106 mmol) **28** in 300 ml absol. MeOH gelöst und mit wenigen Stücken (ca 0.5 g) Natrium versetzt. Man rührt 1 d bei Raumtemp., versetzt anschließend mit 2 g Amberlyst15 (stark sauer in MeOH) und filtriert vom Ionentauscher ab. Nach Destillieren des Lösemittels i. Vak. wird das Produkt aus Methanol/Ethylacetat (1:2) umkristallisiert.

Ausb.: 26.1 g (quant., Lit.<sup>56</sup> quant); farbloser Feststoff; Schmp.: 146°C (Lit.<sup>56</sup>: 146-147);  $R_f = 0.73$  (MeOH);  $[\alpha]_D^{22} = -43.33$  ( $c = 1.0$  MeOH), Lit.<sup>69</sup>:  $-23.7$  ( $c = 1.0, \text{H}_2\text{O}$ );

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$

(246.21)

### 2-Acetamido-(4,6-O-benzyliden)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid<sup>58</sup> 18

Eine Mischung aus 18.7g (76 mmol) feingepulvertem 2-Acetamido-glucosylazid **29** und 1.5 g *p*-Toluolsulfinsäure-Monohydrat (7.6 mmol) werden mit 70 ml Benzaldehyddimethylacetal sowie 50 ml absol. MeOH versetzt und stark geschüttelt, bis nach 50 min die Masse gelartig erstarrt. Der beige gefärbte Feststoff wird 3 h bei Raumtemp. stehengelassen und danach mit 200 ml eines Petrolether/Diethylether-Gemisches (1:1) aufgenommen. Die Suspension wird mit 1.5 ml  $\text{NEt}_3$  neutralisiert und anschließend filtriert. Der so erhaltene Feststoff wird mit 200 ml Diethylether nachgewaschen, scharf abgesaugt und anschließend in 700 ml eines Dichlormethan/Methanol-Gemisches in der Siedehitze gelöst. Man versetzt die Lösung mit 100 g Kieselgel z. A. und entfernt die Lösemittel i. Vakuum. Durch Flash-Chromatographie an 200 g Kieselgel werden mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:1) unpolare Verunreinigungen entfernt. Anschließend wird mit Ethylacetat/Ethanol (1:1) das Produkt eluiert.

Ausb.: 24.8 g (34.8 mmol, 97% d. Th., Lit.: 82%); farbloser Feststoff; Schmp.: 201°C (Lit. 214-216 (korr.);  $R_f = 0.41$  (EE);  $[\alpha]_D^{22} = -71.94$  ( $c = 1.0$  DMF);

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$  Ber: C: 53.89 H: 5.43 N: 16.70

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Ber: C: 51.13 H: 5.72 N: 15.90

(334.13) Gef.: C: 51.30 H: 5.60 N: 16.05

FD-MS (m/z) = 335.4 [M + H]<sup>+</sup>

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm]:

7.96(d, 1H, J<sub>NH,2</sub>=8.30Hz, NH); 7.47-7.35 (m, 5H, H<sub>arom.</sub>); 5.62(s, 1H, H<sub>ipso</sub> -Aryl); 5.44(d, 1H, J<sub>3-OH,H-3</sub>=4.33Hz, 3-OH); 4.59(d, 1H, J<sub>1,2</sub>=8.79Hz, H-1); 4.21(dd, 1H, H-6a); 3.81-3.51(m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a); 1.79(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc))

### **1,2;3,4-Di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose<sup>59</sup> 31**

In einem 6 l Einhalskolben werden 180 g (1 mol)  $\alpha,\beta$ -D-Galactopyranose in 4 l absol. Aceton gelöst, mit 400 g (2.5 mol) CuSO<sub>4</sub> und 20 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und mit einem KPG-Rührer 20 h gerührt. Man filtriert über eine Glasfritte ab, wäscht mit 1 l kaltem Aceton nach und stellt durch Zugabe von Cu(OH)<sub>2</sub> einen neutralen pH-Wert ein. Es wird wiederum über eine Glasfritte abgesaugt und anschließend das Lösemittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird destillativ gereinigt.

Ausb.: 228 g (0.88 mol, 88% d. Th., Lit.<sup>69</sup>: 72%); gelbes Öl; Sdp.<sub>:(0.04mbar)</sub>: 135-153°C, Lit.<sup>59</sup><sub>(0.001-0.01 mm)</sub>: 130-140°C;

C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>

(260.12)

FD-MS(m/z) = 260.7 [M]<sup>+</sup>

### **6-O-Benzyl-1,2;3,4-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-galactopyranose<sup>64</sup> 32**

Man löst 122 g (0.47 mol) Diisopropylidengalactose **31** in 900 ml DMF, kühlt auf 0°C ab und trägt in diese Lösung langsam 25 g (1.35 Äquiv.) NaH (60%ig in Mineralöl) ein. Unter Gasentwicklung steigt die Temp. auf 40°C an. Der Ansatz wird 2 h weitergerührt und nach dieser Zeit mit 76 ml (115 g, 1.35 Äquiv.) BnBr, gelöst in 100 ml DMF, tropfenweise versetzt. Es wird 20 h nachgerührt und anschließend mit 50 ml MeOH überschüssiges NaH vernichtet. Das Lösemittel wird i. Hochvak. entfernt, das resultierende Öl in 700 ml Ethylacetat aufgenommen und mit einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen. Zur Phasentrennung muß evtl. ges. NaCl-Lsg zugegeben werden. Nach Abtrennung der organ. Phase wird diese mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel i. Vak entfernt und das Produkt durch eine Hochvakuumdestillation erhalten.

Ausb.: 73 g (44% d. Th. Lit.: 68% ); R<sub>f</sub> = 0.77 (PE/EE 1:1); gelbes Öl; Sdp.<sub>:(0.04)</sub>: 160-165°C, Lit.: 156°C

C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub> (350.17)

FD-MS(m/z) = 350.6 [M]<sup>+</sup>

**1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose<sup>61,64</sup> 33**

Eine Suspension von 76.5 g (218.5 mmol) 6-O-Benzyl-di-isopropyliden-galactose **32** in 300 ml 60%-iger Essigsäure wird zwei Tage bei 100°C Badtemperatur gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird der Reaktionsansatz i. Vak. eingedampft und zweimal mit je 75 ml Toluol codestilliert. Das Rohprodukt (58.9 g, 217 mmol) wird nach Trocknen i. Hochvak. in 350 ml Pyridin gelöst. Es werden 125 mg DMAP zugegeben und unter Kühlung 350 ml Acetanhydrid zugetropft. Der Ansatz wird 90 min gerührt, überschüssige Reagenzien werden abdestilliert und der Rückstand anschließend zweimal mit je 80 ml Toluol codestilliert. Man nimmt in 250 ml Essigsäureethylester auf, wäscht die organ. Phase zweimal mit 100 ml Wasser, trocknet mit MgSO<sub>4</sub> und engt i. Vak. ein. Das Rohprodukt wird mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (5:1) gereinigt und ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

Ausb.: 75.21 g (171.5 mmol, 79% d. Th. Lit.<sup>64</sup>: 50%); gelbes Öl; R<sub>f</sub>=0.58 (CH/EE 1:1);

C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>

(438.15)

ESI-MS (m/z) = 461.2 [M+Na]<sup>+</sup>

**2,3,4-Tri-O-acetyl-6-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose<sup>62</sup> 34**

Es werden 11.2 g (0.026 mol) **33** in 100 ml absol. DMF gelöst, mit 3.5 g (0.038 mol, 1.5 Äquiv.) N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>\*CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H versetzt und 50 min auf 40°C erwärmt. Nach dieser Zeit kann vollständiger Umsatz detektiert werden (DC-Kontrolle). Die Lösung wird daraufhin mit 500 ml Ethylacetat versetzt. Man wäscht die organ. Phase mit je 100 ml NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und ges. NaCl-Lsg., trocknet über MgSO<sub>4</sub> und entfernt das Lösemittel i. Vak. Man erhält das Produkt als Anomerengemisch durch Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (5:1).

Ausb.: 5.1 g (13 mmol, 50% d. Th.; Lit.: k.A.); gelbes Öl; R<sub>f</sub> = 0.42 (PE/EE 1:1);

C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>

(396.14)

**2,3,4-Tri-O-acetyl-6-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosyl-trichloracetimidat<sup>63</sup> 35**

Man löst 5.1g (0.013 mol) des partiell deblockierten Galactosylderivats **34** in 40 ml Dichlormethan und versetzt die Lösung mit 10 ml Trichloracetonitril. Nach der Zugabe von 5 Tropfen Diazabicycloundecen wird die gelbe Lösung 20 h gerührt. Das Lösemittel wird nach dieser Zeit i. Hochvak. entfernt und das Produkt durch Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (3:1 + 1% NEt<sub>3</sub>) erhalten. Das saubere  $\alpha$ -Anomer fällt man aus Ethylacetat unter vorsichtiger Zugabe von Petrolether aus.

Ausb.: 3.9 g (7.3 mmol, 57% d. Th. Lit.<sup>64</sup>: 36%); farbloser Feststoff; Schmp.:134°C, Lit.: 131°C, R<sub>f</sub> = 0.55 (PE/EE 2:1);  $[\alpha]_D^{22} = 63.30$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>64</sup> : 62.14, c = 1.05, CHCl<sub>3</sub>);

C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>NCl<sub>3</sub> Ber.: C 46.64 H 4.47 N 2.59

(540.81) Gef.: C 46.65 H 4.52 N 2.57

FD-MS (m/z) = 541.6 [M+H]<sup>+</sup>

**2,3,4-Tri-O-acetyl-6-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosylbromid<sup>66,67</sup> 36**

Zu einer Mischung von 10 g ausgeh. Molekularsieb (3Å) und 1.15 g BiBr<sub>3</sub> (7.5 mmol, 5 mol%) werden 22 g (50.25 mmol) 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose **33** in 250 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> über eine Kanüle zugespritzt. Der Ansatz wird auf -50°C abgekühlt und 25 g (163.3 mmol, 3.25 Äquiv.) Trimethylsilylbromid in 250 ml absol. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, in kleinen Portionen (50 ml) zugespritzt. Die Reaktionsmischung verfärbt sich daraufhin gelb. Nach 24 h Rühren bei dieser Temperatur werden weitere 7.5 ml (0.75 Äquiv.) Trimethylsilylbromid sowie eine Spatelspitze BiBr<sub>3</sub> hinzugefügt und die Mischung weitere 2 d bei -10°C gehalten. Ein vollständiger Umsatz kann nicht detektiert werden. Man filtriert das Molekularsieb über HyFlo-Supercel<sup>®</sup> ab und wäscht gründlich mit Dichlormethan nach, neutralisiert das Filtrat unter Eiskühlung mit 200 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und wäscht mit 200 ml H<sub>2</sub>O. Die organ. Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Produkt kann durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (3:1) rein erhalten werden, zersetzt sich auf der Säule jedoch relativ schnell, so daß die direkte weitere Umsetzung ohne Reinigung zu empfehlen ist.

Ausb.: 22.9 g (49.8 mmol, 75% d. Th., Lit.<sup>67</sup> 59%); R<sub>f</sub> = 0.68 (CH/EE 1:1);  $[\alpha]_D^{22} = -8.7$  (c=1, CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>67</sup> k. A.;

C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>BrO<sub>8</sub>

(459.29)

ESI-MS (m/z) = (481.1) [M + Na]<sup>+</sup>

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm]:

7.32-7.26 (m, 5H, H<sub>arom.</sub>); 6.67(d, 1H, J<sub>1,2</sub>=3.42Hz, H-1'), 5.60(m, 1H, H-4'), 4.38(t, 1H, J<sub>2,1</sub>=3.41Hz, J<sub>2,3</sub>=6.34Hz, H-2'), 4.99 (dd, 1H, J<sub>3,2</sub>=6.34Hz, H-3'), 4.56-4.35 (m, 3H, CH<sub>2</sub>(OBn), H-5'), 3.51-3.45 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 2.07, 2.01, 1.97 (3s, 9H, CH<sub>3</sub>(OAc));

### **1,2,3,4-Tetra-O-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-arabinopyranose<sup>69,143</sup> 38**

Man löst 103 g (0.69 mol)  $\alpha,\beta$ -D-Arabinopyranose in 900 ml Pyridin und versetzt die Lösung innerhalb von 2 h mit 1500 ml Acetanhydrid. Man rührt 3 h bei 50°C nach, entfernt das Lösemittel i. Vak. und destilliert vom resultierenden gelben Öl zweimal je 250 ml Toluol ab. Durch Chromatographie an 500 g Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (2:1) erhält man die peracetylierte Arabinose als gelbes Öl.

Ausb.: 203.5 g (0.64 mol, 92% d. Th. Lit. : quant); gelbes Öl; R<sub>f</sub> = 0.27 (PE/EE 2:1);  $[\alpha]_D^{22} = -126.80$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>, nur  $\beta$ -Anomer), Lit.<sup>69</sup>: -129.9 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>

(318.05)

FD-MS (m/z) = 275.6 [M-AcOH]<sup>+</sup>

### **Ethyl-2,3,4-tri-O-acetyl-1-thio- $\alpha,\beta$ -D-arabinopyranosid<sup>69</sup> 39**

Es werden 34.5 g (0.11 mol) **38** in 250 ml Dichlormethan gelöst und 1 h über ausgeh. Molekularsieb (3Å) gerührt. Die Lösung wird auf -50°C abgekühlt. Nach der Zugabe von 11.6 ml (1.5 Äquiv.) Ethanthiol werden langsam 16 ml (1.25 Äquiv.) BF<sub>3</sub>\*OEt<sub>2</sub> eingebracht. Man rührt 1 d bei -25°C und gibt nochmals die gleiche Menge des Mercaptans und der Lewis-Säure zu. Nach weiteren 20 h Rühren bei -25°C neutralisiert man den Ansatz durch Zugabe von 105 ml NEt<sub>3</sub>. Der Ansatz wird je dreimal mit 250 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg und ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit.

Ausb.: 203.5g (0.64 mol, 92% d. Th. Lit: 39%); farbloses Öl; R<sub>f</sub> = 0.27 (PE/EE 2:1); Lit.:

$[\alpha]_D^{22} = +7.4$  (c = 1, CHCl<sub>3</sub>);

C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>S

(320.35)

FD-MS (m/z) = 321.5 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>143</sup> Chem Abstr., (1964), 5737h-5738a;

**Ethyl-1-thio- $\alpha,\beta$ -D-arabinopyranosid<sup>69</sup> 40**

9.35 g (0.03 mol) werden in 100 ml absol. Methanol gelöst und durch Zugabe von wenigen Stücken Na zum gelinden Sieden erhitzt. Man rührt 20 h bei Raumtemp., versetzt anschließend mit 1 g Ionenaustauscher Amberlyst15 und rührt für 30 Minuten. Es wird vom Ionenaustauscher abfiltriert, mit 100 ml Methanol nachgewaschen und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Die Verbindung wird ohne weitere Charakterisierung weiter umgesetzt.

Ausb.: 5.45 g (quant.);  $R_f = 0.37$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  6:1);

**Ethyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1-thio- $\alpha,\beta$ -D-arabinopyranosid<sup>69</sup> 16**

In eine auf 0°C abgekühlte Lösung aus 5.45 g (0.03 mol) **40** in 300 ml DMF werden unter kräftigem Rühren 8.75 g NaH (60% in Mineralöl, 0.21 mol, 7.6 Äquiv.) eingetragen. Man rührt 2 h bei dieser Temperatur nach und versetzt langsam mit 15 ml (0.14 mol, 4.5 Äquiv.) Benzylbromid. Der Ansatz wird auf Raumtemp. erwärmt und 20 h gerührt. Nach dieser Zeit werden, um überschüssiges NaH zu hydrolysieren, 20 ml Methanol hinzugegeben. Nach 10 min Rühren versetzt man die Lösung mit 500 ml eines Wasser/Toluol-Gemisches, wäscht viermal mit 200 ml ges. NaCl-Lsg. und trennt die organ. Phase ab. Diese wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und i. Hochvak. vom Lösemittel befreit. Das Produkt erhält man durch Chromatographie an 300 g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (10:1).

Ausb.: 9.31 g (0.02 mol, 66% d. Th. Lit.: 62%); farbloses Öl;  $R_f = 0.57$  (PE/EE 3:1);  $[\alpha]_D^{22} = +18.9$  ( $c = 1.0$   $\text{CHCl}_3$ ,  $\alpha$ -Anomer), Lit.: +20.4, ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\alpha$ -Anomer);

$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{S}$   
(464.61)

ESI-MS ( $m/z$ ) = 487.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**Methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid-onat<sup>71</sup> 42**

Man suspendiert 3 g (0.095 mol) Neuraminsäure mit 6.5 g Dowex 50WX8 Ionenaustauscher in 250 ml Methanol und schüttelt den Ansatz 14 h. Danach wird der Ionenaustauscher abfiltriert und mit der gleichen Menge Methanol nachgewaschen. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und der verbleibende Feststoff ohne Reinigung weiter eingesetzt.

Ausb.: 3.31 g (0.01 mol, quant.); amorpher Feststoff;  $R_f = 0.72$  (Pentanol/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$  5:2:2);

$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_9$   
(323.11)

FD-MS ( $m/z$ ) = 324.6  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**Methyl-(5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)-onat<sup>71</sup> 43**

2.2 g (0.007 mol) des Neuraminsäuremethylesters **42** werden in 50 ml Pyridin gelöst, auf 0°C abgekühlt und mit 15 ml Acetanhydrid versetzt. Es wird 24 h gerührt, die Lösung mit 50 ml Toluol verdünnt und die Lösemittel anschließend entfernt. Man erhält das Produkt durch Chromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat als Laufmittel.

Ausb.: 2.33 g (0.043 mol, 64% d. Th.); farbloser amorpher Feststoff;  $R_f = 0.53$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1);

C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>14</sub>

(533.17)

ESI-MS (m/z) = 556.24 [M+Na]<sup>+</sup>

**Methyl-(2-ethylthio-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)-onat<sup>72</sup> 44a**

(Me-Ac<sub>4</sub>-NeuNAc-SEt)

0.8 g (1.5 mmol) Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranonat **43** werden in 30 ml frisch absolutiertem und entgastem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 0.15 ml (1.1 Äquiv.) Ethylmercaptan wird der Reaktionsansatz auf 0°C abgekühlt und 20 min gerührt. Man versetzt langsam mit 0.5 ml (2.4 Äquiv) Bortrifluoridetherat und läßt auf Raumtemp. erwärmen. Nach 18 h wird mit 40 ml Dichlormethan verdünnt, mit 50 ml einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und die wässrige Phase mit Dichlormethan gegengeschüttelt. Die vereinigten organ. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird das verbleibende Öl an 50g Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:10) chromatographiert.

Ausb.: 0.67 g (1.25 mmol, 84% d. Th.; Lit: 62%); farbloser amorpher Feststoff;  $R_f = 0.38$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 15:1);  $[\alpha]_D^{22} = -48.18$  (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>), Lit.: +31.4;

C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>12</sub>S Ber.: C: 49.34 H: 6.21 N: 2.61 S: 5.99

(535.17) Gef.: C: 49.71 H: 6.40 N: 2.79 S: 6.11

FD-MS (m/z): 536.7 [M+H]<sup>+</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, COSY, HMQC),  $\delta$  [ppm]:

5.37(m, 1H,  $J_{8''',9a'''}=10.88\text{Hz}$ ,  $J_{8''',9b'''}=2.33\text{Hz}$ , H-8'''); 5.29(dd, 1H,  $J_{7''',8'''}=1.94\text{Hz}$ , H-7'''); 5.13(d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}5'''}=10.17\text{Hz}$ , NH); 4.83(dt, 1H,  $J_{4''',5'''}=10.48\text{Hz}$ ,  $J_{4''',3a'''}=6.82\text{Hz}$ ,  $J_{4''',3e'''}=4.82\text{Hz}$ , H-4'''); 4.28(dd, 1H,  $J_{9''',8'''}=2.31\text{Hz}$ ,  $J_{\text{gem}}=12.40\text{Hz}$ , H-9'''); 4.11-3.98(m, 2H,

$J_{9''a,8''}=10.92\text{Hz}$ ,  $J_{\text{gem}}=12.55\text{Hz}$ ,  $J_{5''a,4''}=10.48\text{Hz}$ ,  $J_{5''a,\text{NH}}=10.17\text{Hz}$ , H-9''a, H-5''); 3.82-3.78(m, 4H,  $J_{6''a,7''}=1.94\text{Hz}$ , H-6'', OCH<sub>3</sub>); 2.75(dd, 1H,  $J_{\text{gem}}=12.14\text{Hz}$ , CH<sub>a</sub>CH<sub>3</sub>); 2.69(dd, 1H,  $J_{3e'',4''}=4.82\text{Hz}$ ,  $J_{3e'',3a''}=12.54\text{Hz}$ , H3e''); 2.52(1H,  $J_{\text{gem}}=12.08\text{Hz}$ , CH<sub>b</sub>CH<sub>3</sub>); 2.14, 2.11, 2.01, 1.85(4s, 13H, H-3''a, CH<sub>3</sub>(OAc)); 2.00(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc)); 1.16(t, 3H,  $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_a/\text{b}}=7.55\text{Hz}$ , CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

100.6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, HMQC, DEPT),  $\delta$  [ppm]:

170.93, 170.63, 170.12(CO, Ester, (OAc, NHAc)); 168.44 (C-1''); 83.32(C-2''); 74.13(C-6''); 69.65(C-4''); 68.65 (C-8''); 67.33 (C-7''); 62.22(C-9''); 52.89 (OCH<sub>3</sub>); 49.36(C-5''); 38.04(C-3''); 23.10(2C, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHAc); 21.15, 20.84, 20.74(CH<sub>3</sub>(OAc)); 14.06(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

### Methyl-(2-phenylthio-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid)-onat<sup>72</sup> 44b

(Me-Ac<sub>4</sub>-NeuNAc-SPh)

3.74 g (7.0 mmol) Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranonat **43** und 4 g gepulvertes Molekularsieb (3Å) werden in 75 ml absol. Dichlormethan suspendiert. Nach Zugabe von 0.75 ml (1.05 Äquiv.) Phenylmercaptan wird bei Raumtemp. 15 min gerührt. Anschließend werden langsam 1.8 ml (2.1 Äquiv.) BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> zutropft. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemp. aufbewahrt und mit weiteren 1.0 ml (1 Äquiv.) BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> versetzt. Nach weiteren 24 h Rühren bei Raumtemp. kann vollständiger Umsatz detektiert werden. Man filtriert über HiFlo-Supercel<sup>®</sup> ab, wäscht mit Dichlormethan nach und neutralisiert die organische Phase mit 100 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., wäscht mit 100 ml Wasser und trocknet über MgSO<sub>4</sub>. Der Rohansatz wird i. Vak eingeeengt und säulenchromatographisch mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:10) gereinigt.

Ausb.: 2.32 g (4 mmol, 57% d. Th.; Lit.: 80%); farbloser, amorpher Feststoff;  $R_f = 0.30$  (EE);  $[\alpha]_D^{22} = -33.48$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: +20.9 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>12</sub>S

(583.6)

ESI-MS: 606.2 [M+Na]<sup>+</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm]: ( $\alpha$ -Anomer)

7.38-7.24 (m, 5 H, H<sub>arom.</sub>); 5.84(d,1H,  $J_{\text{NH,H5''}}=10.29\text{Hz}$ , NH); 5.44(dd, 1H,  $J_{7''a,8''}=1.84\text{Hz}$ , H-7''); 5.35(d, 1H,  $J_{4''a,3e''}=4.78\text{Hz}$ , H-4''); 4.93(dd, 1H,  $J_{8''a,9''b}=J_{8''a,7''}=1.84\text{Hz}$ , H-8''); 4.60(dd, 1H,  $J_{9''a,8''}=10.67\text{Hz}$ ,  $J_{\text{gem}}=10.29\text{Hz}$ , H-9''a); 4.45(dd, 1H,  $J_{6''a,7''}=2.20\text{Hz}$ ,  $J_{6''a,5''}=12.50\text{Hz}$  H-6''); 4.15-4.03(m, 1H,  $J_{9''b,8''}=1.84\text{Hz}$ ); 3.95(dd, 1H,  $J_{5''a,6''}=12.50\text{Hz}$ ); 3.53(s, 3H, OCH<sub>3</sub>);

2.64(dd, 1H,  $J_{3e'',4''}=4.78\text{Hz}$ ,  $J_{3e'',3a''}=13.97\text{Hz}$ , H-3<sup>e''</sup>); 2.05, 2.03, 2.00, 1.85(4s, 13H, H-3<sup>a''</sup>, CH<sub>3</sub>(OAc)); 1.91(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));

100.3 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm]:

171.14, 170.91, 170.23, 170.20, 170.14(5s, CO (OAc, NHAc)); 168.18(C-1<sup>'''</sup>); 136.08(C<sub>meta</sub>-Aryl); 129.67(C<sub>para</sub>-Aryl); 129.04(C<sub>ortho</sub>-Aryl); 128.83(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 89.02(C-2<sup>'''</sup>); 73.18(C-6<sup>'''</sup>); 69.06(C-4<sup>'''</sup>); 68.82(C-8<sup>'''</sup>); 62.68(C-9<sup>'''</sup>); 52.52(OCH<sub>3</sub>); 49.30(C-5<sup>'''</sup>); 37.53(C-3<sup>'''</sup>); 23.09(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 21.01, 20.83, 20.71, 20.67(CH<sub>3</sub>(OAc));

### **5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid**<sup>73</sup> **45**

( $\alpha,\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>NAcCOOH)

6.1 g (19.7 mmol) N-Acetyl-D-neuraminsäure **41** werden in 250 ml Pyridin gelöst, auf 0°C abgekühlt und langsam mit 120 ml Acetanhydrid versetzt. Man lässt den Ansatz auf Raumtemp. erwärmen und rührt bei dieser Temp. weitere 2 h. Die Lösemittel werden i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit 50 ml Toluol codestilliert. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausb.: 11.02 g (quant. Lit.: quant); brauner amorpher Feststoff;  $R_f = 0.18$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1);

C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>14</sub>

(519.45)

ESI-MS (m/z): 542.20 [M+Na]<sup>+</sup>

### **Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha,\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid**<sup>73, 144</sup> **46**

( $\alpha,\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>NAcCO<sub>2</sub>Bn)

11g (21.1 mmol)  $\alpha,\beta$ -NeuAc<sub>5</sub>NAcCOOH **45** werden in 30ml Ethanol gelöst und mit 3.1g (22.5 mmol) Cäsiumcarbonat, gelöst in 10 ml H<sub>2</sub>O, versetzt. Nachdem die Gasentwicklung abgeklungen ist, werden die Lösemittel i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit 70 ml Toluol codestilliert. Man erhält 13 g des Cäsium-Salzes und löst dieses in 120 ml DMF. Zu dieser Lösung werden bei Raumtemp. unter Rühren 5 ml (40 mmol, 2 Äquiv.) Benzylbromid langsam zugetropft. Man rührt 1 h und entfernt anschließend die Lösemittel i. Vak. Der Rückstand wird in 200 ml Ethylacetat aufgenommen und das ausgefallene Cäsiumbromid

<sup>144</sup> S. Keil, *Dissertation* (2000), Universität Mainz

abfiltriert. Nach Entfernen des Lösemittels wird das gelbe Öl an 300g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (1:2) durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Ausbeute: 10.3 g (16.9 mmol, 80% d. Th.; Lit.<sup>144</sup>: 88%);  $R_f = 0.26$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$  15:1);

$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{NO}_{14}$

(609.57)

FD-MS (m/z): 610.4  $[\text{M} + \text{H}]^+$

300-MHz- $^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ [ppm]:

7.31-7.26(m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 5.50-47(m, 1H, H-8'''); 5.33(dd, 1H, H-7'''); 5.29-5.09(m, 3H, NH,  $\text{CH}_2(\text{OBn})$ ); 5.03(dt, 1H, H-4'''); 4.40(dd, 1H,  $J_{\text{gem}}=12.57\text{Hz}$ , H-9''')b); 4.13-4.06(m, 3H,  $J_{\text{gem}}=12.55\text{Hz}$ , H-9'''a, H-5''', H-6'''); 2.49(dd, 1H,  $J_{3e'',4''}=4.77\text{Hz}$ ,  $J_{3e'',3a''}=13.23\text{Hz}$ , H-3e'''); 2.08, 2.06, 1.83 (3s, 15H, H-3'''a,  $\text{CH}_3(\text{OAc})$ ); 2.02-2.00(m, 1H, H-3a'''); 1.97(s, 3H,  $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ );

75.6 MHz- $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , HMQC, DEPT),  $\delta$  [ppm]:

170.74, 170.45, 170.29, 170.11, 170.06, 169.79, 168.19 (CO Ester, (OAc, NHAc)); 165.51 (C-1'''); 134.87( $\text{C}_{\text{ipso-Aryl}}$ ); 128.47, 128.38, 128.17( $\text{C}_{\text{arom}}$ ); 97.59(C-2'''); 72.76(C-6'''); 71.17(C-4'''); 68.37 (C-8'''); 67.83( $\text{CH}_2\text{-Benzyl}$ ); 67.72 (C-7'''); 61.94(C-9'''); 49.03(C-5'''); 35.76(C-3'''); 23.02( $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ ); 20.76, 20.68, 20.54( $\text{CH}_3(\text{OAc})$ );

**Benzyl-[5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chloro-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]-onat**<sup>71,75</sup> **47**

( $\text{Ac}_4\text{NeuNAcCO}_2\text{BnCl}$ )

1.86 g (3 mmol) **46** werden in 30 ml auf 0°C abgekühlten Acetylchlorid gelöst und mit 3 Tropfen Wasser versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 d bei Raumtemp. gerührt, das überschüssige Acetylchlorid i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol codestilliert. Der so erhaltene braune Feststoff wird durch Flash-Chromatographie an 150 g Kieselgel mit Ethylacetat gereinigt.

Ausbeute: 1.3 g (2.22 mmol, 73% d. Th.; Lit.<sup>71</sup>: 91%); brauner, amorpher Feststoff;  $R_f = 0.36$  (EE);

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{ClNO}_{12}$  Ber.: C 53.29 H 5.50 N 2.39

(585.16) Gef.: C 53.16 H 5.93 N 2.02

ESI-MS (m/z): 608.05  $[\text{M} + \text{Na}]^+$

300-MHz- $^1\text{H}$ -NMR( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ [ppm]:

7.37-7.31(m, 5H, H<sub>arom.</sub>); 5.50-5.31(m, 4H, H-8''', H-7''', CH<sub>2</sub>(OBn), NH(Ac)); 5.22-5.12(m, 2H, H-4''', CH<sub>2</sub>(OBn)); 5.03(dt, 2H, J<sub>9'''b,8'''</sub>=2.21Hz, H-6''', H-9'''b); 4.23-4.02(m, 2H, H-5''', H-9'''a), 2.75(dd, 1H, J<sub>3e''',4'''</sub>=4.78Hz, J<sub>3e''',3a'''</sub>=13.60Hz, H-3e'''), 2.25(dd, 1H, J<sub>3a''',3e'''</sub>=13.95Hz, J<sub>3e''',4'''</sub>=2.58Hz, H-3'''a); 2.08, 2.06, 2.01(3s,12H, CH<sub>3</sub>(OAc)); 1.87(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));  
 150.9 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, DEPT), δ [ppm]:  
 170.93, 170.54, 170.30, 169.91 169.60(CO(OAc, NHAc)); 164.73 (C-1'''); 134.58(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.59, 128.20 (C<sub>arom.</sub>); 96.67(C-2'''); 73.92(C-6'''); 69.69(C-4'''); 68.71(C-8'''); 68.32(CH<sub>2</sub>-Benzyl); 66.87(C-7'''); 61.91(C-9'''); 48.76(C-5'''); 40.57(C-3'''); 23.09(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 20.85, 20.77, 20.71(CH<sub>3</sub>(OAc));

**O-Ethyl-S-(benzyl-[5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]-onat-dithiocarbonat <sup>77</sup> 48**

(Ac<sub>4</sub>NeuNAcCO<sub>2</sub>BnXan)

Man löst 1.2 g (2.05 mmol) Ac<sub>4</sub>NeuNAcCO<sub>2</sub>BnCl **47** in 40 ml frisch absol. Aceton und kühlt auf 0°C. Es werden im Argongegenstrom 0.92 g (5.7 mmol) O-Ethyl-S-Kaliumxanthogenat in kleinen Portionen zu der Lösung geben und unter Lichtausschluss 8 h bei 0°C und weitere 30 h bei Raumtemp. gerührt. Zur Aufarbeitung wird mit 50 ml Methylenchlorid verdünnt und je einmal mit 50 ml Wasser, ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organ. Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Die Säulenchromatographische Reinigung erfolgt an Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:5). Ausbeute: 0.82 g (1.23 mmol, 60% d. Th., Lit.: 64%); farbloser, amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.26 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1);  $[\alpha]_D^{22} = +15.49$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>77</sup>: +29.40 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.<sup>144</sup>: +34.1 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>13</sub>S<sub>2</sub> Ber.: C 51.85 H 5.55 N 2.09

(671.73) Gef.: C 52.06 H 6.02 N 2.10

ESI-MS (m/z): 694.19 [M+Na]<sup>+</sup>

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm]:

7.31-7.30(m, 5H H<sub>arom.</sub>); 5.45(bd, 1H, J<sub>NH,H-5'''</sub>=10.29Hz, NH); 5.32-5.17(m, 4H, H-8''', H-7''', CH<sub>2</sub>(Bn)), 4.83(dt, 1H, J<sub>4''',5'''</sub>=10.29Hz, J<sub>4''',3a'''</sub>=6.99Hz, J<sub>4''',3e'''</sub>=4.78Hz, H-4'''), 4.28(dd, 1H, J<sub>9'''b,8'''</sub>=2.31Hz, J<sub>gem</sub>=12.40Hz, H-9'''b), 4.11-3.98(m, 2H, J<sub>9'''a,8'''</sub>=10.92Hz, J<sub>gem</sub>=12.55Hz, J<sub>5'''a,4'''</sub>=10.48Hz, J<sub>5'''a,NH</sub>=10.17Hz, H-9'''a, H-5'''), 3.82-3.78(m, 4H, J<sub>6''',7'''</sub>=1.94Hz, H-6''', OCH<sub>3</sub>), 2.75(dd, 1H, J<sub>gem</sub>=12.14Hz, CH<sub>a</sub>CH<sub>3</sub>), 2.69(dd, 1H, J<sub>3e''',4'''</sub>=4.82Hz, J<sub>3e''',3a'''</sub>=12.54Hz, H-3e'''), 2.52(1H, J<sub>gem</sub>=12.08Hz, CH<sub>b</sub>CH<sub>3</sub>), 2.14, 2.11, 2.01, 2.00(4s,13H, H-3'''a, CH<sub>3</sub>(OAc)), 1.85(s, 3H, NHAc), 1.16(t, 3H, J<sub>CH<sub>3</sub>,Cha/b</sub>=7.55Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

150.9 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, HMQC, DEPT), δ [ppm]:

206.99(CS); 170.71, 170.62, 179.44, 170.29, 170.11, 170.05 (CO<sub>2</sub>Bn, CO(OAc, NHAc)), 167.80(C-1''); 134.88(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.73, 128.61, 128.56, 128.49, 128.19, 127.92(C<sub>arom.</sub>); 86.51(C-2''); 75.23(C-6''); 70.67(C-4''); 68.76 (C-8''); 67.77 (C-7''); 62.03(C-9''); 49.12(C-5''); 37.08(C-3''); 23.06(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 21.00, 20.79, 20.73, 20.70(CH<sub>3</sub>(OAc)); 12.97(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

### 5.3 Synthesen zu Kapitel 3.2

#### 2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-4,6-O-(benzyliden)-2-deoxy-β-D-glucopyranosylazid **17**

*Variante a über Galactosyltrichloracetimidat*<sup>63</sup> **35**:

Es werden 3 g (5.6 mmol, 1.5 Äquiv.) Galactosyltrichloracetimidat **35** mit 1.3 g (3.7 mmol) des Akzeptors **18** in 150 ml absol. Dichlormethan suspendiert und 1 h über ausgeheiztem Molekularsieb (3Å) gerührt. Anschließend kühlt man den Ansatz auf -78°C ab und gibt langsam 1 ml (0.56 mol, 0.15 Äquiv.) TMSOTf, gelöst in 3 ml Dichlormethan, tropfenweise hinzu. Der Ansatz wird anschließend bei -32°C gelagert und der Reaktionsfortschritt dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 6 d wird die Lösung mit festem NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert. Über eine Glasfritte wird das Molekularsieb abgetrennt und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Man nimmt den Rückstand in 150 ml Ethylacetat auf und wäscht mit dem gleichen Volumen ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg, 30%iger NaI-Lsg. und Wasser. Es wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel i. Vak entfernt und der Rückstand an 100 g Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (3:1) gereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Variante b erhaltenen Substanz.

*Variante b über Galactosylbromid*<sup>66</sup> **36**:

Man suspendiert eine Mischung aus 8.5 g (25.5 mmol) Glucosamin-Azid **18**, 21.5 g Quecksilbercyanid und 15 g ausgeh. Molekularsieb (3Å) in 300 ml absol. Dichlormethan und tropft aus 48.9 g (111.5 mmol) 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-O-benzyl-α,β-D-galactopyranose **33** frisch hergestelltes Galactosylbromid **36** in 350 ml absol. 1,2-Dichlorethan zu. Der Ansatz wird 7 d bei Raumtemp. gerührt, über HiFlo-Supercel<sup>®</sup> abfiltriert und mit reichlich Dichlormethan nachgewaschen. Die vereinigten organ. Phasen werden dreimal mit 100 ml NaI (30%ig in Wasser) und zweimal mit 100 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Trocknen mit MgSO<sub>4</sub> und

Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. liefern das Rohprodukt, aus dem man das Disaccharid durch Chromatographie an Kieselgel in Cyclohexan/Ethylacetat (1:1) erhält.

Ausbeute: 17.53 g (24.6 mmol, 97% d. Th.); farbloser amorpher Feststoff;  $R_f = 0.67$  (EE);

$[\alpha]_D^{22} = -8.69$  (c=1.0,  $\text{CHCl}_3$ ; Lit.<sup>64</sup>: -16.2, c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ );

$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{13}$  Ber.: C 57.30 H 5.66 N 7.86

$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  Ber.: C 54.61 H 5.80 N 7.49

(712.33) Gef.: C 54.07 H 5.69 N 7.33

ESI-MS (m/z) = 735.61  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

300 MHz- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm]:

7.42-7.16 (m, 10H,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ); 5.78(d, 1H,  $J_{\text{NH},2}=6.99\text{Hz}$ ); 5.40(s, 1H, CH-Aryl); 5.31-5.26(m, 2H,  $J_{1,2}=9.19\text{Hz}$ , H-1, H-4'); 5.09(dd, 1H,  $J_{2',3'}=10.30\text{Hz}$ ,  $J_{2',1'}=8.09\text{Hz}$ , H-2'); 4.89(dd, 1H,  $J_{3',2'}=10.29\text{Hz}$ , H-3'); 4.70(d, 1H,  $J_{1',2'}=7.72\text{Hz}$ , H-1'); 4.53-4.20 (m, 4H, H-6a/b,  $\text{CH}_2\text{OBn}$ ); 3.71-3.50(m, 4H,  $J_{5',6'a}=6.25\text{Hz}$ ,  $J_{5',6'b}=6.61\text{Hz}$ , H-3, H-4, H-5, H-5'); 3.40-3.29(m, 2H,  $J_{6'a,5'}=6.25\text{Hz}$ ,  $J_{6'b,5'}=6.61\text{Hz}$ , H-6'a/b); 3.19(dd, 1H,  $J_{2,1}=7.71\text{Hz}$ , H-2); 2.05(s, 3H,  $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ ); 1.97, 1.95, 1.92(3s, 9H,  $\text{CH}_3(\text{OAc})$ );

75.6 MHz- $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , DEPT),  $\delta$  [ppm]:

170.89, 170.14, 170.04, 169.59( $\text{CO}(\text{OAc}$ ,  $\text{NHAc})$ ); 137.40, 137.05 ( $\text{C}_{\text{ipso-Aryl}}$ ); 129.30, 128.55, 128.47, 128.32, 127.99( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ); 126.14( $\text{C}_{\text{ipso-Aryl}}$ ); 99.84(C-1'); 87.32(C-1); 80.29(C-4); 76.07(C-5); 71.11(C-3'); 69.67(C-3); 68.38(C-6); 68.14(C-2'); 67.60(C-6'); 67.42(C-4'); 57.63(C-2); 23.55( $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ ); 20.78, 20.63, 20.57( $\text{CH}_3(\text{OAc})$ );

### **2-Acetamido-3-O-(2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid<sup>64</sup> 49**

Eine Mischung von 4.79 g (6.7 mmol) des Disaccharids **16**, 5.01g (79.5 mmol, 12 Äquiv.)  $\text{NaCNBH}_3$  und 5 g ausgeheiztem Molekularsieb (4Å) werden in 300 ml absol. THF suspendiert und 2 h gerührt. Der Ansatz wird auf 0°C abgekühlt und unter DC-Kontrolle werden langsam 9 ml einer gesättigten Lösung von HCl in Ether in Portionen von 2 ml zugetropft. Nach 4 h werden zum quantitativen Umsatz nochmals 1.5 ml Ether sowie eine Spatelspitze  $\text{NaCNBH}_3$  hinzugegeben und 1 h bei 0°C gerührt. Der Ansatz wird mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und das Molekularsieb abfiltriert. Das Filtrat wird dreimal mit 100 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, zweimal mit 100 ml Ethanolamin (5% in Wasser) und zweimal mit 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organ. Phase wird über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird in

Essigester gelöst, die Lösung mit 20 g Kieselgel z. A. versetzt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Man trocknet den Rückstand i. Vak. und bringt ihn auf eine mit 200 g Flash-Kieselgel gefüllte Säule auf. Die Flash-Chromatographie erfolgt mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:3).

Ausb.: 3.65 g (5.11 mmol, 76% d. Th.; Lit.: 57%); farbloser, amorpher Feststoff;  $R_f = 0.54$  (EE);  $[\alpha]_D^{22} = -11.40$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit. = -11.89 (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>);

C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> Ber.: C: 57.11 H: 5.93 N: 7.84

C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> \* 3H<sub>2</sub>O Ber.: C: 53.12 H: 6.29 N: 7.29

(714.35) Gef.: C: 53.47 H: 5.87 N: 7.21

ESI-MS (m/z): 737.3 [M+Na]<sup>+</sup>

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ [ppm]:

7.32-7.26 (m, 10H, H<sub>arom.</sub>); 5.80(d, 1H, J<sub>NH,2</sub>=7.72Hz); 5.34 (d, 1H, J<sub>4',3'</sub>=2.95Hz, H-4'), 5.16(dd, 1H, J<sub>2',3'</sub>=10.29Hz, J<sub>2',1'</sub>=8.09Hz, H-2'); 4.96(m, 2H, J<sub>3',2'</sub>=10.29Hz, J<sub>3',4'</sub>=2,94Hz, H-3', J<sub>1,2</sub>=9.93Hz, H-1); 4.62-4.54 (m, 1H, H-1'); 4.56(s, 1H, OH); 4.49(d, 2H, J<sub>gem</sub>=11.76Hz, CH<sub>2</sub>OBn); 4.38(d, 2H, J<sub>gem</sub>=12.13Hz, CH<sub>2</sub>(OBn)); 4.10(m, 2H, H-6a/b); 3.91(dd, 1H, J<sub>gem</sub>=12.13Hz, H-5'); 3.80(d, 1H, H-4); 3.66(dd, 1H, J<sub>gem</sub>=11.03Hz, J<sub>5,4</sub>=4,78Hz, H-5); 3.48(m, 3H, J<sub>3,2</sub>=9,56Hz, H-3, H-6'a/b); 3.21(dd, 1H, J<sub>2,1</sub>=8,09Hz, J<sub>2,3</sub>=9,56Hz, H-2); 2.05, 2.04, 1.97, 1.94(4s, 12H, CH<sub>3</sub>(OAc), CH<sub>3</sub>(NAc));

75.6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, DEPT), δ [ppm]:

170.59, 170.12, 169.96, 169.30 (CO(OAc), NHAc)); 138.21, 137.02 (C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.49, 128.32, 128.02, 127.96, 127.56, 127.53 (C-Aryl); 101.03 (C-1'); 87.17 (C-1); 83.03 (C-4); 77.58(C-5); 76.58(C-5'); 72.41(C-3'); 69.30 (C-3); 73.69, 73.57 (CH<sub>2</sub>(OBn)), 70.93 (C-3'); 69.27, 67.34 (C-6, C-6'); 67.34 (C-4'); 56.31 (C-2); 23.59 (CH<sub>3</sub>(NHAc)); 20.82, 20.58, 20.50 (CH<sub>3</sub>(OAc));

## 5.4 Synthesen zu Kapitel 3.3

### 2-Acetamido-3-O[2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid<sup>82, 83</sup> **50**

(Arabino-Le<sup>a</sup>-N<sub>3</sub>)

Man löst 0.7 g (1.0 mmol) Disaccharid **49** und 1.47 g (3.1 mmol) Ethylthioarabinosid **16** in je 50 ml absol. Dichlormethan und rührt die vereinigten organ. Phasen 30 min über ausgeheiztem MS (3 Å). Nach Zugabe von 1.3 g (4 mmol) Tetrabutylammoniumbromid und 0.9 g (4 mmol) Kupfer-(II)-bromid wird der Ansatz 6 d unter Lichtausschluss bei Raumtemp. gerührt. Man filtriert anschließend über eine dünne Schicht Kieselgel und spült mit 200 ml Dichlormethan nach. Die organ. Phase wird anschließend mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen, bis die Blaufärbung verschwindet. Es wird zweimal mit ges. NaCl-Lsg. nachgewaschen und dann das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch an 25 g Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (2:1) gereinigt.

Ausbeute: 935 mg (0.84 mmol, 84% d. Th.); farbloser, amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.72 (EE);

$[\alpha]_D^{22} = -90.91$  (c=1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);

C<sub>60</sub>H<sub>68</sub>N<sub>4</sub>O<sub>17</sub> Ber.: C: 64.50 H: 6.12 N: 5.01

(1117.19) Gef.: C: 63.65 H: 5.98 N: 5.05

ESI-MS (m/z): 1140.2 [M+Na]<sup>+</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, COSY),  $\delta$  [ppm]:

7.37-7.18(m, 25H, H<sub>arom.</sub>); 6.68(d, 1H, J<sub>NH,2</sub>=9.39Hz, NH); 5.41(d, 1H, J<sub>4,3</sub>=2.78Hz, H-4''); 5.20(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=3.53Hz, H-1''); 5.14(dd, 1H, J<sub>2',1'</sub>=7.81Hz, J<sub>2',3'</sub>=10.57Hz, H-2''); 4.99-4.95(m, 2H, H<sub>3</sub>, H-1), 4.71-4.31(m, 11H, H-1', CH<sub>2</sub>(OBn)); 4.09(m, 1H, H-5); 4.04-3.97(m, 3H, H-2'', H-6a, H-3); 3.92(m, 2H, H-2, H-4''); 3.82(t, 1H, J<sub>vic</sub>=6.26Hz, J<sub>vic</sub>=6.69Hz, H-5''); 3.69-3.63(m, 5H, H-5''a/b, H<sub>6b</sub>, H-4, H-3''); 3.48(dd, 1H, J<sub>vic</sub>=6.26Hz, J<sub>gem</sub>=17.65Hz, H-6'a); 3.41(dd, 1H, J<sub>vic</sub>=6.66, H-6'b); 2.08(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc)); 1.95, 1.92, 1.53(3s, 9H, CH<sub>3</sub>(OAc));

nicht eindeutig zugeordnet werden konnten H-5, H-3', H-4''

150.9 MHz -<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, HMQC),  $\delta$  [ppm]:

169.99, 169.92, 169.78, 169.62(CO (OAc, NHAc)); 138.27, 138.15, 138.07, 137.65, 137.41(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.45, 128.43, 128.40, 128.30, 128.11, 127.90, 127.84, 127.69, 127.61, 127.57, 127.39, 127.30(C<sub>arom.</sub>); 99.23 (C-1''); 94.12(C-1''); 87.84(C-1); 77.22(C-3''); 76.05(C-2''); 73.92, 73.37, 73.31, 72.38, 71.46(CH<sub>2</sub>(OBn)); 73.84(C-4''); 73.14(C-4); 72.93(C-5); 72.17(C-5''); 70.88(C-3'); 69.82(C-3); 69.06(C-6); 68.38(C-2'); 67.40(C-6'); 67.46(C-4'); 60.58(C-5''); 50.68(C-2); 22.63(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 21.02, 20.75, 20.53(CH<sub>3</sub>(OAc));

nicht eindeutig zugeordnet werden konnten C-3, C-4', C-4'', C-6''

**2-Acetamido-3-O[6-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosylazid 15**

(Arabino-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>)

7.41 g (6.64 mmol) des Lewis-A-Derivates **50** werden in 150 ml absol. Methanol gelöst und mit wenig Na-Stücken (ca. 1.5 g) versetzt, so daß ein leichter H<sub>2</sub>-Fluß entsteht. Nach 20 h Rühren bei Raumtemp. wird der Ansatz mit 7.3 g Ionenaustauscher Amberlyst<sup>®</sup>15 (stark sauer in MeOH) neutralisiert. Nach 15 min wird der Ansatz abdekantiert. Der Ionenaustauscher wird dreimal mit je 30 ml MeOH für 10 min gewaschen und abfiltriert um anhaftendes Produkt auszulösen. Die organ. Lösungen werden vereinigt und die Lösemittel i. Vak. entfernt. Das Produkt wird durch säulenchromatographische Reinigung an 150 g Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (20:1) erhalten.

Ausbeute: 5.83 g (5.88 mmol, 88% d. Th.); R<sub>f</sub> = 0.21 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1); R<sub>t</sub> = 35.8 min (*LunaC18*, Gradient A);  $[\alpha]_D^{22} = -60.92$  (c=1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);

C<sub>54</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub> Ber.: C: 65.44 H: 6.31 N: 5.65

(990.43) Gef.: C: 65.40 H: 6.30 N: 5.49

ESI-MS (m/z) = 1013.2 [M+Na]<sup>+</sup>; 985.2 [M-N<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>

600 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY, ROESY, NOESY), δ [ppm]:

8.06(d, J<sub>NH,H2</sub>=9.09Hz, NH); 7.36-7.18(m, 25H, H<sub>arom.</sub>); 4.99(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=3.62Hz, H-1''); 4.87(d, 1H, J<sub>3'-OH,H-3</sub>=5.33Hz, 3'-OH); 4.70-4.67(m, 2H, H-5''a, CH<sub>2</sub>(OBn)); 4.62-4.52(m, 5H, CH<sub>2</sub>(OBn), H-1); 4.46-4.35(m, 6H, CH<sub>2</sub>(OBn), H-1'); 3.99(bs, 1H, H-4''); 3.94(dd, 1H, J<sub>3'',2''</sub>=10.36Hz, H-3''); 3.87-3.78(m, 4H, J<sub>2'',3''</sub>=10.20Hz, H-6'a, H-3, H-2'', H-2); 3.68-3.59(m, 4H, H-6a, H-4', H-6'b, H-4); 3.55-3.50(m, 4H, H-5, H-6b, H-5', H-5'e); 3.35-3.34(m, 2H, H-2', 2'-OH); 3.29-3.27(m, 1H, H-3'); 1.83(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));

150.9 MHz -<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC), δ [ppm]:

171.31 (CO(NHAc)), 138.31, 138.22, 138.05, 173.26(C<sub>ipso</sub>-Aryl), 128.41, 128.38, 128.18, 127.98, 127.89, 127.76, 127.69, 127.62, 127.53(C<sub>arom.</sub>), 103.05(C-1'); 97.42(C-1''), 87.88(C-1); 77.55(C-3''); 76.72(C-5); 75.76(C-3); 75.72(C-2''); 74.69(C-4''); 73.46, 72.88, 72.16, 70.82, 70.48(CH<sub>2</sub>(OBn)); 73.20(C-3'); 73.06(C-5'); 72.42(C-4); 70.36(C-2'); 68.93(C-6); 68.01(C-4'); 67.41(C-6'); 60.67(C-5''); 54.74(C-2); 23.23(CH<sub>3</sub>(NHAc));

## 5.5 Synthesen zu Kapitel 3.4

### 2-Acetamido-3-O-(6-O-benzyl-3-O-[methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-2-nonulopyranosylat]- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-4-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid<sup>85, 87</sup> **51**

(Ara-Sialyl-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>)

226 mg (0.23 mmol) des Lewis<sup>a</sup>-Bausteins **15** und 325 mg (0.56 mmol, 2.4 Äquiv.) des N-Acetylneuraminsäure-phenylthioglycosids **44b** werden in 15 ml Propionitril gelöst und 1 h mit 1g ausgeheiztem Molekularsieb bei Raumtemp. gerührt. Man kühlt den Ansatz auf -78°C und spritzt 300 mg (1.36 mmol, 5.7 Äquiv.) N-Iodsuccinimid in 7.5 ml Propionitril hinzu. Es werden vorsichtig 0.5 ml einer 0.4 N TfOH-Lösung in Propionitril zugegeben und es wird weitere 5 min gerührt. Der Ansatz wird über Nacht bei -32°C ohne zu rühren gelagert. Da nach 24 h keine Umsetzung festzustellen ist, werden zusätzlich 335 mg Sialinsäuredonor **44b** und weitere 0.5 ml TfOH-Lösung in Propionitril zugespritzt. Nach 36 h können neben dem Produkt auch Nebenprodukte nachgewiesen werden. Der Reaktionsansatz wird mit festem NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert, mit Essigester verdünnt und filtriert. Das Filtrat wird mit 50 ml einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und 50 ml einer 10%igen Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Die Reinigung erfolgt an 30 g Kieselgel mit Toluol/Methanol (10:1) und einer weiteren Chromatographie an 30 g Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (40:1).

Ausb.: 77 mg (0.053 mmol, 23% d. Th.); farbloses Lyophilisat; R<sub>f</sub> = 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1);  $[\alpha]_D^{22} = 83.23$  (c = 1.0 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO);

C<sub>74</sub>H<sub>89</sub>O<sub>26</sub>N<sub>5</sub>

(1463.5796)

HR-ESI-MS (m/z): Ber.: 1486.5688 [M+Na]<sup>+</sup> Gef.: 1486.5653 [M+Na]<sup>+</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, COSY, HMQC),  $\delta$  [ppm]:

7.33-7.24(m, 25H, H<sub>arom</sub>); 6.93(d, 1H, J<sub>NH,2</sub>=7.43Hz, NH); 5.45(d, 1H, J<sub>H1,H2</sub>=7.36Hz, H-1); 5.35-5.21(m, 3H, H-7''', H-8''', NH); 5.05(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=3.31Hz, H-1''); 4.96(dq, 1H, J<sub>4''',5'''</sub>=10.17Hz, J<sub>4''',3e'''</sub>=4.78Hz, H-4'''); 4.79-4.39(m, 12H, H3, H-1', CH<sub>2</sub>(OBn)), 4.26(dd, 1H, J<sub>9''b,9a''</sub>=12.13Hz, J<sub>9''b,8''</sub>=2.51Hz, H-9b'''); 4.08-3.61(m, 20H, J<sub>9''a,9''b</sub>=12.13Hz, J<sub>6''',7'''</sub>=1.93Hz, J<sub>2'',1''</sub>=3.51Hz, J<sub>5'',4''</sub>=10.18Hz, H-9'''a, H-5''', H-6''', H-2'', H-6'a/b, H-5'a/b, H-6a/b, H-4, H-3'', H-4', OCH<sub>3</sub>, H-5', H-2', 3.69-3.52(m, 7H, H-5''b, H6'b, H-5', H-6b,); 3.25(dd, 1H, J<sub>2,NH</sub>=6.94Hz, J<sub>2,1</sub>=8.09Hz, H-2), 2.61(dd, 1H, J<sub>3'''e,3'''a</sub>=13.23Hz, J<sub>3'''e,4'''</sub>=4.78Hz, H-3'''e);

2.19(t, 1H,  $J_{3''a, 3''e}=12.51\text{Hz}$ , H-3''a); 2.10, 2.08, 2.02, 1.98(4s, 12H, OAc); 1.86, 1.68(2s, 6H, NHAc);

100.6 MHz -<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, HMQC),  $\delta$  [ppm]:

171.01, 170.93, 170.63, 170.18, 170.06, 169.86 (CO, Ester, OAc, NHAc); 168.14(C-1'''); 138.36, 138.20, 138.04, 137.42(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 100.18(C-1'); 98.64(C-1''); 87.18(C-1); 85.51(C-2'''); 77.66(C-3''); 76.24(C-2''); 76.14(C-3); 76.04(C-5); 74.74(C-4''), 74.12, 73.40, 73.10, 72.37, 72.22(CH<sub>2</sub>(OBn)); 73.67(C-5'); 72.74(C-6'''); 72.64(C-3'); 71.87(C-4); 70.71(C-2'), 69.44(C-6); 68.86(C-4'''); 68.82 (C-2'); 68.25(C-4'); 68.23(C-6'); 68.05(C-8'''); 67.30(C-7'''); 62.56(C-9'''); 61.05(C-5''); 54.88(C-2); 53.10(OCH<sub>3</sub>); 49.24(C-5'''); 36.53(C-3'''); 23.71(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 21.53, 21.99, 21.42(CH<sub>3</sub>(OAc));

Die analoge Reaktion mit dem Neuraminsäuredonor **44a** führt in identischer Ausbeute zu einem Produkt mit den gleichen analytischen Daten.

**2-Acetamido-3-O-(6-O-benzyl-3-O-[Benzyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-2-nonulopyranosylat]- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-4-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid<sup>88</sup> **54****

(Ara-Sialyl-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>)

165 mg Akzeptor **15** (0.17 mmol) und 280 mg (0.42 mmol, 2.5 Äquiv.) Ac<sub>4</sub>NeuNAcCO<sub>2</sub>BnXan **48** werden in 6 ml absol. Dichlormethan und 10 ml absol. CH<sub>3</sub>CN gelöst. Die Edukte werden in einen 50 ml-Einhalskolben mit 500 mg ausgeheiztem MS (3Å) überführt und 60 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend werden unter Lichtausschluss 108 mg Silbertriflat (0.42 mmol) zugegeben und bei -65°C 0.26 ml Methylsulfenylbromid – Lösung (1.6 M in Dichlorethan) langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 3 h bei -60°C gerührt. Es werden weitere 0.1 ml Methylsulfenylbromid-Lösung zugegeben. Die Mischung wird weitere 60 h bei -32°C ohne zu rühren aufbewahrt. Zur Aufarbeitung wird mit 0.08 ml (0.5mmol) DIPEA neutralisiert, auf Raumtemp. erwärmt und mit 20 ml Methylenchlorid verdünnt. Der Reaktionsansatz wird über Hiflo-Supercel<sup>®</sup> abfiltriert und mit 50 ml Methylenchlorid sowie 15 ml Acetonitril nachgewaschen. Die Lösemittel werden i. Vak. entfernt und der Rückstand durch Chromatographie an 50 g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (1:9) gereinigt.

Ausb.: 88 mg (0.056 mmol, 34% d. Th.); farbloses Lyophilisat; R<sub>f</sub> = 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1);  $[\alpha]_D^{22} = -82.74$  (c = 1.0 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO);

$C_{80}H_{93}O_{26}N_5$

(1539.61)

ESI-MS (m/z):= 1562.60 [M+Na]<sup>+</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, COSY, HMQC), δ [ppm]:

7.31-7.24(m, 25H, H<sub>arom</sub>); 6.94(d, 1H, J<sub>NH,2</sub>=7.36Hz, NH); 5.46(d, 1H, J<sub>H1,H2</sub>=7.72Hz, H-1); 5.35-5.24(m, 3H, H-7''', H-8''', NH); 5.13, 4.78(2d, 2H, CH<sub>2</sub>(OBn)) 5.05(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=3.13Hz, H-1''); 4.96(m, 1H, H-4'''); 4.79-4.39(m, 12H, H3, H-1', CH<sub>2</sub>(OBn)), 4.26(dd, 1H, J<sub>9''b,9a'''</sub>=12.10Hz, J<sub>9''b,8'''</sub>=2.58Hz, H-9b'''); 4.08-3.61(m, 24H, H-9'''a, H-5''', H-6''', H-2'', H-6'a/b, H-5''a/b, H-6a/b, H-4, H-3'', H-4', H-5', H-2', H-5''b, H6'b, H-5', H-6b,); 3.23(dd, 1H, J<sub>2,NH</sub>=7.73Hz, J<sub>2,1</sub>=8.08Hz, H-2), 2.59(dd, 1H, J<sub>3'''e,3'''a</sub>=13.20Hz, J<sub>3'''e,4'''</sub>=4.78Hz, H-3'''e); 2.19(t, 1H, J<sub>3'''a,3'''e</sub>=12.87Hz, H-3'''a); 2.10, 2.08, 2.02, 1.98(4s, 12H, OAc); 1.86, 1.68(2s, 6H, NHAc);

100.6 MHz -<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, HMQC), δ [ppm]:

171.01, 170.93, 170.63, 170.18, 170.06, 169.86 (CO, Ester, OAc, NHAc); 168.14(C-1'''); 138.36, 138.20, 138.04, 137.42(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 129.38, 129.18, 129.06, 128.94, 128.87, 128.57, 128.49, 128.44, 128.25, 127.98, 127.67(C<sub>arom.</sub>); 100.35(C-1'); 98.43(C-1''); 87.17(C-1); 85.48(C-2'''); 77.63(C-3''); 76.29(C-2''); 76.11(C-3); 76.02(C-5); 74.83(C-4''), 74.01, 73.43, 73.23, 72.30, 72.27(CH<sub>2</sub>(OBn)); 73.78(C-5'); 72.76(C-6'''); 72.74(C-3'); 71.82(C-4); 70.73(C-2'), 69.78(C-6); 68.80(C-4'''); 68.81 (C-2'); 68.29(C-4'); 68.17(C-6'); 67.79(C-8'''); 67.15(C-7'''); 62.58(C-9'''); 61.00(C-5''); 54.92(C-2); 49.20(C-5'''); 36.43(C-3'''); 23.72(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 21.50, 22.01, 21.52(CH<sub>3</sub>(OAc));

## 5.6 Synthesen zu Kapitel 3.5

### 2-Acetamido-3-O-[6-O-benzyl-3-O-sulfatyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid<sup>94,95</sup> **60** (Ara-Sulfo-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>)

Es werden 156 mg (0.158 mmol) Arabino-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> **15** und 43 mg (0.173 mmol, 1.1 Äquiv.) Dibutylzinnoxid unter einer Argon-Atmosphäre in 10 ml frisch absol. Methanol suspendiert und zum Sieden erhitzt. Nach 20 min wird die Lösung klar, und es wird noch weitere 3.5 h bei dieser Temp. gerührt. Man entfernt nach dieser Zeit das Lösemittel i. Vak., destilliert vom farblosen Rückstand zweimal 15 ml Toluol ab und trocknet i. Hochvakuum. Der glasartig erstarrte Feststoff wird unter einer Argon-Atmosphäre in 15 ml absol. und aminfreiem DMF gelöst und unter Rühren bei Raumtemp. mit 24 mg (0.173 mmol, 1.1 Äquiv.) SO<sub>3</sub>/NMe<sub>3</sub>-Komplex versetzt. Nach 15 min Rühren ist der Komplex vollständig gelöst. Man rührt 14 h bei Raumtemp. nach. Das Lösemittel wird i. Hochvak. entfernt, der Rückstand zweimal mit 20 ml Toluol codestilliert und das farblose Öl an 30 g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol (15:1) chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 0.144 mg (0.14 mmol, 85% d. Th.); R<sub>f</sub> = 0.17 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10:1); R<sub>t</sub> = 12.5 min (*JupiterC18*, Gradient A); R<sub>t</sub> = 38.3 min (*JupiterC18*, Gradient B);  $[\alpha]_D^{22} = -83.5$  (c=1.0,

CH<sub>3</sub>CN);

C<sub>54</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>17</sub>S Ber.: C: 60.55 H: 5.83 N: 5.23 S: 2.99

C<sub>54</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>17</sub>S \* 2H<sub>2</sub>O Ber.: C: 58.58 H: 6.01 N: 5.06 S: 2.90

(1070.38) Gef.: C: 58.46 H: 5.38 N: 4.94 S: 3.24

ESI-MS : 1115.35 [M-H+2Na]<sup>+</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY),  $\delta$  [ppm]:

8.01(d, J<sub>NH,H2</sub>=9.08Hz, NH); 7.47-7.14(m, 25H, H<sub>arom.</sub>); 4.97(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=3.48Hz, H-1''); 4.78(d, 1H, J<sub>2'-OH,H-2'</sub>=2.48Hz, 2'-OH); 4.70-4.59(m, 4H, 4'-OH, CH<sub>2</sub>(OBn), H-5''a); 4.56-4.33(m, 10H, CH<sub>2</sub>(OBn), H-1', H-1); 3.97-3.73(m, 8H, H-4'', H-4', H-3', H-3'', H-2'', H-6'a, H-3, H-2); 3.67-3.58(m, 3H, H-6a, H-4, H-6'b); 3.54-3.47(m, 5H, H-5', H-5''e, H-5, H-6b, H-2''); 1.81(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));

100.6 MHz -<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC),  $\delta$  [ppm]:

169.59(CO(NHAc)); 139.03, 138.95, 138.71, 138.54, 138.27(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.38, 128.32, 128.23, 128.17, 127.77, 127.50, 127.44, 127.38, 127.30, 127.18, 127.08(C<sub>arom.</sub>); 102.92(C-1'); 97.43(C-1''); 88.01(C-1); 79.12(C-3'); 77.50(C-3''); 76.82(C-5); 75.82(C-3); 75.44(C-2'');

74.51(C-4''); 73.45, 72.33, 72.22, 70.74, 70.34(CH<sub>2</sub>(OBn)); 72.78(C-5'); 72.43(C-4); 69.05(C-2'); 68.63(C-6); 67.44(C-6'); 66.26(C-4'); 60.23(C-5''); 54.68(C-2); 22.95(CH<sub>3</sub>(NHAc));

**2-Acetamido-3-O-[6-O-benzyl-2,4-di-O-acetyl-3-O-sulfatyl-β-D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosylazid  
61**

(Ara-*Sulfo*-Le<sup>a</sup>(OAc)<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>)

Zu einer auf 0°C abgekühlten Lösung von 0.47 g (0.44 mmol) Ara-*Sulfo*-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>-N<sub>3</sub> **60** in 30 ml Pyridin wird unter Rühren 1 ml Acetanhydrid zugespritzt, der Ansatz auf Raumtemp. erwärmt und 18 h nachgerührt. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt, vom Rückstand dreimal je 20 ml Toluol abdestilliert und der gelbliche Feststoff i. Hochvak. getrocknet. Nach chromatographischer Reinigung an 40 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol (10:1) erhält man ein Gemisch aus monoacetyliertem und diacetyliertem Produkt in einem Verhältnis von 1:5 (HPLC). Eine Trennung durch präparative HPLC ist nicht möglich. Die Summenformel, die Elementaranalyse und die NMR-Interpretation beziehen sich auf das diacetylierte Produkt. Ausbeute: 0.436 g (0.38 mmol, 86% d. Th.); farbloses Öl; R<sub>f</sub> = 0.47 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5:1);  $[\alpha]_D^{22} = -80.21$  (c = 1.0, CH<sub>3</sub>CN; Mono- und diacetyliertes Produktgemisch i. Verh. 1:5);

C <sub>58</sub> H <sub>66</sub> N <sub>4</sub> O <sub>19</sub> S	Ber.:	C: 60.30	H: 5.76	N: 4.85	S: 2.78
C <sub>58</sub> H <sub>66</sub> N <sub>4</sub> O <sub>19</sub> S * 3H <sub>2</sub> O	Ber.:	C: 57.61	H: 6.00	N: 4.63	S: 2.65
(1154.40)	Gef.:	C: 57.83	H: 5.68	N: 4.67	S: 2.85

MALDI-MS : 1112.88 [M]<sup>+</sup> R<sub>t</sub> = 37.1 min (*JupiterC18*, Gradient B)

MALDI-MS : 1154.90 [M]<sup>+</sup> R<sub>t</sub> = 38.7 min (*JupiterC18*, Gradient B)

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY), δ [ppm]:

8.08(d, J<sub>NH,H2</sub>=9.20Hz, NH); 7.47-7.06(m, 25H, H<sub>arom.</sub>); 5.39(d, 1H, J<sub>4',3'</sub>=3.52Hz, H-4'); 5.00(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=2.28Hz, H-1''); 4.85(d, 1H, J<sub>1',2'</sub>=8.31Hz, H-1'); 4.78(d, 1H, J<sub>2',1'</sub>=8.31Hz, J<sub>2',3'</sub>=9.50Hz, H-2'); 4.71-4.35(m, 12H, H-5''a, CH<sub>2</sub>(OBn), H-1); 4.19(dd, 1H, J<sub>3',2'</sub>=9.80Hz, J<sub>3',4'</sub>=3.56Hz, H-3'); 3.91-3.72(m, 8H, H-2'', H-3'', H-6'a, H-5', H-4'', H-2, H-3); 3.62-3.49(m, 4H, H-5''b, H-6b', H-4, H-5); 3.34(bs, 2H, H-6a/b); 1.94, 1.79(s, 6H, CH<sub>3</sub>(OAc)); 1.90(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));

100.6 MHz -<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC), δ [ppm]:

169.52, 169.38, 168.77(CO (OAc, NHAc)); 138.81, 138.69, 138.47, 138.16(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.25, 128.16, 127.75, 127.42, 127.34, 127.27, 127.21, 126.98(C<sub>arom.</sub>); 100.11(C-1'); 97.53(C-1''); 87.87(C-1); 77.81(C-3''); 76.58(C-5); 76.04(C-3); 75.66(C-2''); 74.51(C-4'');

73.70(C-3"); 73.57, 72.29, 72.14, 71.02, 70.40(CH<sub>2</sub>(OBn)); 72.44(C-4); 71.82(C-5'); 69.23(C-2', C-4'); 68.11(C-6); 67.27(C-6'); 59.60(C-5"); 54.15(C-2); 22.85(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 20.64, 20.17(CH<sub>3</sub>(OAc));

## 5.6 Synthesen zu Kapitel 3.7

### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von anomeren Glycosylaminen ausgehend von Glycosylaziden.<sup>117</sup>

In eine Lösung aus 0.15 mmol des Glycosylazids in 20 ml eines 2-Propanol/Wasser-Gemisches (17:3) werden katalytische Mengen (zwei Spatelspitzen) Raney-Nickel eingebracht. Das Raney-Nickel der Fa. Acros wird kurz vor der Reaktion gründlich mit Wasser neutral gewaschen. Mit Hilfe einer Edelstahlkanüle wird durch die gerührte Lösung Wasserstoff geleitet. In regelmäßigen Abständen wird der Verlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt, bis kein Edukt mehr nachzuweisen ist. Der Katalysator wird über eine mit Hiflo-Supercel<sup>®</sup> beschichtete Glasfritte abfiltriert. Man wäscht fünfmal mit jeweils 15 ml 2-Propanol und anschließend fünfmal mit jeweils 15 ml Methanol. Von den vereinigten Filtraten werden die Lösungsmittel i. Vak. entfernt, und man erhält das anomere Amin als glasartig erstarrten Feststoff.

### 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-gluco-pyranosylamin<sup>145</sup> 67

( $\beta$ -Ac<sub>3</sub>-GlcNHAc-NH<sub>2</sub>)

Ausgehend von 75 mg (0.2 mmol) Ac<sub>3</sub>GlcNAc-N<sub>3</sub> in 25 ml 2-Propanol/Wasser Gemisch (21:4) wird entsprechend der allgemeinen Vorschrift verfahren. Nach 1.5 h kann vollständiger Umsatz nachgewiesen werden. Ohne weitere Charakterisierung schließen sich die nachfolgenden Umsetzungen an.

Ausbeute: 61 mg (0.17 mmol, 87% d. Th., Lit.: quant.); R<sub>f</sub> = 0.23 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1);

C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>

(346.34)

<sup>145</sup> M. Rösch, *Dissertation*, (2000), Universität Mainz

**2-Acetamido-3-O-[6-O-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-(2-desoxy-β-D-glucopyranosylamin 68**

Ausgehend von 0.28 g (0.29 mmol) Arabino-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> **15** in 75 ml 2-Propanol/Wasser Gemisch (6.5:1) wird entsprechend der allgemeinen Vorschrift verfahren. Nach 5 h kann vollständiger Umsatz nachgewiesen werden. Ohne weitere Charakterisierung werden die nachfolgenden Umsetzungen angeschlossen.

Ausb.: 0.28g (quant.); R<sub>f</sub> = 0.02 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5:1);

C<sub>54</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>

(964.43)

**2-Acetamido-3-O-[6-O-benzyl-3-O-sulfoxy-β-D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy-β-D-glucopyranosylamin 69**

Ausgehend von 196 mg (0.18 mmol) Ara-Sulfo-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>-N<sub>3</sub> **60** in 47 ml 2-Propanol/Wasser Gemisch (9:1) wird entsprechend der allgemeinen Vorschrift verfahren. Nach 3.5 h kann vollständiger Umsatz detektiert werden. Die Reaktion wird daraufhin abgebrochen. Ohne weitere Charakterisierung werden die folgenden Umsetzungen angeschlossen.

Ausb.: 184 mg (0.17 mmol, 96% d. Th.); farbloser amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.09 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5:1);

C<sub>54</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>S

(1044.40)

**N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-allylester-β-tert.-butylester<sup>121</sup> 71**

(Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OAll)

2.53 g (6.14 mmol) Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH **70** und 1.02 g (0.5 Äquiv.) Cäsiumcarbonat werden in 120 ml absol. Methanol gelöst und 10 min geschüttelt. Das Lösungsmittel wird anschließend i. Vak. entfernt und der Rückstand i. Hochvak. getrocknet. Durch Zugabe von 90 ml DMF wird das gebildete Cäsiumsalz gelöst und bei 0°C langsam mit 1.1 ml Allylbromid, gelöst in 10 ml DMF, versetzt. Man entfernt die Kühlung und schüttelt die Reaktion 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend entfernt man das Lösungsmittel i. Hochvak., nimmt den Rückstand in 400 ml Dichlormethan auf und wäscht zweimal mit je 50 ml Wasser. Die wässrige Phase wird einmal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organ.

Phasen werden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. eingengt. Das Rohprodukt wird i. Hochvak. getrocknet und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 2.77 g (quant., Lit.: quant); farbloser, amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.71 (CH/EE 2:1);  
C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>  
(451.52)

### N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure- $\alpha$ -allylester<sup>146</sup> 72

(Fmoc-Asp-OAll)

2.77 g Fmoc-Asp(OtBu)-OAll **71** werden in 30 ml TFA/H<sub>2</sub>O (95:5) gelöst und bei Raumtemp. gerührt. Nach 1.5 h wird der gelblich trübe Ansatz mit 50 ml Toluol verdünnt und anschließend die Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird zweimal mit Toluol codestilliert und i. Hochvak. getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Chromatographie an 150 g Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat/Essigsäure (CH:EE 2:3 + 1% AcOH).

Ausbeute: 2.2 g (5.56 mmol, 91% d. Th., Lit.: 83%); gelblicher, amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.72 (CH:EE 1:2 + 2% AcOH);  $[\alpha]_D^{22} = 15.91$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: 14.9 (c = 1.0, CH<sub>2</sub>Cl)

(C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>N) Ber.: C: 66.83 H: 5.35 N: 3.54

(395.41) Gef.: C: 66.49 H: 5.17 N: 3.34

FD-MS(m/z) = 395.8 [M+H]<sup>+</sup>

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm]:

10.60 (bs, 1H, OH): 7.74(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub> = 7.72Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.58(d, 2H, H1, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=6.98Hz, H1-,H8-Fmoc); 7.40(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub> =J<sub>H6,H5/7</sub>=7.36Hz, H3,H6-Fmoc); 7.29(t, 2H, J<sub>H2,H1/3</sub> = J<sub>H7,H6/8</sub>=7.36Hz, H2,H7-Fmoc); 5.92-5.83(m, 1H, All-H2,  $\omega$ -NH Asn); 5.31(d, J<sub>trans</sub>=17.22Hz, All-H3a); 5.23(d, J<sub>cis</sub>=10.66Hz, All-H3b); 4.66-4.51(m, 2H, All-H1); 4.46-4.32(m, 3H, J<sub>Ha,CH</sub>=6.99Hz, J<sub>Ha,Hb</sub>=19,12Hz, J<sub>Hb,CH</sub>=7.35Hz, J <sub>$\alpha$ CH, $\beta$ CH<sub>2</sub></sub>=17.65Hz, CH<sub>2a/b</sub>-Fmoc,  $\alpha$ -CH Asn); 4.22(t, 1H, J<sub>CH,Ha/b</sub>=6.99Hz, H9-Fmoc); 3.02(dd, 2H, J <sub>$\beta$ CH<sub>2</sub>, $\alpha$ CH</sub>=17.65Hz, J=4.04Hz,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Asn);

150.9 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  [ppm]:

175.98, 170.29 (C=O); 156.10 (C=O Urethan); 143.75; 143.63 (C-4a, C-4b); 141.29 (C-8a, C-9a); 131.27(All-C2); 129.02; 128.22; 127.75; 127.09; 125.28; 125.10 (C-3, C-6, C-2, C-7, C-1, C-8 Fmoc); 119.99 (C-4-, C-5 Fmoc); 119.05 (All-C3); 67.41 (All-C1); 66.54 (CH<sub>2</sub>-Fmoc); 50.28( $\alpha$ -CH-Asp); 47.06 (C-9Fmoc); 36.41 ( $\beta$ -CH-Asp);

<sup>146</sup> K. Thieme, *Dissertation* (2003), Universität Mainz,

***N*<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>ω</sup>-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-asparagin-α-allylester <sup>145</sup> 75**

(Fmoc-Asn(-β-Ac<sub>3</sub>GlcNAc)-OAll)

90 mg (0.23 mmol) FmocAspOAll **72** werden zusammen mit 31 mg (0.23 mmol) HOAT in 2.5 ml trockenem, aminfreiem DMF gelöst. Es werden anschließend in rascher Folge 0.06 ml (46 mg, 2 Äquiv.) DIPEA sowie 87 mg (0.23 mmol) HATU, gelöst in 2 ml absol. DMF, zugesetzt. Man rührt 10 min bei Raumtemp. und versetzt dann mit einer Lösung aus 61 mg (0.18 mmol) frisch hergestelltem β-Ac<sub>3</sub>GlcNAc-NH<sub>2</sub> **67** in 2 ml DMF. Die Lösung wird 22 h bei Raumtemp. unter einer Argon-Atmosphäre gerührt, mit 0.1 ml Hünigs Base sowie je einer Spatelspitze HATU und HOAT versetzt und weitere 15 h gerührt. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt, der Rückstand in ca. 50 ml Methylenchlorid aufgenommen und zweimal mit je 25 ml einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und einmal mit 25 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die wässrigen Lösungen werden mit 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt, die organ. Phasen vereint, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Das Rohprodukt wird in 40 ml Methanol in der Siedehitze gelöst. Im Vak. wird nun soweit eingeeengt, daß erste Kristalle ausfallen. Man läßt über Nacht bei Raumtemp. stehen und filtriert die ausgefallenen Kristalle ab. Diese werden mit trockenem Methanol gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Ausb.: 112 mg (0.20 mmol, 88% d. Th., Lit.: 61%); farbloser Feststoff; Schmp.: 232° u. Zers., Lit.: 234° u. Zers.;  $[\alpha]_D^{22} = 2.28$  (c=1.0, DMF), Lit.: 2.3 (c = 1.0, DMF); R<sub>f</sub>: 0.70

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1);

(C<sub>36</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub>) Ber.: C 59.75 H 5.71 N 5.81

(C<sub>36</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub> \* 3H<sub>2</sub>O) Ber.: C 55.59 H 6.09 N 5.40

(723.73) Gef.: C 55.76 H 6.26 N 5.49

ESI-MS (m/z) = 746.34 [M+Na]<sup>+</sup>; 762.30 [M+K]<sup>+</sup>

400 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ[ppm]:

8.66(d, 1H, J=9.39Hz, ω-NH Asn); 7.91-7.86(m, 3H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub>=7.44Hz, H4-, H5-Fmoc, NH); 7.73-7.67(d, 2H, H1,H8-Fmoc); 7.40(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub>=7.43Hz, H3,H6-Fmoc); 7.31(t, 2H, J<sub>H2,H1/3</sub>=J<sub>H7,H6/8</sub>=7.44Hz, H2,H7-Fmoc); 5.90-5.80(m, 1H, All-H2); 5.27(d, J<sub>trans</sub>=17.22Hz, All-H3a); 5.18-5.06, 4.81(m, 1H, 3H, H-1, H-3, H-4, All-H3b); 4.54-4.44(m, 3H, α-CH Asn, All-H1a, All-H1b); 4.33-4.11(m, 4H, H-2,H-5, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 3.94-3.97(m, 3H, H-6a, H-6b, H9-Fmoc); 2.72-2.52(m, 2H, β-CH<sub>2</sub>-Asn); 1.97(s, 3H, CH<sub>3</sub>Ac); 1.95(s, 3H, CH<sub>3</sub>Ac); 1.89(s, 3H, CH<sub>3</sub>Ac); 1.70(s, 3H, CH<sub>3</sub>Ac);

150.9 MHz- <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, BB, DEPT), δ[ppm]:

171.19, 170.12, 169.61, 169.42, 167.08 (C=O); 155.92 (CO-Urethan); 143.85(C1a-, C8a-Fmoc); 140.83 (C4a-, C5a-Fmoc); 132.43(All-C2); 127.74(C3-,C6-Fmoc); 127.19(C2-,C7-Fmoc); 125.30, 128.76(C1-, C8-Fmoc); 120.22(C4-, C5-Fmoc); 117.55(All-C3); 78.15(C-1); 73.46(C-5); 72.39(C-4); 68.48(C-3); 67.52(CH<sub>2</sub>-Fmoc); 65.86(All-C1); 61.95(C-6); 52.21(C-2); 50.28( $\alpha$ -CH-Asn); 46.69(C9-Fmoc); 36.92( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Asn); 22.69(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 20.62, 20.50, 20.47(CH<sub>3</sub>(OAc));

***N* <sup>$\alpha$</sup> -Fluorenylmethoxycarbonyl-*N* <sup>$\omega$</sup> -(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparagin <sup>144</sup> 76**

(Fmoc-Asn-( $\beta$ -Ac<sub>3</sub>GlcNAc)-OH)

Man löst 0.096 g (0.13 mmol) Fmoc-Asn( $\beta$ -Ac<sub>3</sub>GlcNAc)-OAll **75** in einer Mischung aus 4 ml DMF und 3 ml DMSO. Unter einer Argon-Atmosphäre wird nach Zugabe einer Spatelspitze Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) und 0.7 ml *N*-Methylanilin (0.6 mmol) 18 h unter Lichtausschluss geschüttelt. Anschließend werden die Lösemittel i. Hochvak. entfernt, und der Rückstand wird dreimal mit je 1.5 ml DMF codestilliert. Das resultierende Öl wird in 15 ml einer Dichlormethan/Methanol-Mischung (10:1) aufgenommen und mit 5 ml einer 0.5 M HCl-Lsg. ausgeschüttelt. Die organ. Schicht wird abgetrennt, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und die Lösemittel i. Vak. entfernt. Der gelbliche Feststoff wird in 20 ml Methanol gelöst und auf 1 g Kieselgel aufgezogen. Die Reinigung erfolgt durch Flash-Chromatographie an 20 g Kieselgel mit einem Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/Methanol (20:1) + 1% Essigsäure.

Ausb.: 44 mg (0.06 mmol, 49% d. Th., Lit.: 50%); farbloses Lyophilisat;  $[\alpha]_D^{22} = 8.51$  (c =

1.0, DMF), Lit.: 9.91 (c = 1.0, DMF); R<sub>f</sub> = 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 12:1);

(C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>O<sub>13</sub>N<sub>3</sub>) Ber.: C 57.98 H 5.45 N 6.15

(683.67)

Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden

ESI-MS (m/z) = 684.60 [M+H]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ [ppm]:

8.61(d, 1H, J=8.07Hz,  $\omega$ -NH-Asn); 7.93-7.85(m, 3H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub>=7.36Hz, H4-, H5-Fmoc, NH); 7.73-7.67(d, 2H, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=6.98Hz, H1-,H8-Fmoc); 7.40(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub>=7.36Hz, H3-,H6-Fmoc); 7.31(t, 2H, H2-,H7-Fmoc); 5.20-5.06, 4.80(m, t, 2H, 1H, H-1, H-3, H-4); 4.27-4.14(m, 5H, H-2, H-5, Fmoc-CH<sub>2</sub>,  $\alpha$ -CH-Asn); 3.94-3.78(m, 3H, H-6a, H-6b, H9-Fmoc); 2.52-2.48(m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Asn); 1.97, 1.94, 1.71(3s, 9H, CH<sub>3</sub>(OAc)); 1.88(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));

150.9 MHz- <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>,DEPT),  $\delta$ [ppm]:

170.14, 169.75, 169.61, 169.42 (C=O); 155.89 (CO-Urethan); 143.91(C1a-, C8a-Fmoc); 140.80 (C4a-, C5a-Fmoc); 129.00(C3-,C6-Fmoc); 128.31(C2-,C7-Fmoc); 128.76(C1-, C8-Fmoc); 120.21(C4-, C5-Fmoc); 78.17(C-1); 73.43(C-5); 72.38(C-4); 68.51(C-3); 65.78(CH<sub>2</sub>-Fmoc); 61.93(C-6); 52.24(C-2); 50.47( $\alpha$ -CH-Asn); 46.71(C9-Fmoc); 37.29( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Asn); 22.69(CH<sub>3</sub>(NHAc)); 21.13, 20.62, 20.47(CH<sub>3</sub>(OAc));

***N<sup>α</sup>*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N<sup>ω</sup>*-(2-acetamido-3-*O*-[6-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-*O*-benzyl-(2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl))-L-asparagin- $\alpha$ -allylester 77**

(Fmoc-Asn-[Ara-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>3</sub>]-OAll)

147 mg (0.37 mmol, 1.3 Äquiv.) FmocAspOAll **72** werden zusammen mit 51 mg (0.37 mmol, 1.3 Äquiv.) HOAT in 5 ml trockenem, aminfreiem DMF gelöst. In rascher Folge werden anschließend 0.08 ml (0.74 mmol, 2.6 Äquiv.) DIPEA sowie 140 mg (0.37 mmol, 1.3 Äquiv.) HATU zugesetzt. Die Reaktionsmischung wird 10 min bei Raumtemp. gerührt und dann mit einer Lösung von frisch hergestelltem Glycosylamin **68** (0.27 g in 5 ml DMF) versetzt. Man rührt die Mischung weitere 18 h bei Raumtemp. und entfernt nach dieser Zeit das Lösemittel i. Hochvakuum. Der Rückstand wird in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit 50 ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. bzw. NaCl-Lsg. ausgeschüttelt. Die organ. Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und durch Flash-Chromatographie an 30 g Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (15:1) gereinigt. Der Feststoff wird aus Benzol gefriergetrocknet.

Ausb.: 313 mg (0.30 mmol, 82% d.Th.); farbloses Lyophilisat; R<sub>f</sub> = 0.32 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 15:1); R<sub>t</sub> = 46.3 min (*JupiterC18*, Gradient B);  $[\alpha]_D^{22} = -69.84$  (c=1.0, CH<sub>3</sub>CN);

C<sub>76</sub>H<sub>83</sub>O<sub>19</sub>N<sub>3</sub> Ber.: C 67.99 H 6.23 N 3.13

(1341.56) Gef.: C 66.84 H 5.58 N 3.16

ESI-MS (m/z) = 1364.97 [M+Na]<sup>+</sup>

400 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY),  $\delta$ [ppm]:

8.49(d, 1H, J<sub>NH,H1</sub>=9.32Hz, <sup>15</sup>NH-Asn); 7.96(d, 1H, J<sub>NH,H2</sub>=8.92Hz, NH(NHAc)); 7.88(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub> = J<sub>H5,H6</sub>=7.88Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.69(d, 3H, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=7.88Hz, H1-,H8-Fmoc); 7.40(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub>=7.88Hz, H3-,H6-Fmoc); 7.36-7.14(m, 27H, H2-,H7-Fmoc, H<sub>arom.</sub>); 5.89-5.79(m, 1H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17.23Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub>=10.55Hz, J<sub>All2,All1a</sub>= Hz, All-H2); 5.26(dq, 1H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17.34Hz, All-H3a); 5.14(dq, 1H, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub>=10.44Hz, All-H3b); 4.98(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=3.48Hz, H-1''); 4.91(t, 1H, J<sub>1,NH</sub>=9.36Hz, H-1); 4.70-4.40(m, 15H, J<sub>gem</sub>=11.52Hz, J<sub>5'',4''/3''</sub>=3.00Hz, H-5''a, CH<sub>2</sub>(OBn),  $\alpha$ -CH-Asn); 4.31-4.17(m, 5H, CH<sub>2</sub>(OBn), Fmoc-CH<sub>2</sub>, H9-Fmoc); 4.00-3.97(m,

2H,  $J_{3''/4'',5''a}=3.00\text{Hz}$ , H-3'', H-4''); 3.86-3.78(m, 4H,  $J_{2'',1''}=3.32\text{Hz}$ , H-3, H-6'a, H-2'', H-2); 3.69-3.48(m, 8H, H-6', H-4', H-4, H6b, H-6'b, H-5''e, H-5'); 3.36-3.29(m, 3H,  $J_{2',3'}=9.32\text{Hz}$ , H-2', 2'-OH, H-5); 3.23(dd, 1H,  $J_{3',2'}=9.40\text{Hz}$ , H-3'); 2.65(dd, 1H,  $\beta\text{-CH}_2\text{-Asn}$ ); 2.45(m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2\text{-Asn}$ ); 1.73(s, 3H,  $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ );

100.6 MHz-  $^{13}\text{C-NMR}$ , (DMSO- $d_6$ , HMQC):  $\delta$ [ppm]:

171.08(CO Ester); 171.00, 169.23(CO(NHAc,Amid)); 155.79(CO Urethan); 143.74(C1a-, C8a-Fmoc); 140.69(C4a-, C5a-Fmoc); 138.99, 138.87, 138.71, 138.66, 138.14( $C_{\text{ipso}}$ -Aryl); 132.30(All-C2); 128.21, 128.12; 127.46; 127.22, 128.02, 127.16, 127.05, 126.98( $C_{\text{arom.}}$ ); 127.63(C3-, C6-Fmoc); 127.33(C2-, C7-Fmoc); 125.22(C1-, C8-Fmoc); 120.11(C4-, C5-Fmoc); 117.41(All-C3); 102.85(C-1'); 97.30(C-1''); 78.31(C-1); 77.49(C-3''); 76.58(C-3); 76.54(C-5); 75.78(C-2''); 74.67(C-4''); 73.31( $\text{CH}_2(\text{OBn})$ , C-3'), 72.11, 70.77( $\text{CH}_2(\text{OBn})$ ); 70.38( $\text{CH}_2(\text{OBn})$ , C-2'); 73.03(C-5'); 72.49(C-4); 68.97(C-6); 68.08(C-4''); 67.62(C-6'); 65.75( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ); 64.89(All-C1); 60.23(C-5''); 54.45(C-2); 50.21( $\alpha\text{-CH-Asn}$ ); 46.54(C9-Fmoc); 36.82( $\beta\text{-CH}_2\text{-Asn}$ ); 22.79( $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ );

***N*<sup>o</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>o</sup>-(2-acetamido-3-*O*-[6-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-*O*-benzyl-(2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure 78**

(Fmoc-Asn-[Ara-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>3</sub>]-OH)

Man löst 390 mg (0.29 mmol) **77** in 30 ml absol. und O<sub>2</sub>-freiem THF und trägt in diese Lösung eine Spatelspitze Tetrakis-(Triphenylphosphin)-palladium(0) sowie 0.06 ml N-Methylanilin ein. Die Lösung wird 24 h bei Raumtemp. unter Argon geschüttelt. Da nach dieser Zeit dünnschichtchromatographisch noch Edukt nachzuweisen ist, wird weiteres Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (20 mg) sowie 0.2 ml N-Methylanilin zugegeben und weitere 24 h geschüttelt. Vollständiger Umsatz kann trotz erneuter Zugabe von Palladium-Katalysator und Scavenger nicht beobachtet werden; das Lösemittel wird deshalb i. Vak. entfernt, der Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und mit je 50 ml 0.1N HCl und Wasser gewaschen. Die organ. Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Aus dem öligen Rückstand wird das Rohprodukt mit 6 ml MeOH herausgelöst und über eine C18-Kartusche filtriert. Nach dem Spülen der Filterkartusche mit 10 ml MeOH werden die organischen Phasen vereinigt, das Lösemittel i. Vak. entfernt und das Produkt durch präparative HPLC (Eurosphere C8) gereinigt. Es konnten 12% des Eduktes zurückgewonnen werden.

Ausb.: 279 mg (0.21 mmol, 74% d. Th.); farbloses Lyophilisat;  $R_f = 0.32$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  15:1);  $R_t = 12.7$  min (*LunaC18*, Gradient D);  $[\alpha]_D^{22} = -58.32$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ );

$\text{C}_{73}\text{H}_{79}\text{O}_{19}\text{N}_3$

(1301.5308)

HR-ESI-MS (m/z): Ber.: 1302.5386  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Gef.: 1302.5345  $[\text{M}+\text{H}]^+$

400 MHz- $^1\text{H}$ -NMR, (DMSO- $d_6$ , COSY):  $\delta$ [ppm]:

12.61(bs, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ); 8.41(d, 1H,  $J_{\text{NH,H1}}=9.24\text{Hz}$ ,  $^{\text{9}}\text{NH-Asn}$ ); 7.96(d, 1H,  $J_{\text{NH,H2}}=8.92\text{Hz}$ ,  $\text{NH-Glc}$ ); 7.87(d, 2H,  $J=7.52\text{Hz}$ , H4-, H5-Fmoc); 7.70(d, 2H,  $J=7.48\text{Hz}$ , H1-, H8-Fmoc); 7.48(d, 1H,  $J_{\text{NH},\alpha\text{CH}}=8.36\text{Hz}$ ,  $\text{NH-Urethan}$ ); 7.40(m, 3H, H3-, H6-Fmoc); 7.33-7.21(m, 25H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ); 4.98(d, 1H,  $J_{1'',2''}=3.44\text{Hz}$ , H-1''); 4.92(t, 1H,  $J_{\text{H1},\text{NH}}=9.32\text{Hz}$ ,  $J_{\text{H1},\text{H2}}=9.36\text{Hz}$ , H-1); 4.86(d, 1H,  $J_{3'-\text{OH},\text{H3}}=5.16\text{Hz}$ , 3'-OH); 4.68(m, 2H, H-5''a,  $\text{CH}_2(\text{OBn})$ ); 4.62-4.19(m, 14H,  $\text{CH}_2(\text{OBn})$ , H-1',  $\alpha\text{-CH-Asn}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ , H9-Fmoc); 4.02-3.97(m, 2H, H-3'', H-4''); 3.86-3.77(m, 4H, H-6'a, H-3, H-2'', H-2); 3.69-3.49(m, 7H, H-6a, H-4', H-4, H-6b), H-6'b, H-5', H-5''e); 3.34(m, 3H, H-2', 2'-OH, H-5); 3.25-3.20(m, 1H,  $J_{\text{H-3}',3'-\text{OH}}=5.0\text{Hz}$ , H-3'); 2.62(dd, 1H,  $\beta\text{-CH}_2\text{-Asn}$ ); 2.45-2.41(m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2\text{-Asn}$ ); 1.74(s, 3H,  $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ );

100.6 MHz- $^{13}\text{C}$ -NMR, (DMSO- $d_6$ , BB, HMQC):  $\delta$ [ppm]:

173.10 (CO-Säure); 170.27, 169.61(CO(Amid, NHAc)); 155.89(CO-Urethan); 143.91, 143.87(C1a-, C8a-Fmoc); 140.76(C4a-, C5a-Fmoc); 139.08, 138.97, 138.79, 138.75, 138.28( $\text{C}_{\text{ipso-Aryl}}$ ); 128.43, 128.32; 128.23; 127.74, 127.57, 127.44, 127.27( $\text{C}_{\text{arom}}$ ); 127.30(C3-,C6-Fmoc); 127.15(C2-,C7-Fmoc); 125.36(C1-, C8-Fmoc); 120.18(C4-, C5-Fmoc); 102.94(C-1'); 97.41(C-1''); 78.41(C-1); 77.59(C-3''); 76.69(C-3); 76.63(C-5); 75.81(C-2''); 74.81(C-4''); 73.45, 72.23, 70.92, 70.53( $\text{CH}_2\text{OBn}$ ); 73.45(C-3'); 73.14(C-5'); 72.62(C-4); 70.46(C-2'); 69.12(C-6); 69.07(C-6); 68.18(C-4'); 67.69(C-6'); 65.79( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ); 60.33(C-5''); 54.64(C-2); 50.23( $\alpha\text{-CH-Asn}$ ); 46.79(C9-Fmoc); 37.07( $\beta\text{-CH}_2\text{-Asn}$ ); 22.89( $\text{CH}_3(\text{NHAc})$ );

***N*<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>ω</sup>-(2-acetamido-3-*O*-[6-*O*-benzyl-3-*O*-sulfatyl-β-D-galactopyranosyl]-4-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-*O*-benzyl-(2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-asparagin-α-allylester 79**

(Fmoc-Asn-[Ara-*Sulfo*-Le<sup>α</sup>(OH)<sub>2</sub>]-OAll)

90 mg (0.23mmol, 1.3 Äquiv.) FmocAspOAll **72** werden zusammen mit 31 mg (0.194 mmol, 1.3 Äquiv.) HOAt in 10 ml trockenem, aminfreiem DMF gelöst. Es werden anschließend in rascher Folge 0.08 ml (2.6 Äquiv.) DIPEA sowie 90 mg (0.194 mmol, 1.3 Äquiv.) HATU zugesetzt. Man läßt 10 min bei Raumtemp. stehen und versetzt dann mit einer Lösung aus

frisch hergestelltem Glycosylamin **69** in 5 ml absol. und aminfreiem DMF. Man rührt unter einer Argon-Atmosphäre 17 h bei Raumtemp. nach und entfernt anschließend die Lösemittel i. Hochvak. Der Rückstand wird in 100 ml Methylenchlorid aufgenommen und zweimal mit 50 ml einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und einmal mit 50 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die wässrigen Phasen werden mit 50 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt, die vereinigten organ. Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Nach Gefriertrocknung aus 5 ml Benzol erhält man ein farbloses Lyophilisat.

Ausb: 172 mg (0.12 mmol, 66% d. Th.); farbloses Lyophilisat; R<sub>f</sub> = 0.49 (CHCl<sub>3</sub> / MeOH 5:1); R<sub>t</sub> = 45.5 min (*JupiterC18*, Gradient B);  $[\alpha]_D^{22} = -46.13$ , (c = 1.0 CH<sub>3</sub>CN)

C<sub>76</sub>H<sub>83</sub>N<sub>3</sub>O<sub>22</sub>S

(1421.51)

ESI-MS: 1466.41 [M-H+2Na]<sup>+</sup>

600 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY), δ[ppm]:

8.42(d, 1H, J<sub>NH,H1</sub>=9.31Hz, <sup>o</sup>NH-Asn); 7.91(d, 1H, J<sub>NH,H2</sub>=9.75Hz, NH(NHAc)); 7.88(d, 2H, J<sub>H4,H3=H5,H6</sub>=7.76Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.69(d, 3H, J<sub>H1,H2=H8,H7</sub>=7.76Hz, H1-,H8-Fmoc); 7.40(t, 2H, J<sub>H3,H2/4=H6,H5/7</sub>=7.54Hz, H3-,H6-Fmoc); 7.36-7.14(m, 27H, H2-,H7-Fmoc, H<sub>arom.</sub>); 5.84(m, 1H, All-H2); 5.26(dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17.16Hz, All-H3a); 5.14(dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub>=10.54Hz, All-H3b); 4.98(d, 1H, J<sub>1",2"</sub>=3.40Hz, H-1"); 4.91(t, 1H, J<sub>1,NH</sub>=9.29Hz, H-1); 4.68-4.42(m, 14H, CH<sub>2</sub>(OBn), H-5"a, H-1', AllH1a/b, α-CH-Asn); 4.31-4.18(m, 4H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, H9-Fmoc); 3.97-3.84(m, 6H, H-3", H-4", H-4', H-3, H-3',H-6'a); 3.79(dd, 1H, J<sub>2",3"</sub>=9.56Hz, J<sub>2",1"</sub>=3.35Hz, H-2"); 3.75(d, 1H, J<sub>2,1</sub>=9.62Hz, H-2); 3.65(dd, 1H, J<sub>6a,6b</sub>=14.25Hz, H-6'); 3.58(t, 1H, J<sub>4,3</sub>=9.25Hz, H-4); 3.55-3.47(m, 7H, H-4, H-6b, H-6'b, H-5', H-5"e, H-2); 3.30(d, 1H, J<sub>5,4</sub>=9.62Hz, H-5); 2.64(dd, 1H, β-CH<sub>2</sub>-Asn); 2.46(m, 1H, β-CH<sub>2</sub>-Asn); 1.73(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));

150.9 MHz- <sup>13</sup>C-NMR, (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC): δ[ppm]:

171.11(CO(Ester)); 169.60, 169.11(CO (NHAc), (Amid)); 155.82(CO-Urethan); 143.75(C1a-, C8a-Fmoc); 140.71(C4a-, C5a-Fmoc); 138.98, 138.91, 138.65, 138.62, 138.18(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 132.83(All-C2); 128.23, 128.14; 128.11; 127.66, 127.57, 127.05, 127.44, 127.08, 127.04(C<sub>arom.</sub>); 127.33(C3-, C6-Fmoc); 127.23(C2-, C7-Fmoc); 125.25(C1-, C8-Fmoc); 120.12(C4-, C5-Fmoc); 117.43(All-C3); 102.76(C-1'); 97.29(C-1"); 79.24(C-3'); 78.25(C-1); 77.45(C-3"); 76.68(C-5); 75.96(C-3); 75.79(C-2"); 74.49(C-4"); 73.33, 72.18, 72.11, 70.68, 70.29(CH<sub>2</sub>(OBn)); 72.72(C-5'); 72.51(C-4); 68.95(C-2'); 68.64(C-6); 67.58(C-6'); 66.31(C-4'); 65.77(CH<sub>2</sub>-Fmoc); 64.90(All-C1); 60.12(C-5"); 54.56(C-2); 50.19(α-CH-Asn); 46.55(C9-Fmoc); 36.82(β-CH<sub>2</sub>-Asn); 22.76(CH<sub>3</sub>(NHAc));

***N*<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>ω</sup>-(2-acetamido-3-*O*-[6-*O*-benzyl-3-*O*-sulfatyl-β-D-galactopyranosyl]-4-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-*O*-benzyl-(2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure 80**

(Fmoc-Asn-[Ara-Sulfo-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>]-OH)

Es werden 165 mg (0.116 mmol) **79** in 8 ml absol. und O<sub>2</sub>-freiem THF gelöst und in zwei gleich große Ansätze geteilt. Man versetzt beide Ansätze mit je zwei Tropfen N-Methylanilin und trägt in diese Lösung je eine Spatelspitze Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> ein. Der Verlauf der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 6 h kann vollständiger Umsatz nachgewiesen werden. Die Lösung wird zur Reinigung auf eine C18-funktionalisierte Kieselgelglasplatte aufgebracht. Die Chromatographie wird mit Chloroform/Methanol (2:1) durchgeführt. Nach Abtrennen des Kieselgels vom Glas wird das Produkt durch Extraktion mit Chloroform/Methanol (2:1) erhalten.

Ausb.: 142 mg (0.103 mmol, 92% d. Th.); R<sub>f</sub> = 0.78 (RP-C<sub>18</sub>, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 2:1); R<sub>t</sub> = 41.7min (*JupiterC18* Gradient B);  $[\alpha]_D^{22} = -51.93$ , (c = 1.0 DMSO);

C<sub>73</sub>H<sub>79</sub>N<sub>3</sub>O<sub>22</sub>S

(1381.4876)

HR-ESI-MS Ber: 1382.4949 [M+H]<sup>+</sup> Gef: 1382.4910 [M+H]<sup>+</sup>

400 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY), δ[ppm]:

8.57(bs, 1H, <sup>ω</sup>NH-Asn); 7.91(d, 1H, J<sub>NH,H2</sub>=8.96Hz, NH(NHAc)); 7.88(d, 2H, J<sub>H4,H3=H5,H6</sub>=7.48Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.69(d, 3H, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=7.76Hz, H1-,H8-Fmoc); 7.40(t, 2H, J<sub>H3,H2/4=H6,H5/7</sub>=7.44Hz, H3-,H6-Fmoc); 7.36-7.14(m, 27H, H2-,H7-Fmoc, H<sub>arom.</sub>); 4.98(d, 1H, J<sub>1'',2''</sub>=3.28Hz, H-1''); 4.89(t, 1H, J<sub>1,2</sub>=9.0Hz, J<sub>1,NH</sub>=9.12Hz, H-1); 4.69-4.60(m, 5H, CH<sub>2</sub>(OBn), H-5''a, α-CH-Asn); 4.54-4.42(m, 8H, H-1', CH<sub>2</sub>(OBn)); 4.33-4.20(m, 4H, CH<sub>2</sub>(OBn), Fmoc-CH<sub>2</sub>, H9-Fmoc); 4.01-3.72(m, 8H, H-3'', H-4'', H-4', H-3, H-3',H-6'a, H-2'', H-2); 3.68-3.47(m, 7H, H-6a, H-4, H-6b, H-6'b, H-5', H-5''e, H-2'); 3.28(m, 1H, H-5); 2.56(dd, 1H, J<sub>gem</sub>=15.68Hz, β-CH<sub>2</sub>-Asn); 2.42(dd, 1H, J<sub>gem</sub>=15.44Hz, β-CH<sub>2</sub>-Asn); 1.73(s, 3H, CH<sub>3</sub>(NHAc));

150.9 MHz- <sup>13</sup>C-NMR, (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC): δ[ppm]:

171.11(CO(Ester)); 169.60, 169.11(CO (NHAc), (Amid)); 155.82(CO-Urethan); 143.75(C1a-, C8a-Fmoc); 140.71(C4a-, C5a-Fmoc); 138.98, 138.91, 138.65, 138.62, 138.18(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 132.83(AlI-C2); 128.23, 128.14, 128.11, 127.66, 127.57, 127.05, 127.44, 127.08, 127.04(C<sub>arom.</sub>); 127.59(C3-, C6-Fmoc); 127.21(C2-, C7-Fmoc); 125.31(C1-, C8-Fmoc); 120.10(C4-, C5-Fmoc); 102.54(C-1'); 97.09(C-1''); 79.14(C-3'); 78.34(C-1); 77.47(C-3''); 76.32(C-5); 75.97(C-3); 75.58(C-2''); 74.37(C-4''); 73.18, 72.03, 70.78, 70.26,

70.15(CH<sub>2</sub>(OBn)); 72.62(C-5'); 72.21(C-4); 68.86(C-2'); 68.44(C-6); 67.40(C-6'); 66.35(C-4'); 65.38(CH<sub>2</sub>-Fmoc); 59.88(C-5''); 54.56(C-2); 50.19( $\alpha$ -CH-Asn); 46.87(C9-Fmoc); 36.82( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Asn); 22.81(CH<sub>3</sub>(NHAc));

## 5.8 Synthesen zu Kapitel 3.8

### N-,N'-(Di-benzyloxycarbonyl)-guanidin<sup>134</sup> **86**

Zu einer Lösung von Guanidinhydrochlorid (3.82 g, 0.04 mol) und Natriumhydroxid (8 g, 0.2 mol) in 40 ml Wasser werden 80 ml Dichlormethan gegeben. Die auf 0°C gekühlte Lösung wird innerhalb von 45 min unter starkem Rühren mit 17.1 ml (0.12 mol) Benzyloxycarbonylchlorid versetzt. Nach beendeter Zugabe wird die Reaktionsmischung weitere 20 h bei 0°C gerührt. Der Ansatz wird nach dieser Zeit mit 100 ml Dichlormethan verdünnt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die organ. Phasen werden vereinigt, mit 100 ml Wasser gewaschen und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird das Produkt durch Umkristallisation aus 200 ml Methanol erhalten.

Ausb.: 10.45g (0.032 mol, 80% d. Th.; Lit.: 83%); farblose Kristalle; Schmp.: 146°C (Lit.: 149-150°C); R<sub>f</sub> = 0.29 (PE/EE 3:1);

(C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Ber.: C: 62.38 H: 5.23 N: 12.84

(327.33) Gef.: C: 62.36 H: 5.28 N: 12.71

FD-MS (m/z) = 327.6 [M]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>),  $\delta$ [ppm]:

10.86(bs, 1H, NH-Imin), 8.67(bs, 2H, NH-Urethan), 7.36-7.34(m, 10H, H<sub>arom.</sub>), 5.10(s, 4H, CH<sub>2</sub>(OBn));

### N-,N'-(Di-benzyloxycarbonyl)-N''-trifluormethansufonyl-guanidin<sup>134</sup> **87**

Unter einer Argon-Atmosphäre werden 1.7 g (0.042 mol, 2 Äquiv.) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) zu einer auf 0°C abgekühlten Lösung von 6.8 g (0.021 mol) N-,N'-Di-(benzyloxycarbonyl)-guanidin **86** in 100 ml absol. Chlorbenzol gegeben und eine Stunde gerührt. Die Temperatur der Mischung wird auf -45°C abgesenkt und innerhalb von 10 min 3.4 ml (0.021 mol, 1 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid zugespritzt. Man läßt auf Raumtemp. erwärmen und rührt die Lösung weitere 18 h, entfernt das Lösemittel i. Vak. und

löst den Rückstand in 100 ml Ethylacetat. Die organ. Phase wird zweimal mit 50 ml 2M Natriumbisulfat-Lsg., 100 ml Wasser und 100 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen und anschließend mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nachdem das Lösemittel i. Vak. entfernt wurde, erhält man das Produkt durch zweifache Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (6:1) bzw. Dichlormethan/Diethylether (95:5) als farbloses Öl.

Ausb.: 7.48 g (0.016 mol, 78% d. Th.; Lit: 69%); farbloses Öl; R<sub>f</sub> = 0.83 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O 95:5);

(C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S) Ber.: C: 47.06 H: 3.51 N: 9.15

(459.39)

Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden

FD-MS (m/z) = 459.7 [M]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ[ppm]:

7.40-7.36(m, 10H, H<sub>arom.</sub>), 5.20(s, 4H, CH<sub>2</sub>(OBn));

150.9 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ[ppm]:

152.29, 151.51(CO-Urethan); 135.11(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.61, 128.58, 128.40(C<sub>arom.</sub>); 68.00(CH<sub>2</sub>(OBn));

### N<sup>α</sup>-Fmoc-L-Ornithin 89

Es werden 3.0 g (6.58 mmol) N<sup>α</sup>-Fmoc-(N<sup>γ</sup>-Boc)-L-Ornithin **88** in einer Mischung aus 75 ml TFA, 6 ml H<sub>2</sub>O und 1 ml TIPS gelöst und für 45 min bei Raumtemp. gerührt (vollständiger Umsatz laut DC-Kontrolle). Die Lösung wird mit 40 ml Toluol versetzt, und die Lösemittel werden i. Vak. entfernt, anschließend wird zweimal mit je 25 ml Toluol codestilliert. Man erhält einen glasartig erstarrten Feststoff, der sich aus Diethylether aufschäumen lässt.

Ausb.: 2.33 g (quant.); farbloser Feststoff; Schmpkt.: 56°C; R<sub>f</sub> = 0.72 (2-Prop/H<sub>2</sub>O/AcOH 5:2:2); [α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = + 3.91, (c = 1.0 DMSO)

(C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) Ber.: C: 67.78 H: 6.26 N: 7.90

(354.39)

eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden

FD-MS (m/z) = 355.6 [M+H]<sup>+</sup>; 336.5 [M]<sup>+</sup> (Lactam);

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>), δ[ppm]:

7.88(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub>=7.35Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.70(d, 2H, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=7.35Hz, H1-, H8-

Fmoc); 7.60(d 1H, J<sub>NH,Hα</sub>=7.74Hz, NH); 7.40(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub>=7.35Hz, H3-, H6-Fmoc);

7.31(t, 2H, J<sub>H2,H1/3</sub>=J<sub>H7,H6/8</sub>=7.35Hz, H2-, H7-Fmoc); 4.29-4.18(m, 3H, Fmoc-CH<sub>2</sub>, H9-Fmoc);

3.92(m, 1H, α-CH-Orn); 2.77(m, 2H, δ-CH<sub>2</sub>-Orn); 1.77, 1.61(m, 4H, β-CH<sub>2</sub>-, γ-CH<sub>2</sub>- Orn);

150.9 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>,DEPT), δ [ppm]:

173.72 (COOH); 156.22(CO-Urethan); 143.93(C1a-, C8a-Fmoc); 140.83(C4a-, C5a-Fmoc); 127.75(C3-, C6-Fmoc); 127.20(C2-, C7-Fmoc); 125.36(C1-, C8-Fmoc); 120.23(C4-, C5-Fmoc); 65.75(CH<sub>2</sub>-Fmoc); 53.65( $\alpha$ -CH-Arg); 46.76(C9-Fmoc); 40.44( $\delta$ -CH<sub>2</sub>-Orn); 27.99( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Orn); 24.04( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Orn);

### **N <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc-(N-,N'-di-benzyloxycarbonyl)-L-arginin 84**

*Variante a nach Zervas*<sup>131</sup>

Man löst 160 mg (0.29 mmol) N <sup>$\alpha$</sup> -Boc-(N-,N'-di-benzyloxycarbonyl)-L-arginin in 10 ml TFA und 0.5 ml H<sub>2</sub>O und setzt 0.06 ml (1 Äquiv.) Triisopropylsilan hinzu. Es wird bis zum vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle) 2 h bei Raumtemp. gerührt, mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Anschließend wird dreimal mit je 5 ml Toluol codestilliert. Verbindung **82** wird in einer Mischung von 10 ml 10%ige Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. und 5 ml Dioxan bei 0°C gelöst und in diese Lösung 83 mg (1.1 Äquiv.) Chlorameisensäure-[1-(9-fluorenyl)-ethylester], gelöst in 0.6 ml Dioxan, zugetropft. Nach 3 h Rühren bei Raumtemp. kann vollständiger Umsatz detektiert werden. Während die Lösung in 150 ml dest. H<sub>2</sub>O gegossen wird, fällt ein farbloser Niederschlag aus, der anschließend mit 50 ml kaltem Ether gewaschen wird.

Ausb.: 83 mg (0.12 mmol, 43% d. Th);

*Variante b nach Goodmann*<sup>134</sup>

Man suspendiert 2.31 g (6.56 mmol) N <sup>$\alpha$</sup> -Fmoc-L-Ornithin **92** in 40 ml absol. Dichlormethan, spritzt 1.3 ml (6.91 mmol, 1.05 Äquiv.) N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid hinzu und erhitzt unter Rückfluß, bis sich eine klare Lösung bildet. Nach Abkühlen auf Raumtemp. werden unter einer Argon-Atmosphäre 3.35 g (6.9 mmol, 1.05 Äquiv.) (N-,N'-Di-benzyloxycarbonyl)-N"-trifluormethan-sulfonyl-guanidin **90**, gelöst in 20 ml absol. Dichlormethan, sowie 1 ml (1.1 Äquiv.) NEt<sub>3</sub> zugegeben. Man rührt 2 d bei Raumtemp., verdünnt den Ansatz mit 250 ml Dichlormethan und wäscht die organ. Phase mit je 200 ml 2M NaHSO<sub>4</sub>-Lsg. und Wasser. Man trennt die wässrige Phase ab, trocknet mit MgSO<sub>4</sub> und engt die organische Phase i. Vak. auf 50 ml ein. Nach Überschichten mit 200 ml Petrolether fällt das Produkt bei 4°C als farbloser Feststoff aus.

Ausb.: 3.67 g (5.52 mmol, 84% d. Th.; Lit.<sup>134</sup>: 85%); farbloser Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1); R<sub>t</sub> = 13.2 min (*LunaC18*, Gradient D); Schmp.: 107-109°C (Lit.: k. A.);  $[\alpha]_D^{22} = +16.92$  (c=1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: k. A.;

(C <sub>37</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> )	Ber.:	C: 62.38	H: 5.23	N: 12.84
(C <sub>37</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> * 2H <sub>2</sub> O)	Ber.:	C: 63.42	H: 5.75	N: 8.00
(664.71)	Gef.:	C: 63.65	H: 5.81	N: 8.03

ESI-MS (m/z) = 665.19 [M+H]<sup>+</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY, HMQC), δ [ppm]:

12.59(bs, 1H, OH); 11.61(bs, 1H, NH); 8.43(t, 1H, J<sub>NH,δCH<sub>2</sub></sub>=5.80Hz, NH-Guanidino); 7.82(d, 2H, J<sub>H<sub>4</sub>,H<sub>3</sub></sub>=J<sub>H<sub>5</sub>,H<sub>6</sub></sub>=7.72Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.69(t, 2H, J=7.72Hz, H1-, H8-Fmoc); 7.39-7.27(m, 15H, H<sub>arom.</sub>, H1-, H8-, H2-, H7-Fmoc, NH-Urethan); 5.19(s, 2H, CH<sub>2</sub>-Bzl); 5.01, s, 2H, CH<sub>2</sub>-Bzl); 4.28-4.17(m, 3H, H9-Fmoc, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 3.98-3.93(m, 1H, α-CH-Arg); 3.34-3.32(dd, 2H, J<sub>δCH<sub>2</sub>,NH</sub>=5.80Hz, δ-CH<sub>2</sub>-Arg); 1.72-1.57(m, 4H, β-CH<sub>2</sub>-, γ-CH<sub>2</sub>-Arg);

150.9 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC, DEPT), δ [ppm]:

173.87 (CO-Säure); 163.14 (CN-Imin); 156.25 (CO-Urethan(Fmoc)); 155.24 (CO-Imin); 152.77(CO-Urethan(Guanidino)); 143.94, 143.90 (C1a-, C8a-Fmoc); 140.83(C4a-, C5a-Fmoc); 136.99, 135.26(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.65, 128.59, 128.11, 127.90(C<sub>arom.</sub>); 127.72.(C3-, C6-Fmoc); 127.16(C2-, C7-Fmoc); 125.37(C1-, C8-Fmoc); 120.19(C4-, C5-Fmoc); 67.70, (CH<sub>2</sub>-Bzl); 66.49(CH<sub>2</sub>-Bzl); 65.69(CH<sub>2</sub>-Fmoc); 53.75(α-CH-Arg); 46.79(C9-Fmoc); 40.23(δ-CH<sub>2</sub>-Arg); 28.19(β-CH<sub>2</sub>-Arg); 25.55(γ-CH<sub>2</sub>-Arg);

### N<sup>α</sup>-Fmoc-L-arginin 91

Es werden 61 mg (0.09mmol) N<sup>α</sup>-Fmoc-(N-,N'-Di-benzyloxycarbonyl)-L-arginin **87** in 10 ml absol. Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Palladium auf Kohle (5 mg, Fa. Fluka) versetzt. Man rührt die Lösung unter einem stetigen H<sub>2</sub>-Strom (5 l / h) bis vollständiger Umsatz angezeigt wird (DC-Kontrolle). Man filtriert die Lösung über Hyflo-Supercel<sup>®</sup> ab und wäscht mit 20 ml absol. Methanol nach. Die vereinigten Lösemittel werden i. Vak. entfernt und das Produkt i. Hochvak. getrocknet.

Ausb.: 35mg (0.086 mmol, 96% d. Th.); farbloser amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.43 (MeOH);

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup> = + 7.31 (c = 1.0, MeOH);

(C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> )	Ber.:	C: 63.62	H: 6.10	N: 14.13
------------------------------------------------------------------	-------	----------	---------	----------

(396.44) Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden

ESI-MS (m/z) = 395.09 [M]<sup>-</sup>

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, COSY, HMQC), δ [ppm]:

8.43(bs, 1H, NH-Amin); 7.82(d, 2H, J=7.39Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.69(d, 2H, J=7.72Hz, H1-, H8-Fmoc); 7.70(t, 2H, NH<sub>2</sub>-Amin) 7.51-7.36(m, 2H, H3-, H6-Fmoc); 7.34-7.28(m, 2H, H2-, H7-Fmoc); 4.26-4.15(m, 3H, H9-Fmoc, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 3.82-3.76(m, 1H, α-CH-Arg); 3.11-3.02(bs, 2H, δ-CH<sub>2</sub>-Arg); 1.78-1.42(m, 4H, β-CH<sub>2</sub>- / γ-CH<sub>2</sub>-Arg);

100.6 MHz <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC, DEPT), δ [ppm]:

175.32 (CO-Säure); 157.29 (CN-Imin); 155.58 (CO-Urethan(Fmoc)); 143.96, 143.81 (C1a-, C8a-Fmoc); 140.65 (C4a-, C5a-Fmoc); 127.57(C3-, C6-Fmoc); 127.26(C2-, C7-Fmoc); 125.25(C1-, C8-Fmoc); 120.00(C4-, C5-Fmoc); 65.45(CH<sub>2</sub>-Fmoc); 54.92(α-CH-Arg); 46.69(C9-Fmoc); 40.38(δ-CH<sub>2</sub>-Arg); 29.29(β-CH<sub>2</sub>-Arg); 25.24 (γ-CH<sub>2</sub>-Arg);

## **[2-(Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol <sup>107</sup> 22**

1. Lithiierung:

Zu einer Lösung aus 33.1 g (24.5 ml, 135 mmol) 1-(4-Bromophenoxy)-1-ethoxyethan **23** in 150 ml absol. Diethylether werden bei einer Temp. von -50°C unter Argon 84.5 ml (135 mmol) einer n-Butyllithium-Lsg. (1.6 M-Lsg. in Hexan (Fa. Aldrich)) innerhalb von 45 min zugegeben. Man rührt 20 min bei -40°C, die Lsg. wird trüb und verfärbt sich goldgelb. Anschließend läßt man innerhalb von 45 min auf 5°C - 10°C erwärmen und rührt bei dieser Temperatur 90 min.

2. Cupratbildung und -addition:

In einem ausgeheizten 500 ml Dreihalskolben werden 12.3 g (65.5 mmol) Cu(I)I in ca 50 ml absol. Diethylether suspendiert. Mit Hilfe einer Edelstahldoppelkanüle wird die lithiierte Lösung in einen ausgeheizten, mit Argon gefluteten 250 ml Tropftrichter überführt und anschließend bei 0°C innerhalb von 80 min zur obigen Suspension zugetropft. Die Lösung verfärbt sich daraufhin tiefrot, nach weiteren 20 min weist der Ansatz eine dunkelviolette Färbung auf. Man kühlt auf -50°C ab und tropft mittels einer Spritze 2.7 g (3.2 ml, 23.2 mmol) 2-Trimethylsilyloxiran **94** langsam zu. Man rührt 4 h bei -50°C, tauscht die Aceton/Trockeneis Kühlung gegen eine Eis-Kochsalz-Mischung (Verhältnis 3:1, -19°C) aus und rührt über Nacht. Am nächsten Morgen hat der Ansatz eine Temperatur von 8°C. Man versetzt die Lösung mit 250 ml einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lsg. und rührt 10 min bei 0°C. Die Mischung wird in einen Scheidetrichter überführt. Es werden 300 ml Ethylacetat und weitere 200 ml einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lsg. zugegeben und kräftig geschüttelt. Die org. Phase wird zweimal mit je 250 ml einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lsg. und die gesammelten wässrigen Phasen mit 300 ml

Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organ. Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wird durch zweimalige Flash-Chromatographie an 650 g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (10:1) +0.1% Dimethylethylamin gereinigt. Das Produkt wird zweimal mit je 15 ml Benzol codestilliert, um letzte Reste der zugesetzten Base zu entfernen.

Ausb.: 2.14g (43.2 mmol, 32% d. Th. Lit.: 85%); gelbliches Öl;  $R_f = 0.44$  (PE/EE 3:1);

$[\alpha]_D^{22} = 0$  ( $c = 1.0$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ), Lit.: 0 ( $c = 1.0$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ );

$(\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si})$  Ber.: C 63.78 H 9.28

(282.45) Gef.: C 63.43 H 9.47

FD-MS ( $m/z$ ) = 282.6  $[\text{M}]^+$ ;

300 MHz-  $^1\text{H}$ -NMR (Aceton- $d_6$ ),  $\delta$ [ppm]:

7.05(d, 2H,  $J=8.82\text{Hz}$ ,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ); 6.88(d, 2H,  $J=8.25\text{Hz}$ ,  $\text{H}_{\text{arom.}}$ ); 5.34(q, 1H,  $J=5.15\text{Hz}$ , O-CH-O); 4.06-3.91(m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3.75-3.67(m, 1H, OH); 3.53-3.42(m, 2H,  $J_{\text{gem}}=6.99\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ); 2.33(dd, 1H,  $J=5.15\text{Hz}$ , TMSCH); 1.38(d, 3H,  $J=5.15\text{Hz}$ ,  $\text{CHCH}_3$ ); 1.12(t, 3H,  $J_{\text{gem}}=6.99\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); -0.04(s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ );

150.9 MHz-  $^{13}\text{C}$ -NMR (Aceton- $d_6$ ),  $\delta$ [ppm]:

155.35(C-(O-Ar<sub>ipso</sub>)); 136.43(C-(CH-Ar<sub>ipso</sub>)); 129.39(C<sub>arom.</sub>); 117.96(C<sub>arom.</sub>); 100.28(O-CH-O); 63.52( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 61.73( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ); 40.92(TMSCH); 20.61( $\text{CH}_3\text{CH}$ ); 15.40( $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ); -2.28( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ );

### **[2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol<sup>107</sup> 95**

2.05 g (7.2 mmol) [2-(Ethoxyethoxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **22** werden in 35 ml absol. Methanol gelöst und unter Argon-Atmosphäre gerührt. Eine Lösung von 55 mg Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (0.22 mmol, 0.03 Äquiv.) in 3 ml Methanol wird zugegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemp. ist die Umsetzung vollständig (DC-Kontrolle), und das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie an 130 g Kieselgel mit PE/EE 4:1 gereinigt.

Ausb.: 1.37g (6.5 mmol, 90% d. Th., Lit.: 90%); farbloser, kristalliner Feststoff; Schmp.: 139°C (Lit.: 138-141°C);  $R_f = 0.49$  (PE/EE 1:1);

$(\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{Si})$  Ber.: C 62.81 H 8.63

(210.34) Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden

FD-MS ( $m/z$ ) = 210.5  $[\text{M}]^+$

300 MHz-  $^1\text{H}$ -NMR (Aceton- $d_6$ )  $\delta$ [ppm]:

7.98(bs, 1H, OH-Phenol); 6.94(d, 2H, H<sub>arom.</sub>); 6.72(d, 2H, H<sub>arom.</sub>); 4.05-3.89(m, 2H, CH<sub>2</sub>OH); 3.46(t, 1H, J=5.15Hz, OH); 2.28(dd, 1H, J=5.14Hz, TMS-CH); -0.04(s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  
75.3- <sup>13</sup>C-NMR (Aceton-d<sub>6</sub>, DEPT), δ[ppm]:  
155.41(C-(O-Ar<sub>ipso</sub>)); 133.49(C-(CH-Ar<sub>ipso</sub>)); 129.47(C<sub>arom.</sub>); 116.47(C<sub>arom.</sub>); 63.69(CH<sub>2</sub>OH); 40.77(TMSCH); -2.22(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

#### 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure-allylester<sup>107</sup> 21

Es werden 1.27 g (6.0 mmol) [2-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-trimethylsilyl]ethanol **95** in 40 ml Aceton (p.a.) unter einer Argon-Atmosphäre vorgelegt und gerührt. Es werden nacheinander 1.08 g (7.8 mmol, 1.3 Äquiv.) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 130 mg (0.08 mmol) KI und 0.85 ml (975 mg, 1.2 Äquiv.) Chloressigsäureallylester zugegeben. Nach 18 h werden weitere 0.3 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 40 mg KI sowie 0.25 ml Ester zugegeben und 24 h gerührt. Nach dieser Zeit kann vollständiger Umsatz nachgewiesen werden (DC-Kontrolle). Die braune Lösung wird über Hyflo-Supercel<sup>®</sup> abfiltriert und mit 150 ml Aceton nachgewaschen. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und der ölige Rückstand in Petrolether/Ethylacetat (5:1) flash-chromatographisch an 130 g Kieselgel gereinigt. Man erhält ein klares, gelbliches Öl, welches nach Trocknen i. Hochvak. und Lagern bei 4°C erhärtet.

Ausb.: 1.41 g (4.6 mmol, 76% d. Th., Lit.: 78%); gelbes Öl; R<sub>f</sub> = 0.24 (PE/EE 3:1);

(C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>Si)

Ber.: C 62.30 H 7.84

(308.44)

Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden.

FD-MS (m/z) = 308.6 [M]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ[ppm]:

6.99(d, 2H, J=8.46Hz, H<sub>arom.</sub>); 6.83(d, 2H, J=8.82Hz, H<sub>arom.</sub>); 5.96-5.83(m, 1H, J<sub>H2,H1</sub>=5.52Hz, All-H2); 5.30(dq, 1H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=16.91Hz, All-H3a); 5.23(dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub>=10.3Hz, All-H3b); 4.67(dt, 2H, J<sub>H1,H2</sub>=5.52Hz, All-H1a,b); 4.60(s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CO); 4.09-3.98(t, dd, J<sub>gem</sub>=11.39Hz, J<sub>vic</sub>=4.78Hz, CH-CH<sub>2</sub>OH); 2.36(dd, 1H, J<sub>vic</sub>=4.78Hz, TMSCH); -0.07(s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

75.3MHz- <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, BB), δ[ppm]:

168.77(CO(Ester)); 155.70(C-(O-Ar<sub>ipso</sub>)); 133.56(C-(CH-Ar<sub>ipso</sub>)); 131.42(All-C2); 128.79(C<sub>arom.</sub>); 118.99(All-C3); 114.98(C<sub>arom.</sub>); 65.75(All-C1); 65.55(OCH<sub>2</sub>OH); 63.16(TMSCH-CH<sub>2</sub>); 40.77(TMSCH); -2.69(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

**4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-isoleucyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxy-essigsäure-allylester<sup>107</sup> 96a**

Zu 1.05 g (2.97 mmol) Fmoc-Ile-OH in 20 ml absol. Dichlormethan werden 0.83 g (2.71 mmol) 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure-allylester **21** gegeben. Man rührt unter einer Argon-Atmosphäre und kühlt auf 0°C ab. Es werden in rascher Folge 20.0 mg DMAP (0.16 mmol) sowie 0.67 g DCC (3.26 mmol) zugesetzt. Man läßt 4.5 h bei 0°C unter Argon rühren und filtriert die Mischung über Hyflo-Supercel<sup>®</sup>. Der Filtrerrückstand wird mit ca. 70 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit je 100 ml einer 5%igen NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., einmal mit 100 ml H<sub>2</sub>O und mit 100 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die vereinigten wässrigen Waschlösungen werden mit 25 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinigten organ. Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Der erhaltene Rückstand (farbloser fester Schaum) wird chromatographisch an 130 g Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (9:1) gereinigt.

Ausb.: 1.35g (1.98 mmol, 71% d. Th., Lit.: 91% ); farbloses Öl; R<sub>f</sub> = 0.21 (PE/EE 6:1);  
 $[\alpha]_D^{22} = -1.49$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: -6.0 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

(C<sub>37</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>Si) Ber.: C: 69.02 H: 7.04

(643.84) Gef.: C: 69.18 H: 7.33

FD-MS (m/z) = 644.3[M+H]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ[ppm]:

7.74(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub>=7.35Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.56(d, 2H, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=7.35Hz, H1,H8-Fmoc); 7.37(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub>=7.35Hz, H3,H6-Fmoc); 7.28(t, 2H, J<sub>H2,H1/3</sub>=J<sub>H7,H6/8</sub>=7.35Hz, H2,H7-Fmoc); 6.94-6.91(m, 2H, H<sub>arom.</sub>); 6.78(d, 2H, H<sub>arom.</sub>); 5.96-5.82(m, 1H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17,28Hz, All-H2); 5.33-5.17(m, 3H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17.28Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub>=10.66Hz, All-H3a, All-H3b, NH); 4.69(d, 2H, All-H1a, All-H1b); 4.56(s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-C=O); 4.52(m, α-CH Ile); 4.35(q, 2H, J<sub>Ha,b,CH</sub>=6.99Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.21-4.06(m, J<sub>CH,Ha/b</sub>=6.99Hz, TMSCH-CH<sub>2</sub>, H9-Fmoc); 2.52-2.48(m, 1H, TMS-CH); 1.69-1.63(m, 1H, β-CH-Ile); 0.89-0.65(m, 8H, γ-CH<sub>2</sub>, γ-CH<sub>3</sub>, δ-CH<sub>3</sub> Ile); -0.05(s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

75.3 <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, DEPT), δ[ppm]:

173.35(CO(Ile)); 168.68(CO(All)); 155.97(CO(Urethan)); 155.61(C-(O-Ar<sub>ipso</sub>)); 143.96(C1a-, C8a-Fmoc); 141.28(C4a-, C5a-Fmoc); 133.40133.56(C-(CH-Ar<sub>ipso</sub>)); 131.44(All-C2); 128.35(C<sub>arom.</sub>); 127.66(C3-, C6-Fmoc); 127.01(C2-, C7-Fmoc); 125.07(C1-, C8-Fmoc); 119.93(C4-, C5-Fmoc); 118.98(All-C3); 114.69(C<sub>arom.</sub>); 66.93, 66.27, 65.72, 65.55(All-C1, OC-CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-Fmoc, TMSCH-CH<sub>2</sub>-O); 58.36(α-CH-Ile); 47.18(C9-Fmoc);

37.82(TMSCH); 36.53( $\beta$ -CH-Ile); 24.68( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Ile); 15.22( $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Ile); 11.55( $\delta$ -CH<sub>3</sub>-Ile); -2.72(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

Da Diastereomere vorliegen, kommt es zu Signalverdopplungen.

#### 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-glycyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxy-essigsäure-allylester<sup>107</sup> **96b**

Zu 310 mg (1.0 mmol) Fmoc-Gly-OH in 25 ml absol. Dichlormethan werden 330 mg (1.1 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-[2-Hydroxy-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure-allylester **21** gegeben. Man rührt unter einer Argon-Atmosphäre und kühlt auf 0°C ab. Es werden in rascher Folge 5 mg DMAP (0.04 mmol) sowie 150 mg DIC (1.2 mmol) zugesetzt. Man läßt 70 min bei 0°C unter Argon rühren; nach dieser Zeit ist kein Edukt mehr nachzuweisen. Man filtriert die Mischung über Hiflo-Supercel<sup>®</sup> ab. Der Filtrerrückstand wird mit ca. 70 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird zweimal mit je 80 ml einer 5%igen NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und einmal mit 100 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die vereinigten wässrigen Waschlösungen werden mit 25 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinigten organ. Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt, wobei ein beträchtlicher Teil des entstandenen Harnstoffderivates ausfällt. Der erhaltene Rückstand wird in 10 ml Dichlormethan gelöst und auf Kieselgel aufgezogen. Zur Reinigung wird eine Säulenchromatographie an 50 g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (4:1) durchgeführt..

Ausb.: 401 mg (0.64 mmol, 64% d. Th. Lit.: 90%); farbloses Öl; R<sub>f</sub> = 0.81 (PE/EE 1:1);

$[\alpha]_D^{22} = 0$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: 0 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

(C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>7</sub>Si) Ber.: C: 67.44 H: 2.38

(587.73) Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden.

ESI-MS (m/z) = 610.56 [M+Na]<sup>+</sup>; 626.57 [M+K]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ [ppm]:

7.74(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub>=7.35Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.57(d, 2H, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=7.35Hz, H1,H8-Fmoc); 7.38(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub>=6.99.Hz, H3,H6-Fmoc); 7.28(t, 2H, J<sub>H2,H1/3</sub>=J<sub>H7,H6/8</sub>=6.99Hz, H2-, H7-Fmoc); 6.94-6.91(m, 2H, H<sub>arom.</sub>); 6.78(d, 2H, H<sub>arom.</sub>); 5.96-5.82(m, 1H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17.28Hz, All-H2); 5.33-5.17(m, 3H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17.28Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub>=10.66Hz, All-H3a, All-H3b, NH); 4.67(d, 2H, All-H1a, All-H1b); 4.64-4.48(m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CO, TMSCH-CH<sub>2</sub>); 4.35(d, 2H, J<sub>Ha,b,CH</sub>=6.99Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.19(t, 1H, J<sub>CH,Ha/b</sub>=7.35Hz, H9-Fmoc); 3.83(t, 2H, CH<sub>2</sub> Gly); 2.47(dd, 1H, J<sub>1</sub>=11.40Hz, J<sub>2</sub>=4.41Hz, TMSCH); -0.12(s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

150.9 MHz-  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , BB, DEPT),  $\delta$ [ppm]:

170.23(CO Gly); 168.74(CO All); 156.13 (CO Urethan); 155.62(C-(O-Ar<sub>ipso</sub>)); 143.81(C1a-, C8a-Fmoc); 141.26 (C4a-, C5a-Fmoc); 133.35(C-(CH-Ar<sub>ipso</sub>)); 131.42(All-C2); 128.35, 128.31(C<sub>arom.</sub>); 127.68(C3-,C6-Fmoc); 127.03(C2-,C7-Fmoc); 125.07(C1-, C8-Fmoc); 119.95(C4-, C5-Fmoc); 118.96(All-C3); 114.69(C<sub>arom.</sub>); 67.14, 66.71, 65.73, 65.48(All-C1, O=C-CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-Fmoc, TMS-CH-CH<sub>2</sub>-O); 47.07(C9-Fmoc); 42.71(CH<sub>2</sub>Gly); 37.82(TMSCH); -2.64(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

**4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure<sup>107</sup> 97a**

Es werden 1.31 g (2 mmol) 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure-allylester **96a** in 20 ml THF (p.a.) gelöst und 20 min bei Raumtemp. gerührt. Unter Argon werden zuerst 118 mg (0.1 mmol, 5 mol%) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> und anschließend 465 mg (2.6 ml, 1.3 Äquiv.) *p*-Toluolsulfinsäure-Natriumsalz als Monohydrat, gelöst in 10 ml Methanol (p.a.), zugegeben. Die Lösung verfärbt sich zuerst orange, im Laufe der Reaktion gelblich klar. Nach 90 min ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle) und die Lösemittel werden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird an 200 g Flash-Kieselgel chromatographisch mit Dichlormethan/Methanol/Essigsäure (40:1:0.5) gereinigt.

Ausb.: 1.24 g (quant.); gelblicher, amorpher Feststoff;  $R_f = 0.41$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  15:1 + 0.5% AcOH);  $[\alpha]_D^{22} = -4.88$  (c=1.0,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit.: -6.09 (c = 0.5,  $\text{CHCl}_3$ );

(C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>7</sub>Si) Ber.: C: 67.63 H: 6.84 N: 2.32

(603.78) Es konnte keine korrekte Elementaranalyse erhalten werden.

ESI-MS (m/z) = 602.21 [M]<sup>-</sup>

300 MHz-  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ [ppm]:

9.22(bs, 1H, CO<sub>2</sub>H); 7.74(d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.35\text{Hz}$ , H4-, H5-Fmoc); 7.56(d, 2H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.36\text{Hz}$ , H1-,H8-Fmoc); 7.37(t, 2H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/7} = 7.72\text{Hz}$ , H3-,H6-Fmoc); 7.28(t, 2H,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_1/3} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6/8} = 7.72\text{Hz}$ , H2-,H7-Fmoc); 6.95-6.92(m, 2H, H<sub>arom.</sub>); 6.78(d, 2H, H<sub>arom.</sub>); 5.27(q, 1H, NH); 4.56(s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-C=O); 4.54-4.50(m, 1H,  $\alpha$ -CH Ile); 4.36-4.32(m, 2H,  $J_{\text{H}_a,\text{b},\text{CH}} = 6.99\text{Hz}$ , Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.21-4.176(m, 3H,  $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} = 7.72\text{Hz}$ , TMSCH-CH<sub>2</sub>, H9-Fmoc); 2.52-2.48(m, 1H,  $J_{\text{CH},\text{CH}_2} = 7.72\text{Hz}$ , TMSCH); 1.69-1.60(m, 1H,  $\beta$ -CH-Ile); 0.99-0.65(m, 8H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Ile,  $\delta$ -CH<sub>3</sub>-Ile); -0.02(s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

150.9 MHz-  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , BB, DEPT),  $\delta$ [ppm]:

172.65,173.35(COOH, CO(Ester)); 156.07(CO(Urethan)); 155.22(C-(O-Ar<sub>ipso</sub>)); 143.93, 143.73(C1a-,C8a-Fmoc); 141.28(C4a-,C5a-Fmoc); 133.68(C-(CH-Ar<sub>ipso</sub>)); 128.46, 128.20(C<sub>arom.</sub>); 127.68(C3-, C6-Fmoc); 127.03(C2-, C7-Fmoc); 125.07(C1-, C8-Fmoc); 119.95(C4-, C5-Fmoc); 114.68(C<sub>arom.</sub>); 66.98, 66.29, 65.07(OC-CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-Fmoc, TMS-CH-CH<sub>2</sub>-O); 58.30(α-CH-Ile); 47.16(C9-Fmoc); 37.79(TMSCH); 36.59(β-CH-Ile); 24.61(γ-CH<sub>2</sub>-Ile); 15.22(γ-CH<sub>3</sub>-Ile); 11.50(δ-CH<sub>3</sub> Ile); -2.75(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

Da Diastereomere vorliegen, kommt es zu Signalverdopplungen.

#### 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-glycyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure<sup>107</sup> **97b**

Es werden 530 mg (0.9 mmol) 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-*L*-glycyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure-allylester **96b** in 10 ml THF (p.a.) gelöst und 20 min bei Raumtemp. gerührt. Unter Argon werden zuerst eine Spatelspitze Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> und anschließend 160 mg (1.3 Äquiv.) *p*-Toluolsulfinsäure-Natriumsalz als Monohydrat, gelöst in 10 ml Methanol (p.a.), zugegeben. Die Lösung verfärbt sich zuerst orange, im Laufe der Reaktion gelblich klar. Nach 90 min ist die Reaktion beendet (DC-Kontrolle) und die Lösemittel werden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird an 200 g Flash-Kieselgel chromatographisch mit Dichlormethan/Methanol/Essigsäure (40:1:0.5) gereinigt. Der gelbliche Feststoff wird zweimal mit je 25 ml Toluol codestilliert.

Ausb.: 466 mg (0.85 mmol, 94% d. Th.); gelblicher, amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.17 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15:1 + 0.5% AcOH);  $[\alpha]_D^{22} = 0$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: 0 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>);

(C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>7</sub>Si) Ber.: C: 65.79 H: 6.07 N: 2.56

(547.67) Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden.

FD-MS (m/z) = 547.9 [M+H]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ[ppm]:

7.72(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub>=7.35Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.55(d, 2H, J<sub>H1,H2</sub>=J<sub>H8,H7</sub>=7.35Hz, H1-,H8-Fmoc); 7.37(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub>=7.35Hz, H3-,H6-Fmoc); 7.28(t, 2H, J<sub>H2,H1/3</sub>=J<sub>H7,H6/8</sub>=7.35Hz, H2-,H7-Fmoc); 6.95-6.92(m, 2H, J=8.10Hz, H<sub>arom.</sub>); 6.78(d, 2H, J=8.10Hz, H<sub>arom.</sub>); 5.38(t, 1H, NH); 4.62-4.44(m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-C=O, TMSCH-CH<sub>2</sub>); 4.31(d, 2H, J<sub>Ha,b,CH</sub>=6.98Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.16(t, 1H, J<sub>CH,Ha/b</sub>=7.35Hz, H9-Fmoc); 3.83-3.74(m, 2H, α-CH<sub>2</sub> Gly); -2.45(dd, 1H, J<sub>1</sub>=11.04Hz, J<sub>2</sub>=4.42Hz, TMSCH); -0.04(s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

150.9 MHz- <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, DEPT), δ[ppm]:

172.65, 173.35(COOH, CO(Ester)); 156.07 (CO(Urethan)); 155.22(C-(O-Ar<sub>ipso</sub>)); 143.93, 143.73(C1a-, C8a-Fmoc); 141.28(C4a-, C5a-Fmoc); 133.68(C-(CH-Ar<sub>ipso</sub>)); 128.46, 128.20(C<sub>arom.</sub>); 127.68(C3-, C6-Fmoc); 127.03(C2-, C7-Fmoc); 125.07(C1-, C8-Fmoc); 119.95(C4-, C5-Fmoc); 114.68(C<sub>arom.</sub>); 66.98, 66.29, 65.07(OC-CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-Fmoc, TMS-CH-CH<sub>2</sub>-O); 58.30( $\alpha$ -CH-Ile); 47.16(C9-Fmoc); 37.79(TMSCH); 36.59( $\beta$ -CH-Ile); 24.61( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Ile); 15.22( $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Ile); 11.50( $\delta$ -CH<sub>3</sub>-Ile); -2.75(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

### **Beladung von Nova Syn TG Amino Resin HL mit 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-*isoleucyloxy*)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure 20a**

2.7 g Nova Syn Tentagel HL<sup>®</sup> Resin<sup>147</sup> werden in einem Festphasenreaktor in 20 ml absol. Dichlormethan vorgelegt und 1 h gequollen. Anschließend werden 561 mg (0.93 mmol) 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-*isoleucyloxy*)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure **97a** in 40 ml absol. Dichlormethan und 5 ml DMF gelöst und 127 mg HOAT, 297 mg TBTU sowie 0.21 ml *N*-Methylmorpholin zugegeben. Nach 20 min wird diese Lsg. zum vorgequollenen Tentagelharz über eine Kanüle zugespritzt und 14 h im Festphasenreaktor geschüttelt. Die überstehende Lsg. wird nach dieser Zeit abfiltriert und das Polymer je fünfmal mit 10ml DMF und 10ml absol. Dichlormethan gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Ausbeute : 3.07g

Die photometrische Bestimmung<sup>138</sup> der Beladungsdichte ergibt  $c = 0.3$  mmol/g (das entspricht einer Kupplungsausbeute von 87%).

### **Beladung von Nova Syn TG amino resin HL mit 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-glycyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure 20b**

2.55 g NovaSyn Tentagel HL<sup>®</sup> Harz<sup>147</sup> werden in einem Festphasenreaktor (250 ml Kolben mit Fritte und Schliffhahn am Boden) in 20 ml absol. Dichlormethan vorgelegt und 30 min gequollen. 460 mg (0.84 mmol, 1.35 Äquiv.) 4-[2-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-glycyloxy)-1-(trimethylsilyl)-ethyl]-phenoxyessigsäure **97b** werden in einer Mischung aus 40 ml absol. Dichlormethan und 5 ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung werden nacheinander 130 mg (0.85 mmol) HOBt, 272 mg (0.85 mmol) TBTU sowie 0.2 ml *N*-Methylmorpholin gegeben. Nach 20 min wird diese Lsg. über eine Edelstahlkanüle zum vorgequollenen

<sup>147</sup> Novabiochem; Beladung: 0.44 mmol/g

Tentagelharz zugespritzt und 14 h im Festphasenreaktor geschüttelt. Die überstehende Lsg. wird nach dieser Zeit abfiltriert und das Polymer je fünfmal mit 10ml DMF und 10ml absol. Dichlormethan gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Ausbeute: 2.82g

Die photometrische Bestimmung<sup>138</sup> der Beladungsdichte ergibt  $c = 0.27$  mmol/g (das entspricht einer Kupplungsausbeute von 90%).

### N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucin 101

(Fmoc-Ile-OH)

0.103 g des mit Fmoc-Isoleucin beladenen Polymers **20a** wird in einem Festphasenreaktor dreimal mit 15 ml Dichlormethan gewaschen und anschließend in 10 ml Dichlormethan suspendiert. Es werden 20 mg (2 Äquiv.) TBAF\*3H<sub>2</sub>O zugegeben und 25 min geschüttelt. Man filtriert und wäscht das Harz dreimal mit je 20 ml Dichlormethan nach. Die gesamte Prozedur wird mit 7 mg (0.7 Äquiv.) TBAF\*3H<sub>2</sub>O wiederholt. Die gesammelten organischen Filtrate werden zweimal mit 35 ml Wasser gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt.

Ausb.: 9 mg (0.025 mmol, 85% d. Th.); farbl. Öl;  $R_f = 0.31$  (PE/EE 1:2)  $R_t = 12.4$  min (LUNAC18, Gradient D);  $[\alpha]_D^{22} = -2.76$  ( $c = 0.9$ , DMSO), Lit.<sup>148</sup> :  $-2.99$  ( $c = 1.0$ , DMSO)

C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>

(353.16)

ESI-MS (m/z) = 353.19 [M+H]<sup>+</sup>

300-MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ [ppm]:

7.72(d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.35$ Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.60(d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.35$ Hz, H1-, H8-Fmoc); 7.36(t, 2H,  $J_{H3,H2/4} = J_{H6,H5/7} = 7.35$ Hz, H3-, H6-Fmoc); 7.28(t, 2H,  $J_{H2,H1} = J_{H7,H6} = 7.35$ Hz, H2-, H7-Fmoc); 5.85(d, 1H,  $J_{NH,\alpha CH} = 8.82$ Hz, NH); 4.39-4.17(m, 4H,  $\alpha$ -CH-Ile, Fmoc-CH<sub>2</sub>, H9-Fmoc); 1.65-1.57(m, 1H,  $\beta$ -CH-Ile); 0.99-0.65(m, 8H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>,  $\delta$ -CH<sub>3</sub> Ile);

<sup>148</sup> Fmoc-Ile-OH (Novabiochem)

**N-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>ω</sup>-(2-acetamido-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-4-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-*O*-benzyl-(2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginyll-L-leucyl-(3-*O*-benzyl)-L-threonyl-(5-*O*-benzyl)-L-glutamyl-L-leucyl-(5-*O*-benzyl)-L-glutamyl-(3-*O*-benzyl)-L-seryl-(5-*O*-benzyl)-L-glutamyl-(4-*O*-benzyl)-L-asparaginyll-L-isoleucin 103**

(Fmoc-Asn(Ara-Le<sup>a</sup>)-Leu-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Leu-Glu(OBn)-Ser(OBn)-Glu(OBn)-Asp(OBn)-Ile-OH)

Das Glycopeptid wurde in einem Peptidsynthesizer (Applied Biosystems, ABI 433A) synthetisiert. Dafür wird ein mit Fmoc-Ile-PTMSEL vorbeladenes Tentagelharz **20a** (Beladung ~0.3 mmol/g) verwendet. Die Fmoc-Abspaltungen werden in vier bis fünf 4-Minuten Zyklen mit einer 30%igen Lösung von Piperidin in NMP durchgeführt. Die anschließenden sequentiellen Kupplungen der Fmoc-Aminosäurebausteine erfolgen unter starkem Schütteln (Vortex) mit einer Lösung von je 10 Äquiv. Fmoc-Aminosäurebaustein, HBTU, HOBt und 20 Äquiv. DIPEA in 4 ml DMF / NMP (1:1). Die Kupplungszeit pro Aminosäure beträgt 20 min. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung evtl. verbliebener Aminogruppen mit 0.5 M Ac<sub>2</sub>O, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP behandelt. Anschließend wird die Fmoc-Gruppe abgespalten. Es folgt die Kupplung des nächsten Aminosäurebausteins. Im Anschluß an jeden Reaktionsschritt wird die Reaktionslösung durch Filtration entfernt, das Harz gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Zur Abspaltung des geschützten Glycoundecapeptids vom polymeren Träger wird das Harz in einen Festphasenreaktor nach Merrifield (100 ml-Kolben mit Fritte und Schliffhahn am Boden) überführt und i. Hochvak. getrocknet. Man wäscht das Polymer mit Dichlormethan, versetzt es anschließend mit einer Lösung aus 38 mg (0.12 mmol, 2.4 Äquiv.) TBAF·3H<sub>2</sub>O in 20 ml Dichlormethan und schüttelt 25 min bei Raumtemp. Die Lösung wird abgesaugt und das Harz dreimal mit 10 ml Dichlormethan nachgewaschen. Dieser Abspaltvorgang wird noch einmal mit einer Lösung aus ca. 0.9 Äquiv. TBAF·3H<sub>2</sub>O in 10 ml Dichlormethan wiederholt. Um Ammoniumsalze und evtl. vorhandenes Fluorid zu beseitigen, wird zweimal mit je 10 ml Wasser gewaschen, die organ. Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Die Reinigung erfolgt durch präparative Dünnschichtchromatographie mit einem Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol (15:1). Ausb.: 37 mg (0.013 mmol, 43% d. Th); farbl. amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.43 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 15:1);  $[\alpha]_D^{22} = -74.89$  (c=1.0, DMSO)

C<sub>154</sub>H<sub>186</sub>N<sub>12</sub>O<sub>38</sub>

(2871.29) MALDI-TOF (m/z) = 2895.30 [M+Na]<sup>+</sup>

400-MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC, COSY)

8.37-8.25(m, 2H, NH-Urethan, <sup>o</sup>NH); 8.13-7.95(m, H, NH(AS)); 7.86(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub>=7.36Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.68(m, 2H, H1, H8-Fmoc); 7.40-7.15(m, 59H, Harom., H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc); 5.03-5.00(m, 2H, H-1'', H-1); 4.71-4.66(m, 3H, CH<sub>2</sub>(OBn), α-CH-Asn, H-5''e); 4.65-4.25(m, 16H, CH<sub>2</sub>(OBn), CH<sub>2</sub>-Fmoc, α-CH-(Glu, Ser, Thr, Asn, Leu)); 4.20-4.12(m, 3H, H9-Fmoc, α-CH-Ile, CH<sub>2</sub>-Fmoc); 4.09-3.73(m, 7H, H-3'', H-4'', H-6'a, H-3, β-CH-Thr, H-2'', H-2); 3.61-3.39(m, 9H, H-4, H-5', H-4', H6a/b, H-6'b, H-5''a, β-CH<sub>2</sub>-Ser); 2.81-2.75(m, 1H, β-CH<sub>2</sub>-Asn); 2.59-2.52 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>-Asn); 2.39-2.31(m, 8H, γ-CH<sub>2</sub>-Glu, β-CH<sub>2</sub>-Asp); 1.96-1.74(m, 10H, β-CH<sub>2</sub>-Glu, β-CH-Ile, CH<sub>3</sub>(NHAc)); 1.01-0.71(m, 27H, γ-CH<sub>3</sub>-Thr, δ-CH<sub>3</sub>-Leu, γ-CH<sub>3</sub>-Ile, δ-CH<sub>3</sub>-Ile);

100.6-MHz<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, HMQC)

173.08 (CO Säure), 172.19(bs, CO Amide); 170.70, 169.97, 169.78, 169.12; 156.36 (CO Urethan); 143.75(C1a-, C8a-Fmoc); 140.64(C4a-, C5a-Fmoc); 138.99, 138.87, 138.61, 138.46, 138.09, 137.99(C<sub>ipso</sub>-Aryl); 128.34, 128.10, 128.01, 127.87, 127.83, 127.60, 127.52, 127.46, 127.40, 127.30, 127.21, 127.13, 127.06, 126.98(C3-, C6-, C2-, C7-Fmoc, C<sub>arom.</sub>); 125.10(C1-, C8-Fmoc); 120.06(C4-, C5-Fmoc); 101.84(C-1'); 97.33(C-1''); 79.01 (C-1); 73.29(C-3''); 76.47(C-3, C-5); 75.82(C-2''); 74.85(β-CH<sub>2</sub>-Thr); 74.61(C-4''); 73.32(C-3'); 73.32, 72.13, 70.44, 70.73(CH<sub>2</sub>(OBn)); 72.84(C-5''); 72.35(C-4); 70.50(C-2'); 68.80(C-6); 68.08(C-4'); 67.59(C-6'); 67.82(CH<sub>2</sub>-Fmoc), 60.57(C-5''); 57.82(β-CH<sub>2</sub>-Ser); 56.28(α-CH-Ile); 54.60(C-2); 52.87(α-CH-Glu); 51.66(α-CH-Asn) 51.22(α-CH-Thr); 50.94(α-CH-Leu); 49.23(α-CH-Asp); 46.59(C9-Fmoc); 40.63(β-CH<sub>2</sub>-Leu); 37.99(β-CH<sub>2</sub>-Asp); 36.20(β-CH-Ile); 35.25(β-CH<sub>2</sub>-Asn); 30.12(δ-CH<sub>2</sub>-Glu); 27.78(β-CH<sub>2</sub>-Glu); 24.81(γ-CH<sub>2</sub>-Ile); 23.04(γ-CH-Leu); 23.01, 21.35(δ-CH<sub>3</sub>-Leu); 16.33(γ-CH<sub>3</sub>-Thr); 15.92(γ-CH<sub>3</sub>-Ile); 11.11(δ-CH<sub>3</sub>-Ile);

### **N<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucin- L-valin-α-allylester 108**

(Fmoc-Val-Ile-OAll)

Man löst 1.11 g (3.15 mmol) Fmoc-Ile-OH und 0.62 g (4.1 mmol, 1.3 Äquiv.) HOBt in 10 ml trockenem und aminfreiem DMF und fügt in rascher Folge 1.1 ml (6.3 mmol, 2.6 Äquiv.) Hünigs-Base sowie 1.55 g (4.1 mmol, 1.3 Äquiv.) HBTU hinzu. Man lässt diese Mischung 15 min reagieren und tropft unter Argon eine Lösung von 1.03 g (3.15 mmol) L-Valin-α-O-allylester-hydro-*p*-toluolsulfonat in 8 ml trockenem und aminfreiem DMF hinzu. Die Lösung wird 4 h bei Raumtemp. gerührt. Nachdem kein weiterer Umsatz festgestellt werden kann (DC-Kontrolle), wird das Lösemittel i. Hochvak. entfernt, der Rückstand in 100 ml

Dichlormethan aufgenommen und mit je 100ml ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und Wasser gewaschen. Die organ. Phase wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, i. Vak. auf 50 ml eingengt und mit 10 ml absol. MeOH sowie 2 g Kieselgel z. A. versetzt. Das verbleibende Lösemittel wird i. Vak. entfernt, der Feststoff i. Hochvak. getrocknet und anschließend durch Flash-Chromatographie an 200 g Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch Petrolether/Ethylacetat (3:1) gereinigt.

Ausb.: 1.24 g (2.52 mmol, 80% d. Th.); farbloser, amorpher Feststoff; R<sub>f</sub> = 0.50 (PE/EE 3:1);

$$[\alpha]_D^{22} = -13.45 \text{ (c=1, CHCl}_3\text{)}$$

C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Ber.: C 70.71 H 7.73 N 5.69

(492.60) Gef.: C 70.40 H 7.41 N 5.72

FD-MS (m/z): 493.2 [M+H]<sup>+</sup>

400 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, COSY), δ[ppm]:

7.72(d, 2H, J<sub>H4,H3</sub>=J<sub>H5,H6</sub>=7.71Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.56(t, 2H, J=7.72 Hz, H1,H8-Fmoc); 7.35(t, 2H, J<sub>H3,H2/4</sub>=J<sub>H6,H5/7</sub> = 7.35Hz, H3, H6-Fmoc); 7.25(t, 2H, J<sub>H2,H1/3</sub>=J<sub>H7,H6/8</sub>=7.35Hz, H2,H7-Fmoc); 6.83(d, 1H, J=8.82Hz, NH); 5.89-5.78(m, 1H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17,28Hz Allyl-H2); 5.74(d, 1H, J=9.18Hz, NH); 5.24(dd 2H, <sup>3</sup>J<sub>trans</sub>=17.28Hz, <sup>3</sup>J<sub>cis</sub>=10.29Hz, All-H3a/b); 4.63-4.50(m, 3H, All-H1a, All-H1b, α-CH-Val); 4.44-4.27(2m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.22-4.15(m, 2H, H9-Fmoc, α-CH-Ile); 2.15(s, 1H, β-CH-Val); 1.83(m, 1H, β-CH-Ile); 1.55(m, 1H, γ-CH<sub>2</sub>-Ile); 1.16(m, 1H, γ-CH<sub>2</sub>-Ile); 0.90, 0.88, 0.86, 0.84(4s, 12H, γ-CH<sub>3</sub>-Val, γ-CH<sub>3</sub>-Ile, δ-CH<sub>3</sub> Ile);

150.9 MHz- <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, HMQCBB, DEPT), δ[ppm]:

171.66(CO-All), 171.27(CO-Ile, CO-Val); 156.36 (CO-Urethan); 143.87(C1a-, C8a-Fmoc); 141.25 (C4a-, C5a-Fmoc); 131.56(All-C2); 127.65(C3-, C6-Fmoc); 127.03(C2-, C7-Fmoc); 125.10(C1-, C8-Fmoc); 119.90(C4-, C5-Fmoc); 118.92(All-C3); 67.08(CH<sub>2</sub>-Fmoc), 65.75(All-C1); 59.55(α-CH-Ile); 57.18(α-CH-Val); 47.12(C9-Fmoc); 37.59(β-CH-Ile); 31.09(β-CH-Val); 24.68(γ-CH<sub>2</sub>-Ile); 18.96, 17.79(γ-CH<sub>3</sub>-Ile); 15.35(γ-CH<sub>3</sub> Ile); 11.34(δ-CH<sub>3</sub>-Ile);

### N<sup>α</sup>-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-isoleucin- L-valin 109

(Fmoc-Val-Ile-OH)

Es werden 1.05 g (2.12 mmol) Fmoc-Val-Ile-OAll **108** in 40 ml absol. THF gelöst und zu dieser Lösung 0.57 g (1.5 Äquiv.) *p*-Toluolsulfinsäure-Natriumsalz als Monohydrat, gelöst in 10 ml MeOH (p.a.), zugetropft. Unter Argon-Gegenstrom wird eine Spatelspitze Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> (50 mg) zu der Mischung gegeben und unter Lichtausschluss 3 d bei Raumtemp. gerührt. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in einer Mischung aus 30 ml

Dichlormethan und 10 ml Methanol aufgenommen und mit 1 g Kieselgel z. A. versetzt. Man entfernt das Dichlormethan/Methanol-Gemisch und trocknet das beladene Kieselgel i. Hochvak. Durch eine zweifache chromatographische Reinigung an 300 g Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Essigsäure (15:1:0.1) sowie Cyclohexan/Ethylacetat/Essigsäure (2:1:0.1) kann das Produkt als farbloser Feststoff erhalten werden.

Ausb.: 790 mg (1.8 mmol, 82% d. Th.); farbloser, amorpher Feststoff;  $R_t = 11.2$  min (*LunaC18* GradientC);  $R_f = 0.57$  (EE + 0.1% AcOH);  $[\alpha]_D^{22} = -11.43$  (c=1.0, CHCl<sub>3</sub>);

C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ber.:	C 69.01	H 7.13	N 5.69
(452.54)	Gef.:	C 68.91	H 6.92	N 6.06

FD-MS (m/z): 453.1 [M+H]<sup>+</sup>

300 MHz- <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ [ppm]:

7.66(d, 2H,  $J_{H4,H3}=J_{H5,H6}=7.71$ Hz, H4-, H5-Fmoc); 7.52(d, 2H,  $J=7.48$ Hz, H1-, H8-Fmoc); 7.30(t, 2H,  $J_{H3,H2/4}=J_{H6,H5/7} = 7.35$ Hz, H3-, H6-Fmoc); 7.21(t, 2H,  $J_{H2,H1/3}=J_{H7,H6/8}=7.35$ Hz, H2-, H7-Fmoc); 6.63(d, 1H,  $J=8.45$ Hz, NH); 5.80(d, 1H,  $J=8.45$ Hz, NH); 4.42(q, 1H,  $J=8.46$ Hz,  $\alpha$ -CH-Val); 4.28(m, 2H, , H9-Fmoc,  $\alpha$ -CH-Ile); 4.14, 4.03(2m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 2.26-2.10(m, 1H,  $\beta$ -CH-Val); 1.78(m, 1H,  $\beta$ -CH-Ile); 1.45(m, 1H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Ile); 1.11-1.04(m, 1H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Ile); 0.87, 0.85, 0.83, 0.82(4s, 12H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Val,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Ile,  $\delta$ -CH<sub>3</sub> Ile);

150.9 MHz- <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, DEPT),  $\delta$ [ppm]:

173.33(CO-Säure), 171.35(CO-Amid); 156.24 (CO-Urethan); 143.93, 143.76(C1a-, C8a-Fmoc); 141.17 (C4a-, C5a-Fmoc); 127.62(C3-, C6-Fmoc); 127.02(C2-, C7-Fmoc); 125.22, 125.12(C1-, C8-Fmoc); 119.84(C4-, C5-Fmoc); 66.848(CH<sub>2</sub>-Fmoc), 59.74( $\alpha$ -CH-Ile); 57.08( $\alpha$ -CH-Val); 47.12(C9-Fmoc); 37.43( $\beta$ -CH-Ile); 31.00( $\beta$ -CH-Val); 24.70( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Ile); 18.96, 17.69( $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Ile); 15.43( $\gamma$ -CH<sub>3</sub> Ile); 11.26( $\delta$ -CH<sub>3</sub>-Ile);

**<sup>α</sup>N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valinyl-(5-O-benzyl)-L-glutamyl-(S-acetamidomethyl)-L-cysteinyl-(N',N''-di-benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-(4-O-benzyl)-L-asparaginyl-L-isoleucinyl-L-valinyl-glycin 112**

Während der Festphasensynthese werden vor den Kupplungen jeweils die terminalen Fmoc-Aminoschutzgruppen vom polymergebundenem Peptid abgespalten.

Fmoc – Abspaltung: Die Abspaltung der N<sup>α</sup>-Fmoc-Gruppe geschieht durch mehrstündiges Schütteln in 50 ml eines Morpholin-DMF-Gemisches (1:1). Das Polymer wird zur Trockene abgesaugt und dreimal mit je 10 ml DMF nachgewaschen. Anschließend wäscht man das

Harz dreimal abwechselnd mit je 15 ml Methanol und Dichlormethan. In einem letzten Schritt wird das Harz dreimal mit 15 ml Ether gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Capping: Man schüttelt das Polymer 45 min in einer Mischung aus Pyridin/Acetanhydrid (3:1) (12 ml), saugt zur Trockene ab und wäscht anschließend dreimal mit je 10 ml DMF nach.

In der Synthese werden 1.04 g Tentagel-S-PHB-Gly-Fmoc<sup>149</sup> eingesetzt. Das entspricht einem 0.3 mM Ansatz.

Syntheseprotokoll:

Kupplung mit Fmoc-Ile-Val-OH:

Das in den Festphasenreaktor eingewogene Harz **112** wird in 10 ml absol. Dichlormethan vorgequollen. Es werden 571 mg (1.26 mmol, 4.2 Äquiv.) Fmoc-Ile-Val-OH **111**, 192 mg (1.26 mmol, 4.2 Äquiv.) HOBt, 0.43 ml (2.52 mmol, 8.4 Äquiv.) DIPEA und 477 mg (1.26 mmol, 4.2 Äquiv.) HBTU in 15 ml absol. und aminfreiem DMF zum Polymer gegeben und 14 h im Kreisschüttler geschüttelt. Es wird zur Trockene abgesaugt und dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen. Um eine hohe Beladungsdichte zu erreichen, wird dieser Kupplungsschritt mit 2 Äquiv. Fmoc-Ile-Val-OH und dem reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU / HOAt wiederholt. Nach der Kupplung wird dreimal mit 10 ml DMF und anschließend dreimal mit 10 ml Dichlormethan und Methanol gewaschen. Danach wäscht man das Harz dreimal mit 10 ml Ether und trocknet es i. Hochvak.

Capping: wie oben beschrieben.

Fmoc-Abspaltung: wie oben beschrieben.

Kupplung mit Fmoc-Asp(OBn)-OH: Das polymergebundene Peptid wird in 10 ml absol. Dichlormethan vorgequollen. Es werden 670 mg (1.51 mmol, 5 Äquiv.) Fmoc-Asp(Obn)-OH, 230 mg (1.51 mmol, 5 Äquiv.) HOBt, 0.25 ml (1.51 mmol, 5 Äquiv.) DIPEA und 495 mg (1.51 mmol, 5 Äquiv.) HBTU in 15 ml absol. und aminfreiem DMF zum Polymer gegeben und 18 h im Kreisschüttler geschüttelt. Es wird zur Trockene abgesaugt und dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen.

Capping: wie oben beschrieben.

Fmoc-Abspaltung: wie oben beschrieben.

Kupplung mit Fmoc-Arg-(di-benzyloxycarbonyl)-OH: Das polymergebundene Peptid wird in 10 ml absol. Dichlormethan vorgequollen. Es werden 800 mg (1.2 mmol, 4 Äquiv.) Fmoc-Arg(di-z)-OH **84**, 184 mg (1.2 mmol, 4 Äquiv.) HOBt, 0.41 ml (2.8 mmol, 8 Äquiv.) DIPEA und 380 mg (1.2 mmol, 4 Äquiv.) HBTU in 15 ml absol. und aminfreiem DMF zum Polymer

---

<sup>149</sup> Rapp-Polymere; Beladung: 0.29 mmol/g; 100-200 mesh

gegeben und 16 h im Kreisschüttler geschüttelt. Es wird zur Trockene abgesaugt und dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen.

Capping: wie oben beschrieben.

Nach dem Capping wurden 150 mg beladenes Harz entnommen und eine Testabspaltung durchgeführt. Das Harz wird in einem Festphasenreaktor nach Merrifield mit 4 ml einer Mischung aus Dichlormethan/TFA (1:1) versetzt und 2 h im Kreisschüttler geschüttelt. Man saugt ab, wäscht mit dreimal 10 ml TFA nach und versetzt die Lösung mit kaltem entionisiertem Wasser. Das Produkt fällt sofort in Form einer Suspension aus und wird durch Zentrifugieren von der überstehenden Lösung abgetrennt.

Ausb.: 29 mg (0.026 mmol, 87% d. Th), farbloser, amorpher Feststoff;

$C_{61}H_{70}N_8O_{14}$

(1138.50)

ESI-MS (m/z): 1139.50 [M+H]<sup>+</sup>

Das

Fmoc-Abspaltung: wie oben beschrieben.

Kupplung mit Fmoc-Cys(Acm)-OH<sup>150,151</sup>: Das polymergebundene Peptid wird in 10 ml absol. Dichlormethan vorgequollen. Es werden 625 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) Fmoc-Cys(Acm)-OH, 230 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) HOBt, 0.5 ml (3 mmol, 10 Äquiv.) DIPEA und 570 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) HBTU in 15 ml absol. und aminfreiem DMF zum Polymer gegeben und 16 h im Kreisschüttler geschüttelt. Es wird zur Trockene abgesaugt und dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen.

Capping: wie oben beschrieben.

Fmoc-Abspaltung: wie oben beschrieben.

Kupplung mit Fmoc-Glu(OBn)-OH: Das polymergebundene Peptid wird in 10 ml absol. Dichlormethan vorgequollen. Es werden 691 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) Fmoc-Glu(OBn)-OH, 230 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) HOBt, 0.5 ml (3 mmol, 10 Äquiv.) DIPEA und 483 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) TBTU in 15 ml absol. und aminfreiem DMF zum Polymer gegeben und 17 h im Kreisschüttler geschüttelt. Es wird zur Trockene abgesaugt und dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen.

Capping: wie oben beschrieben.

Fmoc-Abspaltung: wie oben beschrieben.

---

Eine Übersicht über S-Acetamidomethyl geschützte Aminosäuren und Oxidation zur Disulfidverbindung gibt:

<sup>150</sup> B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, H. Rink, P. Sieber, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta*, **4** (1980), 899-915

<sup>151</sup> D. F. Veber, J. D. Milkowski, R. G. Denkwalter, R. Hirschmann, *Tetrah. Lett.*, **1988**, 3057

Kupplung mit Fmoc-Val-OH: Das polymergebundene Peptid wird in 10 ml absol. Dichlormethan vorgequollen. Es werden 510 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) Fmoc-Val-OH, 230 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) HOBt, 0.5 ml (3 mmol, 10 Äquiv.) DIPEA und 570 mg (1.5 mmol, 5 Äquiv.) HBTU in 15 ml absol. und aminfreiem DMF zum Polymer gegeben und 18 h im Kreisschüttler geschüttelt. Es wird zur Trockene abgesaugt und dreimal mit je 10 ml DMF gewaschen. Anschließend wird das Harz abwechselnd mit je dreimal 10 ml Methanol und Dichlormethan und abschließend mit dreimal 10 ml Ether gewaschen und i. Hochvak. getrocknet.

Capping: wie oben beschrieben

Abspaltung vom Harz: Das Harz wird in einem Festphasenreaktor nach Merrifield mit 10 ml einer Mischung aus Dichlormethan/TFA (1:1) versetzt und 2 h im Kreisschüttler geschüttelt. Man saugt ab, wäscht mit dreimal 10 ml TFA nach und versetzt die Lösung mit kaltem entionisiertem Wasser. Das Produkt fällt instantan in Form einer Suspension aus und wird durch Zentrifugieren von der überstehenden Lösung abgetrennt. Der Niederschlag wird mit kaltem Wasser gewaschen und dieses nach Zentrifugieren abgetrennt. Man wiederholt diese Prozedur bis das Filtrat neutral reagiert und trocknet das Lyophilisat durch Gefriertrocknung.

Ausb.: 200 mg (0.12 mmol, 48% d. Th.); farbloses Lyophilisat;  $R_f = 0.44$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  5:1)

$[\alpha]_D^{22} = -38.74$  (c=0.5, DMSO);

$\text{C}_{84}\text{H}_{102}\text{N}_{12}\text{O}_{20}\text{S}$

Ber.: C 61.83 H 6.30 N 10.30

(1630.71)

Eine korrekte Elementaranalyse konnte nicht erhalten werden.

ESI-MS (m/z): 1631.73  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 1653.71  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

400 MHz- $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , COSY),  $\delta$  [ppm]:

8.58-8.50(m, 3H  $^a\text{NH}$ ,  $^b\text{NH}$ -Arg); 8.43-8.34(m, 1H,  $\alpha\text{NH}$ -Asp); 8.28-8.18(m, 3H,  $\alpha\text{NH}$ -Glu,  $\alpha\text{NH}$ -Gly,  $\alpha\text{NH}$ ); 7.82(d, 2H,  $J=7.44\text{Hz}$ , H4-, H5-Fmoc); 7.81-7.75(m, 2H, NH); 7.71(t, 2H,  $J=7.44\text{Hz}$ , H1-,H8-Fmoc); 7.39-7.28(m, 24H, H3-, H6-, H2-, H7-Fmoc,  $H_{\text{arom}}$ ); 5.18, 5.05, 5.03, 5.01(4s, 8H,  $\text{CH}_2$ -Bzl); 4.67(dd, 1H  $J=6.30\text{Hz}$ ,  $J=7.38\text{Hz}$ ,  $\alpha$ -CH-Asp); 4.50(dd, 1H,  $J=7.39\text{Hz}$ ,  $\alpha$ -CH-Glu); 4.40-4.12(m, 9H, H9-Fmoc, Fmoc- $\text{CH}_2$ ,  $\alpha$ -CH-Arg,  $\alpha$ -CH-Val,  $\alpha$ -CH-Ile,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ -Cys); 3.88(t, 1H,  $J=7.51\text{Hz}$ ,  $\alpha$ -CH-Cys); 3.74(dq, 2H,  $J=5.87\text{Hz}$ ,  $J=17.63\text{Hz}$ ,  $J=12.08\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -Gly); 3.30(bs, 2H,  $\delta$ - $\text{CH}_2$ -Arg); 2.93-2.76, 2.71-2.53(2m, 4H,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -Glu,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -Asp); 2.40(t, 2H,  $J=7.83\text{Hz}$ ,  $J=7.18\text{Hz}$ ,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -Cys); 2.05-1.88(m, 4H,  $\beta$ -CH-Val,  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -Arg); 1.85(s, 3H,  $\text{NHAc}$ (Cys)); 1.74-1.32(m, 6H,  $\beta$ -CH-Ile,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ -Glu,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ -Arg,  $\gamma$ -CH-Ile); 0.98-0.74(m, 19H,  $\delta$ - $\text{CH}_3$ -Ile,  $\gamma$ - $\text{CH}_3$ -Ile,  $\gamma$ - $\text{CH}_3$ -Val,  $\gamma$ - $\text{CH}_2$ -Ile);

100.6 MHz- $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , HMQC, DEPT),  $\delta$  [ppm]:

176.90 (CO-Säure); 171.30, 171.16, 170.33, 170.07 (CO); 143.42(C1a-, C8a-Fmoc); 140.88 (C4a-, C5a-Fmoc); 128.52, 128.33, 128.07, 127.88, 127.73(C<sub>arom.</sub>); 127.61(C3-, C6-Fmoc); 127.04(C2-, C7-Fmoc); 125.31(C1-, C8-Fmoc); 120.07(C4-, C5-Fmoc); 67.76, 66.62, 65.77, 65.96(CH<sub>2</sub>-Bn, Fmoc); 60.37( $\alpha$ -CH-Cys); 57.52( $\alpha$ -CH-Val); 57.33( $\alpha$ -CH-Ile) 52.96( $\alpha$ -CH-Glu); 52.41( $\alpha$ -CH-Arg); 49.37( $\alpha$ -CH-Asp); 46.72(C9-Fmoc); 40.75(CH<sub>2</sub>-Gly); 40.72( $\delta$ -CH<sub>2</sub>-Arg); 39.99( $\delta$ -CH<sub>2</sub>-Cys), 37.09( $\beta$ -CH-Ile); 35.82( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Asp); 32.32( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Glu); 30.24( $\beta$ -CH-Val); 30.14( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Cys); 29.78( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Glu); 27.60( $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Arg); 24.96 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Arg); 23.91( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>-Ile); 22.60(COCH<sub>3</sub>(Cys)); 19.24, 18.25( $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Val); 15.35( $\gamma$ -CH<sub>3</sub>-Ile); 11.13( $\delta$ -CH<sub>3</sub>-Ile);

**Versuche zur Synthese von:**

**<sup>α</sup>N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valinyl-(5-O-benzyl)-L-glutamyl-(S-acetamidomethyl)-L-cysteinyl-(N',N''-di-benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-(4-O-benzyl)-L-asparaginyll-L-isoleucinyl-L-valinyl-l-glycyl-N<sup>ω</sup>-(2-acetamido-3-O-[6-O-benzyl-3-sulfatyl-β-D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-(2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginyll-L-leucyl-(3-O-benzyl)-L-threonyl-(5-O-benzyl)-L-glutamyl-L-leucyl-(5-O-benzyl)-L-glutamyl-(3-O-benzyl)-L-seryl-(5-O-benzyl)-L-glutamyl-(4-O-benzyl)-L-asparaginyll-L-isoleucyl-PTMSEL-TG 115**

(Fmoc-Val-Glu(OBn)-Cys(Acm)-Arg(di-Z)-Asp(OBn)-Ile-Val-Asn(Ara-Le<sup>a</sup>)-Leu-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Leu-Glu(OBn)-Ser(OBn)-Glu(OBn)-Asp(OBn)-Ile-PTMSEL-TG)

*Variante a: Fragmentkondensation*

Es wird versucht das Glycooctadecapeptid **115** durch eine Fragmentkondensation des Octapeptids **112** mit einem in einem Peptidsynthesizer (Applied Biosystems, ABI 433A) synthetisierten Nonapeptid zu kondensieren. Dafür wird ein mit Fmoc-Ile-PTMSEL vorbeladenes Tentagelharz **20a** (Beladung ~0.3 mmol/g) verwendet. Die Fmoc-Abspaltungen werden in vier bis fünf 4-Minuten Zyklen mit einer 30%igen Lösung von Piperidin in NMP durchgeführt. Die anschließenden sequentiellen Kupplungen der Fmoc-Aminosäurebausteine erfolgt unter starkem Schütteln (Vortex) mit einer Lösung von 10 Äquiv. Fmoc-Aminosäurebaustein, HBTU, HOBt und 20 Äquiv. DIPEA in 4 ml DMF / NMP (1:1). Die Kupplungszeit pro Aminosäure beträgt 20 min. Nach jedem Kupplungsschritt wird das Harz zur Acetylierung evtl. verbliebener Aminogruppen mit 0.5 M Ac<sub>2</sub>O, 0.125 M DIPEA und 0.015 M HOBt in NMP behandelt. Anschließend wird die Fmoc-Gruppe abgespalten. Es folgt die Kupplung des nächsten Aminosäurebausteins. Im Anschluß an jeden Reaktionsschritt wird die Reaktionslösung durch Filtration entfernt, das Harz gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen. Ansatzgröße: 0.05 mmol.

Nach Aufbau des Nonapeptids wird die Fmoc-Gruppe im Synthesizer abgespalten und der Zuckerbaustein **80** (122 mg, 0.09mmol) mit 14 mg HOAT und 33 mg HATU in 2 ml NMP gelöst und in die Kartusche gefüllt. Es werden anschließend 0.02 ml NMM zugesetzt und Kupplungszeit auf 3 h ausgedehnt. Nach Fmoc-Abspaltung im Synthesizer werden 120 mg (0.06 mmol) des Octapeptids **112** in zusammen mit 14 mg HOAt und 33 mg HATU in 2 ml NMP gelöst und mit 0.02 ml NMM versetzt.

Zur Abspaltung des vollgeschützten Glycododecapeptids vom polymeren Träger wird das Harz in einen Festphasenreaktor nach Merrifield (100 ml Kolben mit Fritte und Schliffhahn am Boden) überführt. Man wäscht das Polymer mit Dichlormethan, versetzt es anschließend mit einer Lösung aus 30 mg (0.12 mmol, 2.4 Äquiv.) TBAF\*3H<sub>2</sub>O in 20 ml Dichlormethan und schüttelt für 25 min bei Raumtemp. Das Lösemittel wird abgesaugt und das Harz dreimal mit 10 ml Dichlormethan nachgewaschen. Der Abspaltvorgang wird noch einmal mit einer Lösung von ca. 0.9 Äquiv. TBAF\*3H<sub>2</sub>O in 10 ml Dichlormethan wiederholt. Um Ammoniumsalze und evtl. vorhandenes Fluorid zu beseitigen, wird zweimal mit je 10 ml entionisiertem Wasser gewaschen, die organ. Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Die Reinigung erfolgt durch präparative Dünnschichtchromatographie mit einem Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol (15:1).

Durch MALDI-MS kann die Masse des glykosylierten Decapeptids **116** nachgewiesen werden. Eine genaue Analyse durch NMR-Spektroskopie ist nicht möglich, da der Hauptbestandteil der Probe aus quartären Ammoniumsalzen besteht.

Farbloser amorpher Feststoff;  $R_f = 0.54$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 5:1);

C<sub>144</sub>H<sub>176</sub>N<sub>12</sub>O<sub>39</sub>S

(2734.18)

MALDI-MS *negativ* (m/z) = 2734.00 [M-2H+Li]<sup>-</sup>

#### *Variante b: Lineare Synthese*

Nach dem beschriebenen Syntheseprotokoll wird versucht, Verbindung **115** durch eine lineare Synthese der Aminosäuren und Glycosylaminosäure darzustellen. Dazu werden 0.5 g (0.15 mM Ansatz) des funktionalisierten Tentagelharzes **20a** verwendet. Die Aminosäuren werden in einem Überschuß von 10 Äquivalenten in die Reaktion eingebracht, der Glycosylaminosäurebaustein **80** in einem Überschuß von 1.65 Äquivalenten. Zur Kupplung von **80** wird wie unter *Variante a* beschrieben verfahren. Die Aminosäure Fmoc-Arg(di-Z)-OH **84** löst sich nur unzureichend in NMP und kann deshalb nicht vom Synthesizer eingezogen werden. In einem anschließenden Cappingschritt wird das Harz am Aminoterminus verschlossen. Das funktionalisierte Harz wird daraufhin aus dem Kupplungsreaktor in einen Merrifieldschen Festphasenreaktor überführt dreimal mit 20 ml Dichlormethan gewaschen. Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgt mit 40 mg (0.15 mmol, 1 Äquiv.) Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat in 20 ml Dichlormethan. Man schüttelt die Suspension 20 min lang bei Raumtemp, filtriert ab und wäscht zweimal mit 20 ml Dichlormethan nach. Der Abspaltvorgang wird noch einmal mit 20 mg TBAF\*3H<sub>2</sub>O in 20

ml Dichlormethan wiederholt. Die vereinigten org. Phasen werden zweimal mit je 50 ml Wasser gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und die Lösemittel i. Vak entfernt. Man erhält einen farblosen amorphen Feststoff, welcher die Masse des acetylierten Glycotridecapeptids AcNH-Ile-Val-Gly-Asn(Ara-*Sulfo*-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>)-Leu-Thr(OBn)-Glu(OBn)-Leu-Glu(OBn)-Ser(OBn)-Glu(OBn)-Asp(OBn)-Ile-OH aufweist.

Ausb.: 70 mg (0.023 mmol, 15% d. Th.); Analytische HPLC ist aufgrund der Unlöslichkeit des Produkts in Acetonitril/Wasser/Methanol nicht möglich. Für das Produkt kann als Retentionsfaktor nur ein Bereich von 0.2-0.45 ( $CHCl_3/MeOH$  5:1) angegeben werden

$C_{154}H_{201}N_{15}O_{43}S$

(3042.43)

MALDI-MS *negativ* (m/z) = 3099.80 [M-3H+Na+K]<sup>-</sup>

**"N-Acetyl-L-isoleucinyl-L-valinyl-L-glycyl-(2-acetamido-3-O-[3-sulfatyl-β-D-galactopyranosyl]-4-O-[-D-arabinopyranosyl]-[2-desoxy-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginyl-L-leucyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-leucyl-L-glutamyl-L-seryl-L-glutamyl-L-aspariginyl-L-isoleucyl 119**

H-Ile-Val-Asn(Ara-*Sulfo*-Le<sup>a</sup>(OH)<sub>2</sub>)-Leu-Thr-Glu-Leu-Glu-Ser-Glu-Asp-Ile-OH

70 mg (0.023 mmol) des geschützten Glycotridecapeptids **118** werden in 10 ml einer Mischung aus Methanol und Dioxan (1:1) gelöst und mit zwei Spatelspitzen (20 mg) Pd(OH)<sub>2</sub> versetzt. Man leitet bis zum vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle) Wasserstoff durch die gut gerührte Lösung, saugt über Hyflo-Supercel<sup>®</sup> ab und wäscht mit reichlich Methanol und Isopropanol nach, um am Katalysatormaterial anhaftendes Produkt zu eluieren. Nach Entfernung des Lösemittels erhält man einen gelben amorphen Feststoff. Das Rohprodukt lässt sich nicht über analytische HPLC analysieren und wird deshalb durch präparative Dünnschichtchromatographie an einer C18-funktionalisierten Kieselgelplatte mit Acetonitril/Methanol (2:1) gereinigt.

Ausbeute: 48 mg (0.023 mmol, quant.); farbloser amorpher Feststoff;

$C_{82}H_{133}N_{15}O_{43}S$

(2049.85)

MALDI-MS *negativ* (m/z) = 2087.98 [M-2H+K]<sup>-</sup>

Eine genaue Analyse durch NMR-Spektroskopie ist nicht möglich, da der Hauptbestandteil der Probe aus quartären Ammoniumsalzen besteht.

## 6 Spektroskopischer Anhang

Auf den folgenden Seiten werden NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen gezeigt:

2-Acetamido-3-O[2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid **50**

2-Acetamido-3-O[6-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid **15**

2-Acetamido-3-O-(6-O-benzyl-3-O-[methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-2-nonulopyranosylat]- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-4-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl)-6-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid **51**

2-Acetamido-3-O-[6-O-benzyl-3-O-sulfatyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosylazid **60**

*N* <sup>$\alpha$</sup> -Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>0</sup>-(2-acetamido-3-O-[6-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-(2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparagin- $\alpha$ -allylester **77**

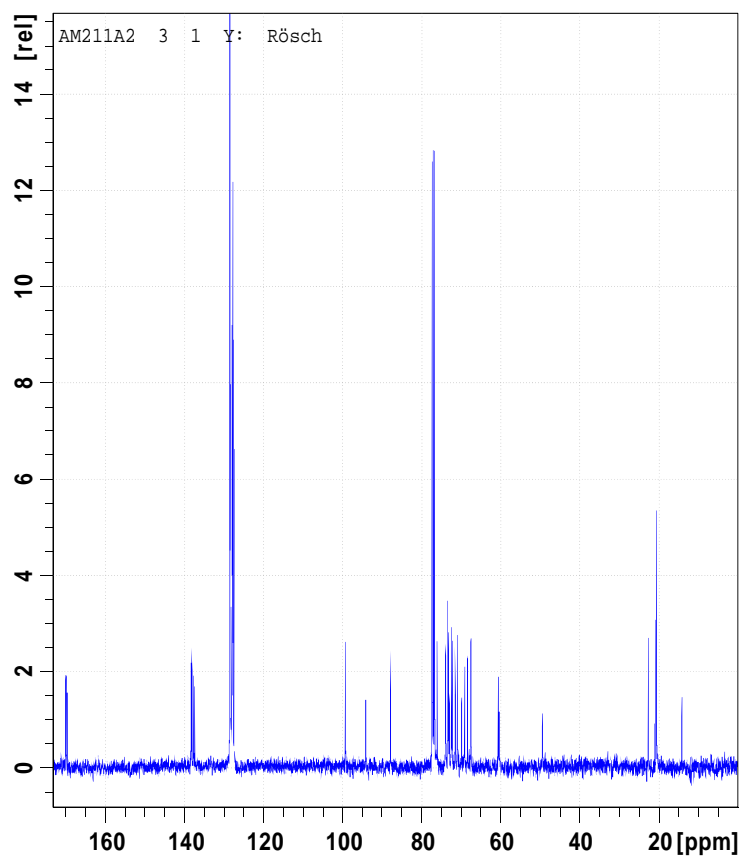
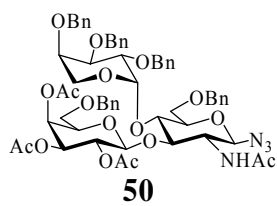
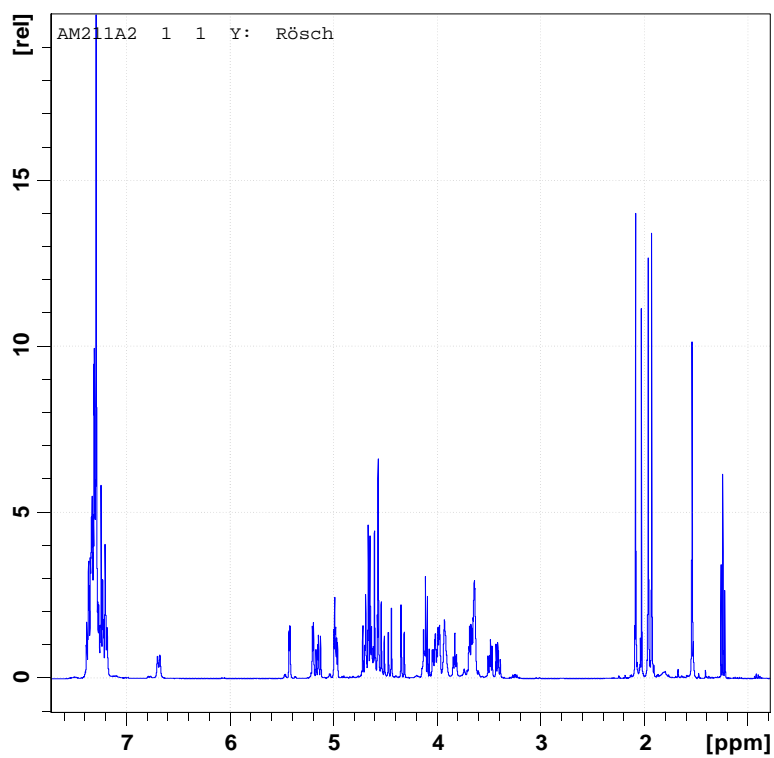
*N* <sup>$\alpha$</sup> -Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>0</sup>-(2-acetamido-3-O-[6-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-(2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure **78**

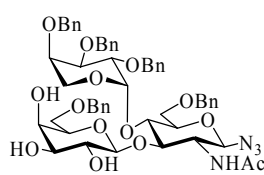
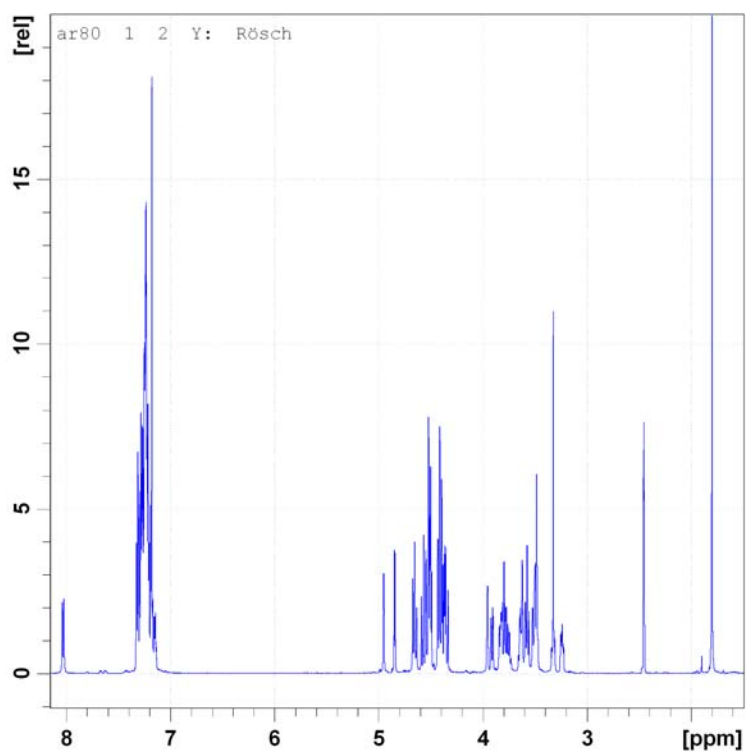
*N* <sup>$\alpha$</sup> -Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>0</sup>-(2-acetamido-3-O-[6-O-benzyl-3-O-sulfatyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-(2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparagin- $\alpha$ -allylester **79**

*N* <sup>$\alpha$</sup> -Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>0</sup>-(2-acetamido-3-O-[6-O-benzyl-3-O-sulfatyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl]-4-O-[2,3,4-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-arabinopyranosyl]-6-O-benzyl-(2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure **80**

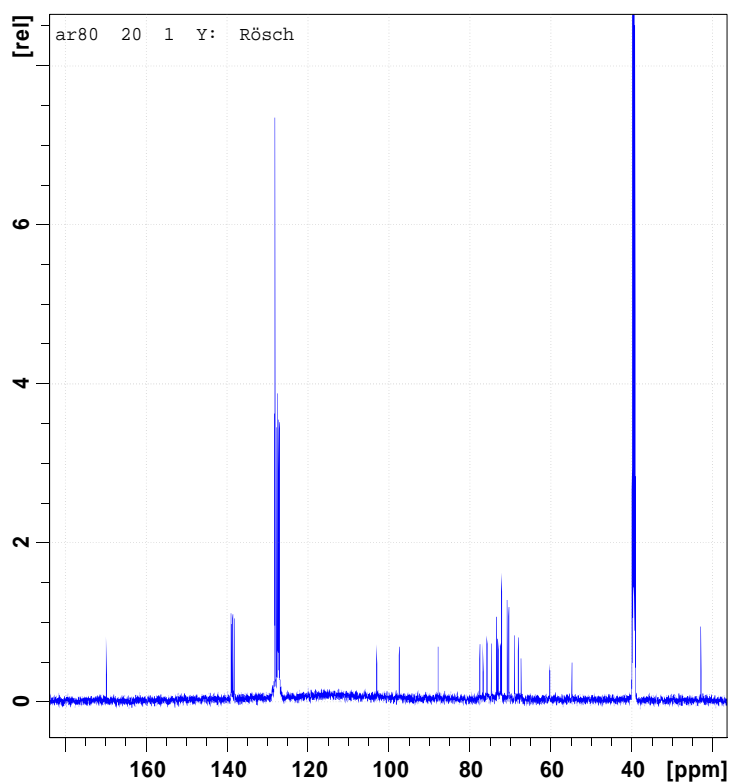
N-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>0</sup>-(2-acetamido-3-*O*-[6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl]-4-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl-β-D-arabinopyranosyl]-6-*O*-benzyl-(2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginyll-L-leucyl-(3-*O*-benzyl)-L-threonyl-(5-*O*-benzyl)-L-glutamyl-L-leucyl-(5-*O*-benzyl)-L-glutamyl-(3-*O*-benzyl)-L-seryl-(5-*O*-benzyl)-L-glutamyl-(4-*O*-benzyl)-L-aspariginyl-L-isoleucin **103**

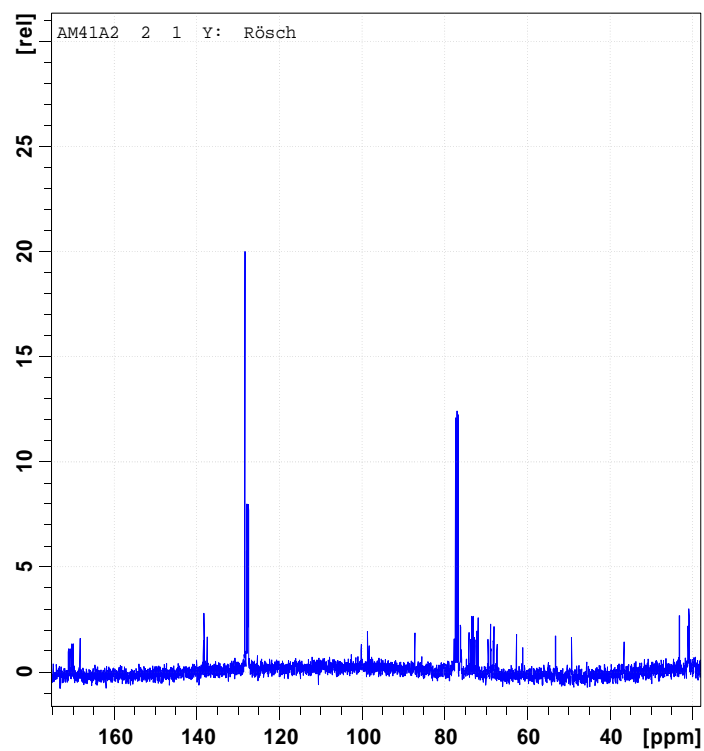
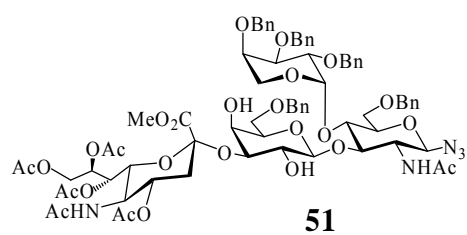
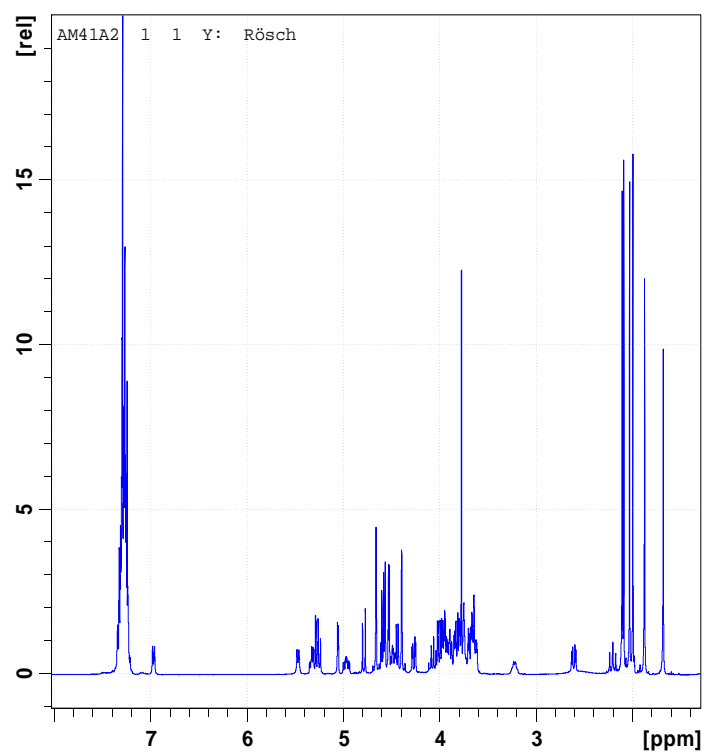
<sup>15</sup>N-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-valinyl-(5-*O*-benzyl)-L-glutamyl-(*S*-acetamidomethyl)-L-cysteinyl-(*N,N'*-*di*-benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-(4-*O*-benzyl)-L-asparaginyll-L-isoleucinyl-L-valinyl-glycin **112**

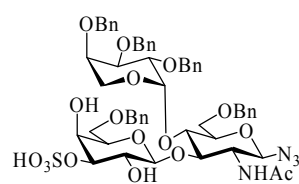
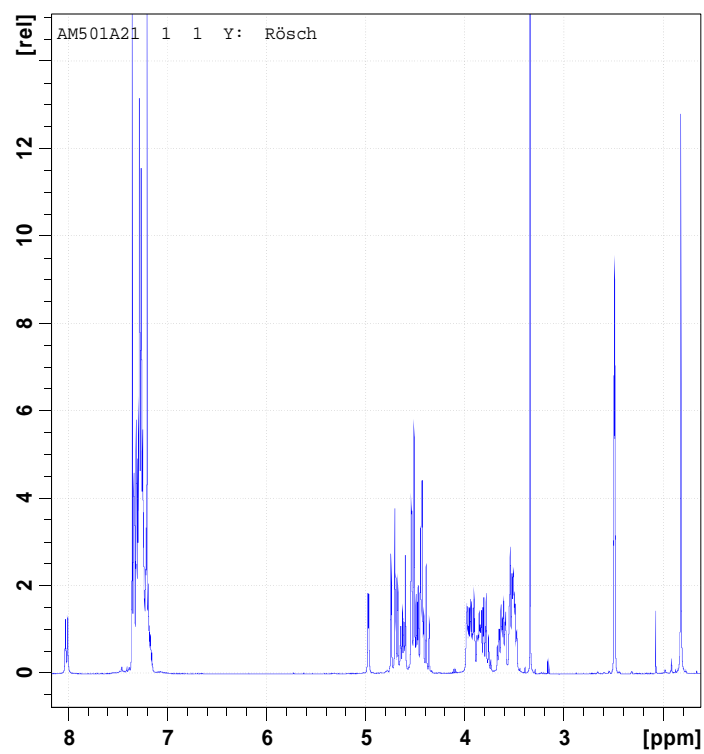




15







60

