

**Synthese *C*-glycosidischer und *N*-methylierter  
Glycosylaminosäuren für den Aufbau von Mimetika  
tumorassoziierter MUC1-Glycopeptidantigene  
unter Verwendung mikrostrukturierter Reaktoren**

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

Annette Buba  
Geboren in Ratibor

Mainz, April 2015



Dekan: Prof. Dr. [REDACTED]  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. [REDACTED]  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.15



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit  
vom 2. Januar 2012 bis 31. März 2015  
am Institut für Organische Chemie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. [REDACTED]  
und Herrn Prof. Dr. [REDACTED] angefertigt.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Krebsimmuntherapie .....	1
1.2	Stabilisierte Glycopeptide .....	3
1.3	Mikroreaktortechnik .....	5
1.4	Mikrowellen und Ultraschall als Energiequelle .....	6
2	Zielsetzung .....	8
3	Allgemeiner Teil .....	10
3.1	Fmoc- <i>N</i> -Methylaminosäuresynthese im Tube-in-Tube-Durchflussreaktor .....	10
3.1.1	Synthese der <i>N</i> -Methylaminosäuren .....	10
3.1.2	Synthese der Oxazolidinone .....	22
3.1.3	Gesamtprozess zur <i>N</i> -Methylaminosäuresynthese .....	26
3.1.4	Säurelabile Schutzgruppen im Durchflussreaktor .....	28
3.2	Vakzinsynthese auf Basis des <i>N</i> -methylierten MUC1-Glycopeptids .....	30
3.2.1	Synthese des <i>N</i> -Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugats .....	30
3.2.2	<i>N</i> -Methylierung von Glycosylaminosäuren .....	32
3.2.3	Glycopeptidsynthesen .....	42
3.2.4	Konjugation der MUC1-Glycopeptide an immunogene Proteine .....	58
3.3	<i>C</i> -Glycosylaminosäuren .....	62
3.3.1	<i>C</i> -Glycoside - Eigenschaften und Zugangsmöglichkeiten .....	62
3.3.2	<i>C</i> -Allylierungen im Mikrowellenreaktor .....	65
3.3.3	Synthese der Aldehydbausteine zur Ugi-Reaktion .....	78
3.3.4	Synthese der Auxiliare zur Ugi-Reaktion .....	82
3.3.5	Ugi-Reaktion .....	85
4	Zusammenfassung .....	94
5	Experimenteller Teil .....	101
5.1	Allgemeine Anmerkungen .....	101
5.1.1	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel .....	101
5.1.2	Analytische Methoden .....	101
5.1.3	Verwendete Geräte .....	104
5.2	<i>N</i> -Methylaminosäuresynthese .....	106
5.2.1	Oxazolidinonsynthese .....	106
5.2.2	<i>N</i> -Methylaminosäuresynthese .....	112
5.3	Vakzinsynthesen .....	119

5.3.1	Synthese des T <sub>N</sub> -Threonins .....	119
5.3.2	Synthese der <i>N</i> -Methylglycosylaminosäuren.....	127
5.3.3	Synthese des Triethylenglycol-Spacers.....	139
5.3.4	Synthese der Glycopeptide.....	144
5.4	<i>C</i> -Glycosylaminosäuresynthese .....	159
5.4.1	Synthese der Saccharidbausteine .....	159
5.4.2	Acetylierungen .....	168
5.4.3	Allylierungen.....	174
5.4.4	Synthese des Galactosylaldehydbausteins.....	179
5.4.5	Synthese des Galactosaminaldehydbausteins.....	180
5.4.6	Synthese der Auxiliare .....	186
5.4.7	Ugi-Reaktion .....	192
5.4.8	Weitere Saccharidbausteine .....	194
6	Literatur.....	198
7	Spektrenanhang .....	210

## Abkürzungsverzeichnis

[ $\alpha$ ]	spezifischer Drehwert	Gal	D-Galactose
absol.	absolut	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
Ac	Acetyl	ges.	gesättigt
AcOH	Essigsäure	Glc	D-Glucose
AD	Außendurchmesser	h	Stunde
Äquiv.	Äquivalent(e)	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- uroniumhexafluorophosphat
arom.	aromatisch	HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- uroniumhexafluorophosphat
AS	Aminosäure		
ber.	berechnet		
Bn	Benzyl		
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl		
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)	$^6\text{Hex}$	Cyclohexan
Bzn	Benzyliden	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
c	Konzentration	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
CAN	Cerammoniumnitrat	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
$\delta$	chemische Verschiebung	HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
d	Tage	Hz	Hertz
DC	Dünnschichtchromatographie	ID	Innendurchmesser
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	$^i\text{Pr}$	Isopropyl
dest.	destilliert	<i>J</i>	Kopplungskonstante
DIPEA	Diisopropylethylamin	kat.	katalytisch
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	konz.	konzentriert
DMSO	Dimethylsulfoxid	$\lambda$	Wellenlänge
DPS	Diphenylsilan	Lit.	Literaturangabe
ELISA	Enzyme Linked Immuno- sorbent Assay	M	Molarität
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>	M	Molekulare Masse
Et	Ethyl	MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorp- tion Ionization</i>
EtOAc	Ethylacetat	mbar	Millibar
Fmoc	9- <i>H</i> -Fluoren-9- ylmethoxycarbonyl	Me	Methyl

MeCN	Acetonitril
Mes	Mesyl, Methansulfonyl
min	Minute(n)
MS	Molekularsieb,
MS	Massenspektrometrie
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
Oxa	Oxazolidinon
<i>p</i>	<i>para</i>
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
Ph	Phenyl
Piv	Pivaloyl
ppm	parts per million
quant.	quantitativ
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RP	Reversed Phase
Raumtemp.	Raumtemperatur
Rückfl.	Rückfluss
Schmp.	Schmelzpunkt
Su	Succinimidyl
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBAB	Tertbutylammoniumbromid
Tentagel	Polyethylenglycol-Polystyrol- Copolymer
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl
TOF	time of flight
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett

### Verwendete Aminosäuren

Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asp, D	Asparaginsäure
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Met, M	Methionin
Phe, F	Phenylalanin
Phe(4-Br)	4-Brom-Phenylalanin
Pro, P	Prolin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Val, V	Valin

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebsimmuntherapie

„Krebs ist meistens Zufall.“ Dies vermuten Tomasetti und Vogelstein, die einen starken mathematischen Zusammenhang zwischen dem Risiko an Krebs zu erkranken und der Gesamtanzahl an Zellteilungen im entsprechenden Gewebe herausgefunden haben. Lediglich ein Drittel aller Krebserkrankungen sind auf Umweltfaktoren oder genetische Disposition zurückzuführen.<sup>[1]</sup>

Krebs entsteht durch die Proliferation entarteter Zellen und ist in den Industrienationen die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen.<sup>[2]</sup> Zur Behandlung werden meist drei Therapiemöglichkeiten herangezogen und kombiniert: operatives Entfernen, Bestrahlung und Chemotherapie. Nachteil dieser Behandlungen ist die fehlende Selektivität gegenüber malignen Zellen, denn in der Regel wird dabei auch gesundes Gewebe zerstört. Außerdem sind chirurgische Teilresektionen oft nicht möglich.

Einen selektiven Heilungsansatz durch gezielte Zerstörung von Tumorzellen, ohne dabei gesunde Zellen zu beeinträchtigen, bietet die Krebsimmuntherapie unter Ausnutzung des menschlichen Immunsystems.<sup>[3,4]</sup> Grundlegend werden Tumorzellen vom Immunsystem als fremd erkannt. Da es sich allerdings um körpereigenes Gewebe handelt, ist die Immunreaktion zur Bekämpfung der unkontrollierten Proliferation nicht ausreichend und muss durch geeignete Substanzen aktiviert werden.

Die Krebsimmuntherapie basiert auf dem Einsatz von Antitumorvakzinen, die hauptsächlich zur akuten Behandlung von Krebs dienen sollten. Prophylaktische Anwendungen gegen Gebärmutterhalskrebs, hervorgerufen durch das humane Papillomvirus (HPV), sind bereits bekannt.<sup>[5]</sup> Im Gegensatz zu konventionellen Methoden ist bei Antitumorvakzinen von großem Vorteil, dass neben dem primären Tumor auch Metastasen bekämpft werden und durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses anschließend einem Wiederausbruch vorgebeugt werden könnte.

Zur Entwicklung hochspezifischer Antitumor-Impfstoffe muss allerdings eine geeignete Antigenstruktur identifiziert werden, die maligne von benignen Zellen eindeutig unterscheidet. Das Mucin MUC1, welches auf Tumorzellen stark überexprimiert ist, bietet ein solches Unterscheidungsmerkmal.<sup>[6]</sup>

Mucine (lat. mucus „Schleim“) sind Glycoproteine mit einem hohen Saccharidanteil von bis zu 90 Gewichtsprozent und werden auf der Oberfläche von Epithelzellen exprimiert. Wegen

des hohen Saccharidanteils besitzen Mucine eine hohe Wasserbindungskapazität. Sie nehmen daher eine gel- oder schleimartige Konsistenz an und können somit die Epithelzellen vor Infektionen, Dehydrierung, physikalischer oder chemischer Schädigung sowie enzymatischem Abbau schützen.<sup>[7,8]</sup> Bis zu 20 verschiedene Mucine sind bekannt und werden in abgesonderte (sekretorische) und membrangebundene Glycoproteine untergliedert.<sup>[9,10]</sup>

Dabei ist der Aufbau des Peptidrückgrats aller Mucine gleich. Dieses setzt sich zusammen aus einer variablen Anzahl sog. *tandem repeat*-Sequenzen (repetitive Sequenzeinheiten, „*variable number of tandem repeats*“ VNTR). Spezifisch für jede Mucinart besteht diese Sequenz wiederum aus 12 - 20 Aminosäuren und ist reich an Serin und Threonin, über dessen Hydroxylgruppen komplexe Oligosaccharide *O*-glycosidisch gebunden sind.<sup>[7,8]</sup>

Das MUC1 ist ein Transmembranprotein, welches mit seinem extrazellulären Teil zur Glykokalyx beiträgt. Seine Wiederholungseinheit besteht aus den 20 Aminosäuren HGVT SAPDTRPAPGSTAPPA und beinhaltet fünf potenzielle *O*-Glycosylierungsstellen.<sup>[11]</sup> Die Anzahl der *tandem repeat*-Einheiten variiert wiederum von 20 bis 120.<sup>[12]</sup> MUC1 wird hauptsächlich von Epithelzellen der Brust, der Ovarien, des Darms und des Pankreas exprimiert. In gesunden Zellen nimmt es aufgrund eines hohen Anteils an Helix-brechendem Prolin in Kombination mit den komplexen Oligosaccharidseitenketten eine starre, gestreckte Konformation auf der apikalen Seite der Zelle ein (Abbildung 1.1, links).<sup>[10,13,14]</sup>

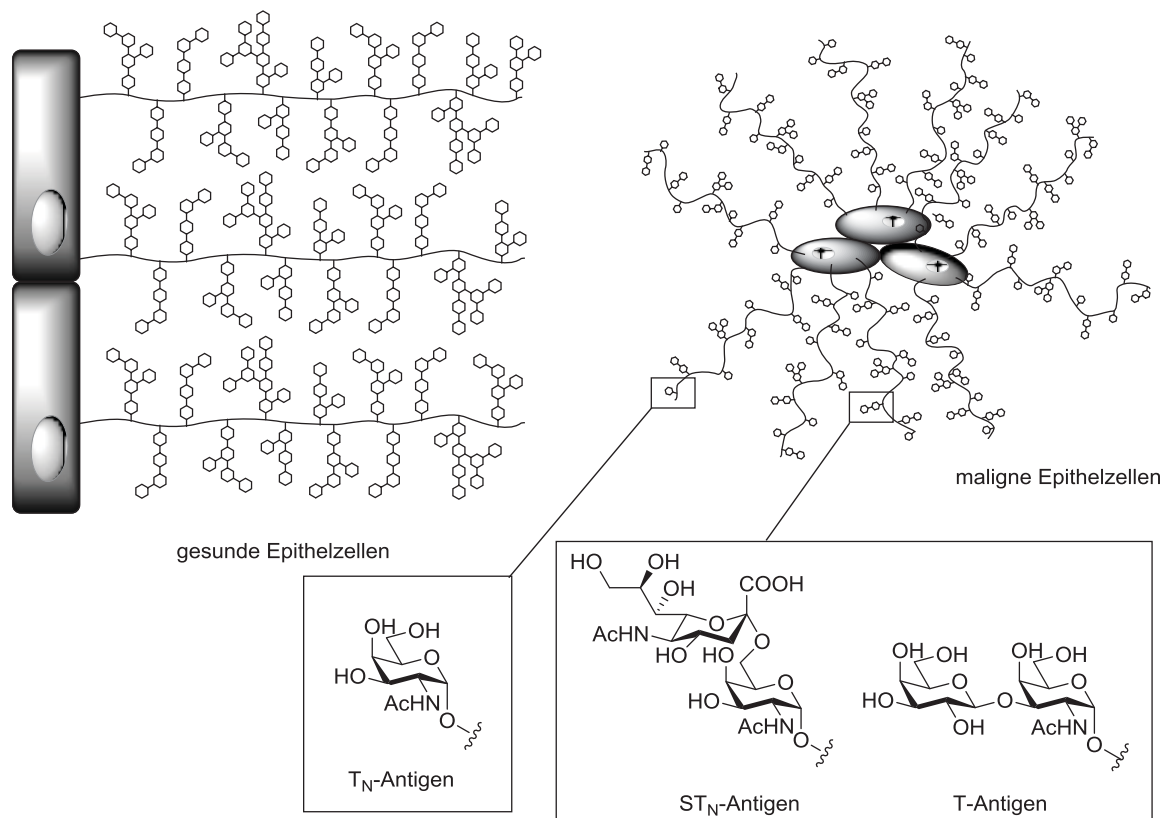


Abbildung 1.1: Gegenüberstellung der Strukturen gesunder und maligner Epithelzellen

In Tumorzellen hingegen wird MUC1 auf der gesamten Zelloberfläche stark überexprimiert und weist zudem charakteristisch veränderte Strukturmerkmale auf. Durch fehlerhafte Aktivitäten verschiedener Glycosyltransferasen liegen hierbei anstatt komplexer Oligosaccharidseitenketten, stark verkürzte und vermehrt sialylierte Glycane vor (Abbildung 1.1).<sup>[15]</sup> Diese verkürzten Kohlenhydratstrukturen werden als tumorassoziierte Kohlenhydratantigene (T- und T<sub>N</sub>-Antigene; Thomsen-Friedenreich-Antigene) bezeichnet und wurden erstmals 1975 von Springer et al. beschrieben.<sup>[16,17]</sup> Als eine Folge der eingeschränkten Glycosylierung und übermäßigen Sialylierung wird die leichtere Abspaltung solcher Tumorzellen vom Zellverband vermutet und somit die Metastasierungen angesehen.<sup>[18]</sup>

Neben den T- und T<sub>N</sub>-Antigenen zeigt sich ein weiteres, eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zwischen gesunden und kranken Zellen. In malignen Zellen liegt das Peptidrückgrat, bedingt durch die verkürzten Saccharidseitenketten, frei und weniger gestreckt vor. Dadurch ergeben sich neue, tumorspezifische und gut zugängliche Peptidepitope für das Immunsystem.

Diese charakteristischen Veränderungen der MUC1-Oberflächenglycopeptide auf tumorösen Epithelzellen bietet die Möglichkeit zur Entwicklung spezifischer Krebsimmuntherapien, durch die selektiv gegen Tumorgewebe gerichtete Antikörperreaktionen induziert werden sollen.

Zur Entwicklung von MUC1-Antitumorvakzinen müssen die tumorassoziierten Glycopeptide allerdings vollsynthetisch aufgebaut werden. Es ist nicht möglich, diese rein aus malignen Zellen zu isolieren, denn neben tumorassoziierten sind auch normale MUC1-Strukturen auf Tumorzelloberflächen vorzufinden (Mikroheterogenität). Die daraus erhaltenen Antikörper würden nicht die nötige Selektivität aufweisen und auch gesundes Gewebe angreifen. Außerdem erlaubt der vollsynthetische Aufbau gezielte Modifikationen der Glycopeptidstruktur und damit eine Steuerung der Vakzineigenschaften.

In zahlreichen Vorarbeiten konnte bereits die erfolgreiche Synthese und Anwendung solcher MUC1-Antitumorvakzine gezeigt werden.<sup>[19-34]</sup>

## 1.2 Stabilisierte Glycopeptide

Wie die meisten Peptide sind auch die MUC1-Glycopeptide instabil gegenüber Hydrolyse oder enzymatischem Abbau im Organismus. Im Allgemeinen werden bei oraler Gabe von Peptid- oder Proteinwirkstoffen lediglich geringe Bioverfügbarkeiten von 1 - 2 % erreicht.<sup>[35]</sup> Dazu trägt die geringe Membranpermeabilität der Peptide bei, wodurch es zu einem rascheren Metabolismus kommt.

Wird allerdings die molekulare Flexibilität, die Oberflächenpolarität oder Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen im Wirkstoff reduziert, so kann die Bioverfügbarkeit drastisch erhöht werden.<sup>[36]</sup>

In Peptiden bzw. Glycopeptiden können diese günstigen Eigenschaften beispielsweise durch Einführung von *N*-Methylgruppen hervorgerufen werden. Durch die Substitution des amidischen Protons wird die Beweglichkeit um die Amidbindung stark beeinflusst. Weiterhin wird die Polarität, durch den Substituenten selbst und dem damit verbundenen Verlust, Wasserstoffbrückenbindungen aufbauen zu können, erniedrigt. Eine derartige Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften kann am Beispiel des Naturstoffs Cyclosporin gezeigt werden (Abbildung 1.2).

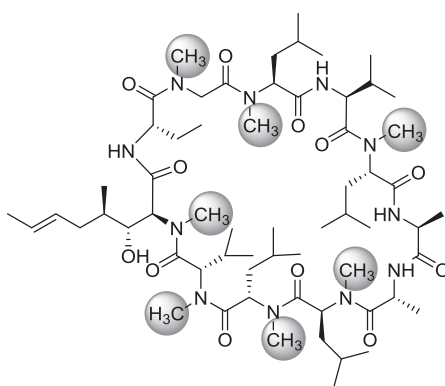


Abbildung 1.2: Darstellung des Naturstoffs Cyclosporin

Cyclosporin ist ein cyclisches Peptid und gehört zur Gruppe der Immunsuppressiva. Es besteht aus elf Aminosäuren bzw. Aminosäurederivaten und ist sieben-fach *N*-methyliert.<sup>[37]</sup> Aufgrund seiner zahlreichen *N*-Methylgruppen ist es metabolisch stabil und kann als Medikament sogar oral verabreicht werden.

Speziell in der Klasse der Glycopeptide, darunter auch in MUC1-Glycopeptiden, ergibt sich neben dem metabolisch labilen Peptidrückgrat eine weitere Schwachstelle: die *O*-glycosidische Verbindung zwischen Kohlenhydratrest und Peptid. Diese *O*-glycosidischen Bindungen können leicht durch saure Hydrolyse, basische  $\beta$ -Eliminierungen oder enzymatischen Abbau gespalten werden. Sie lassen sich jedoch durch den Austausch des glycosidischen Sauerstoffs gegen eine Methylengruppe sehr gut stabilisieren, wodurch ein *C*-Glycosid erhalten wird (Abbildung 1.3).

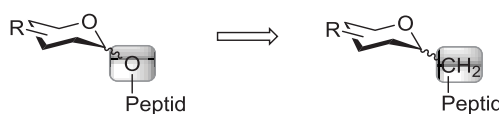


Abbildung 1.3: Stabilisierung hydrolyselabiler *O*-Glycoside durch *C*-Glycosylierung

C-Glycoside sind äußerst robust, sodass einige solcher Glycomimetika bereits erfolgreich synthetisiert und zur Gewinnung stabiler MUC1-Antitumorvakzine in MUC1-Sequenzen eingebaut werden konnten.<sup>[38–40]</sup>

### 1.3 Mikroreaktortechnik

Die meisten organischen Synthesen werden noch immer im Glaskolben als „Batchsynthese“ durchgeführt. Allerdings weisen Batchsynthesen im Vergleich zu kontinuierlich betriebenen Verfahren zahlreiche Nachteile auf. Das Hauptproblem ergibt sich beim „Up-scaling“ (Ansatzvergrößerung) zur Bereitstellung größerer Produktmengen. Zur Wahrung der Produktqualität, müssen die zuvor in Kleinansätzen optimierten Reaktionsparameter bei einer Hochskalierung neu ermittelt werden. Andernfalls werden häufig Ausbeute- und Selektivitätsverluste verzeichnet. Wegen der schlechten Wärmeübertragung in Batchsystemen entstehen außerdem mit steigender Größe des Reaktionsgefäßes stärkere Temperaturgradienten innerhalb des Behälters („hot spots“).<sup>[41]</sup> Weiterhin liegen bei der Zugabe von Substraten oder Reagenzien zu bestehenden Reaktionslösungen an der Zugabe- oder Eintropfstelle lokale Konzentrationsgradienten vor. Bei exothermen Reaktionen können punktuell weitere Temperaturgradienten bzw. „hot spots“ entstehen. Dies kann in Kombination mit den Konzentrationsgradienten ebenfalls zu Ausbeute- oder Selektivitätsverlusten führen.<sup>[41]</sup>

Durch die Verwendung der Mikroreaktortechnik können die meisten dieser Nachteile vermieden werden. Große Produktmengen können hierbei zeitlich optimiert, selektiv und sicher hergestellt werden, wodurch signifikant höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden können. Grundlage dafür bietet das große Oberfläche- zu-Volumen-Verhältnis, welches in Durchflusssystemen bei 10000 bis 50000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> liegt, verglichen mit 100 bis 1000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> in traditionellen Kolbendurchführungen.<sup>[42,43]</sup> Somit ergibt sich ein verbesserter Wärmetransport beim Erhitzen, wodurch Reaktionen stark beschleunigt werden können. Eine effizientere Kühlung bei exothermen Reaktionen kann dagegen zahlreiche Nebenreaktionen unterdrücken und gewährleistet selektivere Umsetzungen. Zur Vermeidung von Konzentrationsgradienten erfolgt die Zugabe der Substrate oder Reagenzien über spezielle Mischer. Dabei wird die Reaktionslösung, verglichen mit dem Rührer im Rührkessel oder Kolben, schneller und wesentlich effizienter homogenisiert.<sup>[43]</sup>

Der größte Vorteil der Mikroreaktortechnik liegt allerdings im „Up-scaling“, denn im Gegensatz zu konventionellen Reaktionsführungen können hierbei die zuvor ermittelten Reaktionsparameter beibehalten werden. So werden zunächst zur Bestimmung der optimalen Systembedingungen lediglich kleinste Produktmengen benötigt. Anschließend wird beispielsweise,

zur Vergrößerung der Produktmengen, allein die Laufzeit des Durchflussprozesses erhöht, ohne Nachoptimierungen zu erfordern. Alternativ kann die Produktmenge durch verlängerte Reaktionskanäle bei gleichzeitig erhöhten Flussraten oder durch Parallelsysteme („numbering-up“) vergrößert werden (Abbildung 1.4).<sup>[44]</sup>

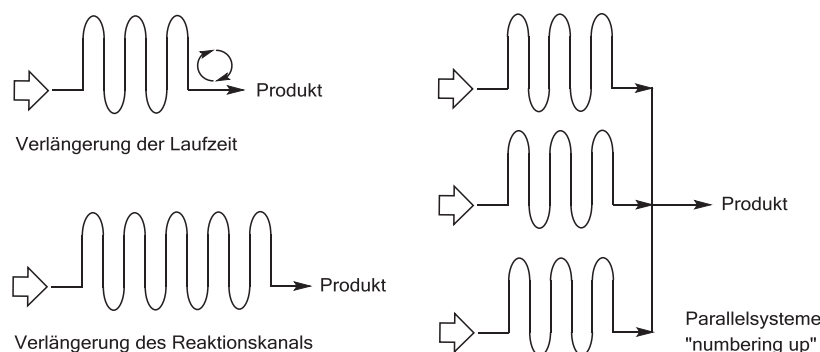


Abbildung 1.4: Möglichkeiten zur Ansatzvergrößerung in Durchflussprozessen

Zuletzt bietet das geringe Reaktionsvolumen zusätzlich eine wesentlich sicherere Handhabung giftiger oder explosiver Substanzen, da partiell lediglich kleinste Mengen der gefährlichen Substanzen in zudem geschlossenen Systemen umgesetzt werden.

Zahlreiche organische Synthesen konnten bereits erfolgreich auf Mikroreaktorsysteme übertragen werden.<sup>[42–49]</sup> Auch industrielle Anwendungen profitieren von den Vorteilen der Mikroreaktortechnik, beschrieben von Würz et al. (BASF).<sup>[50,51]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit werden diese Vorzüge der Mikroreaktortechnik bei der Übertragung bekannter, aber auch neuer organischer Synthesen auf Durchflussreaktoren untersucht.

## 1.4 Mikrowellen und Ultraschall als Energiequelle

Zur Durchführung einer Reaktion bedarf es in der Regel einer Energiequelle. Dazu wird traditionell das Erhitzen mittels externer Heizquelle (z.B. Heizplatten) herangezogen. Dies stellt allerdings eine relativ ineffiziente Methode zum Energieeintrag in ein System dar, da die Wärme zunächst durch die Gefäßwand ins Innere gelangen muss. Hierbei geht bereits, abhängig von der Wärmeleitfähigkeit des Kolben- bzw. Behältermaterials, Energie verloren. Weiterhin entstehen Temperaturgradienten zwischen der äußeren, an der heißen Gefäßwandung befindlichen und der inneren Reaktionslösung. Beim klassischen Erhitzen werden mit steigender Gefäßgröße teilweise mehrere Stunden benötigt, bis sich ein thermisches Gleichgewicht eingestellt hat.

Eine Alternative zum Einbringen von Wärmeenergie in ein System, stellen dagegen Mikro- oder Ultraschallwellen dar. Mikrowellen bilden einen Eintrag von Energie durch elektromag-

netische Strahlung in einem Frequenzbereich von 300 bis 300000 MHz. In diesem Bereich der elektromagnetischen Energie werden lediglich Rotationen bei Molekülen mit Dipolmoment angeregt.<sup>[52]</sup>

Wird nun ein Gefäß der Mikrowellenanregung ausgesetzt, so wird die Energie gezielt in die Reaktanden eingebracht, unabhängig von der Wärmeleitfähigkeit des Behältermaterials (Abbildung 1.5).<sup>[52]</sup>

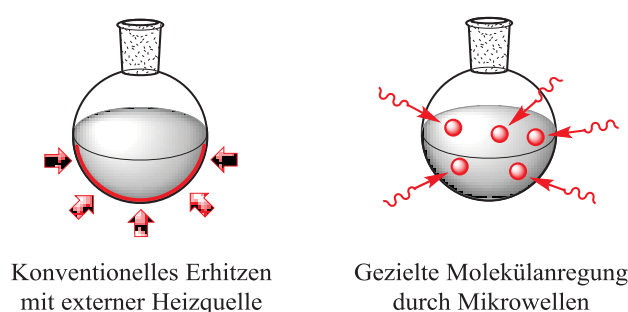


Abbildung 1.5: Vergleich des konventionellen Erhitzens mit Mikrowellenenergie

Das Resultat sind wesentlich schnellere Reaktionsverläufe, bedingt durch effizientes Erhitzen aufgrund selektiver Anregung der Moleküle.

Ultraschall hingegen liegt in einem Frequenzbereich von 20 kHz bis über 100 MHz. Unter Verwendung üblicher Laborgeräte wird die sog. Sonochemie allerdings lediglich zwischen 20 kHz bis 40 kHz durchgeführt. Die Triebkraft der Sonochemie beruht dabei auf dem Prinzip der Kavitation, d. h. dem Prozess aus Bildung und Auflösung von Gas- bzw. Dampfblasen in Flüssigkeiten. Diese Dampfblasen werden durch Kompression und Relaxation des Lösungsmittels erzeugt. Dabei wachsen die Blasen stetig, bis eine instabile Größe erreicht wird und sie schließlich schlagartig zusammenbrechen. Im Moment des Zusammenbruchs wird die zur Synthese benötigte Energie freigesetzt. Jede dieser Blasen fungiert quasi als „Mikroreaktor“, welcher in wässrigen Systemen bis zu einigen Tausend Grad und Drücke über 1000 atm erzeugen kann.<sup>[53]</sup> Dadurch ermöglichen diese extremen Bedingungen in Kombination mit mechanischen Effekten ebenfalls eine beschleunigte Reaktionsführung.

Beide alternative Energiequellen werden hinsichtlich ihrer beschleunigenden Wirkung im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

## 2 Zielsetzung

Eine Erhöhung der Stabilität von Glycopeptiden gegenüber Hydrolyse oder enzymatischem Abbau kann durch die Einführung von *N*-Methylgruppen oder *C*-Glycosylaminosäuren erreicht werden. Aufgrund dieser stabilisierenden Effekte könnten solchermaßen modifizierte vollsynthetische Antitumorvakzine, basierend auf MUC1-Glycopeptiden, eine erhöhte Bioverfügbarkeit aufweisen und dadurch an Wirksamkeit gewinnen.

Zur Synthese solcher stabilen Glycopeptide soll in der vorliegenden Arbeit zunächst eine kontinuierlich betriebene Methode zur *N*-Methylierung von Aminosäuren entwickelt werden. Ausgehend von der zweistufigen Synthese nach Freidinger<sup>[54]</sup> werden gemäß Abbildung 2.1 im ersten Schritt die Fmoc-Aminosäuren mit Paraformaldehyd in Oxazolidinone überführt und im zweiten reaktiv zu *N*-Methylaminosäuren umgesetzt.

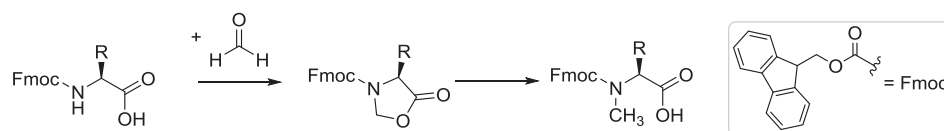


Abbildung 2.1: Geplante *N*-Methylaminosäuresynthese nach Freidinger et al.

Die Synthese soll dabei in einem Tube-in-Tube-Durchflussreaktor mit einer semipermeablen Membran aus Teflon<sup>®</sup> AF 2400 durchgeführt werden. Teflon<sup>®</sup> AF 2400 ist ein für Gase durchlässiges, amorphes Fluorpolymer und soll hier bezüglich seiner Permeabilität gegenüber Flüssigkeiten und atypischen Gasen untersucht werden.

Im weiteren Verlauf soll diese Synthese dazu genutzt werden, Glycosylaminosäuren, darunter verschiedene T<sub>N</sub>-Antigen-Strukturen, zu *N*-methylieren (Abbildung 2.2).

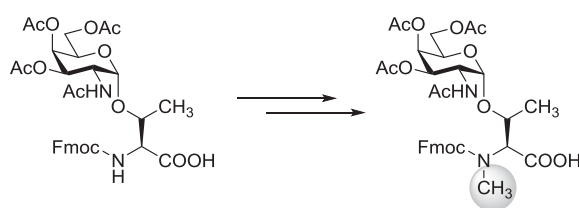


Abbildung 2.2: Geplante *N*-Methylierung von Glycosylaminosäuren

Diese tumorassoziierten T<sub>N</sub>-Antigene sind Bestandteile in MUC1-Antitumorvakzinen, deren Selektivität stark von der Konformation des Glycopeptids beeinflusst wird. Um den konformativen Einfluss einer *N*-Methylglycosylaminosäure auf die Wirksamkeit und Selektivität der resultierenden Vakzine untersuchen zu können, sollen anschließend diese modifizierten Glycosylaminosäuren als Bausteine zur Festphasensynthese von *N*-Methylglycopeptiden verwen-

det werden. Der Einbau der *N*-methylierten Glycosylaminosäure soll dabei gezielt in die *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 erfolgen (Abbildung 2.3).

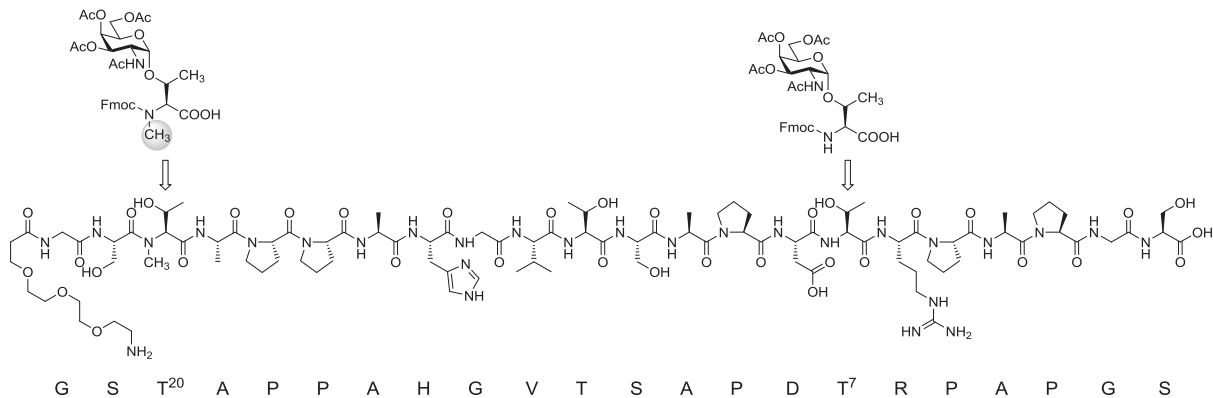


Abbildung 2.3: Gezielter Einbau der Glycosylaminosäuren in das MUC1-Glycopeptid

Zum Aufbau einer vollständigen Drei-Komponenten-Antitumorvakzine sollen die Glycopeptide anschließend an immunogene Proteine konjugiert werden.

Schließlich sollen hydrolyse stabile  $\alpha$ -C-Glycosylaminosäuren aufgebaut werden, deren Strukturen dem natürlichen T<sub>N</sub>-Serin gleichen. Ein neuer Zugang zu C-Glycosiden soll über eine asymmetrische Ugi-Vier-Komponenten-Synthese entwickelt werden. Die geplante Syntheseroute ist in Abbildung 2.4 skizziert.

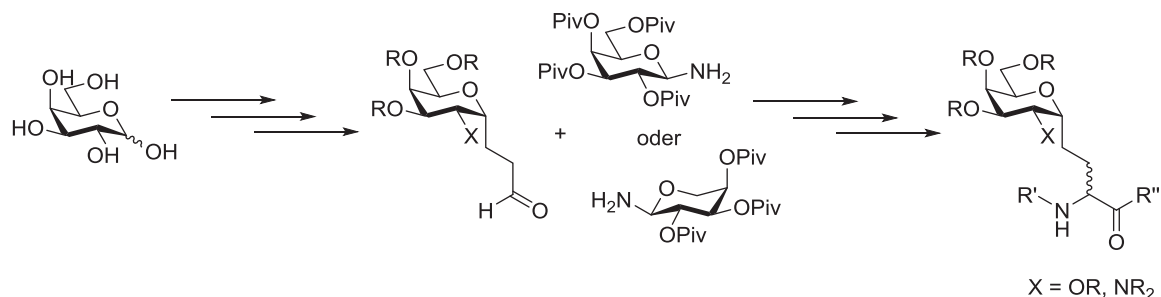


Abbildung 2.4: Geplanter Syntheseweg zur Darstellung von  $\alpha$ -C-Glycosylaminosäuren

Die zur Ugi-Reaktion benötigte Aldehydkomponente wird dabei durch das C-Glycosid und das Amin durch chirale Kohlenhydratamine als Auxiliare eingebracht.

Die C-Glycosyl-Aldehyde werden ausgehend von D-Galactose gewonnen, wobei neben einem einfachen Zuckerbaustein auch eine C-2-funktionalisierte Galactosamineinheit umgesetzt werden soll. Kritische oder langwierige Synthesestufen sollen dabei teilweise in effizienten Durchflussreaktoren durchgeführt werden. Die benötigten chiralen Kohlenhydratamine werden ausgehend von D-Galactose oder D-Arabinose dargestellt, und sollen auf ihre Stereoselektivität in der Ugi-Reaktion untersucht werden.

## 3 Allgemeiner Teil

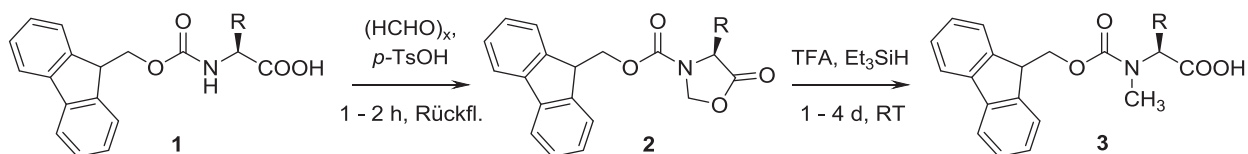
### 3.1 Fmoc-*N*-Methylaminosäuresynthese im Tube-in-Tube-Durchflussreaktor

#### 3.1.1 Synthese der *N*-Methylaminosäuren

Die Einführung einer *N*-Methylgruppe hat weitreichende Auswirkungen auf das modifizierte Molekül. In *N*-Methylpeptiden beispielsweise führt dies einerseits zu einer erhöhten konformativen Beweglichkeit bedingt durch die Beeinflussung des *cis/trans*-Verhältnisses der Amidbindung zugunsten des *cis*-Isomers.<sup>[55,56]</sup> Andererseits können *N*-Methylaminosäuren ähnlich wie Prolinreste die Sekundärstruktur von Peptiden brechen, indem sie *turn*-Strukturen induzieren.<sup>[57]</sup> Den größten Effekt hat die *N*-Methylierung im Peptid allerdings auf den Verlust der Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden.<sup>[58]</sup> Dies führt zu zusätzlichen Konformationsveränderungen und damit zu signifikant veränderten physikalischen Eigenschaften. Wie bereits in Kap. 1.2 beschrieben, bringen diese Veränderungen in *N*-Methylpeptiden stark verbesserte pharmakologische Eigenschaften mit sich wie eine erhöhte Membrandurchgängigkeit durch erhöhte Lipophilie<sup>[59,60]</sup> oder eine höhere proteolytische und damit metabolische Stabilität.<sup>[60]</sup>

Zahlreiche Methoden zur *N*-Methylierung von Aminosäuren sind beschrieben.<sup>[61]</sup> Die Synthese kann u. a. über  $\alpha$ -Bromcarbonsäuren,<sup>[62]</sup>  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäurederivate,<sup>[63]</sup> *N*-Methylierung von Sulfonamiden,<sup>[64]</sup> Carbamate und Amide mit Methyljodid<sup>[65–67]</sup> sowie durch reduktive Aminierung erfolgen.<sup>[68–70]</sup> Diese Zugangswege weisen jedoch verschiedene Nachteile bezüglich der Handhabung, der Toleranz anderer funktioneller Gruppen, der Selektivität oder der Neigung zur Racemisierung auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur Synthese von *N*-Methylaminosäuren im Durchfluss entwickelt, die auf der zweistufigen Umsetzung nach Freidinger et al. (Schema 3.1) basiert.<sup>[54]</sup> Die erste Stufe hiervon beruht wiederum auf Arbeiten von Ben-Ishai.<sup>[71]</sup> Dabei wird säurekatalysiert eine Fmoc-Aminosäure (**1**) mit Paraformaldehyd zum Oxazolidinon (**2**) umgesetzt. Die zweite Stufe, ursprünglich von Weinreb et al.<sup>[72]</sup> beschrieben, stellt eine reduktive Ringöffnung zur *N*-Methylaminosäure (**3**) dar.



Schema 3.1: *N*-Methylaminosäuresynthese nach Freidinger et al.

Die Synthese nach Freidinger et al. verläuft selektiv und ohne Racemisierung. Aufgrund der einfachen experimentellen Handhabung und der milden Reaktionsbedingungen konnte sie bereits auf zahlreiche Aminosäuren mit verschiedenen Schutzgruppenmustern angewandt werden.<sup>[73–76]</sup> Auch eine Anwendung im Mikrowellenreaktor ist hierzu beschrieben.<sup>[77]</sup> Ein Nachteil dieser Umsetzungen liegt allerdings in der langen Reaktionsdauer, die für beide Stufen ein bis fünf Tage betragen kann. Um nun größere Produktmengen in kürzerer Zeit bereitstellen zu können und damit die spezifische Produktleistung zu erhöhen, wurde untersucht, ob diese Synthese in einem Durchflusssystem ausgeführt werden kann. Dabei sollte das günstige Oberflächen-zu-Volumenverhältnis in Mikroreaktoren mit der damit verbundenen höheren Wärmeaustauschleistung genutzt und die Reaktion beschleunigt werden.

In Zusammenarbeit mit [REDACTED] wurde für die Synthese von *N*-Methylaminosäuren ein Tube-in-Tube-Reaktor nach Ley et al.<sup>[78]</sup> entwickelt (Abbildung 3.1).<sup>[79]</sup>

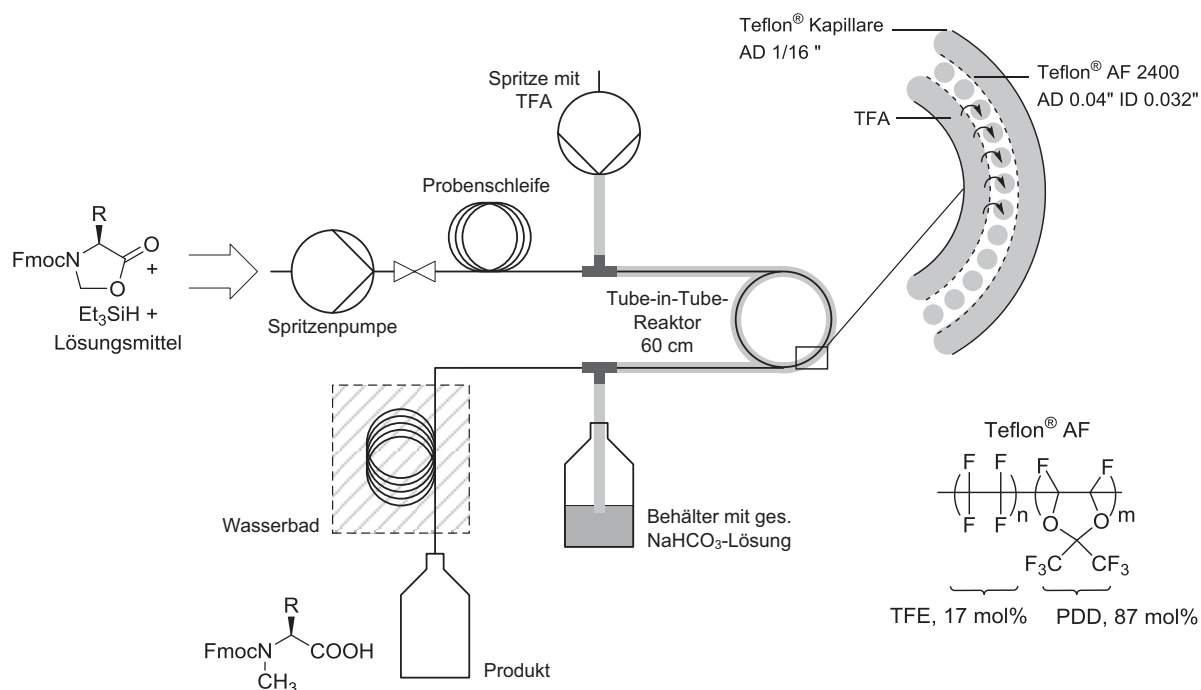


Abbildung 3.1: Tube-in-Tube-Reaktor zur *N*-Methylaminosäuresynthese

Der Reaktoraufbau besteht aus einer Spritzenpumpe, welche die Substrate und das Lösungsmittel befördert, PTFE-Kapillaren (AD: 3.2 mm, ID: 1.6 mm) als Probenschleife

( $V = 1.5 \text{ mL}$ ), dem Verweilelement ( $V = 5 \text{ mL}$ ) und einem Tube-in-Tube-System, das die Misch- und Dosierfunktion übernimmt. Die Besonderheit dieses Tube-in-Tube-Systems besteht in der Verwendung einer semipermeablen Membran aus Teflon<sup>®</sup> AF 2400 in Form einer Kapillare (Länge: 60 cm, AD: 1.00 mm, ID: 0.8 mm), welche sich im Inneren eines PTFE-Schlauchs befindet.

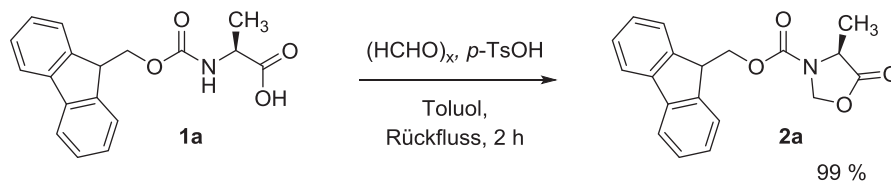
Teflon<sup>®</sup> AF 2400 ist ein amorphes Fluorpolymer, bestehend aus 2,2-Bis-(trifluormethyl)-4,5-difluor-1,3-dioxolan (PDD) und Tetrafluorethylen (TFE) im Verhältnis 87 : 17 mol%.<sup>[80]</sup> Im Vergleich zu anderen amorphen Polymeren ist Teflon<sup>®</sup> AF in gängigen organischen Lösungsmitteln nicht löslich. Durch seine Beständigkeit gegenüber zahlreichen Chemikalien, darunter auch starke Säuren oder Basen, eignet es sich ideal für eine Vielzahl organischer Synthesen.<sup>[81]</sup> Mit einem hohen FFV (*fractional free volume* = Freivolumen/cm<sup>3</sup>) von 0.327 und großen Freivolumenelementen von 5 - 7 Å<sup>[82]</sup> ist Teflon<sup>®</sup> AF vor allem durchlässig für Gase wie z. B. N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> u. ä.<sup>[83-86]</sup> Die Gruppen um Ley,<sup>[78,87-92]</sup> Kappe<sup>[93]</sup> und Polyzos<sup>[94]</sup> konnten bereits einige Gas-Synthesen in einem solchen Tube-in-Tube-Reaktor erfolgreich durchführen.

Neben der hohen Durchlässigkeit für Gase ist für dieses Polymer auch eine geringe Permeabilität für Chloroformlösungen beschrieben, wobei sich fluoridierte Verbindungen durch eine geringfügige Durchgängigkeit auszeichnen.<sup>[95]</sup>

Diese Eigenschaft wurde näher untersucht und die erhöhte Durchlässigkeit fluoridierter Flüssigkeiten durch die Membran für synthetische Zwecke genutzt. Dazu wurde Trifluoressigsäure (TFA) als fluoridierte Verbindung herangezogen und im Tube-in-Tube-Reaktor zur Synthese von *N*-Methylaminosäuren nach Freidinger in der zweiten Stufe eingesetzt.

Wie in Abbildung 3.1 gezeigt, wird die TFA in die äußere Kapillare eingespritzt und anschließend das Lösungsmittel mit der Substratlösung mittels Spritzenpumpe durch das Innere der Teflon<sup>®</sup> AF-Kapillare befördert. Während der Durchführung dringt nach und nach die TFA ins Innere der Kapillare ein und vermischt sich kontinuierlich und gleichmäßig mit der Substratlösung. Die Permeabilität von TFA durch die Membran konnte in vorangegangenen Experimenten mit Methylorange als Indikator nachgewiesen werden. T-Stücke am Anfang und am Ende der Tube-in-Tube-Zone gewährleisten hierbei einen unabhängigen Substrat- und TFA-Zufluss. Im Anschluss an die Tube-in-Tube-Zone durchläuft die Reaktionslösung das Verweilelement, welches sich in einem temperierten Wasserbad befindet. Am Ende des Verweilelements wird das Produkt in einem Kolben aufgefangen und die überschüssige TFA in einem Behälter mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Kap. 5.2.2.1 beschrieben.

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde das einfache Fmoc-Ala-Oxazolidinon (**2a**) ohne funktionalisierte Seitenkette als Modells substrat ausgewählt. Dieses konnte zuvor ausgehend von Fmoc-Alanin-OH (**1a**) gemäß der Literatur<sup>[54]</sup> synthetisiert und in 99 % Ausbeute erhalten werden (Schema 3.2).



Schema 3.2: Synthese des Modells substrats Fmoc-Alanin-Oxazolidinon **2a**

Für die reduktive Ringöffnung des Oxazolidinons wurden die anfänglichen Reaktionsparameter an die Synthese im Kolben nach Freidinger et al. angelehnt, die Temperatur jedoch direkt von Raumtemperatur auf 50 °C angehoben, um die Reaktion zu beschleunigen. Für die ersten Testsynthesen wurde eine Verweilzeit von ca. 1 Stunde ausgewählt, das bedeutet bei einem Gesamtvolumen des Reaktors von ca. 6 mL eine Flussrate von 6 mL/h. Die Ergebnisse der ersten Optimierungsschritte sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Erste Optimierungen der Syntheseparameter

C[C@@H](C(=O)O)N(C)C(=O)OCc1ccc2c(c1)ccc3ccccc23 >> C[C@@H](C(=O)O)N(C)C(=O)OCc1ccc2c(c1)ccc3ccccc23  
**2a**  **3a**

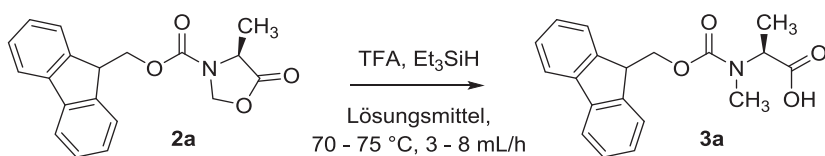
TFA, Et<sub>3</sub>SiH  
 CHCl<sub>3</sub>,  
 3 - 6 mL/h

Eintrag	Temperatur	Flussrate	Umsatz
1	50 °C	6 mL/h	33 %
2	”	3 mL/h	40 %
3	60 °C	”	35 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon (**2a**) (97.0 mg, 0.30 mmol), 1.5 mL Chloroform, 0.15 mL (3 Äquiv., 0.94 mmol) Triethylsilan, 1.5 mL (65 Äquiv., 19.5 mmol) Trifluoressigsäure. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmt.

Unter den gewählten Anfangsbedingungen konnte ein Umsatz von 33 % verzeichnet werden (Eintrag 1). Eine Verdopplung der Verweilzeit, durch eine geringere Flussrate von 3 mL/h, lieferte eine Umsatzsteigerung auf 40 % (Eintrag 2). Eine zusätzliche Temperaturerhöhung auf 60 °C führte zu einer Verringerung des Umsatzes (Eintrag 3). Hierbei könnte das starke Ausgasen des bei 60 °C bereits siedenden Chloroforms (Sdp. CHCl<sub>3</sub>: 61.2 °C) die Ursache sein. Um dieses Problem zu vermeiden und den positiven Temperatureinfluss auf den Umsatz weiter verfolgen zu können, wurden im Folgenden verschiedene höher siedende Lösungsmittel bei 70 °C getestet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Optimierung des Lösungsmittels und der Flussrate



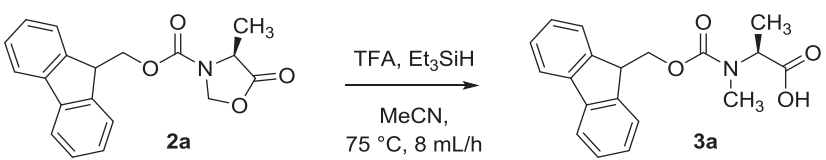
Eintrag	Lösungsmittel	Flussrate	Umsatz
1	Cyclohexan	3 mL/h	0 %
2	Toluol	”	71 %
3	Chlorbenzol	”	100 %
4	Acetonitril	”	100 %
5	Chlorbenzol	6 mL/h	74 %
6	Acetonitril	”	>95 %
7	”	5 mL/h	100 %
8 <sup>a</sup>	”	8 mL/h	100 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon (**2a**) (97.0 mg, 0.30 mmol), 1.5 mL Lösungsmittel, 0.15 mL (3 Äquiv., 0.94 mmol) Triethylsilan, 1.5 mL (65 Äquiv., 19.5 mmol) Trifluoressigsäure. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. <sup>a</sup> 75 °C.

Unpolare Lösungsmittel wie Cyclohexan sind für die Reaktion ungeeignet und lieferten keinen Umsatz, da sie die polaren Zwischenstufen während der Reaktion nicht stabilisieren (Eintrag 1). Zunehmend polare Lösungsmittel können diese dagegen besser stabilisieren und zeigen eine verbesserte Reaktion an (Eintrag 2 - 4). Mit Chlorbenzol und Acetonitril verlief die Reaktion sogar vollständig (Eintrag 3, 4). Allerdings konnte lediglich in Acetonitril die Flussrate auf 5 mL/h bzw. 6 mL/h ohne signifikante Umsatzverluste angehoben werden (Eintrag 5 - 7). Eine leichte Temperaturerhöhung um 5 °C in Acetonitril ermöglichte sogar bei Flussraten von bis zu 8 mL/h vollständige Umsätze, welches einer verkürzten Reaktionszeit von 40 Minuten entspricht (Eintrag 8) Daher wurde für die folgenden Optimierungen Acetonitril als Lösungsmittel verwendet.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die TFA-Menge reduziert werden kann (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Optimierung der TFA-Menge

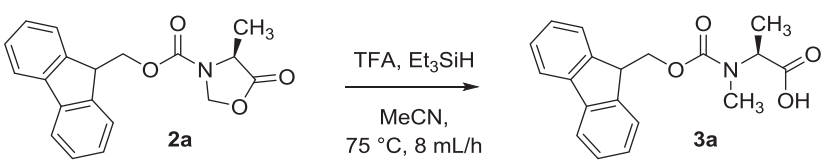


Eintrag	TFA	Umsatz
1	1.5 mL	100 %
2	1.0 mL	89 %
3	-	0 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon (**2a**) (97.0 mg, 0.30 mmol), 1.5 mL Acetonitril, 0.15 mL (3 Äquiv., 0.94 mmol) Triethylsilan, Trifluoressigsäure. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt.

Wurden weniger als 1.5 mL TFA in die äußere Kapillare des Tube-in-Tube-Systems eingespritzt, sank der Umsatz auf 89 % (Eintrag 2). Grund hierfür ist, dass eine vollständige Benetzung der äußeren Membrankapillare mit TFA während der gesamten Reaktionszeit gewährleistet sein muss, damit eine kontinuierliche und gleichmäßige TFA-Zufuhr ins Innere möglich ist. Bei 1 mL ist dies nicht mehr gegeben, denn bereits zu Beginn der Durchführung konnten Leerstellen in der äußeren Kapillare durch rasch ins Innere diffundierte TFA beobachtet werden. Die Blindprobe ohne TFA in der Außenkapillare lieferte keinen Umsatz und bestätigt zum einen die Permeabilität der Membran für TFA und zum anderen die Notwendigkeit der Säure als Katalysator (Eintrag 3). Nachfolgend zeigt Tabelle 3.4 die Optimierung der Triethylsilanmenge.

Tabelle 3.4: Optimierung der Triethylsilanmenge



Eintrag	$\text{Et}_3\text{SiH}$	Umsatz
1	0.15 mL (3 Äquiv.)	100 %
2	0.10 mL (2 Äquiv.)	100 %
3	0.05 mL (1 Äquiv.)	72 %
4	-	0 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon (**2a**) (97.0 mg, 0.30 mmol), 1.5 mL Acetonitril, Triethylsilan, 1.5 mL (65 Äquiv., 19.5 mmol) Trifluoressigsäure. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt.

Eine Reduktion der Triethylsilanmenge von 3 auf 2 Äquiv. war ohne Umsatzeinbußen möglich (Eintrag 2). Wurde die Menge jedoch auf 1 Äquiv. weiter abgesenkt, konnten nur noch 72 % Umsatz beobachtet werden (Eintrag 3). Die Blindprobe ohne Zugabe von Triethylsilan zeigte keine Reaktion und bestätigt somit den Bedarf des Reduktionsmittels für die Umsetzung (Eintrag 4).

Die Optimierungsversuche lieferten folgende Standardbedingungen: Bei einer Reaktionstemperatur von 75 °C, einer Flussrate von 8 mL/h, was einer Reaktionszeit von 40 Minuten entspricht, konnte mit 2 Äquiv. Triethylsilan in Acetonitril als Lösungsmittel, das *N*-Methyl-Alanin (**3a**) in 97 % Ausbeute isoliert werden, wenn ein stetiger Fluss von TFA über die Membran sichergestellt wird.

Die literaturbekannte Durchführung nach Freidinger ermöglichte im Kolben nach 24 Stunden Reaktionszeit die Synthese von *N*-Methyl-Alanin (**3a**) in 98 % Ausbeute. Eine Übertragung der für den Durchflussreaktor ermittelten optimalen Bedingungen auf einen Batchansatz, in dem alle Substrate im Kolben bei 75 °C gerührt wurden, lieferte erst nach 1.5 Stunden einen vollständigen Umsatz. Zudem wurden einige nicht näher identifizierte Nebenprodukte gemeinsam mit dem gewünschten Produkt **3a** isoliert.

Somit konnte *N*-Methyl-Alanin (**3a**) im Tube-in-Tube-Reaktor verglichen mit dem diskontinuierlichen Ansatz in deutlich kürzerer Zeit, analysenrein und in hoher Ausbeute erhalten werden.

Zur Untersuchung der Anwendungsbreite dieser optimierten Durchflusssynthese wurden im Folgenden verschiedene Fmoc-Aminosäuren zu *N*-Methylaminosäuren im Tube-in-Tube-Reaktor umgesetzt. Dazu mussten zunächst die entsprechenden Oxazolidinone nach der Literaturvorschrift<sup>[54]</sup> synthetisiert werden. Die isolierten Oxazolidinonsubstrate **2b-g** sind in Tabelle 3.5 zusammengetragen.

Tabelle 3.5: Isolierte Oxazolidinone aus der Batchsynthese

R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, **1b**  
 = CH<sub>2</sub>OBn, **1c**  
 = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOBn, **1d**  
 = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, **1e**  
 = CH<sub>2</sub>Ph, **1f**  
 = CH<sub>2</sub>Ph-4-Br, **1g**

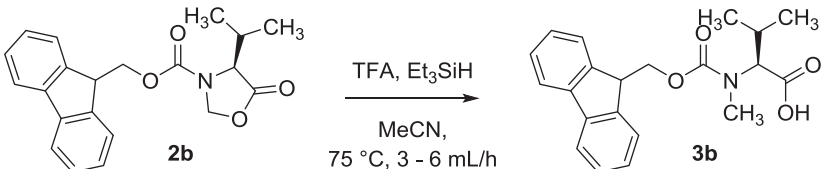
Oxazolidinon	Ausbeute	Oxazolidinon	Ausbeute
 <b>2b</b>	90 %	 <b>2c</b>	99 %
 <b>2d</b>	98 %	 <b>2e</b>	94 %
 <b>2f</b>	81 %	 <b>2g</b>	95 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-Aminosäuren (**2b-g**), *p*-TsOH und Paraformaldehyd in Toluol, 2 h Rückfluss. Die exakten Reaktionsbedingungen und Substratmengen sind dem Experimentellen Teil Kap. 5.2.1 zu entnehmen. Isolierte Ausbeuten.

Die Auswahl der Substrate ist grundlegend eingeschränkt auf Aminosäuren mit geschützten Seitenketten und säurestabilen Schutzgruppen. Unter dieser Voraussetzung konnte eine Vielzahl an Fmoc-Aminosäuren, darunter aliphatische **2b**, aromatische **2f,g** und funktionalisierte **2c-e** Verbindungen, in sehr guten Ausbeuten zu den entsprechenden Oxazolidinonen umgesetzt werden.

#### *N*-Methylaminosäuren mit aliphatischen Seitenketten

Nach der erfolgreichen *N*-Methylierung des Fmoc-Alanins (**1a**) im Durchflussreaktor, wurde weitere aliphatische, nicht funktionalisierte Aminosäure das Valin-Derivat (**2b**) im Tube-in-Tube-Reaktor unter den optimierten Reaktionsbedingungen umgesetzt (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Optimierung der *N*-Methyl-Valin Synthese im Durchfluss


Eintrag	Et <sub>3</sub> SiH	Flussrate	Umsatz	Ausbeute <sup>a</sup>
1	0.1 mL (2 Äquiv.)	6 mL/h	59 %	-
2	0.15 mL (3 Äquiv.)	”	64 %	-
3	0.1 mL (2 Äquiv.)	3 mL/h	74 %	-
4	0.15 mL (3 Äquiv.)	”	100 %	94 %

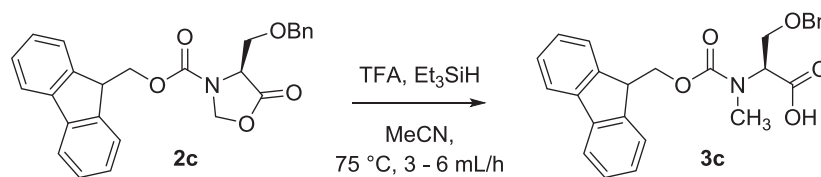
Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Val-Oxazolidinon (**2b**) (105 mg, 0.30 mmol), Triethylsilan, Trifluoressigsäure (1.5 mL, 19.5 mmol, 65 Äquiv.), 1.5 mL Acetonitril. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. <sup>a</sup> Isolierte Ausbeuten.

Trotz der dem Modellsubstrat ähnlichen, aliphatischen Seitenkette, konnte für das Valin-Oxazolidinon (**2b**) unter den Standardbedingungen nur ein Umsatz von 59 % verzeichnet werden (Eintrag 1). Die Erhöhung der Triethylsilan-Konzentration von 2 auf 3 Äquiv. führte zu einer minimalen Umsatzsteigerung auf 64 % (Eintrag 3). Die Verdopplung der Verweilzeit steigerte die Umsätze dagegen deutlich und in Kombination mit 3 Äquiv. Triethylsilan wurden sogar vollständige Umsätze erzielt (Eintrag 3, 4). Die verlängerte Reaktionszeit kann dadurch erklärt werden, dass die  $\alpha$ -Isopropylgruppe sterisch deutlich anspruchsvoller ist als die Methylgruppe des Modellsubstrats. Dadurch wird die Hydridübertragung vermutlich eingeschränkt und die Reaktion allgemein verlangsamt. Trotzdem konnte das *N*-Methyl-Valin (**3b**) nach einer erhöhten Reaktionszeit von 2 Stunden unter Zugabe von 3 Äquiv. Triethylsilan in einer Ausbeute von 94 % isoliert werden (Eintrag 4).

#### *N*-Methylaminosäuren mit funktionalisierten Seitenketten

Unter den Aminosäuren mit funktionalisierten Seitenketten wurden Serin-, Glutaminsäure- und Methionin-Derivate **2c-e** untersucht.

Tabelle 3.7 zeigt die Optimierungsversuche zur Synthese von *N*-Methyl-Serin (**3c**). Hier wurde ein Benzyl-geschütztes Serin-Substrat verwendet, da andernfalls die freie Hydroxylgruppe analog zum Carboxyl-OH unter den gegebenen Reaktionsbedingungen Cyclisierungen eingehen würde.<sup>[75,96]</sup>

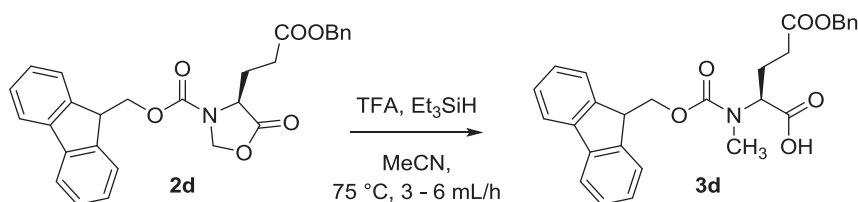
Tabelle 3.7: Optimierung der *N*-Methyl-Serin Synthese im Durchfluss

Eintrag	Et <sub>3</sub> SiH	Flussrate	Umsatz	Ausbeute <sup>a</sup>
1	0.1 mL (2 Äquiv.)	6 mL/h	76 %	-
2	"	3 mL/h	95 %	-
3	0.15 mL (3 Äquiv.)	"	100 %	95 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ser-Oxazolidinon (**2c**) (129 mg, 0.30 mmol), Triethylsilan, Trifluoressigsäure (1.5 mL, 19.5 mmol, 65 Äquiv.), 1.5 mL Acetonitril. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. <sup>a</sup> Isolierte Ausbeuten.

Die Standardbedingungen lieferten einen Umsatz von 76 % (Eintrag 1). Wie bereits bei der Umsetzung des Valin-Derivats **2b**, konnte auch hier der reduzierten Reaktivität, aufgrund des erhöhten sterischen Anspruchs der Seitenkette, durch eine verlängerte Verweilzeit entgegen gewirkt werden. Bei einer Flussrate von 3 mL/h sind 95 % des Edukts **2c** umgesetzt worden (Eintrag 2) und bei Verwendung von 3 Äquiv. Triethylsilan verlief die Reaktion vollständig, sodass das Produkt **3c** in 95 % Ausbeute isoliert werden konnte (Eintrag 3).

Zur Synthese von *N*-Methyl-Glutaminsäure (**3d**) wurde ebenfalls ein Benzyl-geschütztes Substrat herangezogen, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Die Optimierungen hierzu sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8: Optimierung der *N*-Methyl-Glutaminsäure Synthese im Durchfluss

Eintrag	Et <sub>3</sub> SiH	Flussrate	Umsatz	Ausbeute <sup>a</sup>
1	0.1 mL (2 Äquiv.)	6 mL/h	56 %	-
2	"	3 mL/h	100 %	80 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Glu-Oxazolidinon (**2d**) (141 mg, 0.30 mmol), Triethylsilan, Trifluoressigsäure (1.5 mL, 19.5 mmol, 65 Äquiv.), 1.5 mL Acetonitril. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. <sup>a</sup> Isolierte Ausbeuten.

Unter den für das Alanin-Oxazolidinon **2a** optimierten Bedingungen wurden im Fall des Glutaminsäure-Derivats (**2d**) lediglich 56 % des Edukts umgesetzt (Eintrag 1). Jedoch genügte hier bereits eine Halbierung der Flussrate auf 3 mL/h, um 100 % Umsatz zu erreichen und das Produkts **3d** in 80 % Ausbeute zu isolieren (Eintrag 2).

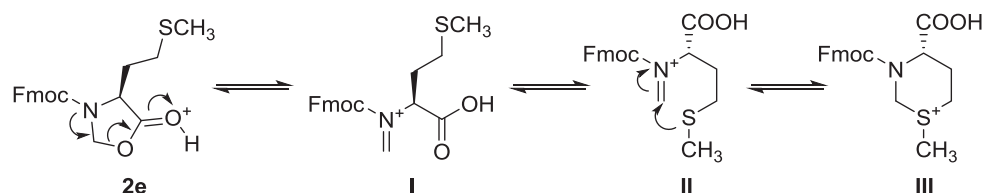
Als Herausforderung erwies sich die Optimierung der *N*-Methyl-Methionin-Synthese (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Optimierung der *N*-Methyl-Methionin Synthese im Durchfluss

Eintrag	Et <sub>3</sub> SiH	Flussrate	Prod. : Nebenprod.	Ausbeute <sup>a</sup>
1	0.1 mL (2 Äquiv.)	6 mL/h	17 % : 83 %	-
2	”	3 mL/h	23 % : 77 %	-
3	0.15 mL (3 Äquiv.)	”	47 % : 53 %	42 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Met-Oxazolidinon (**2e**) (115 mg, 0.30 mmol), Triethylsilan, Trifluoressigsäure (1.5 mL, 19.5 mmol, 65 Äquiv.), 1.5 mL Acetonitril. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Produkt : Nebenproduktverhältnisse ergeben sich aus den integrierten Signalverhältnissen im <sup>1</sup>H-NMR.<sup>9</sup> Isolierte Ausbeuten.

Obwohl bei allen Durchflussreaktionen vollständige Umsätze beobachtet wurden, konnten unter den optimierten Reaktionsbedingungen maximal 42 % des *N*-Methyl-Methionins (**3e**) isoliert werden. Freidinger et al. beschreiben für dieses Substrat ebenfalls eine geringe Ausbeute von lediglich 22 % bei einer verlängerten Reaktionszeit von 5 Tagen. Die Ursache ist eine nachgewiesene, konkurrierende Nebenreaktion bei diesem Substrat (Schema 3.3).



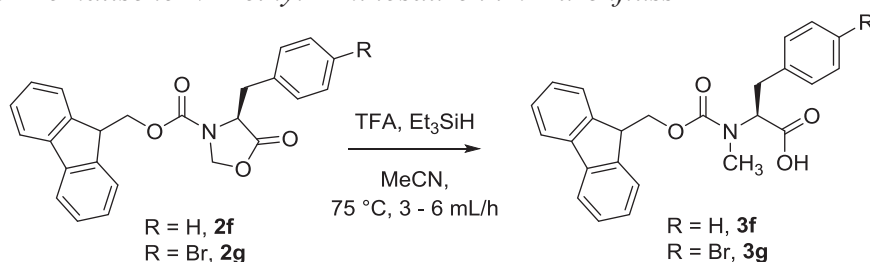
Schema 3.3: Formuliere Nebenreaktion bei der *N*-Methyl-Methionin Synthese

Dabei handelt es sich um eine von Hughes et al. beschriebene Umlagerung,<sup>[16]</sup> bei der nach Protonierung des Carbonylsauerstoffs der Ring geöffnet wird (**I**) und der Schwefel das Iminium intramolekular als Nucleophil (**II**) unter Ausbildung eines 1,3-Thiazinanderivats (**III**) angreift noch bevor die Hydridübertragung vom Silan erfolgen kann.

Bei geringen Triethylsilanmengen ist daher die Bildung des Nebenprodukts (**III**) besonders stark ausgeprägt (Eintrag 1, 2). Durch Erhöhung der Triethylsilanmenge konnte allerdings die Hydridübertragung auf das Intermediat **I/II** beschleunigt und die Bildung des Nebenprodukts (**III**) zurückgedrängt werden (Eintrag 3).

*N-Methylaminosäuren mit aromatischen Seitenketten*

Unter den aromatischen Aminosäuren wurden Phenylalanin- und das 4-Brom-Derivat des Phenylalanins **2g,f** im Tube-in-Tube-Reaktor untersucht. Das bromierte Substrat **3g** bietet durch seine Funktionalisierung die Möglichkeit einer späteren Substitution. Aus Kostengründen wurden für das Oxazolidinon **2f** jedoch nicht alle Parameter untersucht, sondern direkt die optimierten Reaktionsbedingungen des Phenylalanins angewandt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 zusammengetragen.

Tabelle 3.10: *Aromatische N-Methyl-Aminosäuren im Durchfluss*

Eintrag	R=	Et <sub>3</sub> SiH	Flussrate	Umsatz	Ausbeute <sup>a</sup>
1	H	0.10 mL (2 Äquiv.)	6 mL/h	80 %	-
2	H	"	3 mL/h	92 %	-
3	H	0.15 mL (3 Äquiv.)	"	94 %	90 %
4	Br	0.10 mL (2 Äquiv.)	"	100 %	91 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Phe-Oxazolidinon (**2f**) (120 mg, 0.30 mmol), Fmoc-L-4-Br-Phe-Oxazolidinon (**2g**) (96.9 mg, 0.30 mmol), Triethylsilan, Trifluoressigsäure (1.5 mL, 19.5 mmol, 65 Äquiv.), 1.5 mL Acetonitril. Alle Reaktionen wurden in einer zuvor lösungsmittelfreien Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. <sup>a</sup> Isolierte Ausbeuten.

Mit dem Phenylalanin-Derivat **2f** konnte bereits unter den Standardbedingungen ein Umsatz von 80 % erreicht werden (Eintrag 1). Analog zu den vorangehenden Substraten wurde eine zusätzliche Umsatzsteigerung auf 92 % durch eine verdoppelte Verweilzeit ermöglicht (Eintrag 2). Eine Erhöhung der Triethylsilanmenge auf 3 Äquiv. steigerte die Produktbildung nur noch minimal auf 94 % und lieferte das *N*-Methyl-Phenylalanin (**3f**) in 90 % Ausbeute (Eintrag 3).

Unter den für das Phenylalanin-Oxazolidinon **2f** optimierten Reaktionsbedingungen wurde für das bromierte Edukt **3g** direkt ein Umsatz von 100 % erreicht und das Produkt **3g** anschließend in einer Ausbeute von 91 % isoliert (Eintrag 4).

Die erstmalige flüssig-flüssig-Transfer-Anwendung von Teflon<sup>®</sup> AF 2400 als Membran in einem Tube-in-Tube-Reaktor, ermöglichte eine milde und schnelle Synthese von Fmoc-*N*-Methylaminosäuren im Durchfluss. Dadurch können problemlos Synthesen größerer Produktmengen in, verglichen zur konventionellen Methode, stark verkürzter Zeit hergestellt

werden. Zahlreiche *N*-Methylaminosäuren **3a-g** konnten im Rahmen dieser Arbeit in guten bis sehr guten Ausbeuten synthetisiert werden. Dabei wiesen alle isolierten Oxazolidinone und *N*-Methylaminosäuren im NMR-Spektrum Signalverdopplungen sowie teilweise verminderte Signalschärfen auf. Dies ist auf das Vorliegen von Rotameren zurückzuführen, welche u. a. klar an den doppelt vorhandenen *N*-Methylsignalen identifiziert werden können.

### 3.1.2 Synthese der Oxazolidinone

Nachdem die Synthese der *N*-Methylaminosäuren erfolgreich im Durchfluss realisiert werden konnte, wurde anschließend untersucht, ob auch die Oxazolidinonsynthese in einem Tube-in-Tube-Reaktor zu bewerkstelligen ist. Klassisch wird in dieser ersten Stufe die entsprechende Fmoc-Aminosäure **1** mit *para*-Toluolsulfonsäure und Paraformaldehyd in Toluol zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Hierbei wäre es vorteilhaft, die Handhabung von Paraformaldehyd in offenen Behältern zu vermeiden und stattdessen gasförmigen Formaldehyd in einem geschlossenen System zu verwenden.

Unter Verwendung eines Tube-in-Tube-Reaktors kann dabei Formaldehydgas über die Teflon<sup>®</sup> AF-Membran ins Innere der Kapillare gezielt in die Reaktionslösung eingeleitet und überschüssiges Gas am Ende des Reaktors kontrolliert abgeleitet und abgefangen werden. Der erste Reaktorentwurf zur Oxazolidinonsynthese basierte auf dem bereits zur reduktiven Ringöffnung eingesetzten Tube-in-Tube-Reaktor und ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.

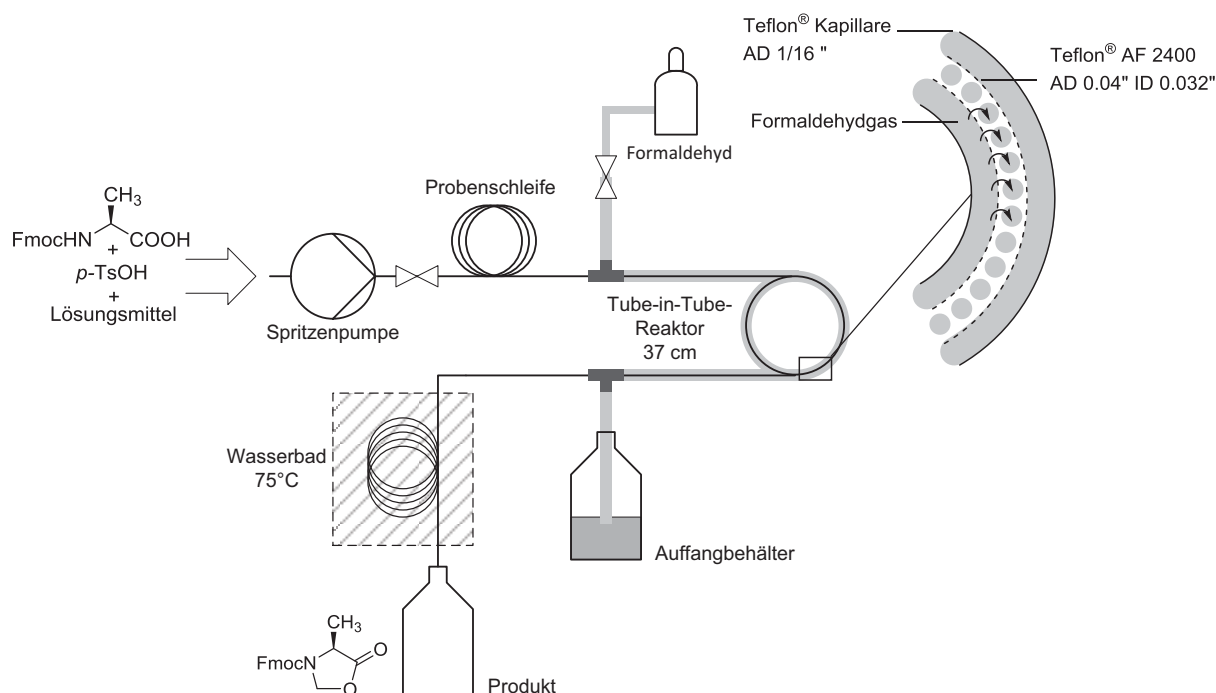


Abbildung 3.2: Tube-in-Tube-Reaktor erster Generation zur Oxazolidinonsynthese

Der Reaktor besteht aus einer Spritzenpumpe, welche die Fmoc-Aminosäure und *p*-TsOH gelöst in einem Lösungsmittel befördert, sowie PTFE-Kapillaren (AD: 3.2 mm, ID: 1.6 mm) als Probenschleife ( $V = 1.5$  mL), dem Verweilelement ( $V = 5$  mL) und dem bereits in Kap. 3.1.1 beschriebenen Tube-in-Tube-System, hier bestehend aus einer 37 cm langen Teflon<sup>®</sup> AF 2400-Kapillare (AD: 1.00 mm, ID: 0.8 mm).

Vor der Optimierung der Synthese musste zunächst ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden, da Formaldehyd in manchen organischen Medien eine geringe Löslichkeit aufweist. In Voruntersuchungen wurden dazu von Dipl.-Chem. Dominik Karl Löslichkeitstests von Formaldehyd in Toluol sowie Acetonitril durchgeführt, wobei das polare Acetonitril deutlich bessere Löslichkeitseigenschaften zeigte. Andere organische Lösungsmittel sind aufgrund der eingeschränkten Substratlöslichkeit für die Synthese nicht geeignet, sodass Acetonitril als Solvens für diese Umsetzung ausgewählt wurde.

Im nächsten Schritt musste eine zuverlässige Formaldehydgas-Quelle gefunden werden. Dabei bieten sich zwei Möglichkeiten an. Zum einen entsteht Formaldehydgas durch Oxidation von MeOH mit CuO (Methode A) und zum anderen kann Paraformaldehyd durch Erhitzen depolymerisiert werden (Methode B). Beide Verfahren erzeugen gasförmigen Formaldehyd, der mit Schiff-Reagenz<sup>[97]</sup> und damit auch die Diffusion durch die Teflon<sup>®</sup> AF 2400-Membran nachgewiesen werden kann. Diese Gaserzeugungsmethoden wurden auf ihre Eignung in der Durchflusssynthese untersucht (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Erste Optimierungsschritte zur Oxazolidinonsynthese im Tube-in-Tube-System

Reaction scheme: Fmoc-L-Ala (**1a**) + HCHO  $\xrightarrow[\text{MeCN, 75 °C, 3-6 mL/h}]{p\text{-TsOH}}$  Oxazolidinone (**2a**)

Eintrag	Formaldehyd-Quelle	Flussrate	Druck	Umsatz
1	Methode A	3 mL/h	-	0 %
2	Methode B	6 mL/h	1.4 - 1.8 bar	0 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ala (**1a**) (95.2 mg, 0.31 mmol), *p*-TsOH (18.9 mg, 0.11 mmol), 1.5 mL Acetonitril. Umsätze wurden mittels NMR bestimmt. Methode A: Formaldehydgas aus der Oxidation von MeOH mit CuO. Methode B: Formaldehydgas durch Erhitzen von Paraformaldehyd.

Bei Methode A wurde MeOH in einem verschlossenen, separaten Behälter auf CuO getropft und das entstandene Gas in die äußere Kapillare des Tube-in-Tube-Reaktors eingeleitet (siehe Abbildung 3.2). Zu Beginn waren die Reaktionsbedingungen zunächst angelehnt an die Synthese im Kolben, d. h. durch eine Flussrate von 3 mL/h wurde eine Reaktionszeit von 2 Stunden imitiert und die Umsetzung im siedenden Lösungsmittel wurde für Acetonitril

(Sdp.: 82 °C) durch eine Wasserbadtemperatur von 75 °C realisiert. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen konnte bei diesem Reaktoraufbau für Fmoc-Ala-OH (**1a**) als Modellsubstrat kein Umsatz beobachtet werden (Eintrag 1). Ursache waren fehlende Ventile an den Reaktorausgängen, sodass das erzeugte Formaldehydgas entwich ohne die Membran zu passieren.

Im nächsten Versuch wurden daher zusätzliche Ventile am Reaktorausgang und vor dem Auffangbehälter angebracht sowie sublimierter Paraformaldehyd als Gasquelle verwendet (Eintrag 2). Durch die Ventile wurde das System abgeschlossen und dadurch ein gewisser Innendruck erzeugt, der einerseits das Formaldehydgas zur Permeation zwang und andererseits die Anwendung von Acetonitril nahe der Siedetemperatur, ohne gasförmig zu entweichen, erlaubte. Obwohl die Handhabung von CuO und MeOH erheblich einfacher ist, erwies sich die Formaldehydgaserzeugung durch das Erhitzen von Paraformaldehyd als wesentlich effektivere Methode, da konstante und größere Gasmengen erzeugt werden können. Dennoch wurde trotz erzeugtem Gasdruck auch nach Methode B keine Reaktion beobachtet. Stattdessen zeigten sich zahlreiche weitere Schwachpunkte im Reaktoraufbau als Ursache für das Ausbleiben der Reaktion.

Da durch das angebrachte Nadelventile am Reaktorausgang ein erhöhter Innendruck im System aufgebaut wurde, konnte die Spritzenpumpe nicht mehr zur Förderung der Reaktionslösung verwendet, sondern musste durch eine HPLC-Pumpe ersetzt werden. Außerdem ist Formaldehydgas nur bei einer Temperatur zwischen 80 und 100 °C stabil. Bei tieferen Temperaturen polymerisiert es wieder zu Paraformaldehyd. Dies wurde auch experimentell als farblose Abscheidungen auf der Membran beobachtet, welche die Poren verschloss und die weitere Permeation dadurch verhinderte. Daher wurde der Tube-in-Tube-Reaktor vollständig in ein Wasserbad versenkt und die Temperatur auf 80 °C erhöht. Der schematische Aufbau dieses modifizierten Tube-in-Tube-Reaktors ist in Abbildung 3.3 gezeigt.

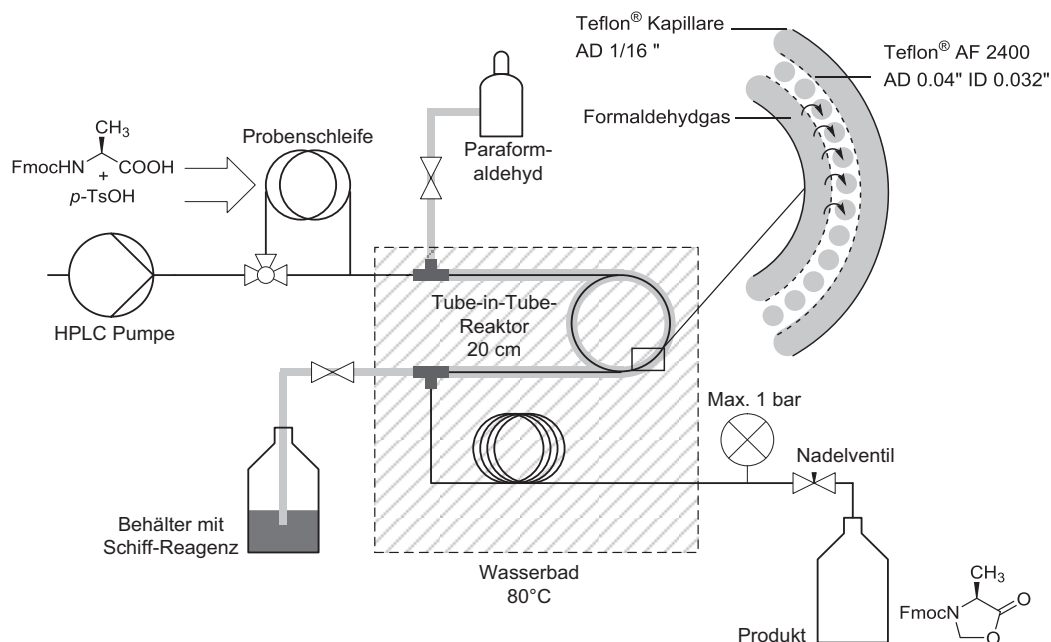
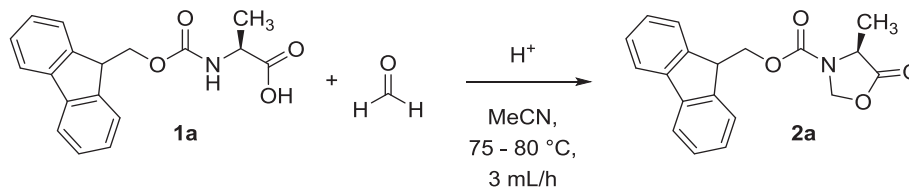


Abbildung 3.3: Optimierter Tube-in-Tube-Reaktor zur Oxazolidinonsynthese

Die Ergebnisse zur Oxazolidinonsynthese im Tube-in-Tube-Reaktor zweiter Generation sowie die Reaktionsparameter sind in Tabelle 3.12 zusammengetragen. Die detaillierte Versuchsdurchführung dazu ist in Kap. 5.2.1.1 beschrieben.

Tabelle 3.12: Optimierung der Oxazolidinonsynthese im Tube-in-Tube-Reaktor



Eintrag	Temperatur	Säure	Druck	Umsatz	Ausbeute <sup>a</sup>
1	75 - 80 °C	<i>p</i> -TsOH	0.5 - 1.0 bar	100 %	91 %
2	80 °C	TFA	”	100 %	87 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ala (**1a**) (96.5 mg, 0.31 mmol), *p*-TsOH (18.9 mg, 0.11 mmol), Trifluoressigsäure (0.05 mL, 0.65 mmol), Formaldehydgas erzeugt durch Erhitzen von Paraformaldehyd, 1.5 mL Acetonitril. Reaktionen wurden in einer mit Lösungsmittel gefluteten Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels NMR bestimmt. <sup>a</sup> Isolierte Ausbeuten.

Die Synthese wurde zunächst bei 75 °C gestartet, die Temperatur jedoch rasch auf 80 °C erhöht, um Polymerisationen des Paraformaldehyds zu verhindern. Nach 2 Stunden waren hierbei 100 % des Modellsubstrats **1a** zum Oxazolidinon **2a** umgesetzt, das mit einer Ausbeute von 91 % isoliert wurde (Eintrag 1). Im Hinblick auf die Entwicklung eines kontinuierlichen Gesamtprozesses aus Oxazolidinonsynthese und reduktiver Ringöffnung wäre die Verwendung der gleichen Säure vorteilhaft. Der Einsatz von TFA anstelle von *p*-TsOH bei der Oxazolidinonsynthese lieferte ebenfalls einen vollständigen Umsatz, jedoch entstanden Neben-

produkte, sodass im Folgenden weiterhin auf *p*-TsOH als Säurekatalysator zur Oxazolidinon-synthese zurückgegriffen wurde.

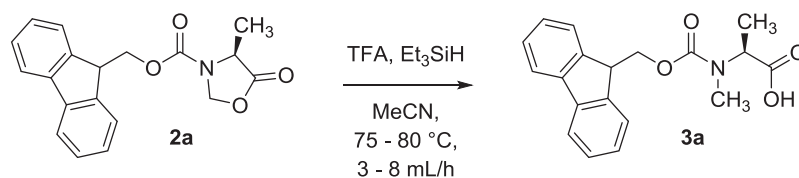
Somit ließ sich im Rahmen dieser Arbeit auch die Oxazolidinonsynthese am Beispiel eines Modellsubstrats **1a**, im Tube-in-Tube-Durchflusssystem erfolgreich realisieren. Hierbei konnte erzeugtes Formaldehydgas nach einigen Modifikationen am Reaktor durch die Membran in die Reaktionslösung eingeleitet und so Fmoc-Alanin **1a** in das entsprechende Oxazolidinon **2a** in sehr guter Ausbeute überführt werden.

### 3.1.3 Gesamtprozess zur *N*-Methylaminosäuresynthese

Nachdem die einzelnen Stufen zur *N*-Methylaminosäuresynthese unabhängig voneinander verwirklicht werden konnten, wurde versucht beide Stufen zu einem großen Tube-in-Tube-Reaktor zu kombinieren. Hierzu mussten zunächst die Reaktionsbedingungen beider Stufen aneinander angepasst und optimiert werden.

Die syntheses Technische Anpassung der ersten Stufe an die zweite wäre aufgrund der Druck- und Temperaturrestriktionen bei der Verwendung von Formaldehydgas wesentlich anspruchsvoller. Daher wurden die Reaktionsbedingungen der zweiten Stufe an die der ersten angeglichen. Rein technisch wurde bisher für die Durchführung der zweiten Stufe eine Spritzenpumpe zur Beförderung des Lösungsmittels und der Substrate verwendet. Darüber hinaus war die Apparatur zu Beginn jeder Synthese lösungsmittelfrei. Bei der Oxazolidinonsynthese im Durchfluss musste allerdings zur Gewährleistung eines bestimmten Reaktordrucks eine HPLC-Pumpe verwendet werden. Durch den damit vorhandenen, permanenten Lösungsmittelfluss, kommt es zu einer starken Verdünnung der TFA, sodass die Reaktorparameter nachoptimiert werden mussten (Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13: Anpassung der Synthesebedingungen an die erste Stufe



Eintrag	Temperatur	Flussrate	Umsatz
1	75 °C	6 mL/h	92 %
2	”	3 mL/h	100 %
3	80 °C	”	100 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon (**2a**) (97.0 mg, 0.30 mmol), 0.10 mL (2 Äquiv., 0.63 mmol) Triethylsilan, 1.5 mL (65 Äquiv., 19.5 mmol) Trifluoressigsäure 1.5 mL Acetonitril. Alle Reaktionen wurden in einer mit Lösungsmittel gefluteten Apparatur durchgeführt. Umsätze wurden mittels NMR bestimmt.

In dieser mit Lösungsmittel gefluteten Apparatur konnte unter den etablierten Bedingungen für das Alanin-Modellsubstrat **2a** kein vollständiger Umsatz erreicht werden (Eintrag 1). Wurde die Flussrate allerdings auf 3 mL/h halbiert, verlief die Reaktion vollständig (Eintrag 2). Zusätzlich konnte die Reaktionstemperatur an die der Oxazolidinonsynthese auf 80 °C angeglichen werden (Eintrag 3).

Diese Anpassung der Reaktionsbedingungen beider Synthesestufen aneinander erlaubte die Zusammenführung beider Tube-in-Tube-Reaktoren. Der schematische Reaktoraufbau für den Gesamtprozess ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

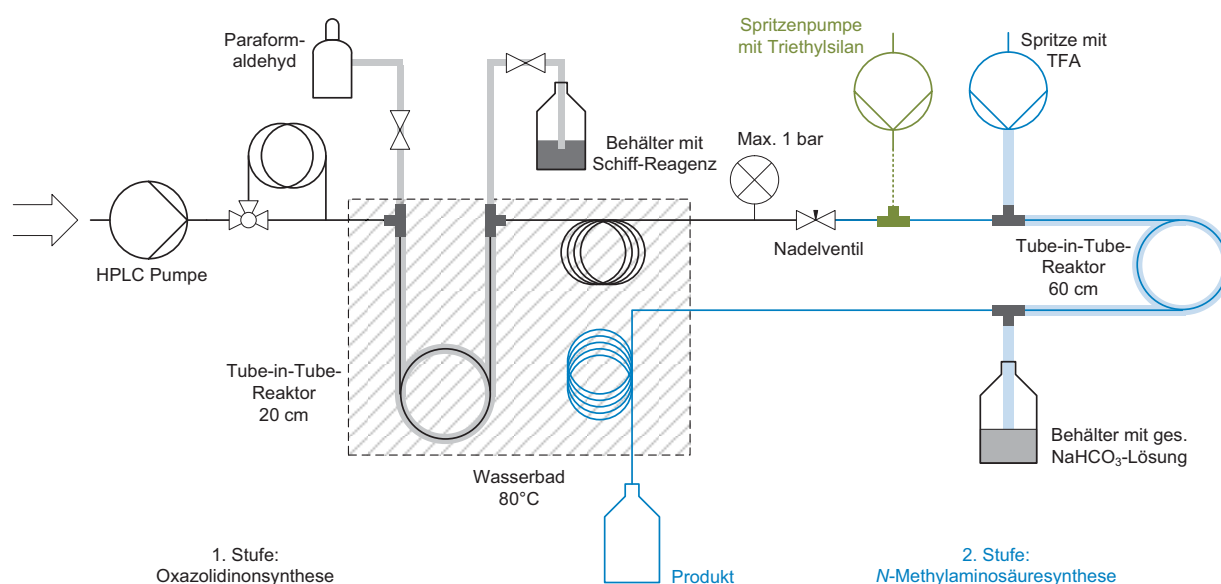


Abbildung 3.4: Gesamtprozess zur N-Methylaminosäuresynthese

Der Reaktor besteht exakt aus der Zusammenlegung beider Einzelreaktoren aus Kap. 3.1.1 und 3.1.2. Der Abschnitt zur Oxazolidinonsynthese ist in Abbildung 3.4 grau/schwarz eingezeichnet, während im blau dargestellten Reaktorteil die reduktive Ringöffnung zu den N-Methylaminosäuren stattfindet.

Im neuen Gesamtreaktor wurde im Folgenden erneut die Umsetzung von Fmoc-Alanin **1a** als Modellsubstrat getestet. Dabei wurden die Aminosäure **1a** mit 0.3 Äquiv. *p*-TsOH in Acetonitril gelöst und 10 statt der bisher 2 - 3 Äquiv. Triethylsilan zugegeben. Danach wurde das Gemisch in die Probenschleife injiziert und bei 3 mL/h befördert. Unter diesen Bedingungen war aber kein Umsatz zu beobachten. Vermutlich wurde das Triethylsilan, trotz des massiven Überschusses, vollständig durch eine Nebenreaktion mit Formaldehyd verbraucht, bevor es zur gewünschten Reaktion kommen konnte.

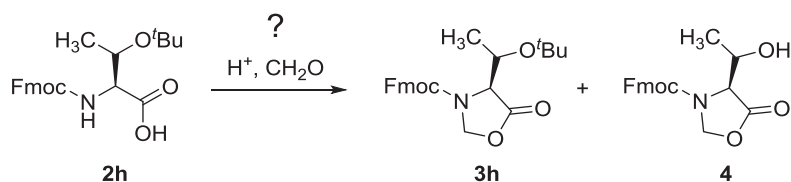
Um den Verbrauch des Triethylsilans durch die Nebenreaktion zu verhindern, wurde das Reduktionsmittel nach einem weiteren Reaktorumbau, separat mittels Spritzenpumpe zudosiert.

Die Einleitung des Triethylsilans erfolgte dabei erst nach der ersten Stufe, aber unmittelbar vor der TFA-Zufuhr. Diese Erweiterung ist in Abbildung 3.4 grün eingezeichnet. Erneut wurde lediglich unumgesetztes Fmoc-Ala-OH (**1a**) erhalten. Dieses Ergebnis zeigt an, dass eine Umsetzung beider Stufen hintereinander in dem vorgestellten Reaktoraufbau nicht möglich ist.

### 3.1.4 Säurelabile Schutzgruppen im Durchflussreaktor

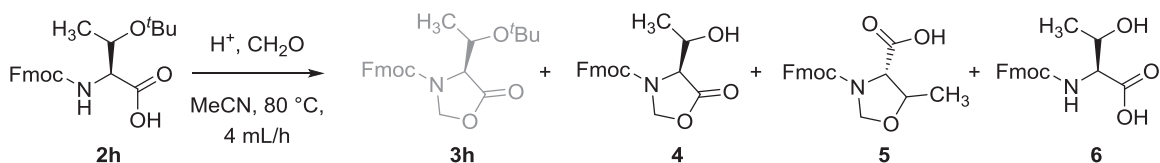
*N*-Methylierungen nach Freidinger<sup>[54]</sup> erweisen sich als sehr schwierig, wenn funktionelle Gruppen der Aminosäure zuvor nicht säurestabil geschützt werden, da freie OH-, NH- oder SH-Gruppen als Nukleophile selbst Cyclisierungen eingehen können (s. Kap. 3.1.1).<sup>[75,96]</sup> Säurelabile Schutzgruppen werden bereits durch *p*-TsOH in der ersten Stufe abgespalten, und so die funktionelle Gruppe freigelegt.

Durch die Verwendung eines Tube-in-Tube-Reaktors unter milden Reaktionsbedingungen, sollte untersucht werden, ob es dennoch möglich ist, Aminosäuren mit säurelabilen Schutzgruppen direkt in die entsprechenden ungeschützten Oxazolidinone umzusetzen. Am Beispiel von Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH (**2h**) wurde die gewünschte Cyclisierung unter gleichzeitiger Schutzgruppenabspaltung analog zu Schema 3.4 untersucht.



Schema 3.4: Umsetzung des Fmoc-Threonins mit säurelabiler Schutzgruppe

Da bei dieser Umsetzung die Säurekonzentration der entscheidende Faktor ist, sollte die Säure in möglichst geringen Mengen kontrolliert zudosiert werden. Dazu wurde der in der *N*-Methylaminosäuresynthese bewährte Tube-in-Tube-Reaktor (Abbildung 3.1) eingesetzt. Anstatt TFA wurde HCl-Gas über die Membran eingeleitet. Die Menge wurde so gering gewählt, dass sie gerade für die Cyclisierung ausreichen sollte, ohne eine Schutzgruppenabspaltung zu verursachen. Das Ergebnis aus der Testsynthese ist in Schema 3.5 gezeigt.



Schema 3.5: Testsynthese mit säurelabilem Substrat im Tube-in-Tube-Reaktor

Unter den ausgewählten Synthesebedingungen entstanden im Durchflussreaktor mindestens drei Produkte, jedoch nicht das gewünschte Zielprodukt **3h**. Mittels HPLC-MS konnte die

Bildung der uncyclisierten Aminosäure **6** und des nicht umgesetzten Edukts **2h** nachgewiesen werden. Zusätzlich fand sich bei der Vermessung der Produktlösung eine Masse, die auf die Bildung des deblockierten Oxazolidinons **4** hinweist. Das in der Literatur<sup>[75,96]</sup> beschriebene Nebenprodukt **5** besitzt jedoch die identische Masse, sodass in diesem Fall möglicherweise beide Produkte entstanden sein könnten.

Auch durch weitere Modifikationen im Reaktoraufbau gelang keine gezielte Oxazolidinon-synthese. Dies zeigt, dass eine Umsetzung von Aminosäuren mit säurelabilen Schutzgruppen, auch in dem verwendeten Tube-in-Tube-Reaktor nicht ohne Weiteres möglich ist.

## 3.2 Vakzinsynthese auf Basis des *N*-methylierten MUC1-Glycopeptids

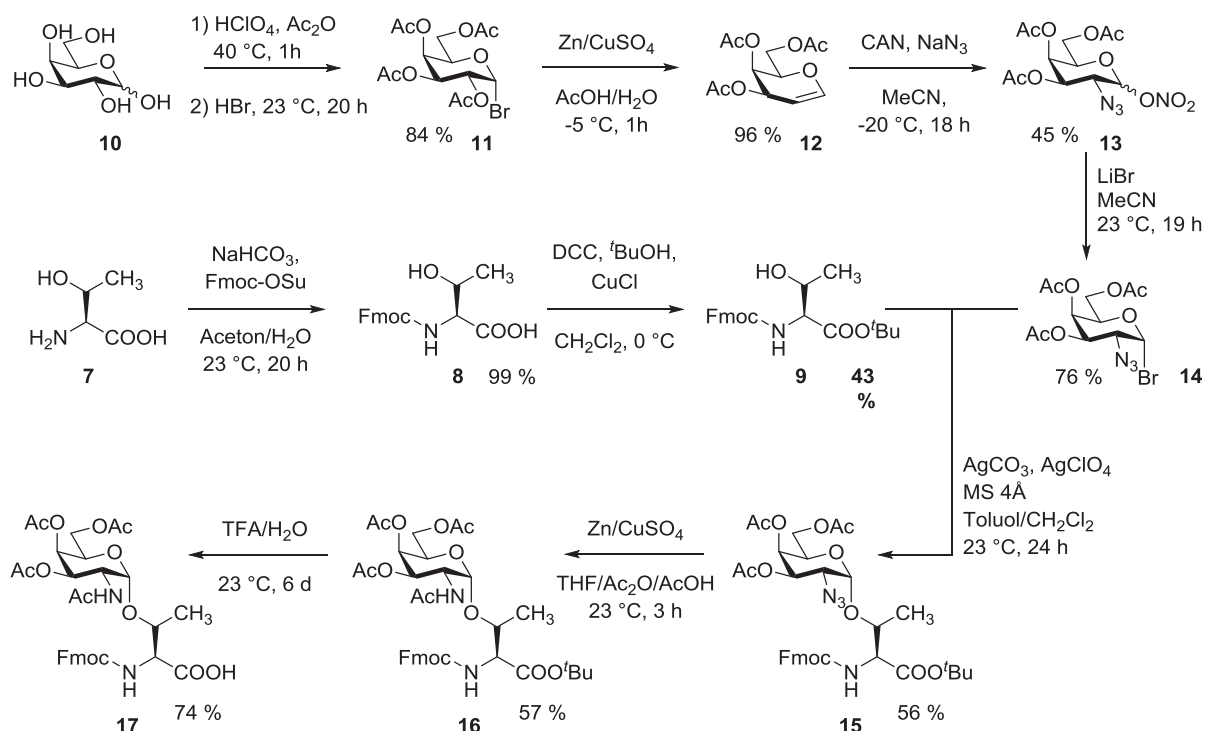
Die Synthese einer *N*-Methylglycopeptid-Antigen enthaltenden Antitumorvakzine erfolgt in vier Schritten. Zunächst wird der *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Baustein (T<sub>N</sub>-Thr) in einer 7+2-stufigen Synthese aufgebaut. Anschließend wird das T<sub>N</sub>-Thr *N*-methyliert und danach mittels Festphasensynthese in das Glycopeptid integriert. Durch die darauffolgende Konjugation an immunogene Proteine entsteht die vollsynthetische Antitumorvakzine, die das *N*-methylierte MUC1-Glycopeptid enthält.

### 3.2.1 Synthese des *N*-Acetylgalactosamin-Threonin-Konjugats

Das T<sub>N</sub>-Antigen besteht aus einem *N*-acetylierten Galactosamin, welches *O*-glycosidisch an Threonin oder Serin gebunden ist. Es hat vor allem als Bestandteil in Glycopeptiden eine immunologische Bedeutung.<sup>[17]</sup> Bereits 1986 wurden diese T- und T<sub>N</sub>-Strukturen von Kunz et al. synthetisiert und in Peptide integriert,<sup>[19]</sup> um Antigene zur Immunisierung zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das geschützte T<sub>N</sub>-Threonin **17** unter Mitarbeit von [REDACTED] hergestellt. Dazu wurde zunächst ausgehend von D-Galactose (**10**) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy-galactosylbromid (**14**) synthetisiert. Der Baustein diente als Donor zur Glycosylierung<sup>[98,99]</sup> eines Threonin-Derivats, welches zuvor am *N*-Terminus Fmoc und am *C*-Terminus *tert*-Butyl geschützt (**9**) wurde. Ein Überblick über die gesamte T<sub>N</sub>-Thr-Synthese ist in Schema 3.6 dargestellt.

Zunächst wurde L-Threonin (**7**) in zwei Stufen modifiziert. In der ersten Stufe konnte in 99 % Ausbeute der Aminoterminus mittels *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)succimidylcarbonat (Fmoc-OSu) Fmoc-geschützt werden.<sup>[100]</sup> Die zweite Stufe ist eine von CuCl vermittelte Veresterung mit *tert*-Butanol, die den Fmoc-Thr-*t*Bu-Ester (**9**) in 43 % Ausbeute lieferte.<sup>[101]</sup>



Schema 3.6: Synthese des  $T_N$ -Thr-Konjugats im Überblick

Der Aufbau des Galactosamin-Bausteins **14** erfolgte in fünf Stufen. Zuerst wurde D-Galactose (**10**) vollständig acetyliert und anschließend mit 33 %iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig in das  $\alpha$ -Galactosylbromid **11** überführt.<sup>[102]</sup> Die darauffolgende reduktive Eliminierung von Bromid und Acetat erfolgte mittels aktiviertem Zink und lieferte das Galactal **12** in einer Ausbeute von 96 %.<sup>[103]</sup> Im Folgenden wurde das Galactal **12** mit Hilfe von Cerammoniumnitrat (CAN) und Natriumazid in einer von Lemieux et al. beschriebenen Radikalreaktion zum Azidonitrat **13** umgesetzt.<sup>[104]</sup> Anschließend konnte der Azidogalactosylbromid-Donor **14** unter wasserfreien Bedingungen mit trockenem LiBr in Acetonitril in 76 % Ausbeute selektiv als  $\alpha$ -Anomer erhalten werden.<sup>[104]</sup>

Die Kupplung des Galactose- (**14**) und des Threonin-Bausteins (**9**) erfolgte durch eine Königs-Knorr-Glycosylierung nach Paulsen.<sup>[98,105]</sup> Dabei wurde das Threonin-Derivat **9** mit Silbercarbonat und Silberperchlorat unter wasserfreier Argon-Atmosphäre vorgelegt und unter Lichtausschluss das Galactosylbromid **14** zugegeben.<sup>[106]</sup> Obwohl die Bildung des  $\alpha$ -Anomers aufgrund des anomeren Effekts bevorzugt ist, wurde dennoch ein  $\alpha,\beta$ -Gemisch erhalten. Das  $\beta$ -Anomer konnte chromatographisch abgetrennt und das anomereneine Kupplungsprodukt **15** in einer Ausbeute von 56 % isoliert werden.

Im weiteren Verlauf wurde die Azidofunktion an C-2 durch mit Kupfersulfat behandeltem Zink reduziert und gleichzeitig durch das Gemisch aus THF/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1) *N*-acetyliert.<sup>[107]</sup> Für den Einsatz in der Festphasenglycopeptidsynthese musste zuletzt noch

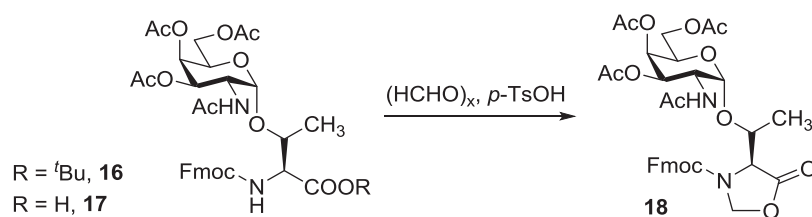
die Carboxylfunktion freigelegt werden. Dies gelang mit Trifluoressigsäure in Gegenwart von Wasser in 74 % Ausbeute.<sup>[22]</sup> Somit wurde der geschützte T<sub>N</sub>-Thr-Baustein **17** in einer Gesamtausbeute von 7 % aus D-Galactose erhalten.

### 3.2.2 *N*-Methylierung von Glycosylaminosäuren

Der starke Einfluss einer *N*-Methylgruppe auf die physikalischen Eigenschaften des modifizierten Moleküls wurde bereits in Kap. 3.1.1 ausführlich beschrieben. Durch fehlende Wasserstoffbrücken,<sup>[58]</sup> induzierte *turn*-Strukturen<sup>[57]</sup> oder die Ausbildung äquivalenter *cis/trans*-Konfigurationen<sup>[55,56]</sup> wird die Peptid-Konformation stark verändert. Eine solche Konformationsänderung durch die Einführung einer *N*-Methylgruppe kann z. B. in MUC1-Glycopeptiden neben dem Glycosylierungsmuster entscheidend für die Tumorselektivität der resultierenden Vakzine sein.

Bisher sind weder eine *N*-Methylierung des T<sub>N</sub>-Antigens in der Literatur beschrieben, noch ist der Einfluss einer *N*-Methylgruppe auf die Vakzine bekannt. Dies soll aber nach erfolgreicher *N*-Me-T<sub>N</sub>-Synthese im späteren Verlauf untersucht werden. Dazu erfolgte zunächst die *N*-Methylierung des T<sub>N</sub>-Threonins bereits auf der Stufe des T<sub>N</sub>-Bausteins, da eine nachträgliche, selektive Substitution am fertigen Peptid nahezu unmöglich ist. Wie bereits in Kap. 3.1.1 beschrieben gibt es zahlreiche Methoden eine *N*-Methylgruppe einzuführen, wovon allerdings viele unter basischen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden müssen. In Anbetracht des stark funktionalisierten, gegenüber Basen zur  $\beta$ -Eliminierung neigenden Substrats ist daher die säurekatalysierte Synthese nach Freidinger et al.<sup>[54]</sup> am besten für diese Umsetzung geeignet.

Ausgehend von Freidingers Reaktionsbedingung wurde zunächst die Oxazolidinonsynthese optimiert (Tabelle 3.14). Unter Katalyse durch *p*-TsOH sollte hier selektiv der Formaldehyd aktiviert werden, ohne dabei die hydrolyseempfindliche *O*-glycosidische Bindung zu spalten. Im Allgemeinen sind  $\alpha$ -*O*-glycosidische Bindungen *O*-acetylierter Glycane weniger empfindlich gegenüber säurekatalysierter Hydrolyse als  $\beta$ -*O*-glycosidische Bindungen, sodass eine Spaltung des vorliegenden  $\alpha$ -*O*-Glycosids relativ unwahrscheinlich ist. Als Substrat diente zunächst das Fmoc-T<sub>N</sub>-Thr-O<sup>t</sup>Bu **16**, das unter den gegebenen Bedingungen die säurelabile Schutzgruppe während der Ringbildung verlieren sollte, wodurch insgesamt ein Syntheseschritt eingespart werden könnte.

Tabelle 3.14: Optimierung der Reaktionsbedingungen zur T<sub>N</sub>-Thr-Oxazolidinonsynthese

Eintrag	R=	Lösungsmittel	Zeit	Temperatur	Umsatz	Ausbeute
1	<sup>t</sup> Bu	Toluol	3 h	80 °C	n. b.	n. b.
2	"	"	3 h	70 °C	n. b.	70 %
3	"	"	24 h	25 - 65 °C	100 %	43 %
4	"	Chloroform	"	"	100 %	51 %
5	"	Acetonitril	"	"	95 %	82 %
6	"	"	6 d	25 - 60 °C	n. b.	81 %
7	H	"	"	"	n. b.	70 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-O<sup>t</sup>Bu (**16**) (9.50 - 79.8 mg, 13.1 - 110  $\mu$ mol) bzw. Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**17**) (32.7 mg, 48.8  $\mu$ mol), *p*-TsOH 1.0 - 1.5 Äquiv., Paraformaldehyd 50 - 100 mg, 1.0 - 5.0 mL Lösungsmittel. Umsatz wurde über <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. Isolierte Ausbeuten.

In Vorversuchen wurde die Stabilität des Substrats **16** unter den Literaturbedingungen<sup>[54]</sup> untersucht. Dabei wurde das T<sub>N</sub>-Thr **16** zusammen mit Paraformaldehyd und *p*-TsOH in Toluol 3 Stunden wegen der Wärmelabilität des Edukts bei 80 °C und nicht wie beschrieben unter Rückfluss erhitzt (Eintrag 1). Unter diesen Bedingungen wurden neben dem gebildeten Produkt **18** dünnschichtchromatographisch zahlreiche Nebenprodukte beobachtet. Diese konnten allerdings auch mit Hilfe von HPLC-MS Messungen nicht identifiziert werden. Auch bei 70 °C in Toluol war der Umsatz nach 3 Stunden vollständig (DC), aber erneut kam es zur Ausbildung von Nebenprodukten (Eintrag 2). Eine weitere Absenkung der Temperatur auf 25 - 65 °C lieferte erst nach 24 Stunden einen vollständigen Umsatz, jedoch entstanden nun durch die lange Reaktionszeit weitere Nebenprodukte, sodass das Oxazolidinon **18** in nur 43 % Ausbeute erhalten werden konnte (Eintrag 3). Tiefere Temperaturen würden die träge Reaktion nur zusätzlich verlängern, daher wurden zunächst andere Lösungsmittel untersucht. Durch den Einsatz von Chloroform konnte keine Verbesserung erzielt werden. Auch hier war der Umsatz zwar vollständig, aber durch die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte ist die Ausbeute relativ gering. (Eintrag 4). Analog zur *N*-Methylaminosäuresynthese lieferte Acetonitril als Lösungsmittel die besten Ergebnisse, denn es vermag neben der guten Löslichkeit von Paraformaldehyd (s. Kap. 3.1.2) auch die polaren Zwischenstufen besser zu stabilisieren. Die Umsetzung verlief unter diesen Bedingungen nahezu quantitativ (Eintrag 5). Dadurch,

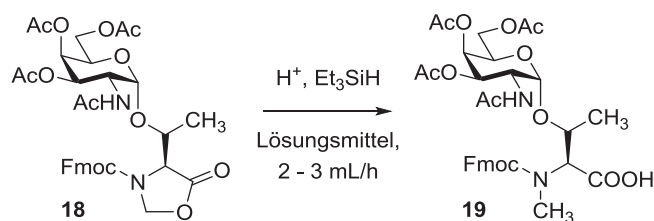
dass kaum Nebenprodukte entstanden konnte die Ausbeute auf 82 % gesteigert werden. Umsatzsteigerungen durch verlängerte Reaktionszeiten von 6 Tagen wurden nicht erreicht (Eintrag 6). Auch durch Nachdosierung von *p*-TsOH oder Paraformaldehyd konnte die Reaktion nicht beschleunigt werden.

Um zu überprüfen, ob die gleichzeitige Deblockierung der Carboxylgruppe die Reaktionsgeschwindigkeit negativ beeinflusst, wurde das Fmoc-T<sub>N</sub>-Thr-OH **17** unter den gleichen Bedingungen zur Reaktion gebracht. Hier jedoch zeigte sich auch nach 6 Tagen dünnschichtchromatographisch kein vollständiger Umsatz (Eintrag 7). Insgesamt konnte bei der Reaktion mit T<sub>N</sub>-Thr-OH **17** keine Verbesserung beobachtet werden, sodass die separate, vorangestellte *tert*-Butylester-Abspaltung durchaus eingespart werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die erste Stufe zur Synthese des *N*-Methyl-T<sub>N</sub>-Threonins erfolgreich entwickelt werden. Die Synthese erfordert lange Reaktionszeiten bei gleichzeitig möglichst milden Reaktionsbedingungen, da es ansonsten zur Ausbildung von Nebenprodukten kommt. Unter diesen Bedingungen konnte das als *t*Bu-Ester geschützte T<sub>N</sub>-Thr **16** in nur einem Syntheseschritt gleichzeitig deblockiert und in hohen Ausbeuten von bis zu 82 % zum Glycosyloxazolidinon **18** umgesetzt werden.

Im nächsten Schritt wurde die reduktive Ringöffnung optimiert. Hierbei wurden, wie bereits bei der *N*-Methylaminosäuresynthese, TFA und TES als Reduktionsreagenzien verwendet. Im Gegensatz zur Oxazolidinonsynthese könnte sich hier die Verwendung der stärkeren Trifluoressigsäure in Kombination mit TES als problematisch gegenüber der hydrolyseempfindlichen *O*-glycosidischen Bindung erweisen, denn es ist bekannt, dass die Kombination aus TFA und TES Acetalbindungen spalten kann.<sup>[108,109]</sup>

Bestärkt durch die sehr guten Ergebnisse aus der *N*-Methylaminosäuresynthese im Tube-in-Tube-Durchflussreaktor (Kap.3.1.1), sollte zunächst diese milde und gleichzeitig beschleunigte Methode auf das vorliegende empfindliche Substrat angewandt werden. Hierzu wurde das Oxazolidinon zunächst unter den zuvor ermittelten Bedingungen im Reaktor (Abbildung 3.1) umgesetzt. Aufgrund der Reaktionsträgheit des Substrats wurde allerdings direkt die doppelte Menge an TES eingesetzt. Die Durchflussexperimente sind im Tabelle 3.15 zusammengefasst.

Tabelle 3.15: Reduktive Ringöffnung des  $T_N$ -Thr-Oxazolidinons im Tube-in-Tube-Reaktor

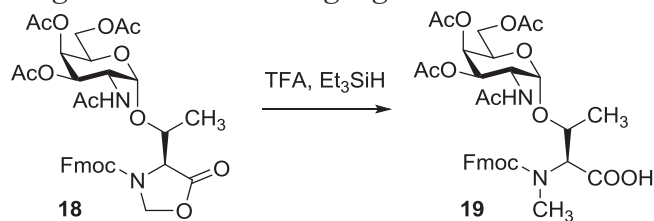
Eintrag	Säure	$Et_3SiH$	Flussrate	Lösungsmittel	Temperatur	Umsatz
1	TFA	0.05 mL (7 Äquiv.)	3 mL/h	Acetonitril	75 °C	9 %
2 <sup>a</sup>	HCl-Gas	0.1 mL (14 Äquiv.)	”	”	”	0 %
3	TFA	”	2 mL/h	Chloroform	50 °C	0 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-Oxazolidinon **18** (30 mg, 44  $\mu$ mol), TFA (1.50 mL, 19.5 mmol), Triethylsilan, Lösungsmittel (1.5 mL). Umsätze wurden mittels  $^1H$ -NMR bestimmt. <sup>a</sup> HCl-Gas wurde aus  $NH_4Cl$  und konz.  $H_2SO_4$  erzeugt und durch die Membran eingeleitet.

Unter den optimierten Reaktorbedingungen aus der *N*-Methylaminosäuresynthese (3 mL/h, 75 °C) wurde nach einer Reaktionszeit von 2 h lediglich ein geringer Umsatz von 9 % beobachtet, allerdings sind auch keine Hydrolyseprodukte entstanden (Eintrag 1). Die Verwendung von HCl-Gas anstelle von TFA als Protonierungsquelle lieferte kein Produkt, da HCl als sehr starke Säure mit dem Organosilan unter Wasserstoffentwicklung reagiert (Eintrag 2).<sup>[108]</sup> Auch mit Chloroform als Lösungsmittel, wie von Freidinger et al. beschrieben, fand selbst bei erniedrigter Flussrate von 2 mL/h und 50 °C keine Reaktion statt (Eintrag 3).

Da unter den ohnehin schon langen Verweilzeiten keine bzw. nur sehr geringe Umsätze beobachtet wurden, erscheint die Durchflussanwendung für diese zeitintensive Umsetzung nicht geeignet zu sein, sodass im Folgenden auf die klassische Reaktionsführung zurückgegriffen wurde. Dazu wurden zunächst die Durchflussbedingungen aus Eintrag 1 in einen Kolbenansatz übertragen. Die ersten Optimierungsschritte sind in Tabelle 3.16 zusammengetragen.

Tabelle 3.16: Optimierung der Reaktionsbedingungen zur reduktiven Ringöffnung im Kolben



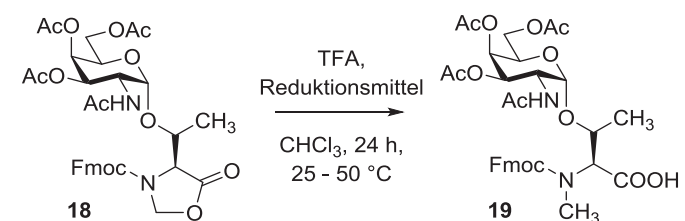
Eintrag	Lösungsmittel	Et <sub>3</sub> SiH	Temperatur	Zeit	Umsatz	Ausbeute
1	Acetonitril	8.5 Äquiv.	75 °C	2.5 h	5 %	-
2	”	21 Äquiv.	25 - 70 °C	24 h	46 %	-
3	Toluol	”	”	”	26 %	-
4	Chlorbenzol	”	”	”	41 %	-
5	Chloroform	”	25 - 50 °C	”	73 %	61 %
6 <sup>a</sup>	”	27 - 54 Äquiv.	25 °C	6 d	95 %	88 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-Oxazolidinon **18** (5.10 - 80.1 mg, 7.47 - 117  $\mu$ mol), TFA Überschuss (0.25 - 1.0 mL), Triethylsilan, 0.5 - 2.0 mL Lösungsmittel. Umsatz wurde über <sup>1</sup>H-NMR bestimmt. <sup>a</sup> Zugabe von zusätzlichem Triethylsilan nach 3 Tagen auf 54 Äquiv. (1.00 mL, 6.26 mmol).

Während der gesamten Reaktionszeit wurde der Umsatz mittels DC kontrolliert. Unter den aus dem Durchflussreaktor übertragenen Bedingungen war nach 2.5 Stunden kaum eine Reaktion eingetreten (Eintrag 1). Durch Erhöhung der Triethylsilanmenge bei gleichzeitig verlängerten Reaktionszeiten konnte der Umsatz auf 46 % gesteigert werden (Eintrag 2). Generell zeigt sich die reduktive Ringöffnung im Vergleich zur vorhergehenden Oxazolidinonsynthese gegenüber längerem Erhitzen unempfindlicher, denn bei gleicher Reaktionstemperatur und trotz eines massiven Überschusses an TFA wurden hier keine Nebenreaktionen oder gar Glycosidspaltungen beobachtet. Erneut konnte allerdings ein großer Einfluss des Lösungsmittels auf die Synthese beobachtet werden. Aromatische Lösungsmittel wie Toluol oder Chlorbenzol sind nicht geeignet und liefern geringe Umsätze (Eintrag 3, 4). Während im Durchfluss Acetonitril die besten Ergebnisse ergab, ist Chloroform bei dieser Umsetzung im Kolben das überragende Lösungsmittel. Acetonitril vermag zwar aufgrund seiner höheren Polarität die Zwischenstufen besser zu stabilisieren, jedoch besitzt TFA in Chloroform die höhere Protonierungskraft und kann somit die Reaktion insgesamt beschleunigen. Aufgrund des niedrigeren Siedepunkts von Chloroform wurde die Temperatur auf max. 50 °C reduziert. Dennoch konnte bei gleichbleibender Reaktionszeit ein Umsatz von 73 % beobachtet werden, wobei keine Nebenprodukte entstanden (Eintrag 5). Analog zu Freidinger et al. wurde auch eine Synthese bei Raumtemperatur durchgeführt, welche mittels DC einen sehr trägen Verlauf zeigte (Eintrag 6). Trotz der bereits zu Beginn stark erhöhten Triethylsilanmengen verlief die Reaktion allerdings erst nach 6 Tagen und einem zusätzlichen, großen Überschuss an Reduk-

tionsmittel annähernd quantitativ. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 9 Tage lieferte hier keine Umsatzsteigerung. Nach 6 Tagen konnte das Produkt **19** in 88 % Ausbeute isoliert werden. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Reduktionsmittels auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht (Tabelle 3.17).

Tabelle 3.17: Optimierung des Reduktionsmittels



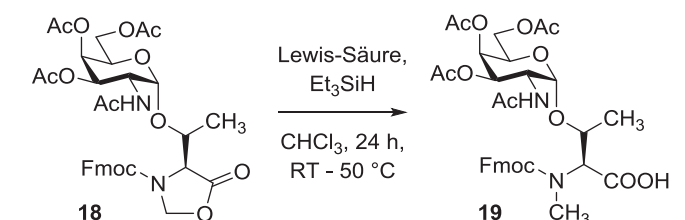
Eintrag	Reduktionsmittel	Umsatz
1	$i\text{Pr}_3\text{SiH}$	45 %
2	$\text{Ph}_2\text{SiH}_2$	0 %

Reaktionsbedingungen: Fmoc-Oxazolidinon **18** (7.90 mg bzw. 13.0 mg, 11.6  $\mu\text{mol}$  bzw. 19.0  $\mu\text{mol}$ ), TFA Überschuss (0.5 mL, 6.49 mmol), Reduktionsmittel (23 Äquiv.), 0.5 mL Chloroform. Umsatz wurde über  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt.

Unter den optimierten Reaktionsbedingungen lieferte Triisopropylsilan (TIS) schlechtere Ergebnisse, und mit Diphenylsilan (DPS) wurde kein Umsatz beobachtet (Eintrag 1, 2). Dies liegt an den reduzierten Hydrid-Donoreigenschaften von TIS und DPS im Vergleich zu TES. Das Reduktionsvermögen von Organosilanen ist abhängig von den Substituenten am Silizium und wurde wie folgt gereiht: TES > TIS > DPS.<sup>[108,110]</sup> Dies entspricht den experimentellen Ergebnissen.

Von Arvidsson et al. wurde der Einsatz von Lewis-Säuren als Katalysatoren anstelle von TFA zur *N*-Methylaminosäuresynthese beschrieben.<sup>[76]</sup> Exemplarisch wurden deshalb  $\text{AlCl}_3$  und  $\text{ZnCl}_2$  als Alternativen untersucht (Tabelle 3.18).

Tabelle 3.18: Einsatz von Lewis-Säuren als Katalysatoren bei der reduktiven Ringöffnung



Eintrag	Lewis-Säure	Umsatz
1	$\text{AlCl}_3$	-
2	$\text{ZnCl}_2$	-

Reaktionsbedingungen: Fmoc-Oxazolidinon **18** (13 mg, 19.0  $\mu\text{mol}$ ), Triethylsilan (21 Äquiv.),  $\text{AlCl}_3$  (4.6 mg, 34.4  $\mu\text{mol}$ , 1.8 Äquiv.),  $\text{ZnCl}_2$  (9.2 mg, 67.5  $\mu\text{mol}$ , 3.6 Äquiv.), 0.5 mL Chloroform. Umsatz wurde über  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt.

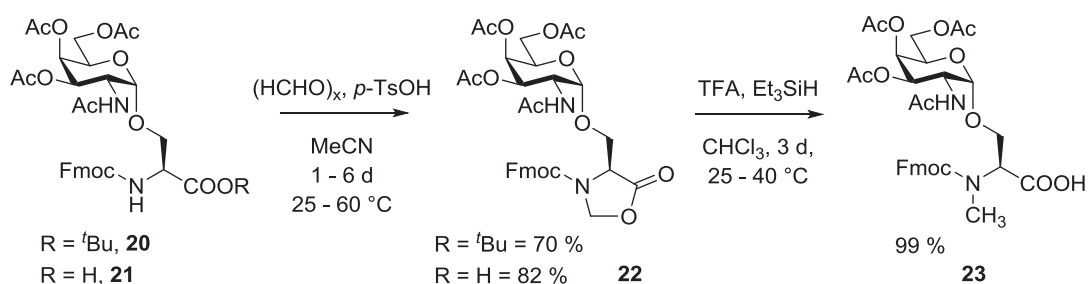
Zwar zeigte sich das Substrat **18** gegenüber großen Mengen an TFA als hydrolysestabil, aber in Übereinstimmung mit der Literatur wird bei der Verwendung von starken Lewis-Säuren wie Aluminium- und Zinkchlorid die  $\alpha$ -O-glycosidische Bindung dennoch gespalten.<sup>[109,111]</sup> Mittels HPLC-MS konnten lediglich Spuren des Produkts nachgewiesen werden.

Erstmals konnte durch Optimierung der Reaktionsbedingungen von Freidingers Synthese der Fmoc-T<sub>N</sub>-Thr-*tert*-Butylester **16** und Fmoc-T<sub>N</sub>-Threonin selbst (**17**) erfolgreich *N*-methyliert werden. Das Glycosid ist entgegen der Literaturangaben<sup>[108]</sup> stabil gegenüber sauren Reaktionsbedingungen, denn auch in Gegenwart überschüssiger TFA in Kombination mit TES wurden keine reduktiven Bindungsspaltungen beobachtet. Im Allgemeinen ist die Oxazolidinonsynthese empfindlicher gegenüber hohen Temperaturen, erfordert längere Reaktionszeiten und führt leichter zur Bildung von Nebenprodukten. Die reduktive Ringöffnung dagegen lieferte konstant gute Ergebnisse, jedoch muss auf den Einsatz von starken Lewis-Säuren verzichtet werden, da diese die *O*-glycosidische Bindung spalten.

Im Folgenden wurde untersucht, ob weitere Glycosylaminosäuren nach dieser Methode *N*-methyliert werden können, wodurch sich zahlreiche weitere Variationsmöglichkeiten in späteren Peptiden und Vakzinen eröffnen.

### T<sub>N</sub>-Serin

Das T<sub>N</sub>-Ser-O<sup>t</sup>Bu **20** wurde bereitgestellt von Herrn Dipl.-Chem. Markus Glaffig<sup>[112]</sup> und unter den optimierten Reaktionsbedingungen sowohl mit (**20**) als auch ohne (**21**) <sup>t</sup>Bu-Schutzgruppe umgesetzt (Schema 3.7). Die Reaktionen wurden mittels DC verfolgt.



### *Schema 3.7: N-Methylierung des T<sub>N</sub>-Serins in zwei Stufen*

Hier zeigt sich, dass im Gegensatz zum Thr-Analogon **16** die <sup>t</sup>Bu-Schutzgruppe einen stark verlangsamen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Nach 6 Tagen bei maximal 60 °C lief die Reaktion von **20** zwar nebenproduktfrei, aber nicht vollständig ab, sodass 70 % Ausbeute erreicht wurden. Mit dem deblockierten Fmoc-T<sub>N</sub>-Ser-OH **21** konnte dagegen bereits nach 24 Stunden und bei maximal 40 °C ein höherer Umsatz erzielt werden und 77 % Ausbeute an Oxazolidinon **22** wurden erreicht. Wurde das T<sub>N</sub>-Ser-OH **21** lediglich bei Raum-

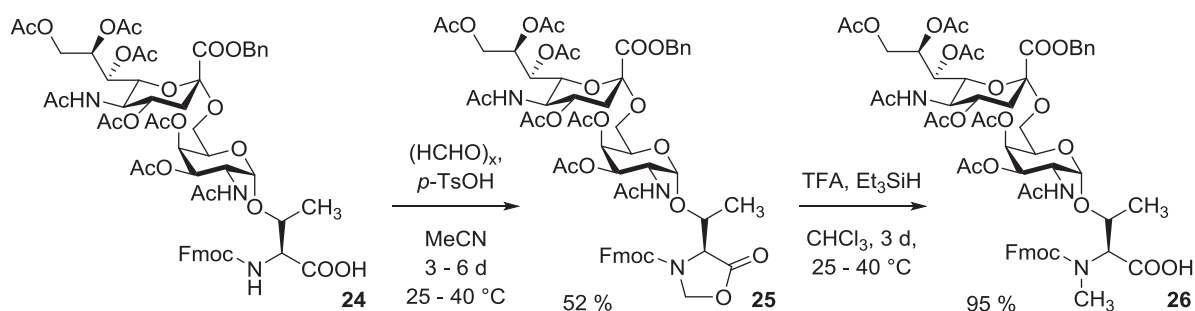
temperatur gerührt, vergingen 6 Tage bis kaum noch Umsatzänderungen sichtbar waren. Unter diesen Bedingungen konnten 82 % des Produkts isoliert werden.

Generell verlief die Reaktion zum  $T_N$ -Ser-Oxazolidinon **22** in Acetonitril sehr selektiv ohne die Ausbildung von Nebenprodukten. Wie zuvor, konnte auch durch Nachdosierung von *p*-TsOH oder Paraformaldehyd keine Reaktionsbeschleunigung oder Umsatzsteigerungen erzielt werden.

Die reduktive Ringöffnung gestaltete sich beim Serin-Antigen problemlos. Unter den bekannten Reaktionsbedingungen reagierte das Oxazolidinon **22** mit TFA und TES in Chloroform, bei ebenfalls max. 40 °C, innerhalb von 3 Tagen selektiv in einer Ausbeute von 99 % zum *N*-Methyl- $T_N$ -Ser **23**.

### Sialyl- $T_N$ -Threonin

Zur Synthese des *N*-Methyl- $ST_N$ -Antigens **26** wurde das Sialyl- $T_N$ -Thr-OH **24** von Herr Dr. Sebastian Hartmann bereitgestellt (Schema 3.8).<sup>[113]</sup>



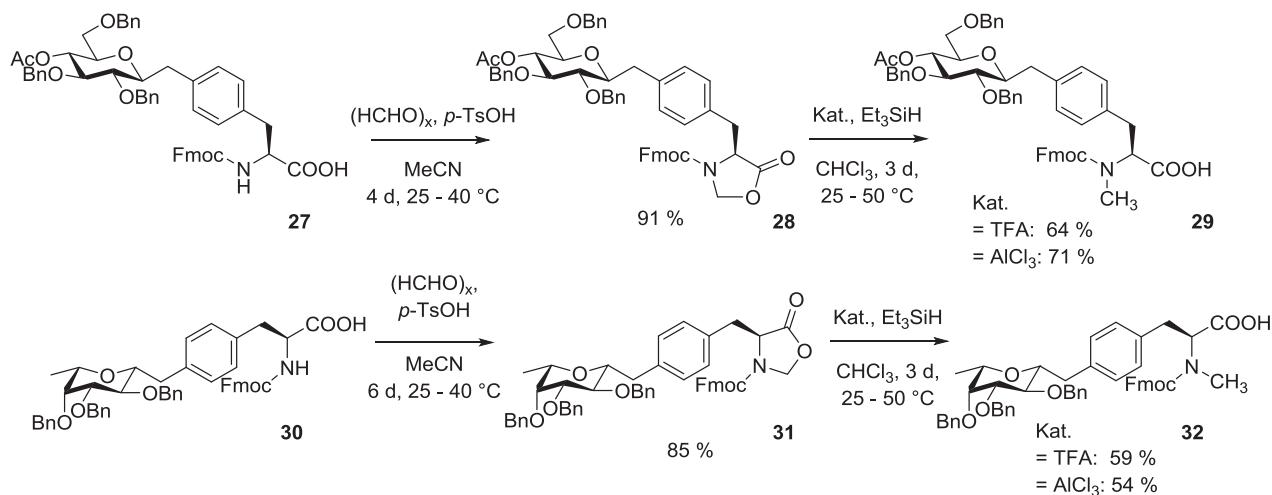
Schema 3.8: *N*-Methylierung des Sialyl- $T_N$ -Threonins in zwei Stufen

Aufgrund der höheren Komplexität wurde das empfindliche Substrat direkt bei max. 40 °C unter den bekannten Reaktionsbedingungen zum Oxazolidinon **25** umgesetzt. Auch hier wurde der Reaktionsverlauf mittels DC kontrolliert und zeigte einen insgesamt sehr trägen Verlauf. Bereits nach 3 Tagen kam die Reaktion praktisch zum Erliegen, sodass auch nach 6 Tagen und nachträglichen *p*-TsOH- und Paraformaldehydzugaben nicht mehr als 52 % Ausbeute erzielt werden konnten.

Analog zum  $T_N$ -Serin-Analogen verlief die säurekatalysierte Ringöffnung unproblematisch. Innerhalb von 3 Tagen bei max. 40 °C in Chloroform konnte das  $ST_N$ -Oxazolidinon **25** sauber und ohne jegliche Hydrolyseprodukte in einer Ausbeute von 95 % zum *N*-Methyl- $ST_N$ -Threonin **26** umgesetzt werden.

C-Glycosyl-Tyrosine

Die verwendeten Tyrosin-C-Glycoside **27** und **30** wurden von [REDACTED] synthetisiert und bereitgestellt.<sup>[39]</sup> Beide C-Glycoside wurden ohne Carboxylschutzgruppe zur Oxazolidinonsynthese eingesetzt (Schema 3.9).



Schema 3.9: N-Methylierung der C-Glycosyl-Tyrosine in zwei Stufen

Das Glucose-Derivat **27** reagierte bei max. 40 °C in Acetonitril nach 4 Tagen und das Fucose-Derivat **30** nach 6 Tagen glatt und frei von Nebenprodukten zu den entsprechenden Oxazolidinonen **28** und **31**. Über diese Reaktionszeit hinaus wurden dünnschichtchromatographisch keine Veränderungen mehr beobachtet, sodass die Produkte **28** und **31** in 91 % bzw. 85 % Ausbeute isoliert werden konnten.

Die zweite Stufe verlief ebenfalls ohne Schwierigkeiten und Nebenreaktionen, jedoch kam sie in beiden Fällen nach 3 Tagen zum Stillstand. Somit konnte nach dieser Zeit bei max. 40 °C in Chloroform lediglich 64 % bzw. 59 % der N-Methylglycosylaminosäure **29** bzw. **32** isoliert werden. Da es sich um hydrolysestabile C-Glycoside handelt, wurde hier erneut eine von  $\text{AlCl}_3$  vermittelte Reaktion untersucht. Zwar entstanden nach dieser Methode keine Nebenprodukte, allerdings blieb die erwartete Reaktionsbeschleunigung bzw. Umsatzsteigerung ebenfalls aus. Hierbei konnte das N-methylierte Glucose-Derivat **29** in 71 % Ausbeute und das N-methylierte Fucose-Derivat **32** in 54 % Ausbeute erhalten werden.

Die Produktvielfalt zeigt, dass diese Methode zur N-Methylierung auch erfolgreich auf andere Glycosylaminosäure-Strukturen übertragen werden kann. Mit einigen substratspezifischen Anpassungen der Reaktionsbedingungen, konnten neben C-Glycosylaminosäuren weitere, teilweise sehr empfindliche O-Glycosylaminosäuren in guten bis sehr guten Ausbeuten N-methyliert werden. Wie bereits bei den N-Methylaminosäuren wirkt sich die Substitution am Stickstoff auf die *cis/trans*-Konformation aus. Rotamerenbildungen sind allerdings haupt-

sächlich bei den *N*-Methylglycosylaminosäuren beobachtet worden und weniger unter den Oxazolidinonen. Das Vorliegen der Rotamere ist u. a. durch Signalverdoppelungen des *N*-Methylsignals im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR nachweisbar.

### 3.2.3 Glycopeptidsynthesen

Das synthetisierte *N*-Methyl- $T_N$ -Threonin **19** soll nun in Peptidfestphasensynthesen eingesetzt werden, um als Teil einer Antitumorvakzine fungieren zu können. Im Allgemeinen bestehen viele bisher entwickelte Antitumorvakzine aus drei Komponenten, dem Glycopeptid, einem Abstandshalter und einem immunogenen Protein (Abbildung 3.5).<sup>[34]</sup> Der Dreikomponentenaufbau ist notwendig, da das Glycopeptid (B-Zell-Epitop) selbst nicht ausreichend immunogen ist und daher an immunogene Proteine (T-Zell-Epitope) geknüpft werden muss. Eine direkte Aneinanderknüpfung der Epitope würde allerdings zu einer gegenseitigen, konformativen Beeinflussung führen. Die charakteristische Konformation der Epitope ist jedoch für die Wirksamkeit der Vakzine wichtig. Um diese zu erhalten, wird zur räumlichen Trennung zusätzlich ein nicht-immunogener Spacer als Abstandshalter eingefügt.

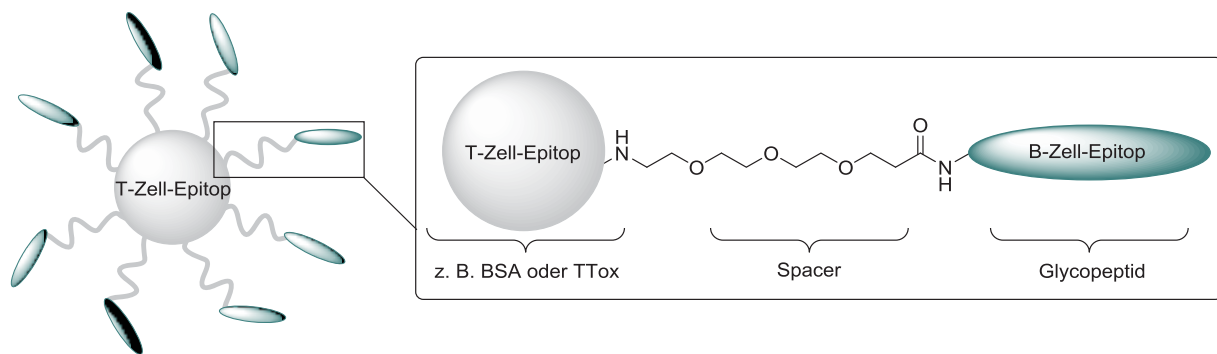


Abbildung 3.5: Allgemeiner Aufbau einer Dreikomponentenvakzine.

Beim Glycopeptid handelt es sich um eine Partiaalsequenz des MUC1-Mucins, welches in tumorassoziiierter Form im Zusammenhang mit verschiedenen Krebsarten überexprimiert wird. Diese MUC1-Strukturen werden vollsynthetisch nachgestellt, da aus Tumorgewebe isoliertes MUC1 wegen seiner Mikroheterogenität nicht selektiv zur Immunisierung eingesetzt werden kann (siehe Kap. 1). Zur Synthese der Vakzine wird zunächst das Glycopeptid an fester Phase aufgebaut.

#### 3.2.3.1 Allgemeines zur Peptidfestphasensynthese

Peptide und Glycopeptide können prinzipiell auf zwei Arten synthetisiert werden, in Lösung und an fester Phase. Dabei hat die Festphasensynthese nach Merrifield<sup>[114]</sup> erhebliche Vorteile, denn während der Synthese ist der wachsende Peptidstrang an eine polymere Matrix gebunden, und alle weiteren Reagenzien liegen in Lösung vor. Dadurch können die im Überschuss eingesetzten Reagenzien nach jedem Reaktionsschritt durch Filtration und Waschen ohne großen Aufwand entfernt werden. Nach diesem Verfahren lassen sich automatisiert Peptidstränge von 2 bis 50 Aminosäuren effizient aufbauen. Der Aufbau erfolgt

hierbei im Gegensatz zur Proteinbiosynthese vom C- zum N-Terminus. Im Allgemeinen erfolgt die Kupplung einer Aminosäure in drei Stufen. Der schematische Verlauf einer Festphasenpeptidsynthese ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

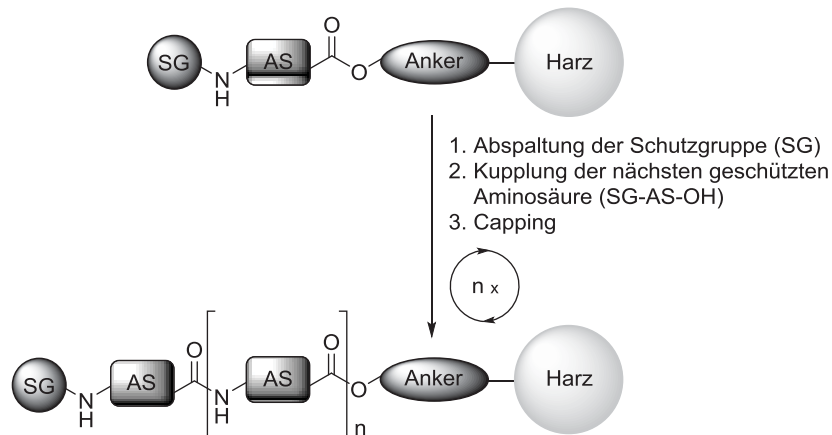


Abbildung 3.6: Allgemeines Schema zur Festphasenpeptidsynthese nach Merrifield

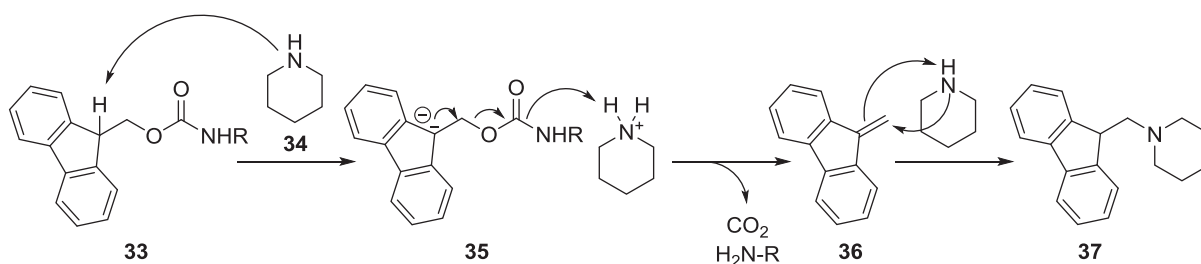
Im ersten Schritt wird die N-terminale Schutzgruppe abgespalten und danach die nächste Aminosäure mit Hilfe geeigneter Kupplungsreagenzien angeknüpft. Nach jeder Kupplung wird ein Capping-Schritt eingefügt. Dabei werden nicht umgesetzte Aminofunktionen durch Acetylgruppen blockiert, um die Ausbildung von Fehlsequenzen zu verhindern. Dieser Prozess wiederholt sich nun, bis das Peptid seine vollständige Länge erreicht hat. Glycopeptide werden nach dem gleichen Prinzip aufgebaut, allerdings werden an bestimmten Stellen statt normaler Aminosäuren zuvor synthetisierte Glycosylaminosäuren eingesetzt. Zum Schluss wird das Peptid bzw. Glycopeptid durch Spaltung des Ankers vom Harz abgetrennt.

Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen beim Kuppeln, Abspalten und Capping während der Festphasenpeptidsynthese erfordern eine genaue Abstimmung der Reagenzien sowie der Substrate und deren Schutzgruppen. Vor allem ist bei der Syntheseplanung zu beachten, dass Substrate mit orthogonal stabilen Schutzgruppen am Aminoterminus und den Seitengruppen verwendet werden.<sup>[115]</sup> Hierzu können grundlegend zwei Ansätze zum Peptidaufbau an der festen Phase genutzt werden, die Fmoc-<sup>[116]</sup> und die Boc-<sup>[117,118]</sup> Strategie.

Bei der Boc-Strategie wird der Aminoterminus mittels säurelabiler *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (Boc) geschützt. Daher sollten bei diesem Verfahren Aminosäuren mit säurestabilen Seitenschutzgruppen verwendet werden, um beim stark sauren Deblockierungsschritt nicht mit abgespalten zu werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings neben Aminosäuren mit säurelabilen Seitenschutzgruppen auch säureempfindliche *O*-Glycoside<sup>[109]</sup> eingesetzt, sodass die Fmoc-Strategie herangezogen wurde. Die Fmoc-Schutzgruppe (9-*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl) ist im

Gegensatz zur Boc-Gruppe basenlabil und wird bei milden Bedingungen durch Piperidin (**34**)<sup>[119]</sup> unter Ausbildung eines Dibenzofulven-Piperidin-Addukts **37** gespalten (Schema 3.10).



Schema 3.10: Fmoc-Abspaltung mit Piperidin

Das Addukt **37** ist stark UV-aktiv, und mit Hilfe eines UV-Detektors kann über die Signalintensität Auskunft zur Güte des vorangegangenen Kupplungsvorgangs gegeben werden. Die basischen Reaktionsbedingungen nach der Fmoc-Strategie erlauben somit die Verwendung säurelabiler Seitenschutzgruppen wie *tert*-Butyl, Triphenylmethyl (Trityl) oder 2,2,5,7-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) sowie den Einsatz von *O*-Glycosiden.

Jede Festphasensynthese beginnt mit der Wahl eines geeigneten polymeren Trägers. Eine wichtige Anforderung an das Harz ist eine gute Quellfähigkeit in den verwendeten Lösungsmitteln. Eine hohe Quellfähigkeit erlaubt eine optimale Diffusion und gute Zugänglichkeit der Reagenzien zu den Reaktionszentren. Zudem sollte die polymere Matrix während der relativ langen Reaktionszeiten mechanisch, chemisch und thermisch möglichst stabil sein.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wird in der vorliegenden Arbeit ein Tentagel-Harz der Firma *Rapp Polymere* verwendet. Das Harz besteht aus einem vernetzten Polystyrolgerüst mit aufgepfropften Polyethylenglycol (PEG)-Seitenketten (Abbildung 3.7).

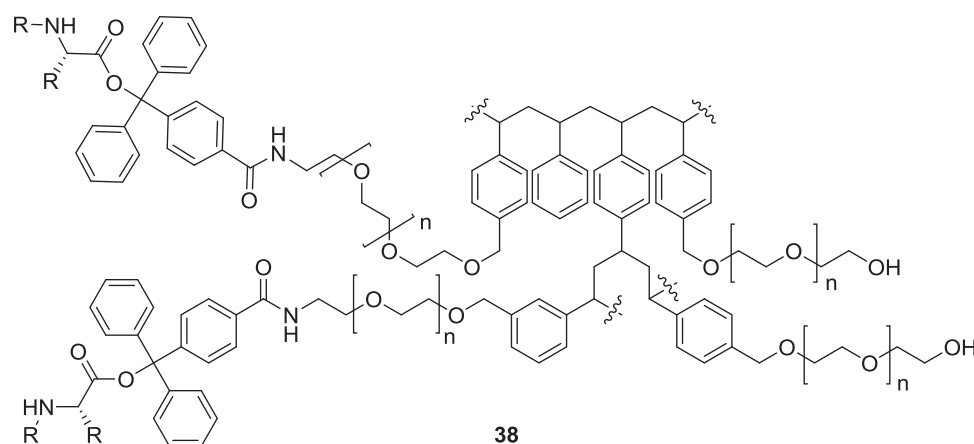


Abbildung 3.7: Ausschnitt des Tentagel-Harzes mit angeknüpften Trityl-Ankern

Neben den oben beschriebenen Eigenschaften besitzt das Tentagel-Harz zudem eine hohe Flexibilität durch die PEG-Ketten und erleichtert dadurch die Synthese sterisch anspruchsvoller Peptide.<sup>[120]</sup> Von entscheidender Bedeutung ist der direkt über die PEG-Ketten an das Harz gebundene Anker, welcher die C-terminale Aminosäure der späteren Peptidkette trägt. Er sollte ebenfalls unter den Reaktionsverhältnissen stabil und gleichzeitig am Ende der Synthese unter so milden Bedingungen spaltbar sein, dass die Amid- oder Glycosidbindungen nicht beeinträchtigt werden. Es gibt zahlreiche Ankersysteme die eine individuelle Reaktionsführung ermöglichen. In dieser Arbeit wurde der säurelabile Trityl-Anker verwendet, der bereits unter schwach sauren Bedingungen die Peptidabspaltung ermöglicht, wobei gleichzeitig die ebenfalls säurelabilen Aminosäureseitenketten entfernt werden können. Von großem Vorteil ist der Trityl-Anker zudem wegen seines großen sterischen Anspruchs, wodurch eine häufig auftretende Nebenreaktion bei der Peptidsynthese nach der *Fmoc*-Strategie, die Diketopiperazinbildung,<sup>[121]</sup> verhindert werden kann.

Die Peptidsynthese beginnt mit der Anknüpfung der zweiten Aminosäure. Die Aminosäurekupplung erfolgt immer mit Hilfe spezieller Kupplungsreagenzien. Das bekannteste Kupplungsreagenz zur Knüpfung einer Peptidbindung ist Dicyclohexylcarbodiimid (DCC),<sup>[122]</sup> das oft zur Peptidsynthese in Lösung herangezogen wird. Für die Synthese an fester Phase ist es jedoch weniger geeignet, da bei der Kupplung schwerlösliche Stoffe (Dicyclohexylharnstoff) ausfallen, die nur mühsam von der polymeren Matrix entfernt werden können. Neben DCC gibt es zahlreiche weitere Kupplungsreagenzien.<sup>[123]</sup> Am häufigsten verwendet werden die Uroniumsalze HBTU **39** (*O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat),<sup>[124,125]</sup> HATU **41** (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)<sup>[126]</sup> in Kombination mit den Additiven HOBt **40** (1-Hydroxybenzotriazol)<sup>[127]</sup> und HOAt **42** (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol)<sup>[126]</sup> (Abbildung 3.8).

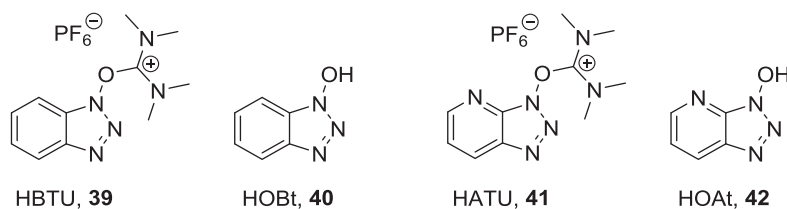
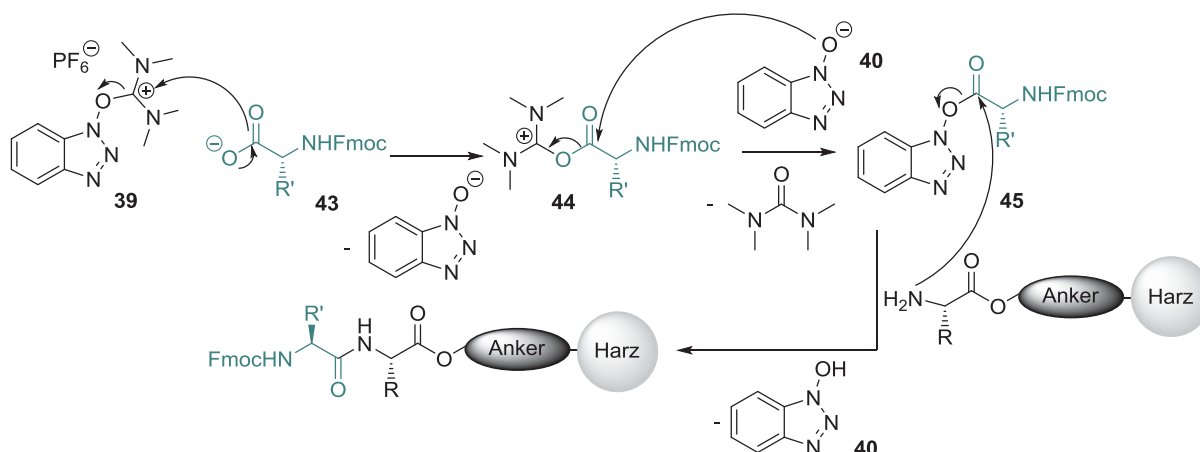


Abbildung 3.8: Verwendete Kupplungsreagenzien zur Festphasensynthese

Diese Uroniumsalze sind den meisten Kupplungsreagenzien in Bezug auf Reaktivität und Unterdrückung von Racemisierung überlegen. Durch Zugabe der Additive HOBt und HOAt wird ein reaktiver Aktivester **45** gebildet, wodurch die Aktivierung beschleunigt, die Basizität des Mediums abgesenkt und die Racemisierungsgefahr erheblich vermindert wird. Der Me-

chanismus zur Aminosäurekupplung an fester Phase mit HBTU und HOBt ist in Schema 3.11 gezeigt.



Schema 3.11: Mechanismus zur Aminosäurekupplung mit HBTU und HOBt an fester Phase

Der Kupplungsmechanismus beginnt mit der Deprotonierung der Aminosäure **43** und des HOBts (**40**) mit *N,N*-Diisopropylamin (DIPEA). Danach kann der negativ geladene Carboxylatsauerstoff am Carbeniumion des HBTUs (**39**) angreifen, worauf deprotoniertes HOBt austritt. Das zugesetzte bzw. freigewordene deprotonierte HOBt reagiert anschließend mit dem Carboxyl-Kohlenstoff der Aminosäure unter Ausbildung des Aktivesters **45**, wobei *N,N,N',N'*-Tetramethylharnstoff abgespalten wird. Im letzten Schritt reagiert der Aktivester **45** selektiv mit der *N*-terminalen Aminogruppe des Peptidstrangs unter Ausbildung der Amidbindung und Freisetzung eines protonierten HOBts.

Mit der Kombination aus HBTU und HOBt werden gewöhnliche Fmoc-Aminosäuren an Peptide angefügt. Sterisch anspruchsvolle Verbindungen wie Glycosylaminosäuren, *N*-Methylaminosäuren<sup>[128,129]</sup> oder der Spacer müssen allerdings mit reaktiveren Reagenzien gekuppelt werden. Am reaktivsten ist die Kombination aus HATU und HOAt, denn der zusätzliche, elektronenziehende Stickstoff im Ring erhöht die Acidität und ergibt somit für das deprotonierte HOAt eine stabilere Abgangsgruppe. Der Aktivierungsmechanismus mit HATU und HOAt verläuft analog zum abgebildeten Mechanismus in Schema 3.11.

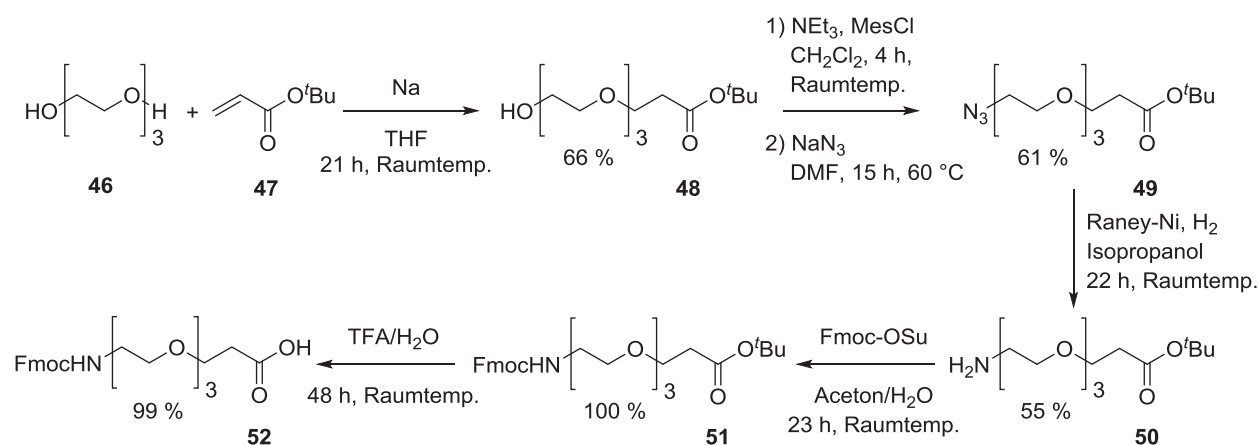
In dieser Arbeit wurden wegen der Verwendung sterisch anspruchsvoller Kupplungspartner ausschließlich diese beiden beschriebenen Uroniumsalz-Kombinationen als Kupplungsreagenzien verwendet.

Nach jedem Kupplungsschritt erfolgt abschließend das Capping. Dabei werden mit  $\text{Ac}_2\text{O}$ , DIPEA und HOBt offene Aminofunktionen *N*-acetyliert und Fehlsequenzbildungen durch darauf folgende Kupplungen verhindert. Zusätzlich sind die dabei entstehenden verkürzten

Abbruchsequenzen am Ende der Synthese wesentlich leichter chromatographisch vom vollständigen Peptid abzutrennen.

### 3.2.3.2 Synthese des Triethylenglycol-Spacers

Wie bereits zu Beginn des Kapitels 3.2.3 erwähnt ist die Verwendung eines Abstandshalters (Spacer) zum Aufbau der Dreikomponentenvakzine unumgänglich. Dabei ist die Entwicklung und Synthese des Spacers an einige Anforderungen geknüpft. Er sollte selbst nicht immunogen, unter physiologischen Bedingungen stabil und in der Festphasensynthese einsetzbar sein, d. h. über eine Fmoc-geschützte Amino- und freie Carboxylfunktion verfügen. In Anlehnung an etablierte Synthesestrategien<sup>[130,131]</sup> wurde dazu ein *N*-Fmoc-Triethylenglycol-Spacer entwickelt,<sup>[132]</sup> der diesen Ansprüchen genügt. Die Synthese des Spacers **52** verläuft in sechs Stufen<sup>[132]</sup> und erfolgte unter Mitarbeit von [REDACTED] (Schema 3.12).



Schema 3.12: Synthese des Triethylenglycol-Spacers

In der ersten Stufe wurde Triethylenglycol (**46**) in THF an Acrylsäure-*tert*-butylester (**47**) in einer Ausbeute von 66 % addiert. Die Überführung der endständigen Hydroxylgruppe in ein Azid (**49**) erfolgte in zwei Schritten, indem zunächst das Mesylat gebildet und anschließend durch nucleophile Substitution mit Natriumazid die Azidofunktion eingeführt wurde. Die darauf folgende Reduktion mit Raney-Nickel unter einer Wasserstoffatmosphäre lieferte das Amin **50** in 55 % Ausbeute. Die für die Festphasensynthese wichtige Fmoc-Gruppe konnte danach mittels *N*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) eingeführt werden. Im letzten Schritt wurde der säurelabile *t*Bu-Ester mit TFA in einer Ausbeute von 99 % in Wasser abgespalten. Die Synthese lieferte den Spacer **52** in einer Gesamtausbeute von 22 %. Dieser kann nun analog zu einer Fmoc-geschützten Aminosäure im Peptidsynthesizer eingesetzt werden.

### 3.2.3.3 *Synthese der MUC1-Glycopeptide*

Die Konformation des MUC1-Glycopeptids ist entscheidend für die Tumorselektivität der induzierten Immunantwort.<sup>[133–135]</sup> Sie wird maßgeblich durch das Glycosylierungsmuster und die Aminosäuresequenz bestimmt.<sup>[27]</sup> Nicht nur die Art und Anzahl der Kohlenhydratseitenketten ist von Bedeutung, sondern auch die Position der Glycosylierung im MUC1.<sup>[27,28,30,32–34]</sup> Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, besitzt das MUC1 in seiner *tandem repeat*-Region mit jeweils 20 Aminosäuren fünf potentielle Glycosylierungsstellen an den Serinen und Threoninen (Abbildung 3.9).<sup>[11]</sup>

Gly-Ser-**Thr**-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-**Thr**-Arg-Pro-Ala-Pro  
 G S T A P P A H G V T S A P D T R P A P

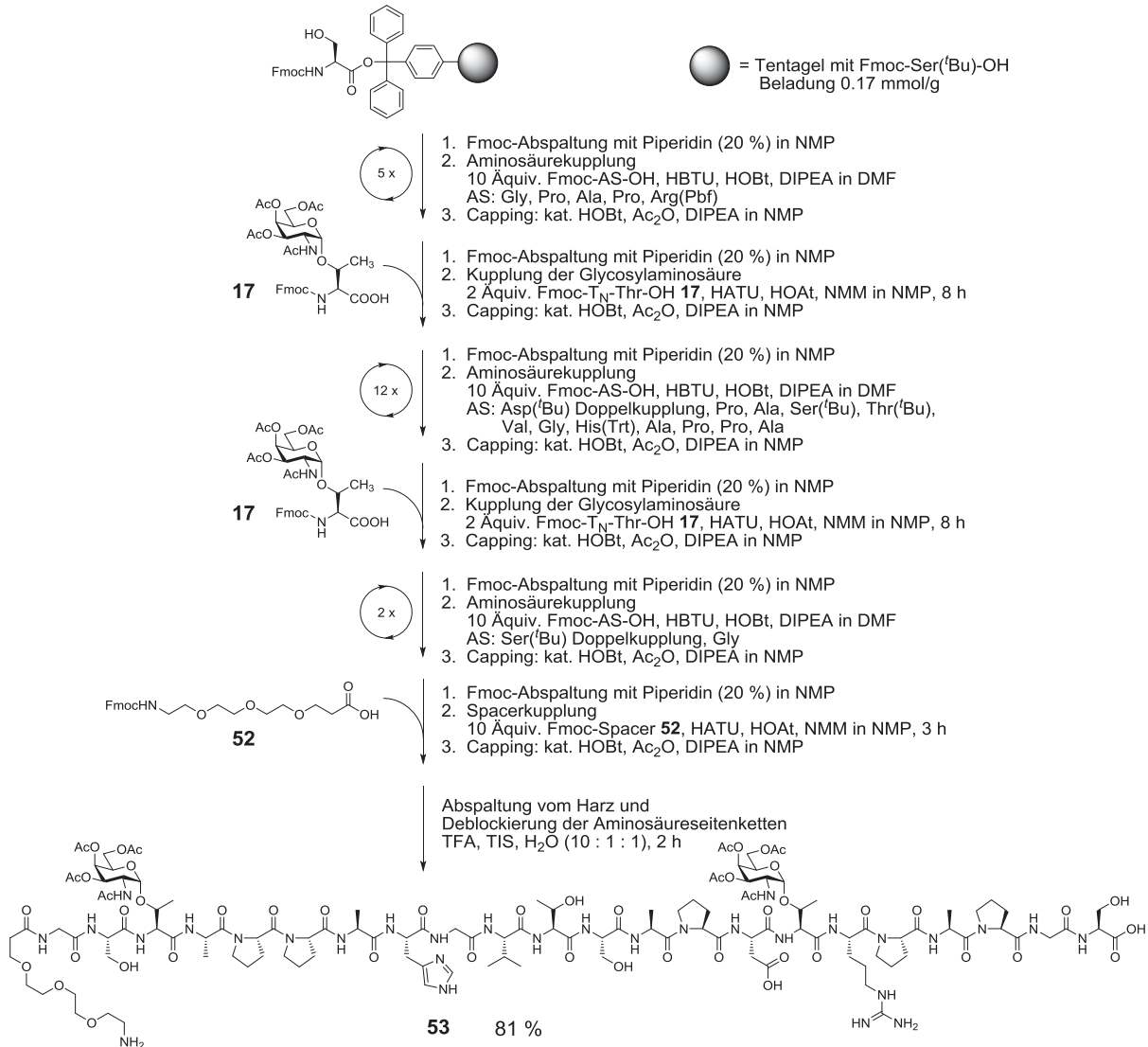
Abbildung 3.9: *Tandem repeat-Sequenz des MUC1*

Der PDTRP-Region wird eine besondere räumliche Struktur zugesprochen. Sie wurde auch als immundominante Domäne identifiziert.<sup>[136,137]</sup> Durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des Prolins und dem Amidproton des Arginins entsteht eine  $\beta$ -turn Struktur im Peptid.<sup>[133]</sup> Dabei ragen die Aminosäuren APDTRP „Knauf-ähnlich“ aus dem gestreckten MUC1-Rückgrat heraus und können somit gut von verschiedenen Antikörpern angegriffen werden.<sup>[134,137]</sup> Glycosylierungen in diesem Bereich sind von kontroverser Immunogenität. Es wurden für glycosylierte PDTRP-Sequenzen sowohl reduzierte,<sup>[27]</sup> als auch stark erhöhte Immunantworten beschrieben.<sup>[33,138]</sup> Neben der PDTRP wird auch der Glycosylierung in der GVSTA-Region ein sekundärstrukturgebender Effekt zugeschrieben.<sup>[132]</sup> Entscheidender für die Konformation ist aber eine Glycosylierung in der STAPPA-Sequenz.<sup>[27,139]</sup>

In dieser Arbeit wurden daher die beiden strukturgebenden Regionen PDTRP sowie STAPPA durch Verwendung des *N*-methylierten T<sub>N</sub>-Threonins **19** modifiziert. Auf diese Weise soll untersucht werden, ob die zusätzliche Methylgruppe einen Einfluss auf die Tumorselektivität der resultierenden Vakzine hat, indem diese ggf. turn-Struktur analog zur immundominanten PDTRP-Region induzieren kann. Daher wurde das *N*-methylierte T<sub>N</sub>-Thr **19** in die STAPPA- und das nicht methylierte T<sub>N</sub>-Thr **17** in die PDTRP-Sequenz eingebaut.

Die Aminosäuresequenz wurde so ausgewählt, dass das empfindliche *N*-Methyl-T<sub>N</sub>-Thr **19** möglichst kurz den harschen Reaktionsbedingungen im Synthesizer ausgesetzt ist, und die Kette zusätzlich um zwei Aminosäuren, Gly und Ser, verlängert (siehe Abbildung 3.9).<sup>[27]</sup>

Um den Einfluss der zusätzlichen Methylgruppe besser untersuchen zu können wurde zum Vergleich ein Referenzpeptid mit zwei T<sub>N</sub>-Antigenen und analogem Glycosylierungsmuster synthetisiert. Im Folgenden wird zuerst die Synthese des Referenzpeptids **53** beschrieben (Schema 3.13).



Schema 3.13: Synthese des Referenzpeptids GS-T<sub>N</sub>-APPAHGVTSAPD-T<sub>N</sub>-RPAPGS

Alle Peptidsynthesen wurden mit einem *Perkin-Elmer ABI 433A-Peptidsynthesizer* der Firma *Applied Biosystems*<sup>®</sup> durchgeführt. Das verwendete Tentagel-Harz **38** der Firma *Rapp Polymere* trug bereits die Startaminosäure Fmoc-Ser<sup>(t</sup>Bu)-OH. Um während der Synthese gegenseitige Beeinflussungen der sterisch zunehmend anspruchsvoller werdenden Peptidstränge zu vermeiden, wurde eine niedrige Harzbeladung von 0.17 mmol/g gewählt. Die Peptidsynthese erfolgte nach dem in Kap. 3.2.3.1 beschriebenen Ablauf, d. h. durch Wiederholung der drei aufeinanderfolgenden Schritte aus Fmoc-Abspaltung mit Piperidin in NMP, Aminosäurekupplung und abschließendem Capping mit Ac<sub>2</sub>O. Zur Kupplung der einfachen Fmoc-

Aminosäuren wurden die Reagenzien HBTU (**39**) und HOBt (**40**) mit DIPEA in DMF verwendet. Der Gesamtprozess aus Fmoc-Abspaltung, Aminosäurekupplung und Capping dauerte im Synthesizer ca. eine Stunde pro Aminosäure. Etwas anders dagegen erfolgte der Ablauf beim Anknüpfen der sterisch anspruchsvollen Glycosylaminosäuren **17** und des Spacers **52**. Hier wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU (**41**) und HOAt (**42**) (s. Kap. 3.2.3.1) eingesetzt und die Kupplungszeit der Glycosylaminosäure **17** auf 8 Stunden und beim Spacer **52** auf 3 Stunden angehoben. Somit sollte eine möglichst hohe Bindungsrate gewährleistet werden. Um nach Anknüpfung der anspruchsvollen Glycosylaminosäuren keinen Einbruch bei der Ausbeute zu erleiden, wurde die darauffolgende Fmoc-Aminosäure in einer Doppelkupplung angeknüpft. Hierbei wurden zwei Kupplungszyklen mit der gleichen Aminosäure durchlaufen, ohne jedoch dazwischen zu acetylieren. Die Güte jeder abgeschlossenen Kupplung konnte anschließend nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe durch UV-Detektion des Benzofulven-Piperidin-Addukts (Schema 3.10) kontrolliert werden. Das Abspaltprotokoll zur Referenzpeptidsynthese ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

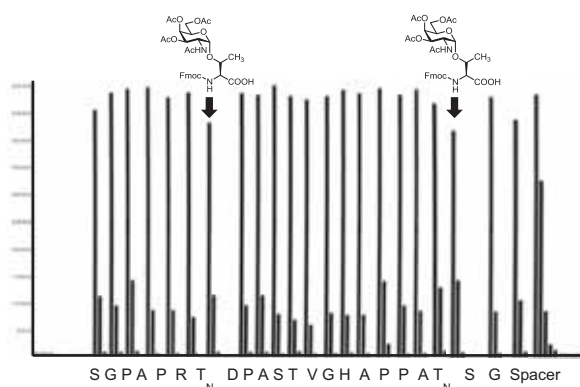
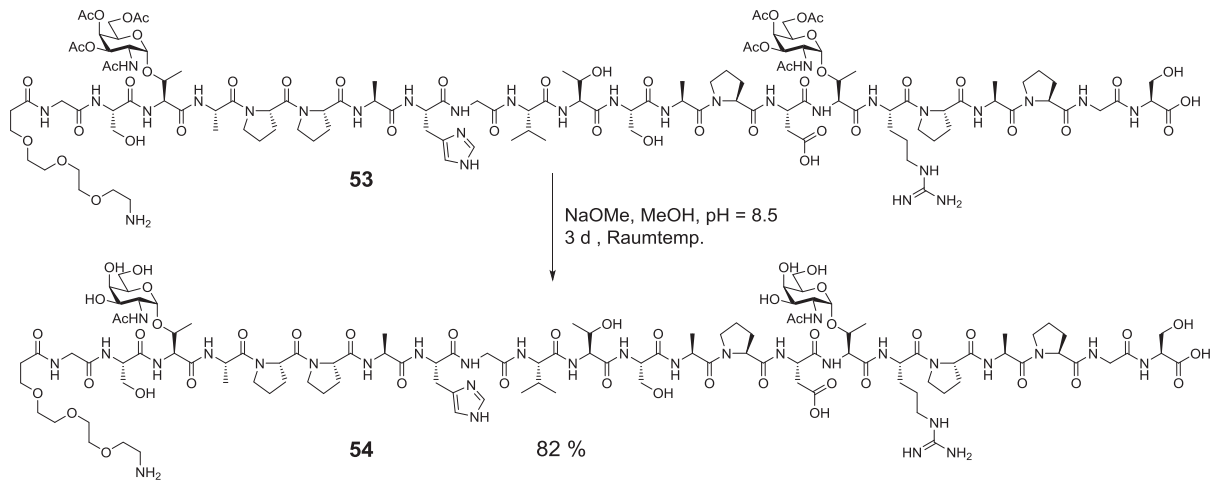


Abbildung 3.10: Abspaltprotokoll der Referenzpeptidsynthese

Das UV-Protokoll zeigt einen optimalen Syntheseverlauf mit gleichmäßig hohen Intensitäten der Fmoc-Abspaltungen an. Auch die Kupplungsausbeuten der Glycosylaminosäuren an Thr<sup>7</sup> und Thr<sup>20</sup> sowie der darauffolgenden Aminosäure zeigen keinen Ausbeuteeinbruch, und lassen auf eine erfolgreiche Peptidsynthese schließen. Hatte das Peptid seine vollständige Länge erreicht, wurde am Ende der Synthese lediglich die Fmoc-Gruppe abgespalten, ohne einen Capping-Schritt anzuschließen, da die endständige Aminofunktion im späteren Verlauf noch funktionalisiert werden soll. Die Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen an den Aminosäureseitenketten geschah in einem *Merrifield-Reaktor* innerhalb von 2 Stunden mit TFA, TIPS und Wasser (10 : 1 : 1). Danach wurde das Rohpeptid mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und in 81 % Ausbeute erhalten. Im nächsten Schritt wurden die Acetylschutzgruppen der Kohlenhydratreste entfernt. Dies erfolgte durch Umesterung unter *Zemplén*-Bedingungen im schwach basischen Milieu mit

NaOMe/MeOH.<sup>[99,140]</sup> Dabei musste der pH-Wert exakt zwischen 8 und 9 liegen und stetig kontrolliert werden, da unterhalb dieses pH-Werts keine Reaktion stattfindet und darüber  $\beta$ -Eliminierungen<sup>[141]</sup> der Glycosylsubstituenten beobachtet werden. Die Deacetylierung des Referenzpeptids **53** ist in Schema 3.14 gezeigt.



Schema 3.14: Deacetylierung der Kohlenhydratreste im Referenzpeptid **53**

Die Deblockierung des Peptids **53** verlief problemlos und ohne das Auftreten von  $\beta$ -Eliminierungen. Nach Neutralisation mit konz. Essigsäure und anschließender Aufarbeitung wurde das Rohpeptid mittels präparativer RP-HPLC gereinigt und in einer Ausbeute von 82 % erhalten. Das ESI-MS-Spektrum des isolierten Referenzpeptids **54** ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

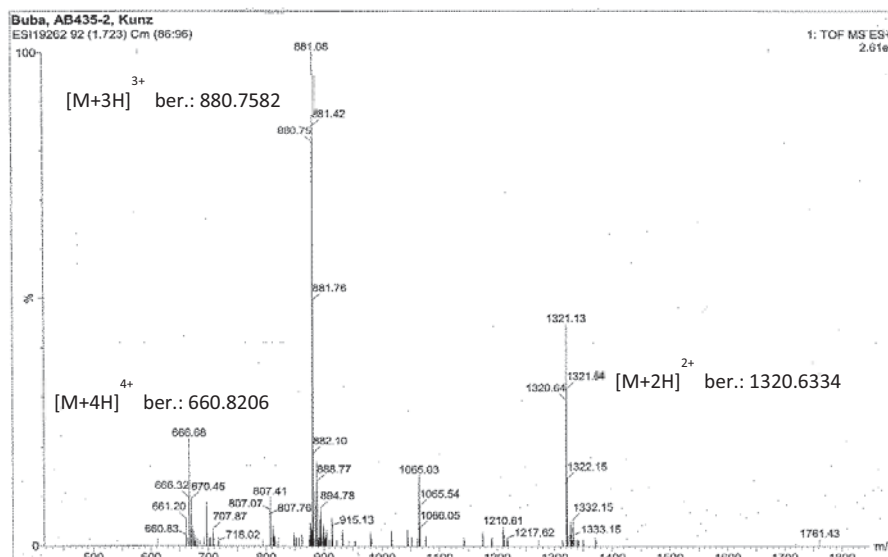
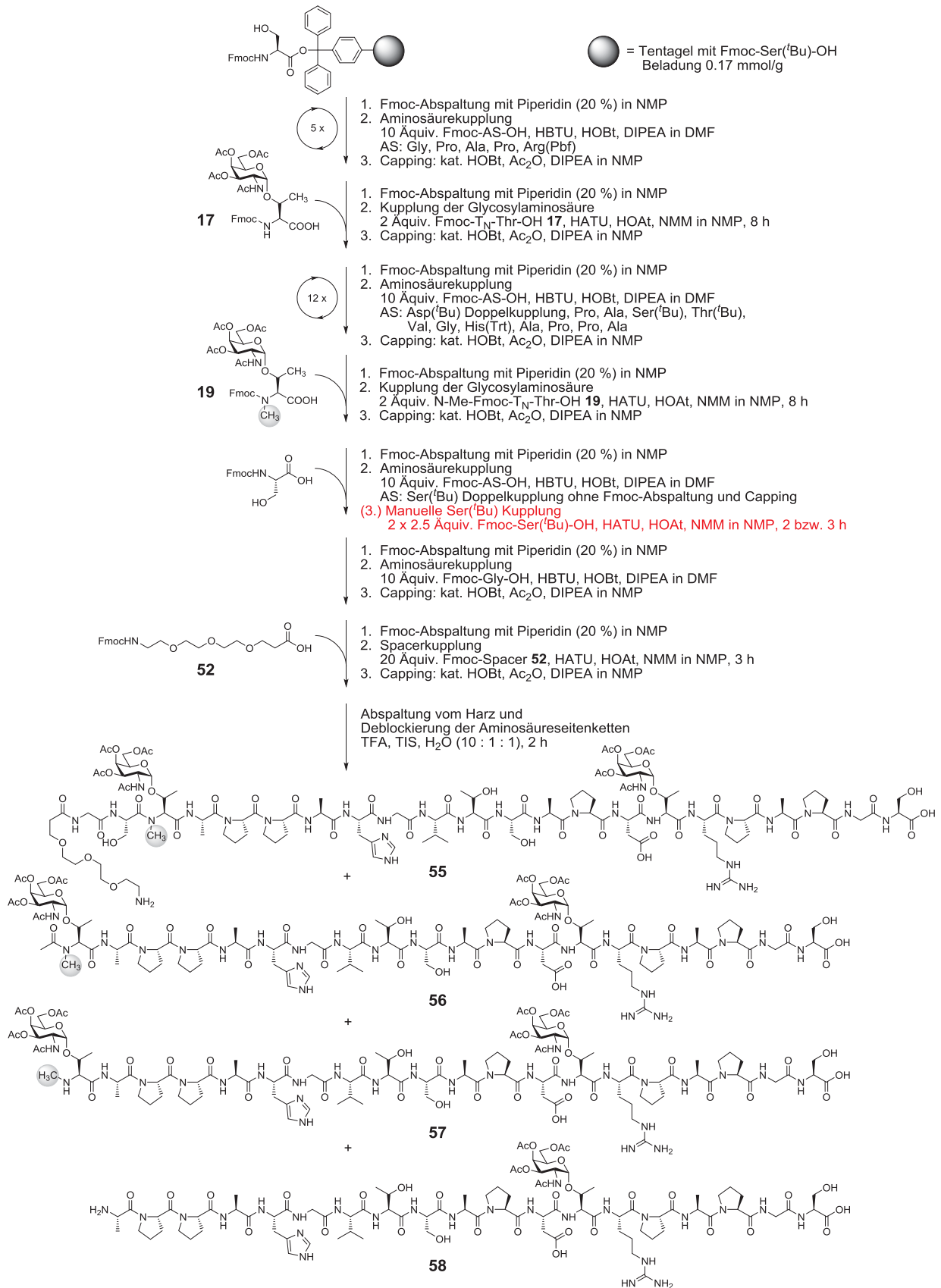


Abbildung 3.11: ESI-MS-Spektrum des Referenzpeptids in Wasser

Nach erfolgreicher Synthese des Referenzpeptids **53** wurde anschließend das *N*-methylierte MUC1-Glycopeptid **55** aufgebaut. Der allgemeine Synthesablauf erfolgte analog zum Referenzpeptid und ist in Schema 3.15 abgebildet.



Schema 3.15: Synthese des *N*-Methylpeptids GS-NMeT<sub>N</sub>-APPAHGVTSAPD-T<sub>N</sub>-RPAPGS

Im Allgemeinen sind Synthesen von *N*-Methylpeptiden schwierig, denn es treten bereits während der Synthese an fester Phase oder beim Aufarbeiten zahlreiche Nebenreaktionen auf,<sup>[128]</sup>

sodass die Ausbeuten meist gering sind. Die besten Ergebnisse für die Kupplung von *N*-Methylaminosäuren sind mit HATU (**41**) beschrieben.<sup>[128,129]</sup>

In einem Vorversuch wurde die etablierte Kombination aus HATU (**41**) und HOAt (**42**) daher zunächst an einer kurzen Aminosäuresequenz mit *N*-Methyl-Serin untersucht. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten damit sehr gute Ergebnisse erreicht werden. Hier zeigte das Abspaltprotokoll beim Aufbau der Sequenz G-NMeS-TAPPA keine Einbrüche in der Ausbeute laut UV-Intensität des Fulvenaddukts, weder beim Anknüpfen des *N*-Me-Serins noch bei dem des darauffolgenden Glycins. Daher wurden die Reagenzien HATU und HOAt auch für die anspruchsvolle *N*-Me-T<sub>N</sub> Kupplung ausgewählt. Alle einfachen Fmoc-Aminosäuren wurden dagegen wie zuvor mit HBTU (**39**), HOBt (**40**) und DIPEA in DMF gekuppelt. Der Einbau des T<sub>N</sub>-Antigens **17** am T<sup>7</sup> erfolgte problemlos und analog zur Referenz mit einer Kupplungszeit von 8 Stunden mit anschließender Doppelkupplung des Aspartats. Im ersten Anlauf der *N*-Methylpeptidsynthese wurde auch das *N*-methylierte T<sub>N</sub>-Threonin **19** unter Standardbedingungen umgesetzt, d. h. mit einer Kupplungszeit von 8 Stunden und anschließender Doppelkupplung des darauf folgenden Serins.

Wie dem Abspaltprotokoll in Abbildung 3.12 (Abspaltprotokoll a) zu entnehmen ist, gelang die Anknüpfung des *N*-Methyl-T<sub>N</sub>-Threonins **19** in zufriedenstellendem Umfang, allerdings brach die Kupplungsausbeute laut Intensität des UV-Signals bei der Kupplung des folgenden Serins signifikant ein.

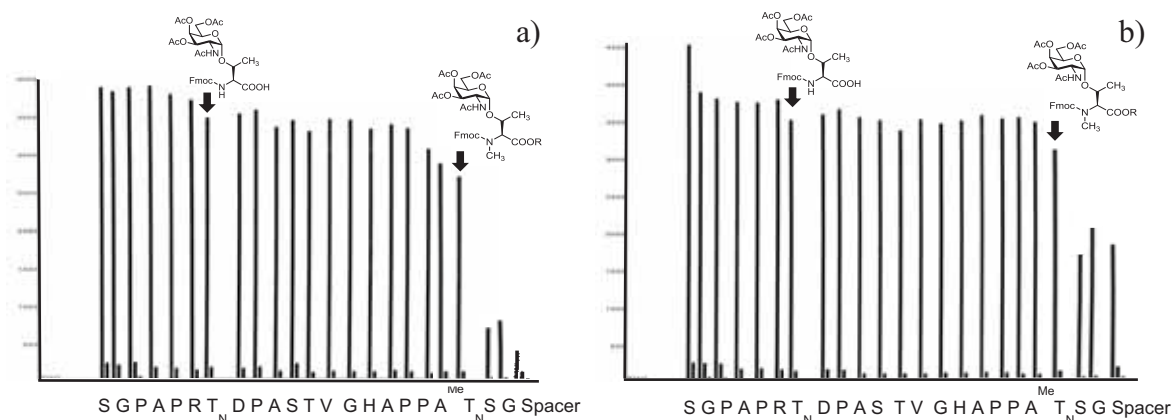


Abbildung 3.12: Abspaltprotokolle der *N*-Methylglycopeptidsynthese

Offenbar reicht eine Doppelkupplung des Serins für die schwierige Bindungsknüpfung nach der *N*-methylierten Glycosylaminosäure nicht aus, sodass die Reaktionsbedingungen im weiteren Verlauf optimiert werden mussten. Die Kupplungsbedingungen für die *N*-Methylglycosylaminosäure selbst können hingegen beibehalten werden. Trotz des Einbruchs wurde die Synthese vollendet, wobei aber nach Aufarbeitung und Reinigung mittels RP-HPLC hauptsächlich die *N*-acetylierte Abbruchsequenz **56** isoliert wurde.

Im nächsten Versuch zur Synthese des *N*-Methylglycopeptids wurde daher die Kupplungszeit des Ser<sup>21</sup> insgesamt verlängert und zudem mehrfach durchgeführt (Schema 3.15, in Rot). Dazu erfolgte zunächst, wie bereits zuvor, eine Doppelkupplung des Serins, jedoch ohne nachfolgende Fmoc-Abspaltung und Capping im Anschluss, sodass anschließend weiteres Fmoc-Serin-OH zweimal manuell angeknüpft werden konnte. Dabei wurde die einfache Aminosäure analog zu einer Glycosylaminosäuren oder einem Spacer mit HATU und HOAt für 3 bzw. 2 Stunden im Synthesizer angefügt. Nach dieser Methode konnten deutliche Verbesserungen erzielt werden (Abbildung 3.12, b), allerdings war die Kupplungsausbeute noch immer deutlich vermindert.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid wie üblich mit TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O (10 : 1 : 1) vom Harz abgespalten und die Schutzgruppen entfernt. Die Reinigung mittels RP-HPLC lieferte fünf Fraktionen. Über ESI-MS Messungen konnten in vier Fraktionen die Abbruchsequenzen **57**, **58** und weitere kleinere Peptidfragmente identifiziert werden. Eine Fraktion stellte eine Mischfraktion aus dem gewünschte Peptid **55** und der Abbruchsequenzen **56** dar (Schema 3.15). Auffällig hierbei ist die nicht *N*-acetylierte Abbruchsequenz **57**. Offensichtlich ist neben der erschwerten Aminosäurekupplung an dieser Stelle sogar das Capping problematisch. Die *N*-Methylgruppe kann jedoch nicht allein verantwortlich sein für die schwierige Bindungsbildung, da im vorhergehenden Testversuch die Kupplung einfacher *N*-Methylaminosäuren problemlos gelungen ist. Vermutlich ist der zusätzliche Kohlenhydratrest der Glycosylaminosäure mit ausschlaggebend für die schlechten Kupplungseigenschaften. Um dies zu belegen, wurde die Arbeit von Herrn Dr. S. Dziadek herangezogen, in der die Protonenkorrelation von Saccharidresten im MUC1 mit dem Peptidgrundgerüst mittels ROESY untersucht wurden.<sup>[132,142]</sup>

Hierbei zeigten sich starke Konnektivitäten zwischen der NH-Gruppe des T<sub>N</sub>-Threonins und dem NH-Proton des Galactosamin-Acetamids (Abbildung 3.13).

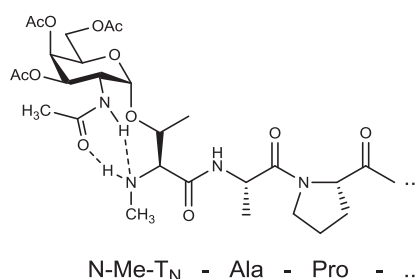
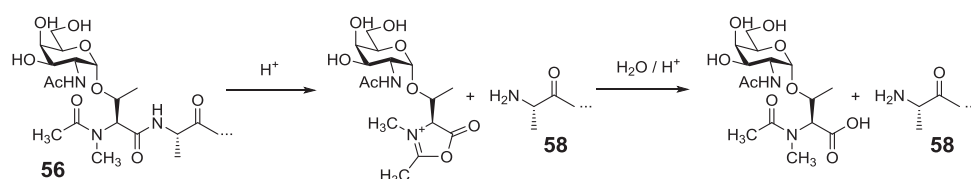


Abbildung 3.13: Wechselwirkung des *N*-Methyl-T<sub>N</sub>-Threonins mit dem Peptidrückgrat im MUC1

Diese Konnektivitäten deuten auf räumliche Nähe der Protonen hin, u. a. bedingt durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des Galactosamin-Acetamids und

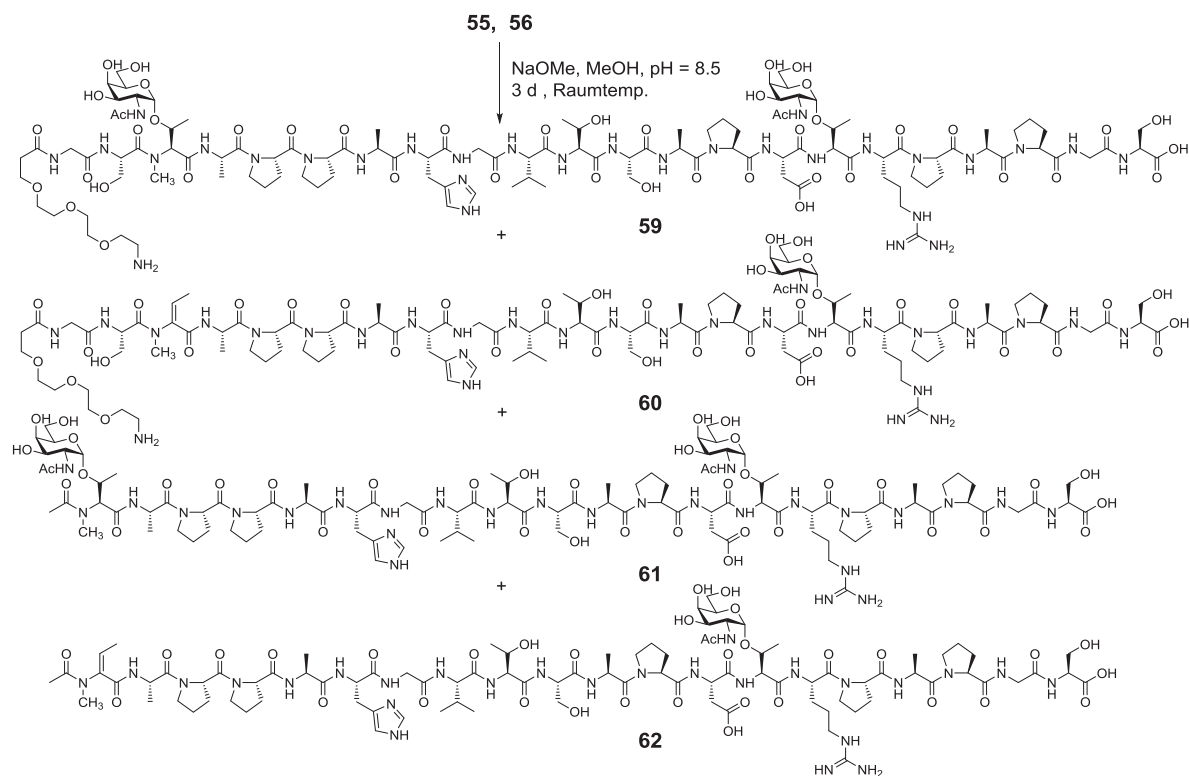
des Thr-NH-Protons. Betrachtet man den Kupplungsmechanismus, so wird ein Aminproton zur Protonierung des abgespaltenen HOAts nach dem nukleophilen Angriff am Aktivester benötigt (Schema 3.11). Da nun im *N*-methylierten T<sub>N</sub> nur ein Aminproton vorhanden und dieses zudem an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist, wird die Reaktion an dieser Stelle stark gehindert. Das erklärt neben dem erschwerten Anknüpfen von Aminosäuren auch das eingeschränkte Capping.

Die Entstehung der nicht *N*-acetylierten Abbruchsequenz **58** ohne das *N*-methylierte T<sub>N</sub>-Threonin ist vermutlich auf eine Nebenreaktion während der Harzabspaltung ausgehend von Peptid **56** zurückzuführen.<sup>[128,143]</sup> Dabei wird die terminale *N*-Acetyl-Aminosäure säurekatalysiert abgespalten (Schema 3.16).



Schema 3.16: Säurekatalysierter Aminosäureabbau während der Peptidabspaltung vom Harz

Trotz zahlreicher Schwierigkeiten wurde das gewünschte *N*-Methylglycopeptid **55** erhalten, allerdings als Mischfraktion mit **56**. Versuche, diese Mischfraktion mittels HPLC aufzutrennen, waren nicht erfolgreich, sodass diese als Gesamtes der Deacetylierung mit NaOMe/MeOH<sup>[99,140]</sup> unterworfen wurde (Schema 3.17).



Schema 3.17: Deacetylierung der Kohlenhydrate im *N*-Methylglycopeptid

Nach Neutralisation der Reaktionslösung mit konz. Essigsäure und Reinigung mittels RP-HPLC wurden zwei Fraktionen erhalten (Abbildung 3.14).

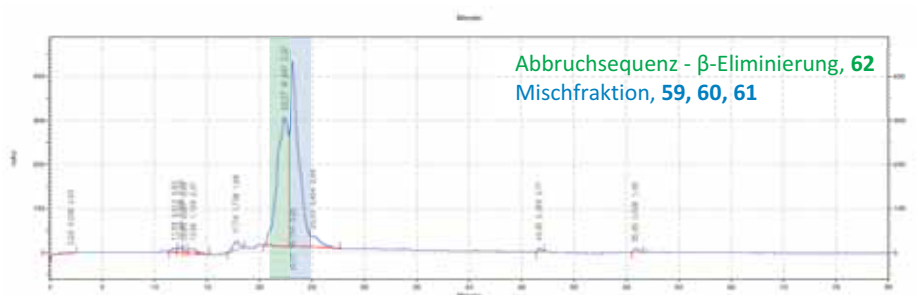


Abbildung 3.14: Elutionsdiagramm der präparativen RP-HPLC des N-Me-Glycopeptids

Beide Fraktionen zeigten deutliche Verluste durch  $\beta$ -Eliminierungen des Kohlenhydrats. Mittels ESI-MS konnte für die erste Fraktion nur das Eliminierungsprodukt **62** aus der Abbruchsequenz **56** identifiziert werden. Die zweite Fraktion hingegen wurde erneut als Mischfraktion erhalten, bestehend aus dem deblockierten Peptid **59**, seinem  $\beta$ -Eliminierungsprodukt **60** und der deblockierten N-acetylierten Abbruchsequenz **61**. Das zugehörige ESI-MS-Spektrum der Mischfraktion ist in Abbildung 3.15 dargestellt

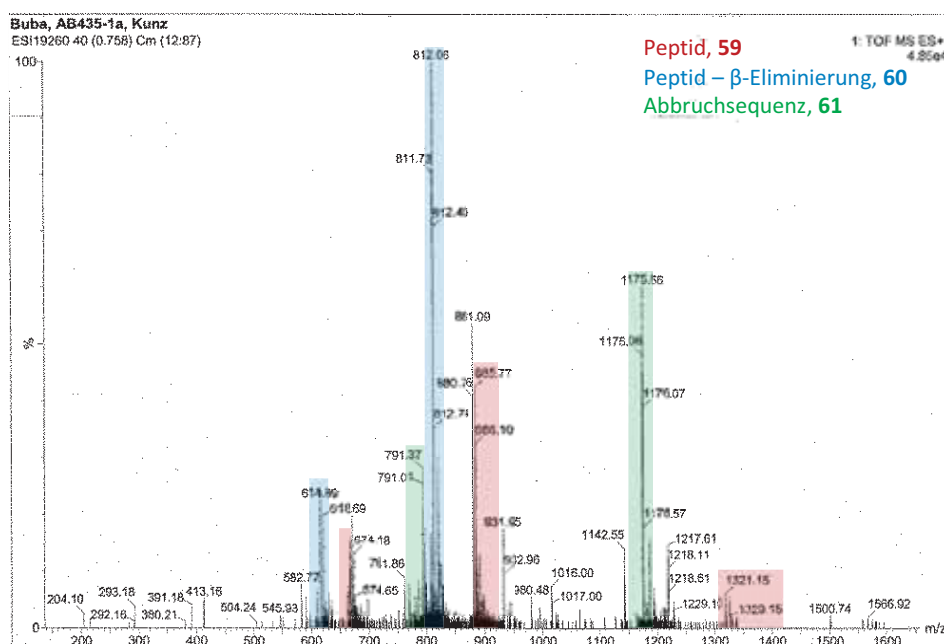
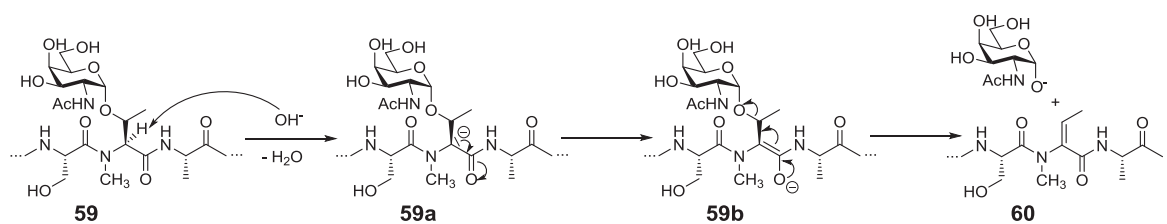


Abbildung 3.15: ESI-MS-Spektrum der erhaltenen Mischfraktion

Auffällig hierbei ist, dass ausgehend von beiden Peptiden **55** und **56** die  $\beta$ -Eliminierungen des Kohlenhydratrests lediglich an der N-methylierten Aminosäure auftrat. Der Grund für die Basenlabilität des N-methylierten Glycopeptids kann mit Hilfe des Mechanismus zur  $\beta$ -Eliminierung am Beispiel des Peptids **59** geklärt werden (Schema 3.18).<sup>[141]</sup>



Schema 3.18: Mechanismus zur  $\beta$ -Eliminierung am Beispiel des *N*-Methylglycopeptids

Nach der Deprotonierung am  $\alpha$ -C-Atom des  $\text{T}_\text{N}$ -Threonins in Verbindung **59** entsteht ein Enolat-Anion **59a**, dessen Stabilität maßgeblich die Basenlabilität definiert. Allgemein ist bekannt, dass bei unsubstituierten Aminogruppen im Peptid  $\beta$ -Eliminierungen weniger leicht auftreten, da das Enolat-Anion nach Deprotonierung der freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen durch Resonanz stabilisiert und die Elektronendichte am  $\alpha$ -C-Atom erhöht werden kann.<sup>[141]</sup> Dieser Effekt ist in ausreichendem Maß bei amidischen NH-Gruppen im Glycopeptid vorhanden. Ist allerdings die Amidgruppe durch *N*-Methylierung nicht mehr deprotonierbar, so kann die Elektronendichte am  $\alpha$ -C-Atom nicht mehr erhöht werden und der Glycosylrest wird im basischen Milieu leichter abgespalten.

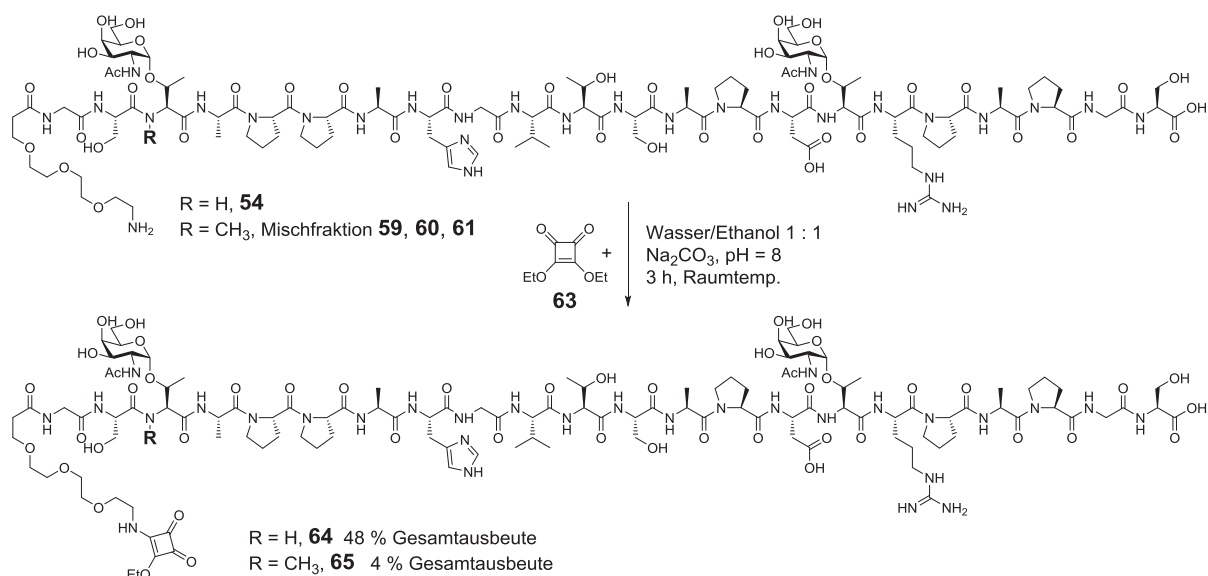
Somit konnten zwar die Abbruchsequenzen **57** und **58** aus der vorherigen Stufe sowie das  $\beta$ -Eliminierungsprodukt der *N*-acetylierten Abbruchsequenz **62** abgetrennt werden. Allerdings gelang es auch hier nicht, die Mischfraktion aus **59**, **60** und **61** weiter aufzutrennen. Daher musste auch im weiteren Verlauf das synthetisierte *N*-Methylglycopeptid **59** als Mischfraktion verarbeitet werden.

Trotz zahlreicher Schwierigkeiten wurde dennoch erstmals die Synthese eines *N*-methylierten MUC1-Glycopeptid mittels Festphasenpeptidsynthese realisiert.

### 3.2.4 Konjugation der MUC1-Glycopeptide an immunogene Proteine

Zum Abschluss der Vakzinsynthese wurden die MUC1-Glycopeptide zur Erhöhung der Immunogenität nun an T-Zell-Epitope gebunden, um somit eine Vakzine zu erhalten, mit der die Toleranz des Immunsystems gegen das körpereigene Tumorgewebe durchbrochen werden kann. Saccharide, kleine Peptide und Glycopeptide (u. a. auch MUC1) sind alleine oft nur schwach immunogen (Haptene), da sie entweder kein peptidisches Epitop besitzen oder das vorhandene Epitop nur begrenzt T-Zell-Stimulationen hervorrufen kann. Durch Konjugation dieser Substanzen mit einem T-Zell-Epitop tragenden Träger-Protein, sog. Carrier-Protein, könnte die Immunantwort erheblich verstärkt und somit z. B. eine therapeutisch wirksame Antitumorvakzine entwickelt werden. Geeignete Carrier-Proteine sind Rinderserumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumin), das Hämocyanin der Schlüssellochnapfschnecke (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin) oder Tetanus-Toxoid (TTox). Es konnten bereits zahlreiche Vakzine basierend auf diesen Carrier-Proteinen hergestellt werden,<sup>[20,25–28,31–33,132]</sup> wobei mit TTox-Konjugaten die besten immunologischen Ergebnisse erreicht wurden.<sup>[32]</sup> Dagegen sind BSA-Konjugate nur wenig immunogen. Sie eignen sich jedoch als Beschichtungsmaterial in ELISA-Experimenten. Aus den genannten Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit BSA und TTox als Carrier-Proteine eingesetzt.

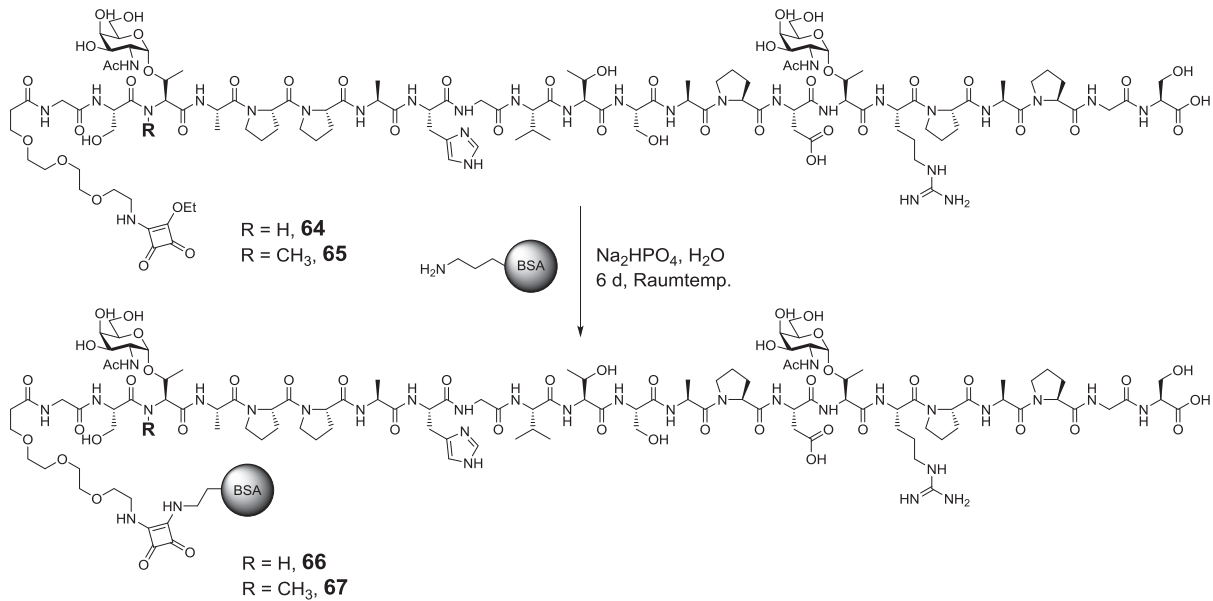
Entscheidend ist allerdings die Anknüpfung des Glycopeptids an das Protein. Sie sollte unter möglichst milden Bedingungen ablaufen ohne dabei die Konformation des Proteins und Peptids zu verändern. Dazu sind zahlreiche Methoden in der Literatur beschrieben worden,<sup>[19,144–146]</sup> die allesamt Vor- und Nachteilen aufweisen. Aufgrund guter Erfahrungen in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Kunz, erfolgte die Verknüpfung des Glycopeptids mit dem Protein hier über eine von Tietze et al. beschriebene Methode mittels Quadratsäurediethylester.<sup>[25,132,147]</sup> Mit Hilfe des immunologisch unbedenklichen Squarats **63** gelingt eine selektive Anbindung des Glycopeptids an die Lysinseitenketten des Proteins im wässrigen Medium, ohne dabei die zahlreichen funktionellen Gruppen im MUC1-Glycopeptid zu beeinträchtigen. Bei einem pH-Wert von 8 reagiert zunächst die Aminogruppe des Spacers chemoselektiv mit dem Quadratsäurediethylester **63** unter Abspaltung von Ethanol. Die im Peptid ebenfalls verfügbare Guanidino-Funktion des Arginins reagiert nicht mit dem Squarat, da sie unter diesen Reaktionsbedingungen im Vergleich zur weniger basischen Aminogruppe protoniert vorliegt. Die Anbindung des Squarats **63** an die synthetisierten MUC1-Glycopeptide ist in Schema 3.19 dargestellt.



Schema 3.19: Funktionalisierung der MUC1-Glycopeptide mit Quadratsäurediethylester

Die Peptide wurden zunächst in einem Wasser/Ethanol 1 : 1-Gemisch gelöst. Mit Natriumcarbonat wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Zur Umsetzung des *N*-Methylglycopeptids wurde die erhaltene Mischfraktion aus **59**, **60** und **61** verwendet, in der Erwartung einer leichteren Auftrennung der Produktfraktionen nach der partiellen Funktionalisierung mittels Squarat **63**. Die Anbindung des Quadratsäureesters **63** sowohl an das Referenzpeptid **54** als auch an das *N*-Methylglycopeptid **59** verlief relativ problemlos. Nach präparativer RP-HPLC konnte neben dem Referenzpeptid **64** auch das *N*-Methylpeptid **65** rein isoliert werden, womit die Abtrennung der Abbruchsequenzen **60** und **61** aus der vorherigen Mischfraktion an dieser Stelle gelungen ist.

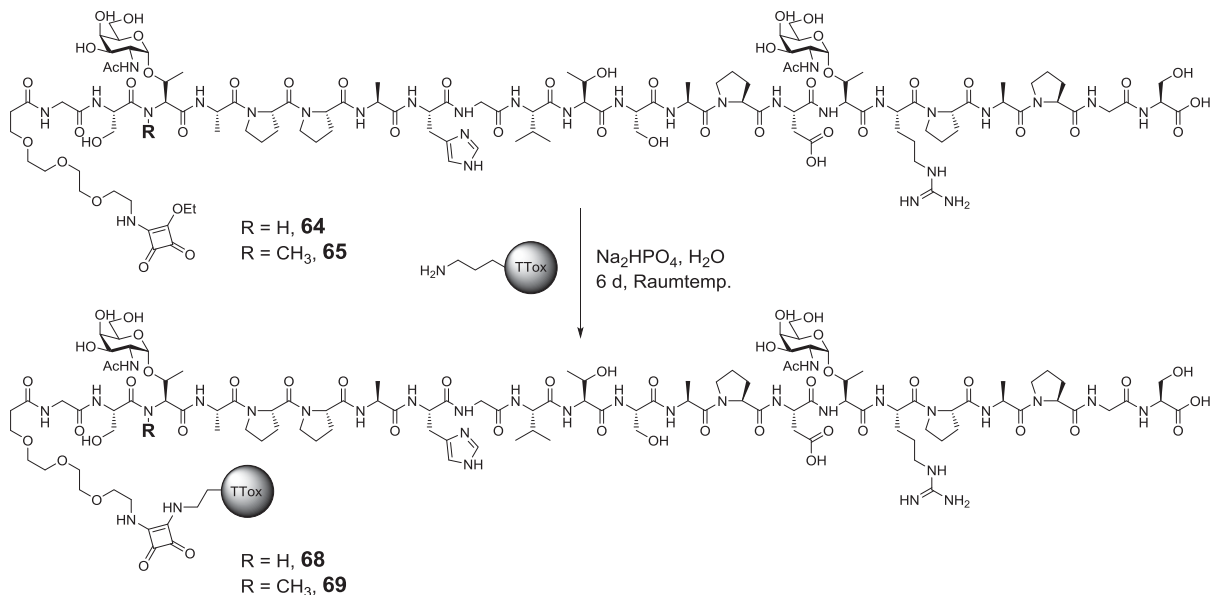
Im nächsten Schritt wurden die funktionalisierten Glycopeptide an entsprechende T-Zell-Epitope gekuppelt. Zuerst wurden die BSA-Konjugate hergestellt. BSA ist ein Protein bestehend aus 584 Aminosäuren, darunter 59 Lysinreste, wovon sich 30 auf der Außenseite des globulären Proteins befinden, die zur Konjugation mit den Glycopeptiden genutzt werden können.<sup>[148]</sup> Die Synthese der BSA-Konjugate ist in Schema 3.20 abgebildet. Sie verläuft im wässrigen Medium bei pH = 9.5 innerhalb von 6 Tagen bei Raumtemperatur. Das Referenzpeptid **64** wurde dabei im 36-fachen und das *N*-Methylglycopeptid **65** im 30-fachen Überschuss eingesetzt. Mittels Ultrafiltration wurden anschließend alle nicht gebundenen Peptide abfiltriert und die Konjugate durch Lyophilisierung isoliert.



Schema 3.20: Konjugation der MUC1-Glycopeptide an BSA

Durch MALDI-TOF-Experimente wurde nach der Anbindung des Referenzpeptids **64** zum BSA-Konjugat eine Belegung von 1 - 28 Peptidmolekülen pro BSA-Molekül ermittelt. Aufgrund zu geringer Substanzmengen wurde die Belegungsrate des *N*-Methylglycopeptid-BSA-Konjugats **67** nicht bestimmt.

Die Synthese der TTox-Konjugate verlief analog zur Anbindungsreaktion an BSA und ist in Schema 3.21 abgebildet.



Schema 3.21: Konjugation der MUC1-Glycopeptide an TTox

Auch diese Konjugation verlief ohne Schwierigkeiten, sodass mittels MALDI-TOF eine Belegung von 3 - 21 Referenzpeptidmoleküle **64** pro TTox-Molekül ermittelt werden konnte.

Für das *N*-Methylglycopeptid **65** wurde eine Belegung von 1 - 11 Peptidmolekülen pro TTox-Molekül errechnet. Die erhaltenen Mengen von 2 - 3 mg pro Konjugat **66**, **67**, **68** und **69** sollen in immunologischen Studien eingesetzt werden.

### 3.3 C-Glycosylaminosäuren

#### 3.3.1 C-Glycoside - Eigenschaften und Zugangsmöglichkeiten

Der Austausch des Sauerstoffatoms in der *O*-glycosidischen Bindung gegen ein Kohlenstoffatom bewirkt eine wesentlich erhöhte Stabilität der entsprechenden Glycosylaminosäure bzw. des Glycopeptids gegenüber saurer Hydrolyse, basischen  $\beta$ -Eliminierungen oder dem enzymatischen Abbau im Organismus. Dies führt wiederum zu einer höheren Bioverfügbarkeit der sog. Glycopeptidmimetika<sup>[149,150]</sup> und macht sie attraktiv für die Entwicklung von Pharmaka<sup>[151]</sup> sowie für die Synthese von stabilen MUC1-Antitumorvakzinen (Kap. 1). Zahlreiche C-Glycosidsynthesen sind in der Literatur beschrieben,<sup>[152]</sup> wovon die meisten Serinanaloga sind<sup>[153–168]</sup> und nur wenige Threonin<sup>[169,170]</sup> imitieren. Zwar sind die Zugangsmöglichkeiten zu ihnen vielfältig, wie z. B. über Wittig-,<sup>[153,155,160,163]</sup> Horner-<sup>[156,161]</sup> oder Auxiliar-vermittelte Reaktionen<sup>[154,157–159,164]</sup> sowie Kreuzmetathesen,<sup>[165,166,168]</sup> jedoch mangelt es an einer gezielten Stereokontrolle bezüglich der Konformation am anomeren C-Atom. Oft werden  $\alpha/\beta$ -Gemische oder gar ausschließlich das  $\beta$ -Anomer erhalten. Dennoch sind auch selektive Zugänge zu  $\alpha$ -S-konfigurierten C-Glycosiden über Sm-vermittelte Reaktionen oder mit Hilfe von Sn-Organen beschrieben worden.<sup>[171–173]</sup>

Da die Kohlenstoffreste in Glycopeptiden eine entscheidende Rolle bei Erkennungsprozessen spielen, sollte das C-Glycosid der natürlichen Struktur der T<sub>N</sub>-Antigene möglichst ähneln, um die Selektivität nicht zu beeinflussen. Konformationsanalysen hierzu lassen vermuten, dass durch den Austausch des Sauerstoffs gegen ein Kohlenstoff keine großen geometrischen Unterschiede vorliegen.<sup>[174,175]</sup> Jedoch sollte die  $\alpha$ -Konformation am anomeren Zentrum sowie die ursprünglichen *S*-Konfiguration der Aminosäure ebenfalls nicht verändert werden (Abbildung 3.16).

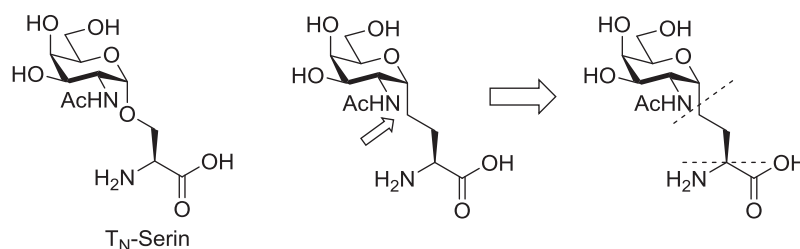
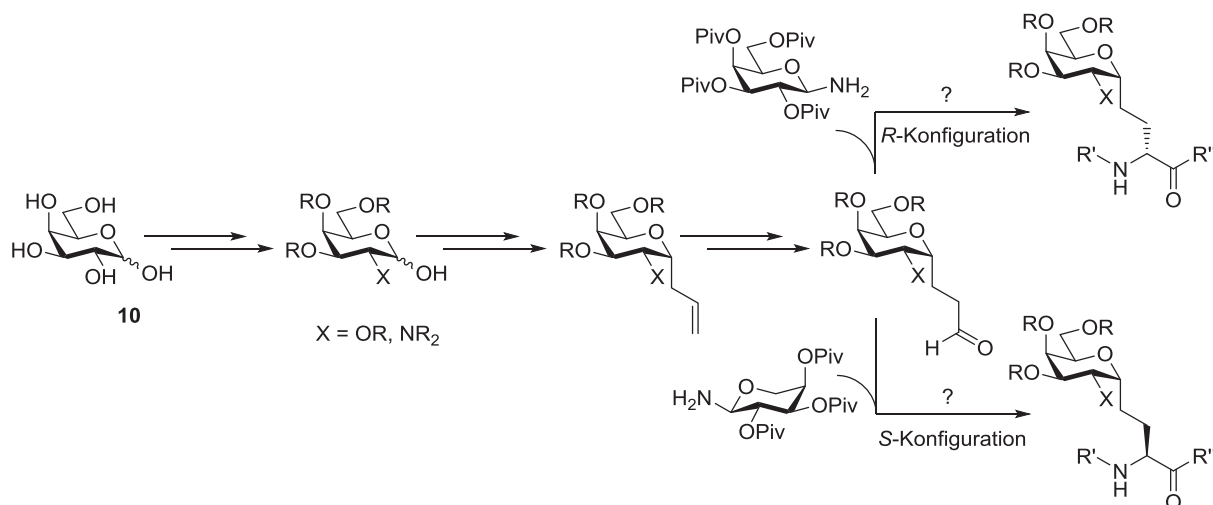


Abbildung 3.16: Darstellung der T<sub>N</sub>-Serins und des C-Glycosyl-Analogons

In dieser Arbeit sollte ein neuer Auxiliar-vermittelter Zugang zum  $\alpha$ -C-Glycosyl-Serin geschaffen werden. Retrosynthetisch wurde dazu das C-Glycosid aus drei Teilen aufgebaut, aus der Galactoseeinheit, der C-Kette und der Aminosäure-Funktionalität (Abbildung 3.16). Die

eingeschlagene Synthesestrategie geht von D-Galactose aus und ist in Schema 3.22 abgebildet.



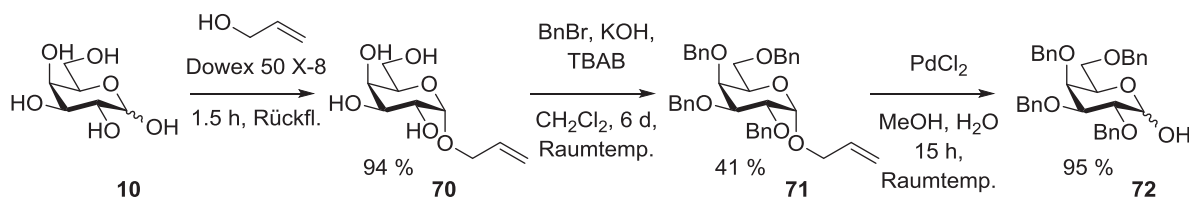
Schema 3.22: Synthesepfad zum selektiven Aufbau des  $\alpha$ -C-Glycosyl-Serins

Im ersten Schritt soll der Zuckerbaustein geschützt und funktionalisiert werden. Zum Aufbau der C-Glycosid-Kette soll im zweiten Schritt die geschützte Galactose zuerst acetyliert und danach selektiv  $\alpha$ -ständig C-allyliert werden. Im weiteren Verlauf soll die Allylkette zum Aldehyd umfunktionalisiert zu werden. Im letzten Schritt soll untersucht werden, ob in einer Ugi-Reaktion die Selektivität mit Hilfe des entsprechenden Auxiliars zugunsten der R- oder S-konfigurierten C-Glycosylaminosäure gesteuert werden kann.

Da C-glycosidische Bindungsknüpfungen C-2-funktionalisierter Aminozucker anspruchsvoll sein können, werden Zuckerbausteine mit und ohne Stickstoff-Funktionalisierung in C-2-Position hinsichtlich dieser Synthesestrategie untersucht.

### 3.3.1.1 Synthese des Galactosebausteins

Ausgehend von D-Galactose (10) wurde der einfache Saccharidbaustein 72 ohne C-2-Funktionalisierung in drei Stufen aufgebaut (Schema 3.23).



Schema 3.23: Synthese des einfachen Galactosebausteins

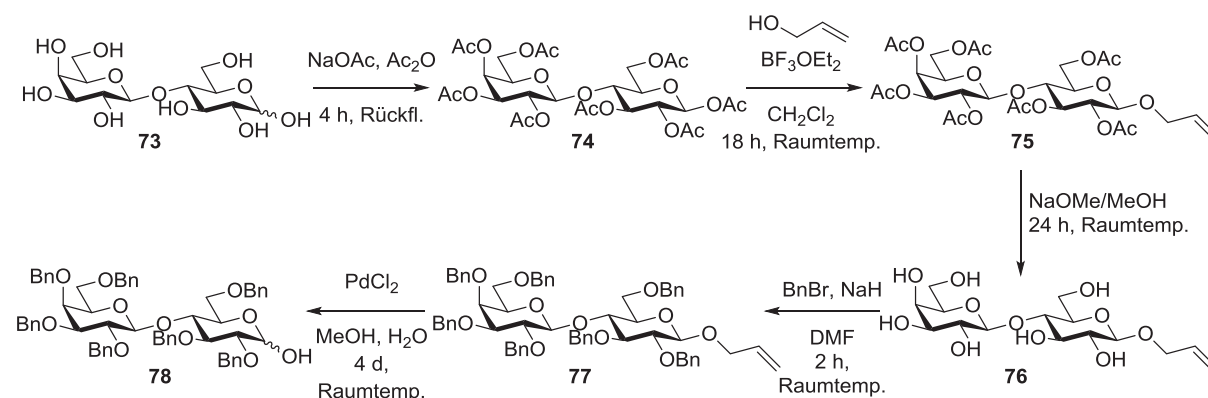
In der ersten Stufe wurde aus D-Galactose mit Allylalkohol säurekatalysiert das Allylgalactosid 70 in 94 % Ausbeute gebildet.<sup>[176]</sup> Danach wurden dessen Hydroxylgruppen mit Hilfe von Benzylbromid alkyliert<sup>[177]</sup> und im letzten Schritt die Allylschutzgruppe mit ca. 10 mol%

$\text{PdCl}_2$  in 95 % Ausbeute entfernt.<sup>[177]</sup> Versuche, die Allylschutzgruppe Iod-vermittelt unter basischen Reaktionsbedingungen in DMSO zu entfernen, sind nicht gelungen.

Der Benzyl-geschützte Saccharidbaustein **72** konnte in einer Gesamtausbeute von 37 % über drei Stufen erhalten werden.

### 3.3.1.2 Synthese des Lactosebausteins

Als weiteres Saccharid zur C-Glycosidsynthese wurde D-Lactose (**73**) herangezogen. Die Synthese erfolgte in fünf Stufen und ist in Schema 3.24 abgebildet.



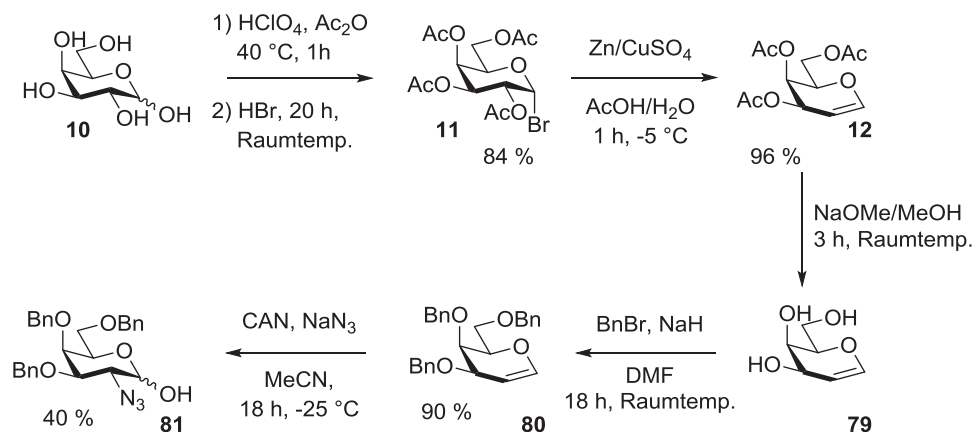
Schema 3.24: Synthese des einfachen Lactosebausteins

Dazu wurde zunächst D-Lactose (**73**) mit Acetanhydrid und Natriumacetat vollständig geschützt, wobei selektiv das  $\beta$ -Anomer **74** erhalten werden konnte.<sup>[178]</sup> Durch Aktivierung durch Bortrifluorid-Etherat wurde im nächsten Schritt das anomere Zentrum O-allyliert.<sup>[39]</sup> Unter *Zemplén*-Bedingungen<sup>[140]</sup> wurde das Lactosid zunächst deacetyliert und danach mittels Benzylbromid und Natriumhydrid O-benzyliert.<sup>[39]</sup> Im letzten Schritt konnte erneut mit Hilfe von Palladiumchlorid in Methanol die Allylgruppe entfernt werden und lieferte den Lactosebaustein **78** in einer Gesamtausbeute von 19 % über fünf Stufen.

### 3.3.1.3 Synthese des Galactosaminbausteins

Um Erkennungsprozesse nicht zu beeinflussen und eine bessere Vergleichbarkeit bzgl. des Austausches vom glycosidischen Sauerstoff gegen Kohlenstoff zu erhalten, sollte die Kohlenhydratstruktur dem natürlichen  $\text{T}_\text{N}$ -Antigen möglichst gleichen. Das heißt, neben der angestrebten  $\alpha$ -Konformation und *S*-Konfiguration sollte analog zur ursprünglichen Form an C-2 eine Acetamido-Funktion vorliegen. Nur wenige C-Glycosidsynthesen an Aminozuckern sind beschrieben worden,<sup>[161,162,171,172,179]</sup> da Amino- oder Acetamido-Funktionen in C-2-Position meist nicht toleriert werden.

Hinsichtlich der angestrebten Syntheseroute ist die direkte Umsetzung von Aminozuckern ebenfalls schwierig, daher wurde die C-2-Funktion zunächst als Azid eingesetzt, das erst im späteren Verlauf zum Amin reduziert wird. In Zusammenarbeit mit [REDACTED] und [REDACTED] wurde der Azido-Baustein **81** in fünf Stufen hergestellt (Schema 3.25).

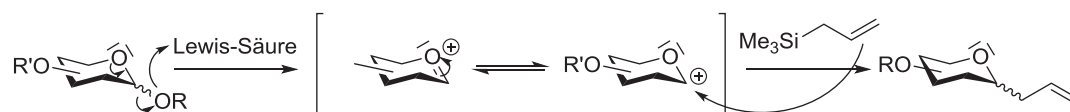


Schema 3.25: Synthese der Benzyl-geschützten Azido-Galactopyranose

In den ersten zwei Stufen wurde nach bekannter Methode (Kap. 3.2.1  $\text{T}_\text{N}$ -Thr-Synthese) D-Galactose (**10**) zum Galactal **12** umgesetzt.<sup>[102,103]</sup> Im nächsten Schritt wurden die Acetylgruppen entfernt und durch Benzylgruppen ersetzt.<sup>[180,181]</sup> Anschließend wurde das O-benzylierte Galactal **80** mit Cerammoniumnitrat (CAN) und Natriumazid in die Azido-Galactopyranose **81** überführt.<sup>[182]</sup> Die Synthese des entsprechenden Azidonitrats gelang an dieser Stelle jedoch nicht, da das Nitrat unter diesen Reaktionsbedingungen sofort hydrolysierte. Somit konnte der Azido-Baustein **81** in einer Gesamtausbeute von 29 % über fünf Stufen erhalten werden.

### 3.3.2 C-Allylierungen im Mikrowellenreaktor

Die C-Allylierung von Kohlenhydraten ist eine sehr verbreitete Methode zur Synthese von C-Glycosiden. Dabei können Methylglycoside oder Chloride in einer Sakurai-Reaktion<sup>[183,184]</sup> oder Acetate, erstmals beschrieben von Kishi et al.,<sup>[185]</sup> mit Allyltrimethylsilanen und verschiedenen Lewis-Säuren selektiv an C-1 allyliert werden (Schema 3.26).<sup>[186-191]</sup> Neueste Entwicklungen von Murphy et al. zeigen zudem effiziente Allylierungen nach Sakurai im Ultraschallbad mit stark verkürzten Reaktionszeiten von nur 20 Minuten.<sup>[192]</sup>



Schema 3.26: Allylierung von Methylglycosiden oder Acetaten mit Allyl-TMS

Die Reaktion verläuft im Allgemeinen über ein Oxocarbenium-Ion, welches von einem Nucleophil abgefangen wird. Als Nucleophile können sowohl substituierte Allyltrimethylsilane<sup>[183,184]</sup> als auch Propargyltrimethylsilane<sup>[192,193]</sup> genutzt werden. In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und Substituenten am Kohlenhydrat entsteht bevorzugt entweder das  $\alpha$ - oder das  $\beta$ -Anomer.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Allylierung der synthetisierten Saccharidbausteine **72**, **78** und **81** ein Verfahren entwickelt, basierend auf den Arbeiten von Kishi et al.<sup>[185]</sup> und Murphy et al.<sup>[192]</sup> in dem die Substrate in einem Durchflussreaktor allyliert wurden. Durch die verbesserte Wärmeaustauschleistung in Durchflusssystemen in Kombination mit einem gezielten Energieeintrag durch Mikro- oder Ultraschallwellen sollte ein wesentlich kürzerer und effizienterer Reaktionsverlauf ermöglicht werden. Zur Entwicklung einer solchen Durchflussmethode wurden die synthetisierten *O*-Benzyl-hexosen zunächst in die entsprechenden Acetate überführt, um anschließend *C*-allyliert werden zu können.

### 3.3.2.1 Acetylierung der Saccharide

Die Acetylierung der Saccharide erfolgte in Anlehnung an Takeo.<sup>[194]</sup> Dabei werden die Substrate mit Acetanhydrid und Natriumacetat 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Neben den bereits synthetisierten Zuckerbausteinen **72**, **78** und **81** (siehe Kap. 3.3.1.1 - 3.3.1.3) wurden zusätzlich weitere acetylierte Kohlenhydrate **82a-d** hergestellt, um die Anwendungsbreite der anschließenden *C*-Allylierung im Durchfluss untersuchen zu können (Tabelle 3.19).

Tabelle 3.19: Isolierte 1-Acetyl-hexosen

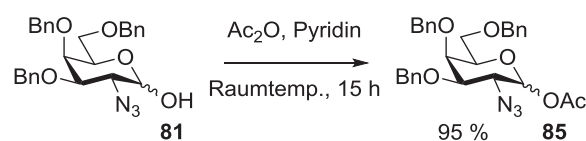
Produkt	Ausbeute	Produkt	Ausbeute
	95 % (94 %) <sup>a</sup>		67 %
	> 99 %		88 %
	58 %		28 %

Reaktionsbedingungen: Hexose, Acetanhydrid, Natriumacetat; die exakten Mengen sind dem Experimentellen Teil Kap. 5.4.2 zu entnehmen. Rühren bei Raumtemperatur 3 d. Isolierte Ausbeuten. <sup>a</sup> Umsetzung im Batch in der Mikrowelle.

Der synthetisierte Galactosebaustein **72** ließ sich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nahezu quantitativ in das entsprechende Acetat **83** überführen. Die Umsetzung der Lactose **78** lieferte lediglich 67 % Ausbeute an **84**, da die 1,4-glycosidische Bindung z. T. hydrolysiert wurde. Dagegen konnte 4,6-Benzylidenglucofuranose,<sup>[39]</sup> bereitgestellt von [REDACTED], quantitativ zu **82a** acetyliert werden. Sie bietet durch ihr differenziertes Schutzgruppenmuster zahlreiche Substitutionsmöglichkeiten. Die vollständige Acetylierung des Glucosamins lieferte **82b** in einer Ausbeute von 88 %. Dieses Substrat soll, obwohl die C-Allylierung von Amino- bzw. Acetamidozuckern gemäß Literatur nicht möglich ist,<sup>[188]</sup> dennoch unter den modifizierten Allylierungsbedingungen im späteren Verlauf untersucht werden.

Bei der Umsetzung der 3,4-Benzylidengalactopyranose,<sup>[39]</sup> ebenfalls bereitgestellt von [REDACTED], sind zwei Produkte entstanden. Unter Abspaltung der Benzylidenschutzgruppe wurde zum einen das in 3- und 4-Position acetylierte Acetat **82c** und zum anderen das einfach acetylierte Acetat **82d** in 58 % bzw. 28 % Ausbeute gebildet.

Die Acetylierung der Azido-Galactopyranose **81** unter sauren Bedingungen ist nicht gelungen und wurde daher nach Paulsen<sup>[195]</sup> in Pyridin und Natriumacetat durchgeführt (Schema 3.27).



Schema 3.27: Acetylierung der Azido-Galactopyranose in Pyridin nach Paulsen

Die Reaktion verläuft nahezu quantitativ und liefert das Produkt **85** in 95 % Ausbeute.

Zusätzlich wurde im Anschluss eine in der Literatur beschriebene, durch Mikrowellen-Einstrahlung unterstützte Acetylierungen<sup>[196]</sup> mit dem robusten Galactosebaustein **72** durchgeführt. Die Synthese lieferte unter den Literaturbedingungen bei max. 50 W und max. 120 °C innerhalb von nur 30 Minuten 94 % Ausbeute an **83** und stellt somit eine effiziente Mikrowellen-unterstützte Alternative dar.

Nach erfolgreicher Synthese zahlreicher 1-O-Acetate wurde anschließend eine Methode zur Allylierung in Durchflussreaktor entwickelt.

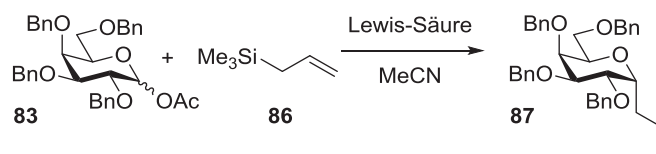
### 3.3.2.2 Allylierung der Saccharide im Durchflussreaktor

Zur Entwicklung einer Allylierungsmethode im Durchfluss wurde das vollständig benzylierte Galactosylacetat **83** als stabiles Modells substrat herangezogen. Hier sollen vor allem alternative Wärmequellen zum Energieeintrag untersucht werden. Wie bereits in Kap. 1.4 beschrie-

ben, stellen beispielsweise Ultraschall- oder Mikrowellen eine effiziente und beschleunigende Form des Energieeintrags im Vergleich zum traditionellen Erwärmen dar.

Zu Beginn wurden zunächst alle gängigen, literaturbekannten Synthesemethoden im Batch untersucht. Dabei wurde das Acetat **83** mit Allyl-TMS (**86**) unter Zugabe verschiedener Lewis-Säuren in Acetonitril umgesetzt und die entsprechenden Energiequellen miteinander verglichen (Tabelle 3.20).

Tabelle 3.20: Vorversuche zur Allylierung im Batch



Eintrag	Lewis-Säure	Methode	Zeit	Umsatz <sup>a</sup>
1	4 Äquiv. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	Rühren bei 4 °C	2 d	99 %
2	0.5 Äquiv. TMSOTf	Ultraschallbad	20 min	7 %
3	4 Äquiv. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	”	20 min	22 %
4	”	Mikrowelle	20 min	28 %
5	”	Rühren bei 25 - 30 °C	20 min	17 %

Reaktionsbedingungen: 1-O-Acetyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosid (**83**) (15.0 mg, 25.7  $\mu\text{mol}$ ), 2 Äquiv. TMS-Allyl (**86**) (8.5  $\mu\text{L}$ , 52  $\mu\text{mol}$ ), 0.5 Äquiv. TMSOTf (2.5  $\mu\text{L}$ , 13.8  $\mu\text{mol}$ ) bzw. 4 Äquiv.  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (10  $\mu\text{L}$ , 113  $\mu\text{mol}$ ), 0.5 mL trockenes Acetonitril. Ultraschall: 50/60 Hz, 230 V bzw. Mikrowelle: max. 50 W, max. 30 °C. <sup>a</sup> Umsätze wurden mittels HPLC mit internem Standard bestimmt (Biphenyllösung in Acetonitril  $c = 10 \text{ mg/mL}$ ).

Entsprechend der Literatur gelingt die Allylierung bei 4 °C nach Kishi<sup>[185]</sup> oder Brenna et al.<sup>[191]</sup> quantitativ, jedoch erst nach einer Reaktionszeit von 2 Tagen (Eintrag 1). Bei einer Reaktionsführung nach Murphy et al.<sup>[192]</sup> wurden mit TMS-Triflat als Lewis-Säure im Ultraschallbad nach 20 Minuten lediglich 7 % Umsatz verzeichnet (Eintrag 2).

Im Hinblick auf eine spätere Übertragung der Synthese in einen Durchflussreaktor sollte eine möglichst kurze Reaktionszeit angestrebt werden, weshalb im nächsten Schritt versucht wurde, die Effizienz der Methode nach Murphy durch den Einsatz einer anderen Lewis-Säure zu steigern. Unter Verwendung von Bortrifluorid-Etherat in Anlehnung an Kishi et al.,<sup>[185]</sup> konnte der Umsatz auf 22 % gesteigert werden (Eintrag 3). Bortrifluorid ist damit die geeignetere Lewis-Säure für diese Umsetzung. Im Folgenden wurde die Mikrowelle herangezogen. Mit den eingestellten Parametern von 50 W und 30 °C konnte eine weitere Umsatzsteigerung auf 28 % unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen wie im Ultraschallbad erreicht werden (Eintrag 4). Zum direkten Vergleich der Energiequellen wurde auch eine Reaktion unter leichtem Erwärmen bei 25 - 30 °C im Wasserbad durchgeführt. Diese Methode lieferte nach 20 min

lediglich 17 % Umsatz (Eintrag 5) und zeigt tatsächlich eine gewisse Überlegenheit der alternativen Energiequellen im Vergleich zum traditionellen Erwärmen mittels externer Heizquelle auf. Dabei bewirkte die Mikrowelle wiederum etwas bessere Umsätze als das Ultraschallbad. Sie wurde daher im Folgenden bevorzugt zur Entwicklung eines effizienten Durchflussreaktors verwendet.

Zu beachten ist allerdings, dass die Temperaturmessung in der Mikrowelle extern über einen IR-Sensor erfolgt. Direkte Aussagen zur Temperatur der Lösung sind daher schwierig. Außerdem wird während des Prozesses heftig mit Druckluft gekühlt, sodass die externe Temperatur nicht konstant bleibt, sondern meist niedriger liegt als gemessen. Auch der Energieeintrag kann nicht konstant eingehalten werden, da die Leistung beim Erreichen der eingegeben Höchsttemperatur herunterreguliert wird, um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden. Die Angaben zu den Reaktionsbedingungen entsprechen daher den eingestellten Mikrowellenparametern und werden wegen der teilweise starken Schwankungen, durch den Zusatz max. ausgedrückt. Diese Form der Angabe wird auch im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung beibehalten.

Generell zeigte die Synthese keine Schwierigkeiten und verlief ohne Nebenreaktionen. Allerdings sollte die Umsetzung unter möglichst wasserfreien Bedingungen und mit trockenem Lösungsmittel durchgeführt werden, da es sonst zur Ausbildung von Hydrolyseprodukten kommt.

Der Literatur entsprechend entstand unter diesen Reaktionsbedingungen bei allen Reaktionen bevorzugt das  $\alpha$ -C-Glycosid. Nur mittels HPLC konnten Spuren des  $\beta$ -Anomers mit Produktverhältnissen von  $> 20 : 1$  ( $\alpha : \beta$ ) nachgewiesen werden. Im  $^1\text{H-NMR}$  dagegen sind ausschließlich die  $\alpha$ -Glycosid-Signale zu sehen. Dies wird am Beispiel des H-2'-Allyl-Protons im Ausschnitt aus dem Roh-NMR der allylierten Galactose **87** gezeigt (Abbildung 3.17).

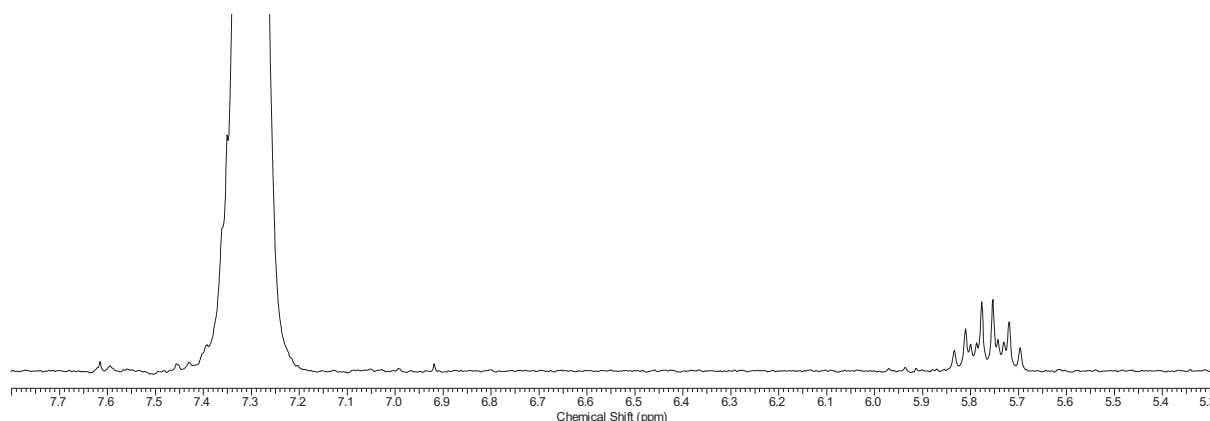


Abbildung 3.17: Ausschnitt aus dem Roh-NMR des 1-Allyl-Galactopyranosids **87**

Das vorliegende Multipllett bei 5.83 - 5.70 ppm ist in der Literatur für das  $\alpha$ -Anomer beschrieben. Nicht zu sehen ist dagegen das Signal des  $\beta$ -Anomers, welches ein Multipllett bei 5.94 ppm aufweist.<sup>[191]</sup>

Die Selektivität wird hauptsächlich von der Art und der Konformation des Kohlenhydrtrings bestimmt. Diesbezüglich wurden zahlreiche Studien von Woerpel et al. durchgeführt.<sup>[197-199]</sup> Die hier erhaltene starke  $\alpha$ -Selektivität bei der Reaktion mit Tetra-*O*-benzylgalactose **83** kann anhand Woerpels Beobachtungen erklärt werden (Abbildung 3.18).

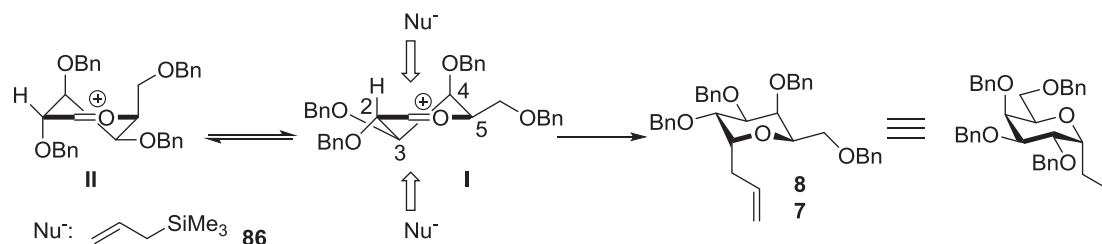


Abbildung 3.18: Erklärung zur bevorzugten Selektivität bei der Allylierung

Im Allgemeinen nehmen Intermediate von Tetrahydropyranoxocarbeniumionen (I) bevorzugt eine Halbsessel-Konformation ein.<sup>[200]</sup> Dieser Halbsessel zeichnet sich wiederum durch ein Gleichgewicht zweier Konformere I und II aus. Der nucleophile Angriff kann nun von oben und von unten erfolgen, wobei hierzu die Positionen der Substituenten berücksichtigt werden müssen. Diese können entweder pseudoaxial oder pseudoequatorial angeordnet sein und je nach Art des Substituenten (Alkyl, Alkoxy) werden bevorzugte Konformationen eingenommen. Für die Betrachtung nach Woerpel werden hauptsächlich die C-2, C-3 und C-4 Substituenten berücksichtigt, wobei C-3 Substitutionen meist nicht genügend eindeutige Ergebnisse liefern und daher hier nicht mit einbezogen werden. Woerpel et al.<sup>[197,198]</sup> beschreiben für die vorliegenden Benzyl-Substituenten am C-4 eine bevorzugte pseudoaxiale- und am C-2 eine bevorzugte pseudoequatoriale Konformation. Daher liegt vorwiegend das Konformer I vor, sodass der Angriff des Nucleophils aus sterischen Gründen bevorzugt von unten erfolgt und somit hauptsächlich das  $\alpha$ -Anomer gebildet wird.

Nachdem aus den Allylierungen im Batch  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  als geeignete Lewis-Säure und die Mikrowelle als bevorzugte Energiequelle ermittelt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Synthese in einen Durchflussreaktor übertragen. Der Mikrowellenreaktor zur Allylierung ist in Abbildung 3.19 gezeigt.

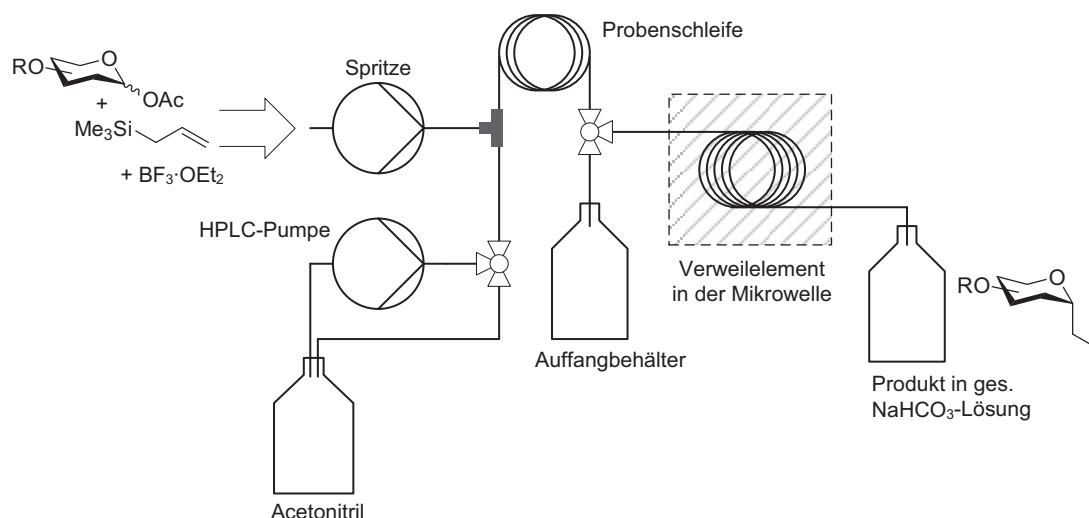


Abbildung 3.19: Durchflussreaktor zur Allylierung der Saccharidacetate

Der Reaktor besteht aus einer HPLC-Pumpe, welche das Lösungsmittel und die Reagenzien befördert, PTFE-Kapillaren als Probenschleife (AD: 3.2 mm, ID: 1.6 mm, V = 1.0 mL) und als Verweilelement (AD: 1.25 mm, ID: 0.75 mm, V = 4 mL) und einem CEM Discover-Mikrowellengerät als Wärmequelle. Für die Methodenoptimierung wurden kleine Probenmengen je Versuchsansatz ausgewählt.

In einem typischen Versuchsansatz wurden ca. 15 mg (25.7  $\mu$ mol) des Galactopyranosylacetats **83** zuvor in 0.5 mL Acetonitril gelöst und mit Allyl-TMS (**86**) und BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> versetzt. Das Gemisch wurde sofort in die Probenschleife injiziert und mittels HPLC-Pumpe über das Lösungsmittel in den Mikrowellenreaktor befördert. Unmittelbar vor dem Einspritzen der Probe wurden die Mikrowellenparameter eingestellt und der Energieeintrag gestartet. Am Ende des Reaktors wurde das Produkt in gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgefangen. Zur Erhaltung der Reaktionszeit von 20 Minuten wurde bei einem Reaktionsvolumen des Verweilelements von 4 ml eine Flussrate von 12 mL/h errechnet und angewendet.

Die ersten Optimierungsversuche bezüglich der Mikrowellenparameter sind in Tabelle 3.21 zusammengetragen.

Tabelle 3.21: Erste Optimierungsversuche zur Allylierung im Durchflussreaktor

BnOC1OC(OBn)C(OBn)C(OAc)O1 + Me3SiCH2CH=CH2
 $\xrightarrow[MeCN]{4 \text{ Äquiv. } BF_3 \cdot OEt_2}$ 
BnOC1OC(OBn)C(OBn)C(O)O1

**83** + **86**  $\xrightarrow[MeCN]{4 \text{ Äquiv. } BF_3 \cdot OEt_2}$  **87**

))), 12 mL/h, 20 min

Eintrag	Mikrowelleneinstellungen <sup>a</sup>	Umsatz <sup>b</sup>
1	50 W, 30 °C	57 %
2	50 W, 25 °C	48 %
3	40 W, 30 °C	54 %
4	50 W, 35 °C	56 %
5	100 W, 35 °C	55 %
6	100 W, 40 °C	51 %

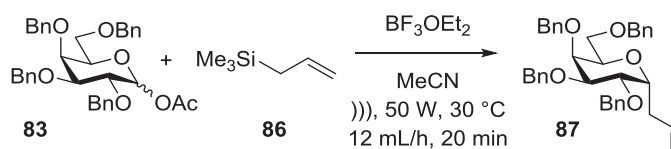
Reaktionsbedingungen: 1-*O*-Acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosid (**83**) (15.0 mg, 25.7  $\mu$ mol), 2 Äquiv. TMS-Allyl (**86**) (8.5  $\mu$ L, 52  $\mu$ mol), 4 Äquiv.  $BF_3 \cdot OEt_2$  (10  $\mu$ L, 113  $\mu$ mol), 0.5 mL trockenes Acetonitril. Mikrowelle. 12 mL/h. <sup>a</sup> Bei den Werten handelt es sich um die eingestellten Mikrowellenparameter. <sup>b</sup> Umsätze wurden mittels HPLC mit internem Standard bestimmt (Biphenyllösung in Acetonitril  $c = 10$  mg/mL).

Im ersten Versuch wurden die optimierten Parameter aus der Batch-Synthese übernommen (Tabelle 3.20, Eintrag 4), d. h. max. 50 W bei max. 30 °C. Die Reaktionsführung im Durchfluss lieferte hierbei unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen einen doppelt so hohen Umsatz (Eintrag 1). Bei einer niedrigeren Temperatur von max. 25 °C oder geringeren Mikrowellenleistung von max. 40 W wurden erwartungsgemäß geringere Umsätze beobachtet, wobei die Temperatur einen größeren Effekt hat (Eintrag 2, 3). Höhere Temperaturen und/oder Leistungen hingegen lieferten keine Umsatzsteigerung (Eintrag 4 - 6). Die starken Temperatur- und Leistungsschwankungen der Mikrowelle, die bereits zu Beginn der Beschreibung erwähnt wurden, erschweren an dieser Stelle allerdings eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse. Letztendlich wurde im Vergleich zu den Anfangsbedingungen (Eintrag 1) durch eine Temperaturerhöhung um 5 °C ein identisches Ergebnis erhalten (Eintrag 4) und durch gestiegene Leistungen keine Verbesserungen, jedoch auch keine signifikanten Verschlechterungen verzeichnet (Eintrag 5, 6). Eine mögliche Erklärung für die annähernd gleichen Ergebnisse könnte in den relativ ähnlichen Durchschnittstemperaturen und -leistungen der jeweiligen Synthesedurchläufe liegen. Denn während bei einer Leistungseinstellung von 50 W diese auch tatsächlich erreicht und längere Zeit gehalten werden konnte, wurden bei 100 W lediglich max. 51 bzw. 58 W erreicht. Wird die Leistung nun über die gesamte Synthesedauer gemittelt, ergeben sich möglicherweise nahezu gleiche Durchschnittswerte. Scheinbar können dabei auch leichte Temperaturerhöhungen die Reaktion nicht signifikant beschleunigen. Um dies aller-

dings zu bestätigen, müssten Aufzeichnungen des gesamten Temperatur- und Leistungsverlaufs während der Synthesedauer durchgeführt werden.

Die besten Umsätze wurden somit bei einer Mikrowelleneinstellung von 50 W und 30 °C erzielt und daher im Folgenden zur Optimierung der Reagenz- und Substratmengen verwendet (Tabelle 3.22).

Tabelle 3.22: Optimierung der TMS-Allyl- und Lewis-Säure-Menge



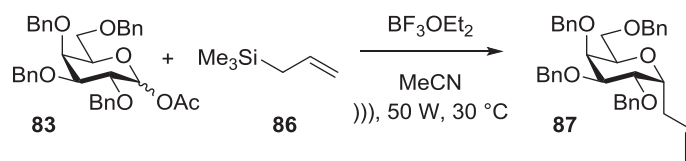
Eintrag	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	TMS-Allyl	Umsatz <sup>a</sup>	Ausbeute
1	8 Äquiv.	2 Äquiv.	47 %	-
2	4 Äquiv.	4 Äquiv.	59 %	-
3	8 Äquiv.	4 Äquiv.	71 %	-
4	16 Äquiv.	8 Äquiv.	91 %	93 %

Reaktionsbedingungen: 1-O-Acetyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosid (**83**) (15.0 mg, 25.7  $\mu\text{mol}$ ), TMS-Allyl (**86**),  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ , 0.5 mL trockenes Acetonitril, Mikrowelle: max. 50 W, max. 30 °C, 12 mL/h. <sup>a</sup> Umsätze wurden mittels HPLC mit internem Standard bestimmt (Biphenyllösung in Acetonitril  $c = 10 \text{ mg/mL}$ ).

Die einseitige Erhöhung der  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  oder TMS-Allyl-Menge lieferte rückläufige bzw. gleichbleibende Umsätze (Eintrag 1, 2). Wurden hingegen beide Mengen verdoppelt und das 2 : 1-Verhältnis aus Lewis-Säure zu TMS-Allyl belassen, konnte die Reaktion stark beschleunigt und somit ein verbesserter Umsatz 71 % erhalten werden (Eintrag 3). Eine erneute Verdopplung auf 16 Äquiv. an Lewis-Säure und 8 Äquiv. an Allyl-TMS lieferte sogar eine annähernd quantitative Umsetzung mit einer Ausbeute von 93 % (Eintrag 4). Der um das 4-fache erhöhte Substrat- und Säurebedarf im Vergleich zur ursprünglichen Menge ist vermutlich auf die starke Verdünnung im Durchflussreaktor zurückzuführen.

Zuletzt wurde untersucht, ob die Flussrate gesteigert bzw. ob die Substrat- und Reagenzmengen bei geringeren Flussraten reduziert werden kann (Tabelle 3.23).

Tabelle 3.23: Optimierung der Flussrate



Eintrag	BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub>	TMS-Allyl	Zeit / Flussrate	Umsatz <sup>a</sup>
1	4 eq	2 Äquiv.	40 min / 6 mL/h	38 %
2	16 eq	8 Äquiv.	10 min / 24 mL/h	83 %

Reaktionsbedingungen: 1-*O*-Acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosid (**83**) (15.0 mg, 25.7  $\mu$ mol), TMS-Allyl (**86**), BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, 0.5 mL trockenes Acetonitril, max. 50 W, max. 30 °C. <sup>a</sup> Umsätze wurden mittels HPLC mit internem Standard bestimmt (Biphenyllösung in Acetonitril c = 10 mg/mL).

Bei geringeren Flussraten wurde ein starker Umsatzeinbruch beobachtet (Eintrag 1), da vermutlich ausgeprägtere Diffusionen der Substrate und Reagenzien aufgrund der längeren Verweilzeit im Verweilelement vorliegen und so zu einer verstärkten Verdünnung führen. Insgesamt sank zwar der Umsatz bei Verdoppelung der Flussrate, allerdings konnten dennoch 83 % des Edukts **83** innerhalb von nur 10 Minuten umgesetzt werden (Eintrag 2).

Eine effiziente und stark beschleunigte, Mikrowellen-unterstützte Durchflusssynthese konnte somit verwirklicht werden. Nach dieser Methode wurde bei erhöhten BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>- und TMS-Allyl-Mengen das Modellsubstrat **83** innerhalb kürzester Zeit in einer Ausbeute von 93 % allyliert.

Nach Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden zusätzliche Reaktoroptimierungen durchgeführt. Dabei sollte ein System entwickelt werden, das es ermöglicht, die schwierige Handhabung von BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> zu erleichtern, indem die Zugabe der Lewis-Säure separat erfolgt. Zunächst wurde dazu die Umsetzung in einem Tube-in-Tube-Reaktor nach Abbildung 3.1 untersucht. Hier wird Bortrifluorid-Etherat als fluorhaltige Komponente in die äußere Membran eingespritzt, deren Durchgängigkeit für BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> ebenfalls zuvor mittels Indikator bestätigt werden konnte. Jedoch war die Diffusionsgeschwindigkeit der Lewis-Säure scheinbar zu gering, denn es fand keine Umsetzung des Galactosylacetats **83** in diesem Reaktor statt.

Eine weitere Möglichkeit zur separaten Zugabe von Bortrifluorid-Etherat wurde daher durch gesonderte Zuflussströme geprüft. Der Reaktoraufbau für eine solche Reaktionsführung ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

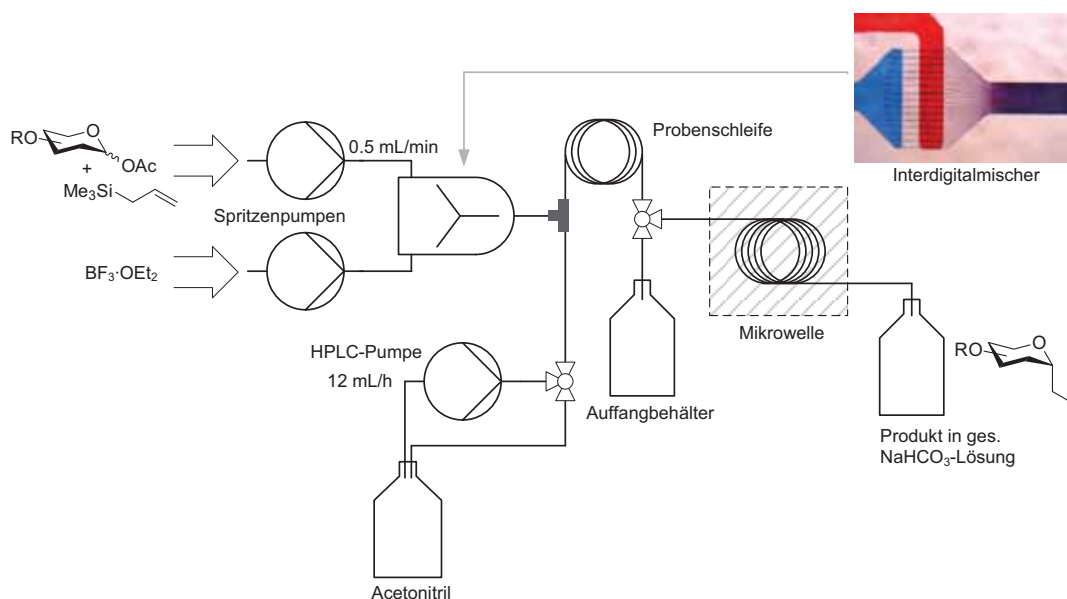
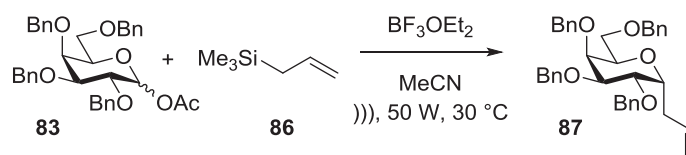


Abbildung 3.20: Mikrowellen-Durchflussreaktor mit eingebautem Interdigitalmischer

Die Substratlösung und die Lewis-Säure wurden hierbei getrennt mittels Spritzenpumpen in einen Mikromischer (Interdigitalmischer) eingeleitet, dort effizient gemischt und anschließend in die direkt verbundene Probenschleife injiziert. Nach beendeter Zugabe wurde anschließend das Lösungsmittel mitsamt der Probenlösung mittels HPLC-Pumpe bei 12 mL/h durch den Reaktor befördert. Entscheidend bei diesem Reaktoraufbau ist eine erfolgreiche Mischung der separaten Zuflussströme aus Substratlösung und Lewis-Säure. Beide Ströme müssen innerhalb der gleichen Zeit über den Mischer in die Probenschleife befördert werden.

Zur Ermittlung geeigneter Mischungsparameter werden unterschiedliche Lewis-Säure-Mengen bei verschiedenen Flussraten mit der Substratlösung vermischt (Tabelle 3.24). Dazu wurden die Substrate **83** und **86** zuvor in 0.5 mL Acetonitril gelöst und danach mit der Lewis-Säure innerhalb einer Minute in die Probenschleife eingeleitet.

Tabelle 3.24: Optimierung der Lewis-Säure-Menge



Eintrag	BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub>	Flussrate BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub>	Umsatz <sup>a</sup>
1	40 μL	40 μL/min	32 %
2	70 μL	70 μL/min	51 %
3	90 μL	90 μL/min	80 %

Reaktionsbedingungen: 1-O-Acetyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosid (**83**) (15.0 mg, 25.7  $\mu$ mol), TMS-Allyl (**86**) (35  $\mu$ L, 220  $\mu$ mol, 8 Äquiv.), BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, 0.5 mL trockenes Acetonitril, max. 50 W, max. 30 °C.<sup>a</sup> Umsätze wurden mittels HPLC mit internem Standard bestimmt (Biphenyllösung in Acetonitril c = 10 mg/mL).

Mit den ursprünglichen 16 Äquiv. (ca. 40  $\mu$ L) an Lewis-Säure konnten bei diesem Reaktoraufbau lediglich 32 % Umsatz verzeichnet werden (Eintrag 1). Mit 90  $\mu$ L an Lewis-Säure wurden dagegen annähernd die gleichen Ergebnisse, wie in dem Reaktoraufbau ohne separate Dosierung der Säure (siehe Abbildung 3.19), erreicht (Eintrag 3).

Somit konnte auch ein Reaktorsystem mit Hilfe separater Zudosierung der Säure entwickelt werden, das eine wesentlich sicherere und leichtere Handhabung der Lewis-Säure ermöglicht. Dennoch wurde aufgrund des erhöhten Bedarfs an Lewis-Säure sowie der niedrigeren Umsätze die Anwendungsbreite der Methode mit dem ursprünglichen Reaktorsystem aus Abbildung 3.19 untersucht. Unterschiedlich substituierte Mono- und Di- sowie anspruchsvolle C-2 funktionalisierte Saccharide sind eingesetzt worden. Die isolierten Allyl-Produkte sind in Tabelle 3.25 aufgeführt.

Tabelle 3.25: Isolierte Allyl-C-Glycoside aus der Mikrowellen-Durchflusssynthese

$\text{RO-Glycoside (13, 82-85)} + \text{Me}_3\text{Si-allyl (86)} \xrightarrow[\text{MeCN, 12 mL/h}]{\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2, 50 \text{ W, max. } 30 \text{ }^\circ\text{C}}$ 
 $\text{Allyl-C-Glycoside (87-90)}$

Produkt	Ausbeute	Produkt	Ausbeute
 <b>87</b>	93 % (98 %) <sup>a</sup>	 <b>88</b>	0 %
 <b>89a</b>	51 % (72 %) <sup>a</sup>	 <b>89b</b>	0 %
 <b>90a</b>	(99 %) <sup>b</sup>	 <b>90b</b>	0 %
 <b>90c</b>	65 %	 <b>90d</b>	81 %

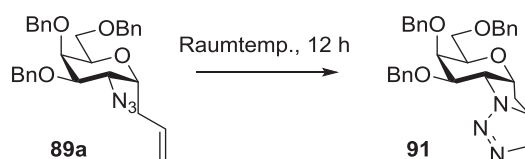
Reaktionsbedingungen: Acetyl-Saccharid **13**, **82** - **85**, 8 Äquiv. TMS-Allyl (**86**), 16 Äquiv.  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ , 0.5 mL trockenes Acetonitril; die exakten Mengen sind dem Experimentellen-Teil Kap. 5.4.3 zu entnehmen, Mikrowelle: max. 50 W, max. 30  $^\circ\text{C}$ . Isolierte Ausbeuten. <sup>a</sup> Allylierung im Kolben bei tiefen Temperaturen, gemäß der Literatur. <sup>b</sup> Als Edukt (**82a**)/Produkt (**90a**)-Gemisch erhalten.

Das Modellsubstrat **83** konnte wie bereits beschrieben innerhalb von 20 Minuten im Reaktor in einer Ausbeute von 93 % allyliert werden. Nach Berichten von Kishi<sup>[185]</sup> bzw. Brenna,<sup>[191]</sup>

wurden etwas bessere Ausbeuten von 98 % erhalten, allerdings bei sehr langen Reaktionszeiten von 2 Tagen.

Die Umsetzung des Lactose-Derivats **84** unter den vorliegenden stark Lewis-sauren Bedingungen lieferte lediglich die allylierte Galactose **87**, da hierbei die säurelabile 1,4-glycosidische Bindung gespalten wurde.

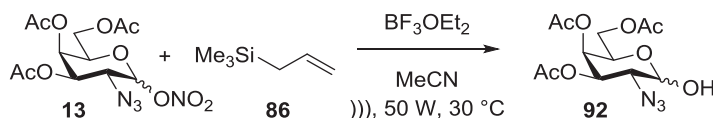
Die Allylierung des Azido-Galactose-Derivats **85** ist im Allgemeinen sehr anspruchsvoll, da das Produkt bei Raumtemperatur innerhalb kürzester Zeit spontan irreversible 1,3-Dipolare Cycloadditionen eingeht und somit sehr instabil vor allem gegenüber Wärmeeinwirkung ist (Schema 3.28).<sup>[190]</sup>



Schema 3.28: Irreversible Nebenreaktion des Azido-Allyl-Galactosids **89a**

Daher wurde die Synthese bisher lediglich in der Kälte, bei entsprechend langen Reaktionszeiten von 2 - 6 Tagen, durchgeführt. Dennoch konnte unter diesen Reaktionsbedingungen kein vollständiger Umsatz erreicht werden und lieferte eine maximale Ausbeute von 72 %. Die Durchflusssynthese dagegen erbrachte innerhalb von 20 Minuten bereits 51 % des Allyl-Produkts **89a**. Außerdem wurde hierbei, trotz erhöhter Reaktionstemperatur von bis zu 30 °C keine Ausbildung des cyclischen Nebenprodukts beobachtet.

Alternativ zur Benzyl-geschützten Azido-Galactose **85** wurde dessen Vorstufe, nämlich das acetylierte Azidonitrat **13** (Synthese, Schema 3.4) eingesetzt. Dieses Substrat würde die Möglichkeit einer verkürzten Gesamtsynthese zum C-Glycosid **89b** ermöglichen, da der Austausch der Schutzgruppen von Acetyl zu Benzyl eingespart werden könnte (siehe Schema 3.25). Allerdings scheiterten alle Versuche das Azidonitrat **13** im Durchflussreaktor zum C-Allylglycosid umzusetzen. Auch Versuche im Batch bei Raumtemperatur oder unter dem Einfluss von Mikro- oder Ultraschallwellen lieferten trotz wasserfreier Bedingungen lediglich die hydrolysierte Azido-Galactopyranose **92** (Schema 3.29).



Schema 3.29: Umsetzung des Azidonitrats **13** im Mikrowellenreaktor mit Allyl-TMS **86**

Die Allylierung des 4,6-Benzyliden-Glucoseacetats **82a** im Mikrowellenreaktor gelang nur mäßig. Der Umsatz war nicht vollständig und die säulenchromatographische Trennung des

Edukts vom Produkt gestaltete sich aufgrund sehr ähnlicher  $R_f$ -Werte schwierig. Das Produkt **90a** konnte hier lediglich als Edukt/Produkt-Gemisch isoliert werden.

Das acetylierte Glucosamin **82b** konnte auch im Mikrowellenreaktor trotz modifizierter Synthesebedingungen nicht allyliert werden. Das unumgesetzte Edukt wurde zurückgewonnen, wodurch die Beobachtungen aus der Literatur bestätigt werden können.<sup>[188]</sup>

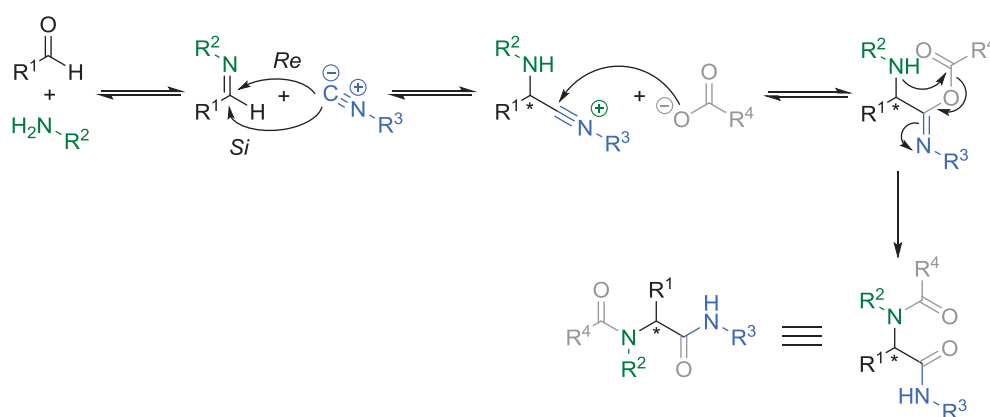
Zuletzt konnte das Galactose-Derivat **90c** in relativ guten Ausbeuten von 65 % erhalten werden. Ebenso wurde **90d** in 81 % Ausbeute isoliert, wobei das Substrat von Frau Dr. Fauziya Syed<sup>[201]</sup> zur Verfügung gestellt wurde.

Mit der auf den Arbeiten von Kishi und Murphy basierenden, entwickelten Mikrowellen-Durchflusssynthese, konnten einige funktionalisierte Acetate  $\alpha$ -selektiv in C-Glycoside überführt werden. Die Methode ermöglicht eine effiziente Allylierungen in kurzer Zeit in guten bis sehr guten Ausbeuten. Dabei konnte unter anderem auch das wärmeempfindliche Azido-Allyl-Galactosid **89a** nebenproduktfrei hergestellt werden.

Im Folgenden werden die synthetisierten Allyl-C-Glycoside in die entsprechenden Aldehyde überführt, um so als Substrate für die Ugi-Reaktion dienen zu können.

### 3.3.3 Synthese der Aldehydbausteine zur Ugi-Reaktion

Die Ugi-Reaktion wurde erstmals 1962 von Ivar Ugi beschrieben.<sup>[202,203]</sup> Es handelt sich um eine Vier-Komponenten-Reaktion, die auf der 1921 eingeführten Drei-Komponenten-Passerini-Reaktion basiert.<sup>[204]</sup> Bei der Ugi-Reaktion reagieren ein Aldehyd oder Keton, eine Carbonsäure, ein Amin und ein Isonitril miteinander zu *N*-acylierten  $\alpha$ -Aminocarbonsäureamiden (Schema 3.30).



Schema 3.30: Mechanismus der Vier-Komponenten Ugi-Reaktion

Die Reaktion beginnt mit der Kondensation desamins mit einem Aldehyd oder Keton zum Imin, welches anschließend von einem Isonitril entweder von der *Re*- oder *Si*-Seite angegriffen werden kann, wodurch die Konfiguration des Produkts bestimmt wird. Im Produkt stammt

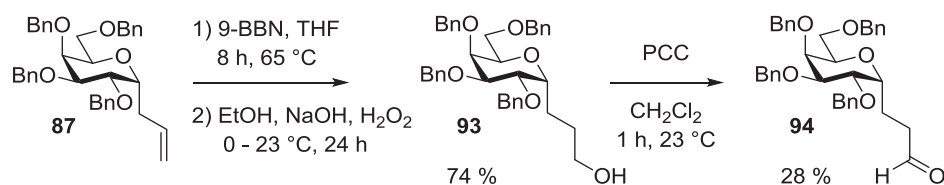
dabei der Aminosäurealkylrest vom Aldehyd, der Amidrest vom Isonitril und der Carbonsäure sowie der *N*-Acylrest am Amin ebenfalls von der Carbonsäure ab.<sup>[205]</sup> Hierbei können generell primäre und sekundäre, aliphatische und aromatische Amine mit einer Vielzahl an Aldehyden oder Ketonen mit verschiedenen Isonitrilen und Carbonsäuren zu zahlreichen Produkten, darunter  $\alpha$ -Aminocarbonsäureamide, Thioamide, Oligopeptide,  $\beta$ -Lactame, Urethane u. v. m., umgesetzt werden.<sup>[202]</sup> Die Reaktion weist eine hohe Atomökonomie auf und zeigt eine große Gruppentoleranz, weshalb sie oft z. B. zum Aufbau komplexer Naturstoffe herangezogen wird.<sup>[206–208]</sup> Zudem ist sie exotherm und läuft somit innerhalb kurzer Zeit unter milden Reaktionsbedingungen in sehr hohen Ausbeuten ab.

Eine stereoselektive Durchführung der Ugi-Reaktion ist prinzipiell durch den Einbau von Chiralität in allen vier Komponenten möglich, allerdings ist der Einfluss des Isonitrils und der Carbonsäure auf die Stereoselektivität des Reaktionsverlaufs sehr gering.<sup>[209]</sup> Da der asymmetrische Induktor am Ende der Synthese zur Ausbildung von  $\alpha$ -Aminosäuren wieder abgespalten werden muss und die Aldehydkomponente den Aminosäurerest definiert, bleibt nur noch die Aminokomponente, um sie als chirales Hilfsmittel einzusetzen.

Im Folgenden wird der Aufbau der Aldehydkomponenten zur Ugi-Reaktion beschrieben. Dazu wurde zum einen das einfache Allyl-Galactopyranosid **87** und zum anderen das C-2-funktionalisierte Azido-Allyl-Galactopyranosid **89a** verwendet.

### 3.3.3.1 Synthese des Galactosylaldehyds

Zunächst wurde das *O*-Benzyl-geschützte *C*-Allylglycosid **87** umgesetzt. Die Synthese zum Aldehyd erfolgte dabei in zwei Stufen (Schema 3.31).



Schema 3.31: Synthese des Galactosylaldehyds über eine Hydroborierung

Im ersten Schritt wurde an der Doppelbindung des Allylrestes eine Hydroborierung mit 9-BBN (9-Borabicyclo[3.3.1]nonan) durchgeführt. Synthesen mit 9-BBN erlauben eine regio-selektive anti-Markownikow-Funktionalisierung der Doppelbindung.<sup>[210]</sup> Einige Hydroborierungen sind exakt an diesem Substrat beschrieben, indem es bei 0 °C mit 9-BBN versetzt wird.<sup>[211–213]</sup> Allerdings wurde nach diesen Vorschriften auch nach langer Reaktionszeit nur eine sehr geringe Umsetzung beobachtet. Erfolgte die Zugabe von 9-BBN dagegen bei Raumtemperatur mit anschließendem Erhitzen unter Rückfluss,<sup>[214]</sup> verlief die Reaktion erheblich

schneller bei wesentlich höheren Umsätzen. Zudem erwies sich die Zugabe der unverdünnten 0.5 M 9-BBN Lösung in THF als vorteilhaft. Nach oxidativer Aufarbeitung mit Wasserstoffperoxid im alkalischen Milieu konnte der Alkohol **93** in 74 % Ausbeute isoliert werden.<sup>[214]</sup> Im nächsten Schritt wurde die Oxidation zum Aldehyd durchgeführt. Dafür gibt es zahlreiche Möglichkeiten, jedoch sollte die Reaktion selektiv auf der Stufe des Aldehyds enden, ohne weiter zur Carbonsäure zu reagieren. Hier wurde die Oxidation mit PCC (Corey-Reagenz)<sup>[215]</sup> in Anlehnung an Dondoni et al.<sup>[216]</sup> ausgewählt. Um die Reaktion zur Carbonsäure zu verhindern, wurde unter streng wasserfreien Bedingungen gearbeitet. Nach einer Stunde war die Umsetzung vollständig. Sie lieferte aber den gewünschten Aldehyd **94** in einer Ausbeute von lediglich 28 %. Die Ursache für die geringe Ausbeute ist auf die Ausbildung eines stark unpolaren, nicht näher identifizierten Nebenprodukts zurückzuführen, welches einen  $R_f$ -Wert von 0.83 ( $^o\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2 : 1) aufweist. Eine Zeichnung der angefertigten DC ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

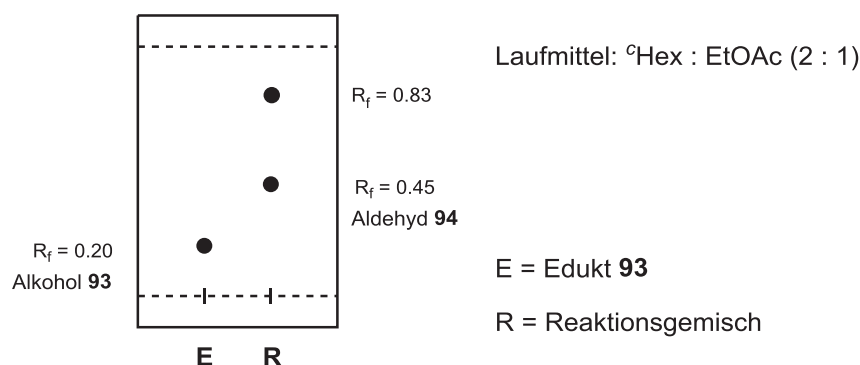


Abbildung 3.21: Schematische Zeichnung der erhaltenen DC nach beendeter Reaktion

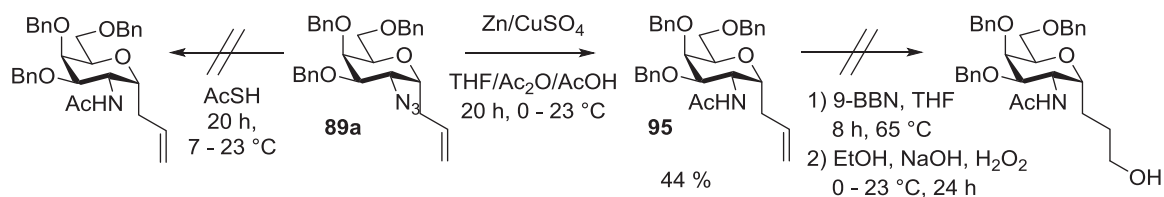
Die DC zeigte einen vollständigen Umsatz an. Zudem konnte eine Oxidation zur Carbonsäure sowie eine Rückreaktion zum Allylsaccharid **87** ( $R_f = 0.72$ ,  $^o\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2 : 1) ausgeschlossen werden. Auch nach Wiederholung des Versuchs wurde das identische Ergebnis erhalten. Der Aldehyd **94** konnte somit über beide Stufen in einer Gesamtausbeute von 21 % isoliert werden.

### 3.3.3.2 Synthese des Galactosaminaldehyds

In ähnlicher Weise wie zuvor, wurde auch das Azido-Allyl-Galactosid **89a** zum Aldehyd umgesetzt. In Zusammenarbeit mit [REDACTED] wurden dafür verschiedene Zugangswege untersucht. Allen gemeinsam war zunächst die Reduktion des Edukts **89a**.

Zuerst sollte die im natürlichen  $T_N$ -Antigen vorhandene Acetamidogruppe in C-2-Position gebildet werden. Diese kann ausgehend vom Azid über eine reduktive Acetylierung erzeugt werden und erfolgte hier in Anlehnung an die bekannte Durchführung aus der Synthese des

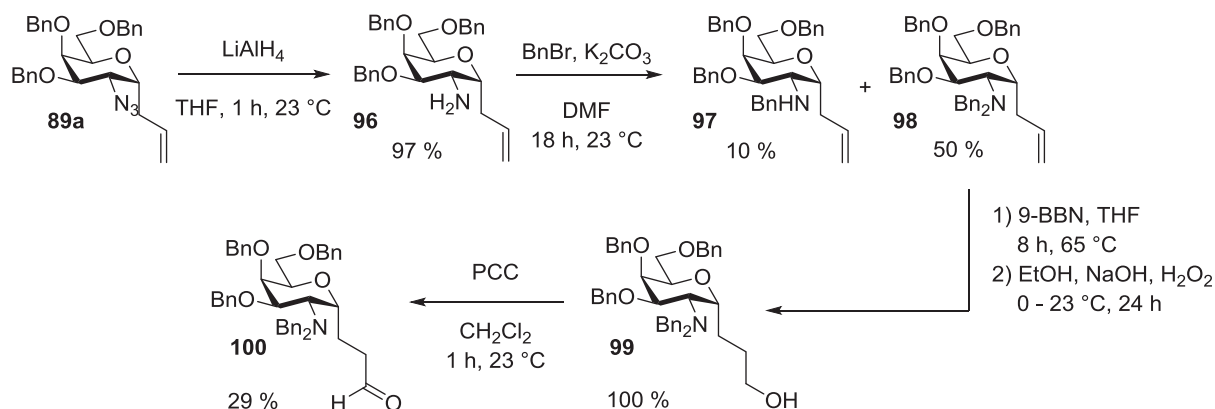
T<sub>N</sub>-Threonin-Derivats<sup>[107]</sup> (Kap. 3.2.1) mit Zink und Kupfersulfat in einem THF/Ac<sub>2</sub>O/AcOH 3 : 2 : 1 Gemisch (Schema 3.32).



Schema 3.32: Reduktive Acetylierung des Azido-Allyl-Galactosids

Wegen der Wärmelabilität des Substrats wurde die Synthese zunächst bei 0 °C durchgeführt und die Temperatur nur langsam, innerhalb von 20 h, auf Raumtemperatur erhöht. Die Umsetzung verlief nicht vollständig und zudem entstanden zahlreiche Nebenprodukte, sodass nur eine mäßige Ausbeute von 44 % an **95** erhalten wurde. Ein alternativer Zugang nach Rosen et al. mit Thioessigsäure<sup>[217]</sup> ist nicht gelungen. Die anschließende Hydroborierung des Acetamids mit 9-BBN lieferte nach einem insgesamt schleppenden Verlauf ebenfalls zahlreiche Produktfraktionen. HPLC-MS-Messungen zeigten, dass die Carbonylgruppe der Acetamidofunktion teilweise oder komplett reduziert<sup>[218]</sup> und die C-C-Doppelbindung nur unvollständig hydroxyliert wurde. Versuche, die Hydroborierung direkt am Azid **89a** durchzuführen, sind ebenfalls gescheitert. Lediglich Fragmente des [3+2]-Cycloaddition-Nebenprodukts des Substrats konnten erhalten werden.

Aufgrund der geringen Toleranz der Hydroborierung gegenüber Acetamidogruppen musste eine alternative Schutzgruppe für das Amin gefunden werden. Um Nebenreaktionen zu verhindern, sollte es zudem vollständig geschützt werden. Eine geeignete Schutzgruppe sollte unter den Hydroborierungsbedingungen stabil sein, d. h. keine funktionellen Gruppen tragen, und in Anbetracht der darauffolgenden Oxidation nicht oxidierbar sein. Benzylgruppen erfüllen diese Anforderungen und sind zudem bereits im Saccharid vorhanden, sodass im späteren Verlauf alle Schutzgruppen in nur einem Schritt entfernt werden könnten. Die Alternativroute zur Synthese des Galactosaminaldehyds ist in Schema 3.33 abgebildet.



Schema 3.33: Alternativroute zur Synthese des Galactosaminaldehyds

Die Synthese beginnt mit der Reduktion des Azids **89a** nach Nicotra et al.<sup>[219]</sup> bei Raumtemperatur, allerdings mit äquimolaren Mengen an  $\text{LiAlH}_4$ , um die Reduktion zu beschleunigen und so die intramolekularen Nebenreaktion des Substrats zurückzudrängen. Die Reaktion verlief innerhalb einer Stunde quantitativ, sodass das Amin **96** in einer Ausbeute von 97 % isoliert werden konnte. Im nächsten Schritt folgte die Benzilyierung desamins **96** in Anlehnung an Dasgupta et al.<sup>[220]</sup> mit Benzylbromid in DMF. Unter diesen Bedingungen wurde das einfach (**97**) und das zweifach (**98**) benzylierte Produkt in 10 % bzw. 50 % Ausbeute erhalten. Um Nebenreaktion bei der Hydroborierung zu vermeiden, wurde lediglich das zweifach benzylierte Amin **98** weiter umgesetzt. Die anschließende Hydroborierung und Oxidation erfolgte analog zur Umsetzung aus Kap. 3.3.3.1. Der zunächst erhaltene Alkohol **99** wurde in quantitativen Mengen isoliert. Allerdings lieferte die Oxidation mit PCC bei einem vollständigen Umsatz erneut nur geringe Ausbeuten. Auch an dieser Stelle wurde keine Oxidation zur Carbonsäure beobachtet, jedoch entstand, ähnlich zur vorhergehenden Oxidation (Kap. 3.3.3.1), ein unpolares Nebenprodukt ( $R_f = 0.82$ ,  ${}^c\text{Hex} : \text{EtOAc}$ , 2 : 1), sodass der gewünschte Aldehyd **100** in lediglich 29 % Ausbeute isoliert werden konnte.

Beide zur Ugi-Reaktion benötigten Aldehydbausteine **94** und **100** konnten ausgehend von den Allylsubstraten **87** und **89a** über eine Hydroborierung mit anschließender Oxidation erfolgreich synthetisiert werden. Die direkte Umsetzung des Acetamido-Saccharids **95** gelang dabei nicht, sodass zunächst das freie Amin **96** mit stabilen Benzylschutzgruppen vollständig geschützt werden musste und erst im späteren Verlauf umfunktionalisiert werden kann.

### 3.3.4 Synthese der Auxiliare zur Ugi-Reaktion

Auxiliare (Hilfsstoffe, Helfer) sind chirale Verbindungen, die es ermöglichen, den stereochemischen Verlauf einer Reaktion zu beeinflussen. Sie bringen eine reagierende Funktion und

damit eine chirale Information in die Reaktion ein. Nach erfolgter Synthese entsteht nach Abspaltung des Hilfsstoffs bevorzugt ein Enantio- oder Diastereomer. Die bekanntesten Auxiliare sind Evans-Auxiliare. Sie basieren auf Oxazolidinonen und werden zum Aufbau enantiomerenreiner  $\alpha$ -substituierter Carbonsäurederivate in der Evans-Synthese verwendet.<sup>[221]</sup>

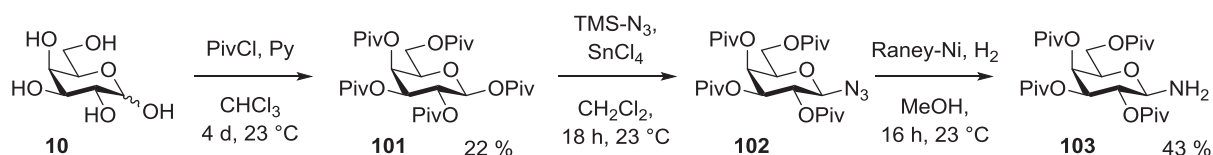
In der Arbeitsgruppe Kunz wurden Kohlenhydratamine als Auxiliare in zahlreichen Strecker-<sup>[209,222–227]</sup> und Ugi-Synthesen<sup>[209,226,228–230]</sup> verwendet. Im Allgemeinen lassen sich Kohlenhydratamine in zwei Gruppen einteilen, in Aminozucker und Glycosylamine. Aminozucker sind Kohlenhydrate, deren alkoholische OH-Gruppen durch Aminofunktionen ersetzt werden. Glycosylamine hingegen sind Zucker, deren anomeres OH durch ein Amin ersetzt ist. Aminozucker zeigen allerdings nur sehr geringe Selektivitäten bei asymmetrischen Synthesen,<sup>[209]</sup> weshalb hauptsächlich Glycosylamine eingesetzt werden. Hier wiederum zeigen Pivaloyl-geschützte Glycosylamine gegenüber Acetyl-geschützten neben einer höheren Stabilität auch eine höhere Selektivität in asymmetrischen Strecker-Synthese.<sup>[209,227]</sup>

In diesen asymmetrischen Strecker-Synthesen<sup>[226,227]</sup> und Ugi-Reaktionen<sup>[209,226,228–230]</sup> konnte die Stereoselektivität durch die Wahl des entsprechenden Glycosylamins maßgeblich beeinflusst werden. Dabei wurde unter der Verwendung von D-Galactosylamin bevorzugt die *R*-konfigurierte Aminosäure ausgebildet, während mit D-Arabinosylamin hauptsächlich das *S*-Produkt entstand.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher das Pivaloyl-geschützte D-Galactosylamin (**103**) und D-Arabinosylamin (**109**) synthetisiert und diese als Auxiliare in Ugi-Reaktionen zur *C*-Glycosylaminosäuresynthese untersucht.

### 3.3.4.1 Synthese des Galactosylamin-Auxiliars

Die Synthese des Galactosylamins aus D-Galactose (**10**) erfolgte in Zusammenarbeit mit [REDACTED] in drei Stufen (Schema 3.34).<sup>[225,227]</sup>



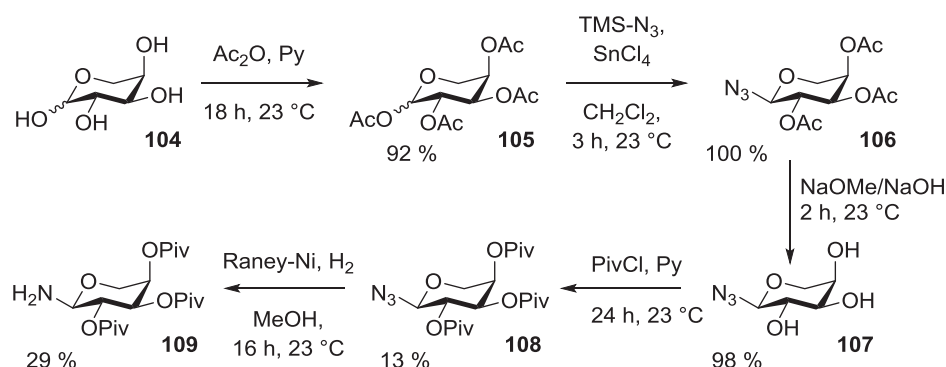
Schema 3.34: Synthese des Galactosylamin-Auxiliars

Bei der Reaktion der Galactose **10** mit Pivaloylchlorid in Pyridin entstand ein  $\alpha/\beta$ -Gemisch der Pentapivaloyl-galactose **101**, wobei das reine  $\beta$ -Anomer nach Umkristallisation aus Methanol erhalten werden konnte. Analog zu den Arbeiten von Paulsen et al.<sup>[231]</sup> wurde daraus das Azid **102** mittels TMS-Azid und Zinntetrachlorid erhalten und als Rohprodukt in der an-

schließenden Reduktion eingesetzt. Die Reduktion erfolgte durch Hydrierung über Raney-Nickel und lieferte das Tetrapivaloyl-Galactosamin-Auxiliar **103** in einer Gesamtausbeute von 10 % über alle drei Stufen. Zur Synthese kleinerer Produktmengen ist diese kurze Sequenz ausreichend. Höhere Ausbeuten können mit einer längeren Syntheseroute über Tetraacetylgalactosylazid erhalten werden.<sup>[209,227]</sup>

### 3.3.4.2 Synthese des Arabinosylamin-Auxiliars

Die Synthese des Arabinosylamins **109** gelingt dagegen nicht über eine kurze Sequenz analog zur D-Galactose, da hierbei hauptsächlich Furanosen oder das unerwünschte  $\alpha$ -Azid entstehen.<sup>[227,229]</sup> In Zusammenarbeit mit [REDACTED] und [REDACTED] wurde daher das Arabinosyl-Auxiliar über ein Tetraacetylderivat **105** hergestellt (Schema 3.35).<sup>[209,227,229]</sup>



Schema 3.35: Synthese des Arabinosylamin-Auxiliars

Ausgehend von D-Arabinose **104** gelang zunächst die Synthese des peracetylierten Saccharids **105** in einer Ausbeute von 92 %. Im Anschluss wurde das Azid **106** analog zum Galactosebaustein durch Reaktion mit TMS-Azid und  $\text{SnCl}_4$  erhalten, wobei nach dem von Paulsen<sup>[231]</sup> beschriebenen *trans*-Effekt selektiv das  $\beta$ -Anomer entstand. Im weiteren Verlauf wurden die Acetylgruppen mittels Natriummethanolat in Methanol abgespalten und danach die Hydroxylgruppen mit Pivaloylchlorid geschützt. Hierbei wurde ein Isomeregemisch aus  $\alpha/\beta$ -Pyranose und Furanosen erhalten, sodass nach chromatographischer Trennung lediglich 13 % des Arabinopyranosylazids **108** isoliert werden konnten. Die darauffolgende Reduktion mit Raney-Nickel lieferte das Arabinosyl-Auxiliar **109** in einer Gesamtausbeute von 4 %.

Mit den somit synthetisierten Auxiliaren sind die Vorbereitungen zur Ugi-Reaktion abgeschlossen, und es können nun die stereoselektiven Effekte bei der Umsetzung der Aldehyde untersucht werden.

### 3.3.5 Ugi-Reaktion

Die Ugi-Reaktion ist, wie bereits zuvor beschrieben, die Reaktion eines Aldehyds oder Ketons mit einer Carbonsäure, einem Amin und einem Isonitril zu *N*-acylierten  $\alpha$ -Aminocarbonsäureamiden. Mit Glycosylaminen wurde sie zur stereoselektiven Synthese von  $\alpha$ -Aminosäuren erfolgreich auf zahlreiche Substrate angewendet.<sup>[209,226,228–230,232]</sup> Aus diesen Vorarbeiten haben sich folgenden Beobachtungen ergeben:

- Unter den klassischen Ugi-Reaktionsbedingungen ohne Zugabe von Lewis-Säure findet keine Umsetzung statt. Erst mit Hilfe einer Lewis-Säure wird die Elektrophilie des gebildeten Glycosylimins erhöht und so die Reaktion ermöglicht. Dabei bewirkt  $\text{ZnCl}_2$  die höchsten Diastereoselektivitäten.
- Als Lösungsmittel eignen sich polare Lösungsmittel wie THF und Isopropanol am besten, während unpolare Lösungsmittel wie Chloroform nur unbefriedigende Selektivitäten liefern. Dies kann am Beispiel des Pivaloyl-geschützten Galactosylamins in Abbildung 3.22 erklärt werden.

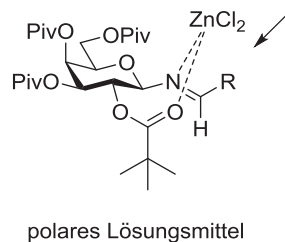


Abbildung 3.22: Einfluss des Lösungsmittels auf die optische Ausbeute der Ugi-Reaktion

In polaren Medien liegt das  $\text{ZnCl}_2$  in Lösung vor, sodass es von der C-2-Acylgruppe und dem Iminstickstoff komplexiert wird, wodurch die Vorderseite des Imins abgeschirmt wird und der Angriff bevorzugt von hinten abläuft.

- Generell wurden, je nach Reaktionsbedingungen, Anomerisierungen zu  $\alpha$ -Iminen beobachtet und lieferten dadurch zusätzliche Produktisomere. Allerdings konnten diese weitgehend durch die Verwendung von THF als Lösungsmittel unterdrückt werden.
- Die optimale Reaktionstemperatur liegt bei ca.  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ . Eine Reaktionsführung bei Raumtemperatur liefert geringere Stereoselektivitäten. Bei tieferen Temperaturen können diese verbessert werden, jedoch mit schlechteren Umsätzen und längeren Reaktionszeiten.
- Als Carbonsäure wurde hauptsächlich Ameisensäure verwendet, denn *N*-Formyl-Gruppen lassen sich am Ende der Reaktion wesentlich leichter entfernen als *N*-Acetyl-Gruppen.
- Das aliphatische, verzweigte <sup>t</sup>Bu-NC zeigt unter optimierten Bedingungen die besten Selektivitäten.

- Aromatische Aldehyde lassen sich am besten umsetzen. Um ähnliche Selektivitäten mit aliphatischen Aldehyden zu erreichen, müssen die Reaktionen bei tieferen Temperaturen und signifikant längeren Reaktionszeiten durchgeführt werden.
- Die Verwendung des D-Galactosylamins als Auxiliar lieferte bevorzugt *R*-Aminosäuren, wohingegen das D-Arabinosylamin die Selektivität zur *S*-Konfiguration lenkte. Die Ursache dafür wird in Abbildung 3.23 erläutert.

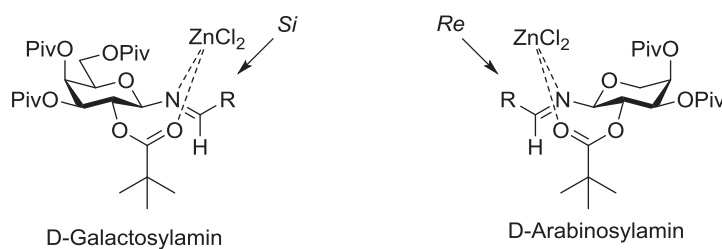
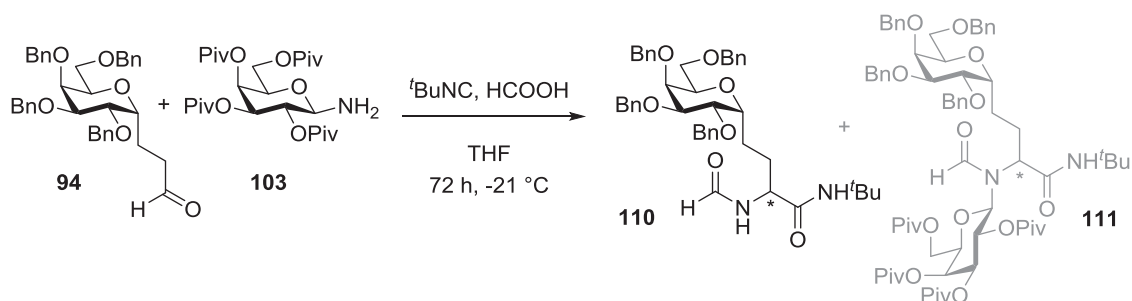


Abbildung 3.23: Einfluss der Glycosylamins auf die Selektivität

Beim Galactosylamin wird die Vorderseite des Imins abgeschirmt, sodass der Angriff des Nitrils bevorzugt über die Rückseite (*Si*-Seite) stattfinden kann, und es somit zur Ausbildung der *R*-Konfiguration kommt. Das Arabinosylamin verhält sich dagegen spiegelbildlich, weshalb das Nitril hauptsächlich über die *Re*-Seite angreift und die entsprechend *S* konfigurierte Aminosäure liefert.

Diese aus den Vorarbeiten ermittelten Bedingungen wurden nun im letzten Schritt der *C*-Glycosylaminosäuresynthese zur Ugi-Reaktion angewendet. Hierbei wurden die synthetisierten Zucker-Aldehydbausteine **94** und **100** mit den Auxiliaren **103** und **109** umgesetzt. Zuerst wurde der einfache Aldehyd **94** herangezogen und dieser zunächst mit dem D-Galactosylamin-Auxiliar **103** bei  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$  in THF unter Aktivierung durch Zinkchlorid zur Reaktion gebracht (Schema 3.36).



Schema 3.36: Ugi-Reaktion des Galactosylaldehyds **94** mit dem Galactosylamin-Auxiliar **103**

Die Synthese war innerhalb von 3 Tagen vollständig abgelaufen (DC). Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt rein erhalten werden. Anschließende ESI-MS Analysen zeigten allerdings anstatt der Masse des vollständigen Ugi-Produkts **111** unerwartet eine geringere Masse an. Diese lässt die Entstehung eines hydrolysierten *N*-acylierten  $\alpha$ -Aminocarbonsäureamid **110** ohne Auxiliarrest vermuten. Das zugehörige ESI-MS-Spektrum ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

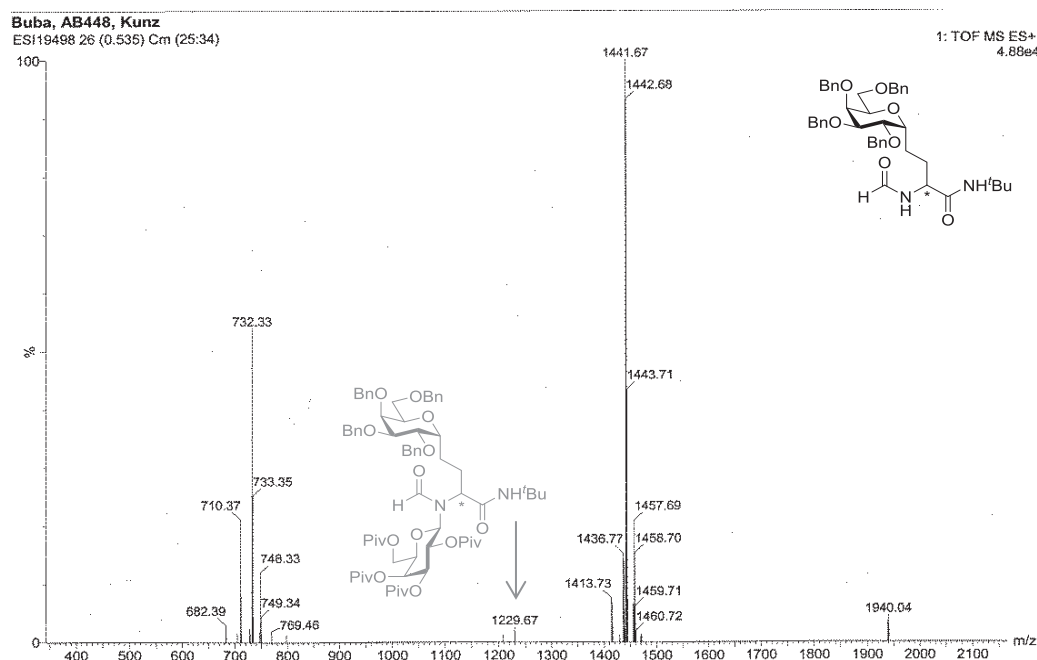


Abbildung 3.24: ESI-MS-Spektrum zum Produkt aus der Ugi-Reaktion von **94** mit **103**

Die Signale mit den Massen 710.37 ( $[M_{110}+H^+]$ ) und 732.33 ( $[M_{110}+Na^+]$ ) können dabei eindeutig dem vermuteten Hydrolyseprodukt **110** zugeordnet werden. Lediglich ein kleine Signalpeak mit der Masse 1229.67 ( $[M_{111}+Na^+]$ ) deutet auf die Bildung geringer Mengen des Ugi-Produkts **111** hin.

Eine Hydrolyse des Auxiliars bereits während der Ugi-Reaktion ist ungewöhnlich und bisher auch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung liefert die Annahme, dass das Auxiliar bereits zu Beginn der Reaktion solvolysiert war, möglicherweise durch wässrige Ameisensäure hydrolysiert wurde, und die Ugi-Reaktion anstatt mit dem Glycosylamin **103**, mit Ammoniak abgelaufen ist. Dies würde allerdings gleichzeitig den Verlust eines selektiven Reaktionsverlaufs bedeuten und an dieser Stelle zur Ausbildung von mindestens zwei Diastereomeren führen. Da Diastereomere im Gegensatz zu Enantiomeren unterschiedliche physikalische Eigenschaften besitzen, sollten sie beispielweise im NMR voneinander unterschieden werden können. Daher wurden im Folgenden  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR Untersuchungen durchgeführt. Die NMR-Spektren sind in Abbildung 3.25 gezeigt.

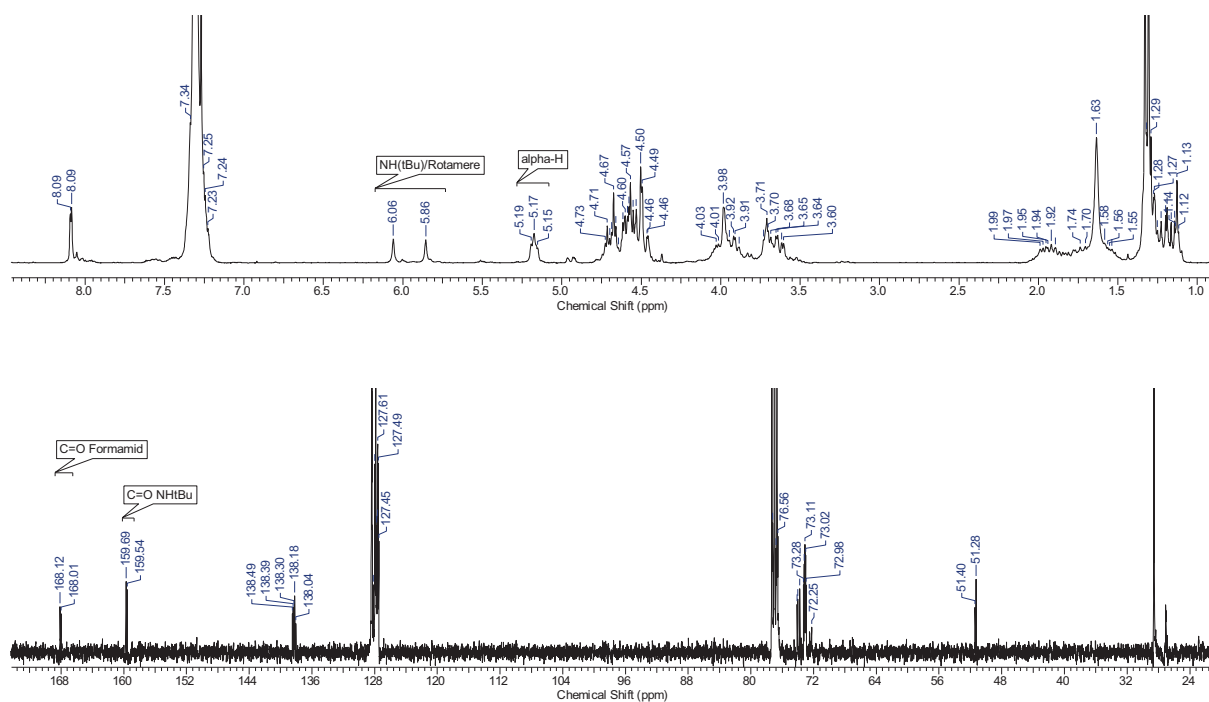


Abbildung 3.25:  $^1\text{H}$ -NMR (oben) und  $^{13}\text{C}$ -NMR (unten) des isolierten Produktes aus der Ugi-Reaktion von **94** mit **103** in  $\text{CDCl}_3$

Im  $^1\text{H}$ -NMR deuten Formamidssignale bei 8.09/8.08 ppm eine erfolgreiche Ugi-Reaktion an. Des Weiteren liegen NH-Signale des *tert*-Butylamids bei 6.06 und 5.86 ppm sowie ein Triplet des  $\alpha$ -H bei 5.17 ppm vor. Dem  $^{13}\text{C}$ -NMR ist das Vorliegen zweier Carbonylgruppen zu entnehmen. Dabei können die Signale bei 168.12/168.01 ppm dem Formamid-Carbonyl und bei 159.69/159.54 ppm der CO-Gruppe des *tert*-Butylamids zugeordnet werden. Die Signalverdopplung kann auf vorhandene Rotamere oder Diastereomere (Verhältnis 1 : 1) zurückzuführen sein.

Nicht im NMR-Spektrum zu erkennen sind dagegen die Zuckersignale des Auxiliars **103**. Lediglich Spuren von Pivaloylresten zwischen 1.0 und 1.25 ppm deuten auf die Bildung geringer Mengen des vollständigen Ugi-Produktes hin und stehen damit im Einklang mit den ESI-MS-Ergebnissen. Ebenso ist das NH-Proton des Formamidssignals nicht zu sehen, das vermutlich unter den aromatischen Signalen liegt. Die Integration der  $^1\text{H}$ -Signale bestätigt die Hydrolyse des Auxiliars, denn die Protonenzahl entspricht der des Produktes **110**.

Zur Konfiguration kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden jedoch konnte in  $\text{CDCl}_3$  nur ein  $\alpha$ -H-Signal (t, 5.17 ppm) identifiziert werden. Die Signalverdopplung des  $\alpha$ -H als Indikator für das Vorliegen von Diastereomeren scheint hier jedoch nicht gegeben zu sein. Im weiteren Verlauf wurde daher zunächst mit Hilfe von 2D-NMR Experimenten eine vollständige und korrekte Signalzuordnung getroffen und die Konnektivität der funktionellen Gruppen untereinander überprüft.

Nachdem mittels  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY und HSQC die Zuordnung der aussagekräftigen Formamid-, NH- und  $\alpha$ -H-Signale bestätigt werden konnte, wurde das HMBC zur Ermittlung der Konnektivität der funktionellen Gruppen herangezogen. Das HMBC Spektrum des Reaktionsprodukts ist in Abbildung 3.26 gezeigt.

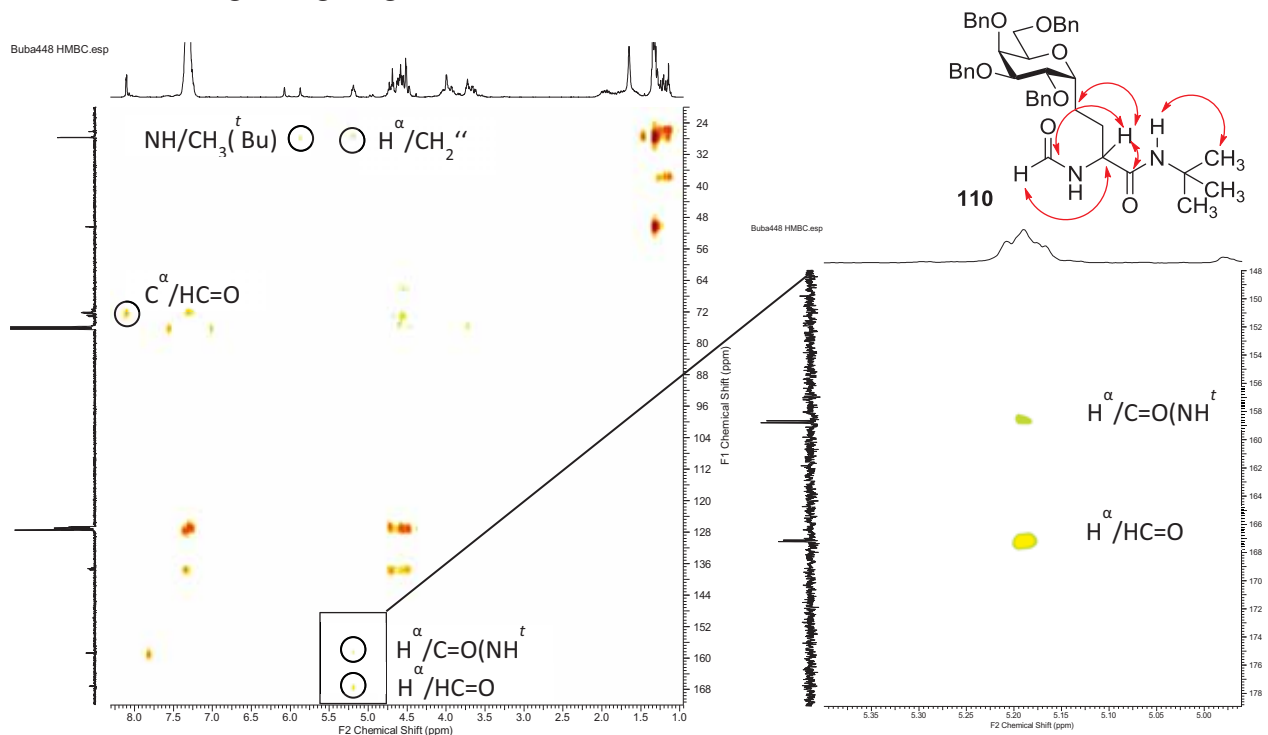


Abbildung 3.26: HMBC Spektrum des Reaktionsprodukts **110**

Dem Spektrum sind Korrelationen zu entnehmen, die auf das Vorliegen des Hydrolyseprodukts **110** hinweisen. Neben einer starken Kopplung des Formamidprotons mit dem  $\alpha$ -C sind zahlreiche schwächere Kopplungen, wie z. B. zwischen dem  $\alpha$ -H und dem Carbonyl-C des *tert*-Butylamids zu sehen. Die entscheidenden Korrelationen sind im Spektrum markiert und durch rote Pfeile in der Strukturformel des  $\alpha$ -Aminocarbonsäureamids **110** veranschaulicht. Somit konnte mit Hilfe des HMBC-Spektrums die bisher angenommene Konstitution des Produkts **110** bestätigt werden.

Um zu überprüfen, ob eine selektive Umsetzung stattgefunden hat bzw. wie viele Isomere ggf. aus der Reaktion hervorgekommen sind, wurden HPLC-Messungen durchgeführt. Bereits in den Vorarbeiten zur Ugi-Reaktion<sup>[209]</sup> wurde eine gute Trennung der gebildeten Diastereomere mittels HPLC vorausgesagt. Da bei dieser Umsetzung lediglich Diastereomere gebildet werden, ist möglicherweise ein Rückschluss von der Anzahl der Peaks auf die Isomerenanzahl zulässig. Das Chromatogramm sowie das zugehörige Massenspektrum der RP-HPLC-MS-Untersuchung sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

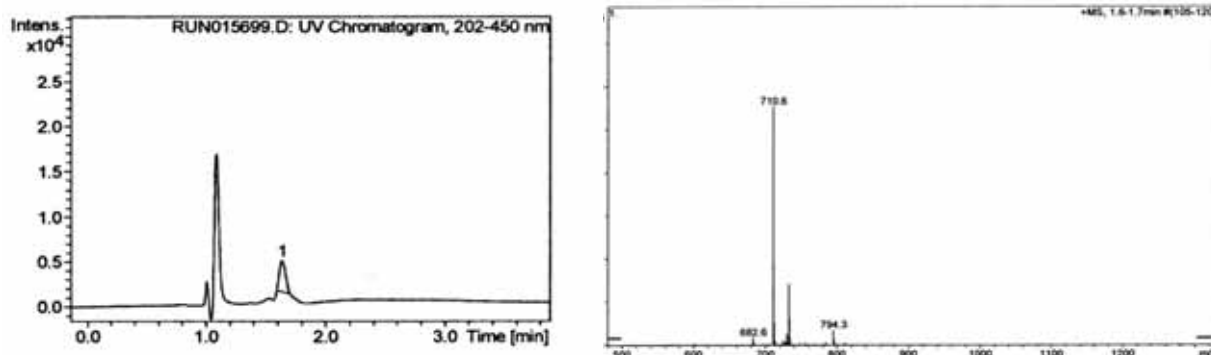
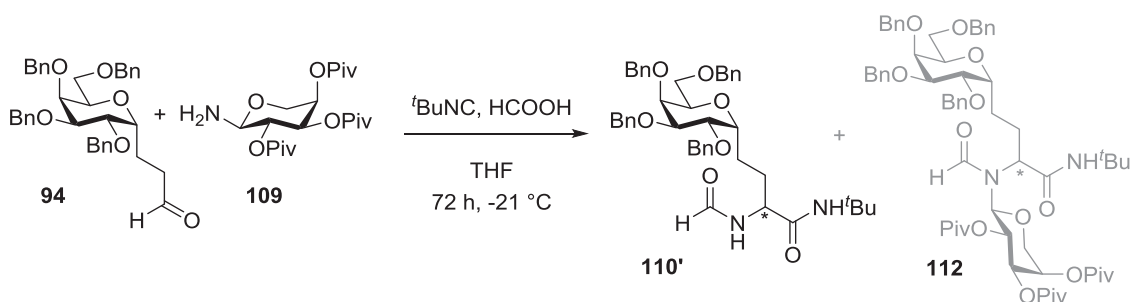


Abbildung 3.27: Elutionsdiagramm und Massenspektrum der RP-HPLC-MS Messung

Die Messung lieferte nur ein Signal und die zugehörigen Massenpeaks 710.6 ( $[M_{110}+H^+]$ ) sowie 732.3 ( $[M_{110}+Na^+]$ ) können erneut dem Carbonsäureamid **110** zugeordnet werden. Unter der Annahme, dass die Peakanzahl der Isomerenanzahl entspricht, würde diese HPLC-MS-Untersuchung darauf schließen lassen, dass nur ein Isomer im Produkt enthalten ist.

Um dies allerdings zu überprüfen, wurde zum Vergleich die Synthese mit dem *S*-dirigierenden Arabinosylamin-Auxiliar unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt (Schema 3.37).



Schema 3.37: Ugi-Reaktion des Galactosylaldehyds **94** mit dem Arabinosylamin-Auxiliar **109**

Nach 3 Tagen war auch hier die Reaktion abgeschlossen und erneut wurde mittels ESI- und HPLC-MS bestätigt, dass hauptsächlich das hydrolysierte Produkt **110'**, ohne Auxiliärrest entstanden ist. Die Isolierung des Produkts erwies sich hier jedoch als schwierig, da eine Verunreinigung mit sehr ähnlichen  $R_f$ -Wert chromatographisch nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

Sollte die vorangegangene Reaktion nun selektiv zugunsten des *R*-konfigurierten Produkts verlaufen sein, müsste hier durch die Verwendung des Arabinosyl-Auxiliars hauptsächlich das *S*-Isomer vorliegen. Da es sich dann hierbei um Diastereomere Verbindungen handelt, müssten entsprechend der Theorie und den Vorarbeiten, die charakteristischen Signale der beiden Produkte deutlich unterschiedliche Verschiebungen im NMR aufweisen.

Die Analyse mittels NMR lieferte allerdings identische Signalverschiebungen und deutet somit auf die Bildung identisch konfigurierter Glycosylaminosäuren hin. Ausschnitte aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Produktspektren beider Ugi-Reaktionen sind in Abbildung 3.28 gegenübergestellt.

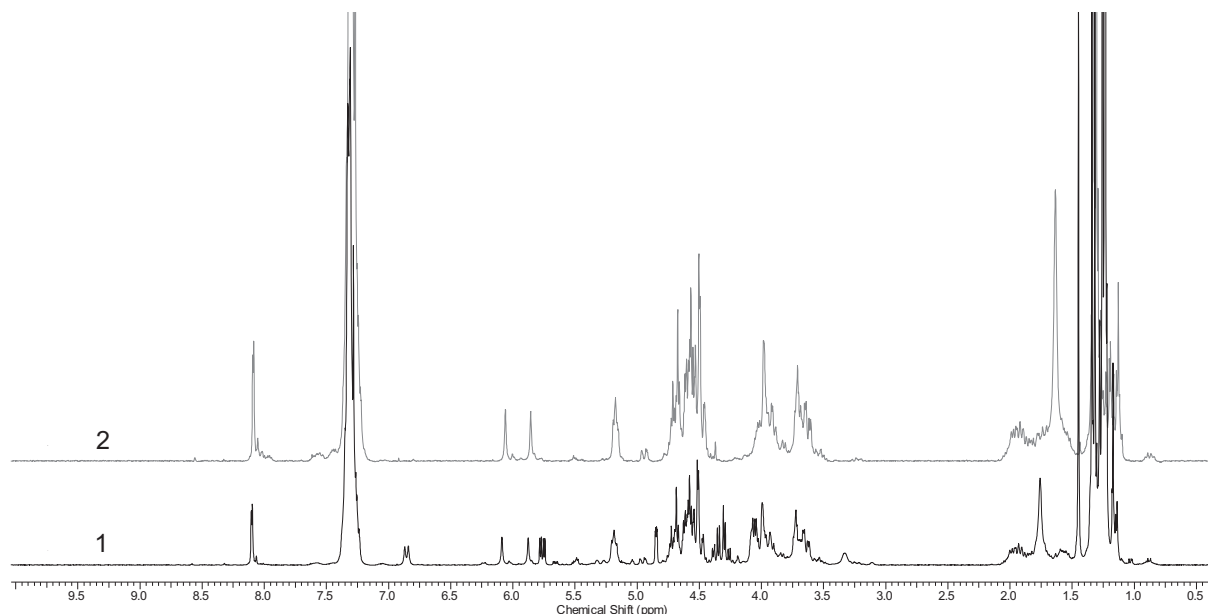


Abbildung 3.28: Gegenüberstellung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aus den Ugi-Reaktionen von **94** mit **103** (oben) bzw. **109** (unten)

Das untere Spektrum (1) zeigt das Produkt-NMR aus der Arabinosylamin vermittelten Ugi-Reaktion, wohingegen das obere Spektrum (2) aus der vorangegangenen Galactosylamin-Reaktion stammt. Abgesehen von verbliebenen Verunreinigungen im unteren NMR-Spektrum, sind die Verschiebungen der charakteristischen Formamid- (8.08/8.09 ppm), NH- (6.06/5.86 ppm) und  $\alpha$ -H- (t, 5.17) Signale mitsamt der Signalverdopplung identisch zum oberen Spektrum.

Dieses unerwartete Ergebnis lässt nun zwei Vermutungen zu. Entweder ist die Reaktion unabhängig vom verwendeten Auxiliar selektiv zugunsten eines Diastereomers verlaufen, sodass identisch konfigurierte Produkte entstanden sind und die Signalverdopplung durch die Rotamere hervorgerufen wird. Wahrscheinlicher lassen jedoch die identischen Produkte vermuten, dass eine vorzeitige Hydrolyse des Auxiliars stattgefunden hat, sodass die Reaktion mit Ammoniak zu einer unselektiven Umsetzung führte und die Signalverdopplung den gebildeten Diastereomeren zugewiesen werden kann. Ungewöhnlich wäre hierbei allerdings die identische Verschiebung des  $\alpha$ -S- und  $\alpha$ -R-Protons.

Um eine dieser Vermutungen bestätigen zu können, wurden zusätzliche HPLC Messungen zum einen mit den Produktgemischen und zum anderen an chiralen HPLC-Säulen durchgeführt. Die Messergebnisse sind in Abbildung 3.29 gezeigt.

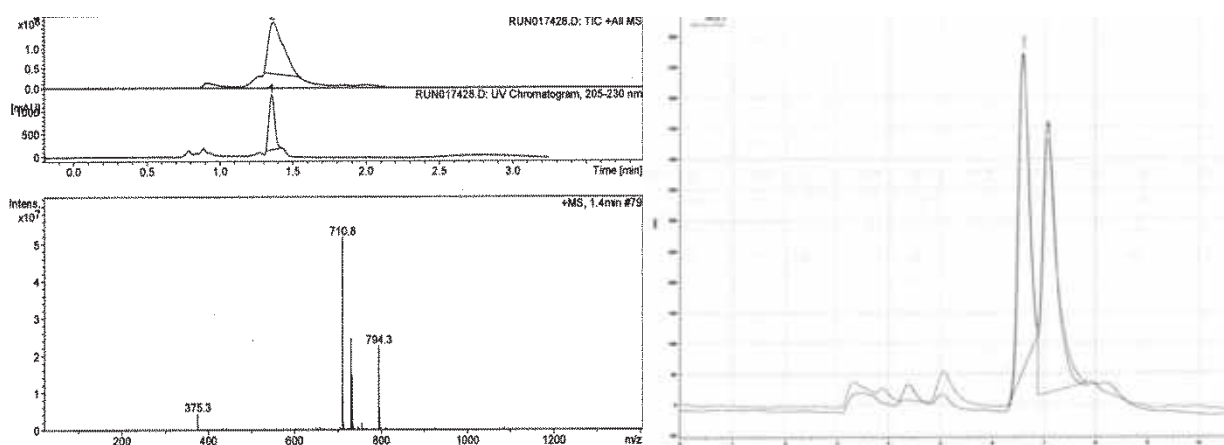


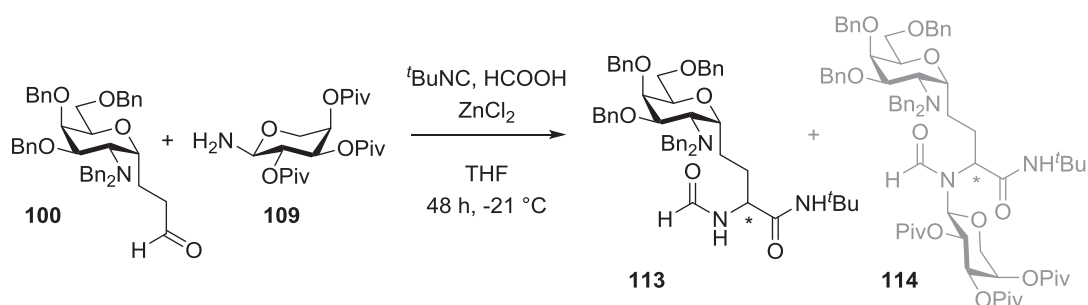
Abbildung 3.29: links: RP-HPLC-MS Messung des Gemisches aus **110** und **110'**; rechts: Übereinander gelegte Chromatogramme der Einzelmessungen von **110** und **110'** mittels chiraler HPLC

Das Elutionsdiagramm aus der Vermessung des Gemisches aus **110** und **110'** an der RP-HPLC-MS zeigt lediglich ein Peak (Abbildung 3.29, links). Dies bedeutet, dass beide Glycosylaminosäuren **110** und **110'** die gleiche Retentionszeit von 1.35 min besitzen und erhärtet, neben den übereinstimmenden Verschiebungen der NMR-Signale, zusätzlich den Verdacht, dass identische Produkte vorliegen.

Messungen an der chiralen HPLC zeigen hingegen zwei Peaks mit jeweils identischen Retentionszeiten (Abbildung 3.29, rechts) und unterstützen die Theorie einer unselektiven Reaktion mit Ammoniak die zur Ausbildung von zwei Diastereomeren geführt hat.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich somit keine Aussage zum stereoselektiven Verlauf der Ugi-Reaktion des Aldehyds **94** mit den Auxiliaren **103** und **109** treffen.

Zuletzt wurde auch der Galactosaminaldehyd **100** unter den zuvor beschriebenen Reaktionsbedingungen einer Ugi-Reaktion mit dem Arabinosyl-Auxiliar **109** unterworfen (Schema 3.38).



Schema 3.38: Ugi-Reaktion des Galactosaminaldehyds.

Analog zu den vorangegangenen Ugi-Reaktionen wurde auch hier mittels Massenspektrometrie festgestellt, dass hauptsächlich ein hydrolysiertes Produkt (**113**) entstanden ist.

Die Isolierung gestaltete sich wie zuvor problematisch, sodass Verunreinigungen im Produkt verblieben sind. Selbst durch mehrfache säulenchromatographische Reinigungen ließ sich keine Auftrennung der Fraktionen erzielen.

Durch die starken Verunreinigungen war eine eindeutige Auswertung der NMR-Daten nicht möglich. Daher wurden zur Ermittlung der Isomerenanzahl RP-HPLC-Messungen durchgeführt (Abbildung 3.30).

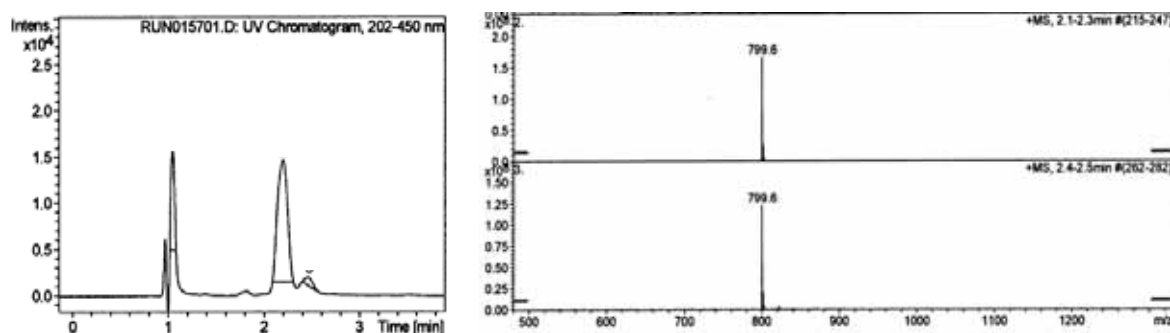


Abbildung 3.30: RP-HPLC-Chromatogramm und Massenspektrum des Produkts aus der Ugi-Reaktion von **100** mit **109**

Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks bei 2.20 und 2.46 min mit einer identischen Masse, welche dem hydrolysierten Aminocarbonsäureamid **113** zugeordnet werden kann. Eine präzise Aussage, ob es sich hierbei um Isomere oder chromatographisch aufgetrennte Rotamere handelt, ist bedingt durch die unklaren Ergebnisse aus den vorherigen Experimenten nicht möglich.

Die entwickelte Ugi-Reaktion zur stereoselektiven Synthese von  $\alpha$ -C-Glycosylaminosäuren lieferte sowohl mit dem einfachen Galactosyl-, als auch mit Galactosaminaldehyd **94** und **100** die unerwarteten Hydrolyseprodukte **110** und **113** unter dem Verlust der jeweils eingesetzten Auxiliare **103** und **109** und somit auch der Selektivität. Konkrete Aussagen bezüglich der Konfiguration sowie der Anzahl an gebildeten Isomeren, konnten durch die unklare Ergebnislage nicht zweifelsfrei getroffen werden.

## 4 Zusammenfassung

Der veränderten Glycosylierung des Mucins MUC1 wird im Zusammenhang mit epithalen Tumoren eine besondere Rolle zugewiesen. Im Vergleich zu gesunden Zellen wird das MUC1 auf Tumorzellen mit drastisch verkürzten Saccharidseitenketten überexprimiert, wodurch sich ein Ansatzpunkt zur Krebsimmuntherapie ergibt. Vakzine von aus Tumorgewebe isoliertem MUC1 sind wegen ihrer Mikroheterogenität nicht zur Immunisierung einsetzbar, sodass für eine zuverlässige Anwendung der Vakzine die tumorassoziierten Strukturen vollsynthetisch aufgebaut werden müssen. Solche vollsynthetischen Vakzine bestehen meist aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden, welche über einen Spacer an immunogene Proteine geknüpft sind.

Wie die meisten Glycopeptide, sind auch die MUC1-Sequenzen nicht stabil gegenüber Hydrolyse oder enzymatischem Abbau. Jedoch kann diese Stabilität in strukturverwandten Mimika durch *N*-Methylgruppen oder *C*-glycosidisch verknüpfte Saccharidreste erhöht und somit eine verbesserte Bioverfügbarkeit geschaffen werden. Die Einführung von *N*-Methylgruppen hat neben der gesteigerten Hydrolysestabilität weiterhin einen starken Einfluss auf die Konformation des entsprechenden Peptids. Die Glycopeptidkonformation ist für die Tumorselektivität der Immunantwort gegen MUC1-Vakzine wichtig.

Zur Synthese von hydrolysestabilen Antitumorvakzinen wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Verfahren zur effizienten *N*-Methylierung von Fmoc-Aminosäuren entwickelt. Die Synthese erfolgte in einer zweistufigen Umsetzung über Oxazolidinone nach Freidinger et al. unter Verwendung eines Tube-in-Tube-Durchflussreaktors nach Ley et al. Hierfür wurde eine semipermeable Membran aus Teflon<sup>®</sup> AF 2400 verwendet, einem amorphen Fluorpolymer, welches stark durchlässig für Gase ist (Abbildung 4.1).

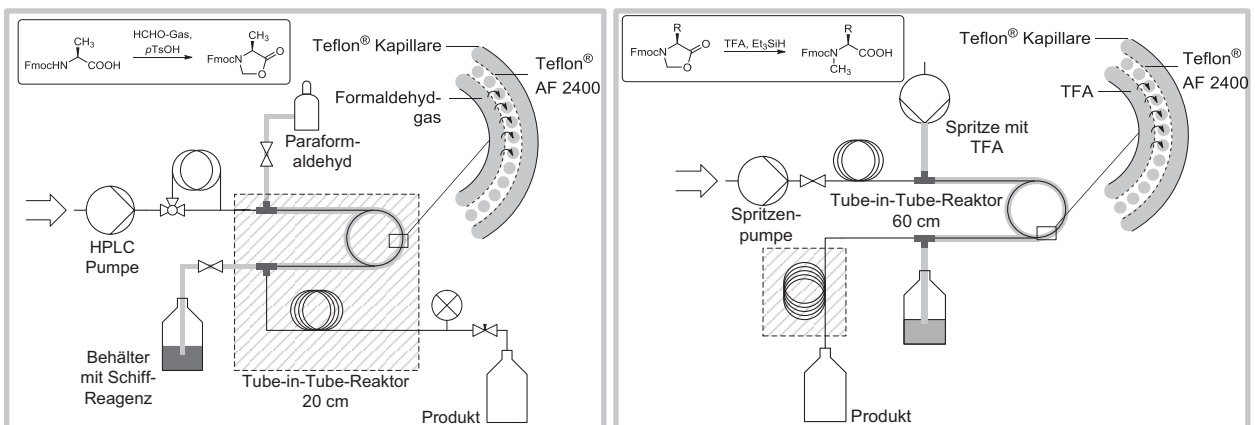
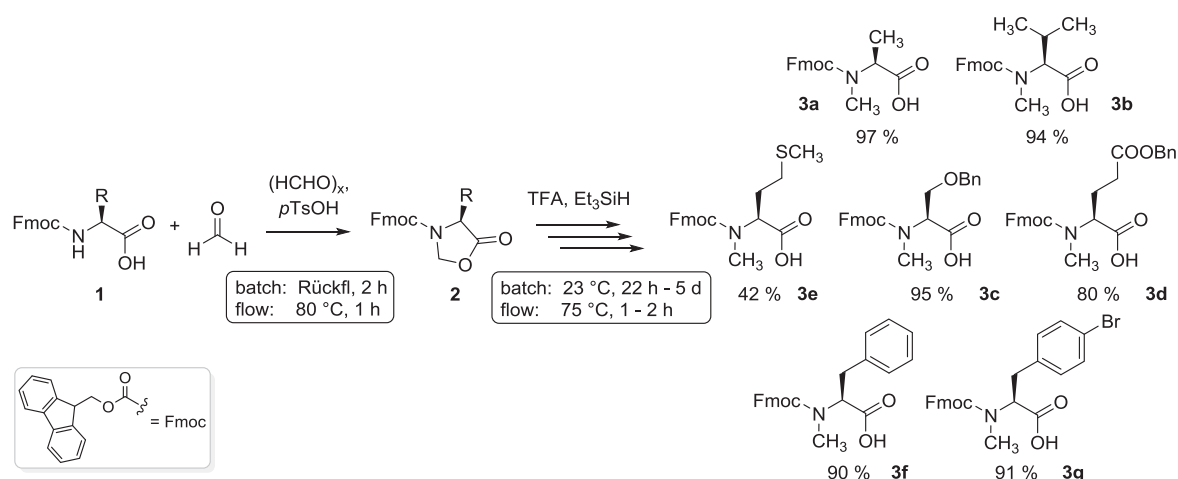


Abbildung 4.1: Tube-in-Tube-Reaktoren zur *N*-Methylaminosäuresynthese

In der ersten Stufe wurde die Membran zur Einleitung von Formaldehydgas, das durch Erhitzen von Paraformaldehyd gewonnen wurde, eingesetzt (Abbildung 4.1, links). Das Modellsubstrat Fmoc-Alanin (**1a**) konnte mit diesem Reaktoraufbau säurekatalysiert bereits nach 2 h bei 80 °C in das entsprechende Oxazolidinon **2a** umgesetzt und in 91 % Ausbeute isoliert werden.

In der zweiten Stufe wurde mit TFA erstmals eine Flüssigkeit durch die Membran des Tube-in-Tube-Reaktors in die Substratlösung eingeleitet (Abbildung 4.1, rechts). Die Optimierung der Reaktionsparameter für die TFA katalysierte reduktive Ringöffnung erfolgte mit dem vom Alanin abgeleiteten Oxazolidinon **2a**. Bei 75 °C in Acetonitril unter Zugabe von 2 Äquiv. Triethylsilan wurde *N*-Methyl-Fmoc-Alanin (**3a**) innerhalb einer Stunde in 97 % Ausbeute erhalten. Zahlreiche weitere Fmoc-Aminosäuren, darunter aliphatische, aromatische und funktionalisierte, konnten ebenfalls durch geringfügige Nachoptimierungen im Tube-in-Tube-Reaktor zur entsprechenden *N*-Methylaminosäure umgesetzt werden (Schema 4.1).



Schema 4.1: Synthetisierte *N*-Methylaminosäuren im Tube-in-Tube-Reaktor

Im Vergleich zum Modellsubstrat mussten an dieser Stelle zum einen die Verweilzeiten auf zwei Stunden erhöht und zum anderen die Triethylsilanmengen teilweise auf 3 Äquiv. angehoben werden. Damit konnten einige *N*-Methylaminosäuren in hohen Ausbeuten zwischen 80 % und 97 % isoliert werden. Lediglich *N*-Methylmethionin (**3e**) wurde aufgrund einer konkurrierenden Nebenreaktion in mäßiger Ausbeute von 42 % erhalten.

Die große Anzahl an Aminosäuren, die innerhalb kürzester Zeit umgesetzt werden konnten, zeigt die Effizienz der kontinuierlichen Reaktionsführung im Tube-in-Tube-Reaktor auf. Im Vergleich zur klassischen Kolbensynthese können wesentlich bessere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden. Die Zusammenführung beider Reaktorsysteme zu einem Gesamtprozess gelang nicht.

Im nächsten Schritt wurden erstmals sensible Glycosylaminosäuren, darunter auch T<sub>N</sub>-Antigen-Strukturen, *N*-methyliert, um sie als Bausteine für die Synthese von MUC1-Antitumorvakzinen zu gewinnen. Zunächst wurden die Reaktionsparameter am Beispiel von Fmoc-T<sub>N</sub>-Threonin **19** als Modellsubstrat angepasst.

Aufgrund der Reaktionsträgheit des Substrats wurde die *N*-Methylierung im Kolben anstatt im Durchflussbetrieb durchgeführt. Nach Optimierung der Parameter wurde das Fmoc-T<sub>N</sub>-Threonin mit Paraformaldehyd säurekatalysiert in Acetonitril bei 25 - 60 °C nach 6 Tagen in einer Ausbeute von 81 % zum entsprechenden Oxazolidinon umgesetzt. Die anschließende reduktive Ringöffnung lieferte bei erhöhten Triethylsilanmengen von bis zu 54 Äquiv. nach 6 Tagen bei Raumtemperatur in Chloroform das Fmoc-*N*-Methyl-T<sub>N</sub>-Threonin **19** in 88 % Ausbeute.

Generell erwies sich die Oxazolidinonsynthese empfindlicher gegenüber hohen Temperaturen im Vergleich zur reduktiven Ringöffnung. Trotz der deutlich sauren Reaktionsbedingungen wurde keine Hydrolyse der *O*-glycosidischen Bindung beobachtet.

Nach geringfügigen substratspezifischen Anpassungen der Reaktionsbedingungen konnten weitere Glycosylaminosäuren *N*-methyliert werden (Abbildung 4.2).

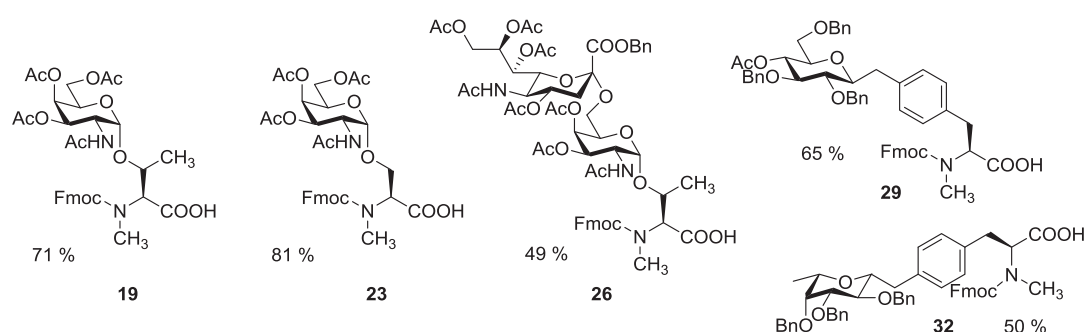
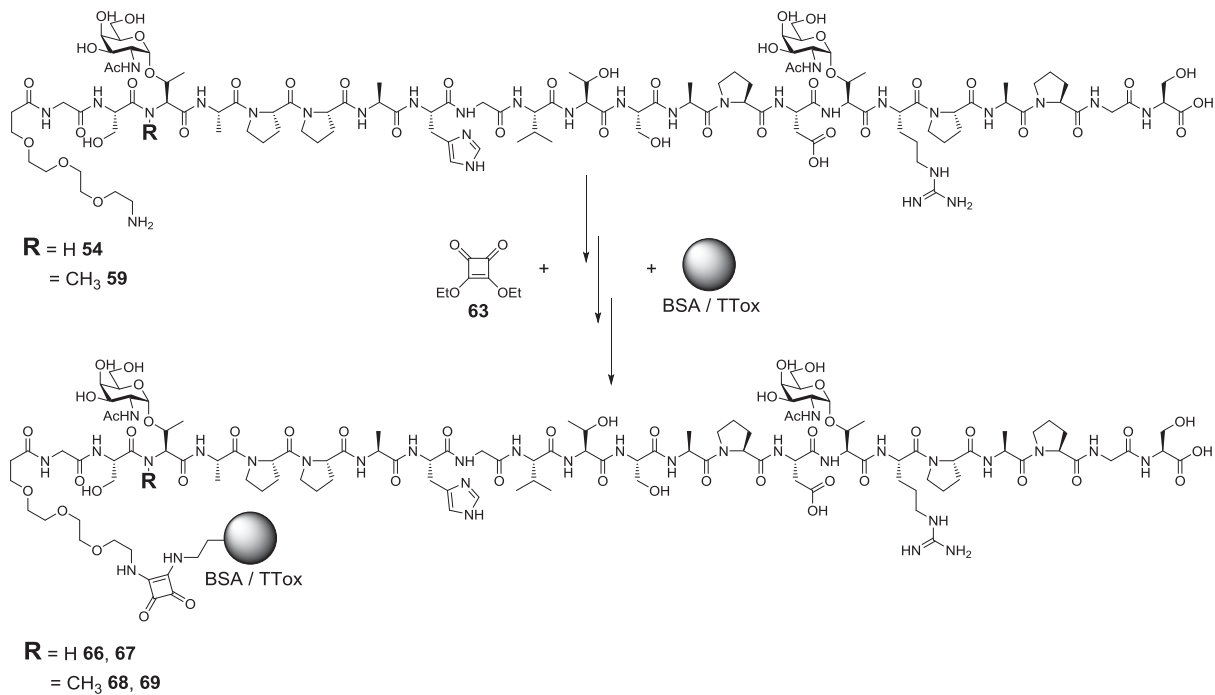


Abbildung 4.2: Synthetisierte *N*-Methylglycosylaminosäuren

Neben Fmoc-*N*-Methyl-T<sub>N</sub>-Threonin **19** konnten die Fmoc-geschützten *N*-Methyl-T<sub>N</sub>-Serin **23**, *N*-Methyl-Sialyl-T<sub>N</sub>-Threonin **26** sowie zwei *N*-Methyl-C-Glycosylaminosäuren **29** und **32** in guten bis sehr guten Ausbeuten zwischen 49 % und 81 % erhalten werden. Die in Abbildung 4.2 angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die Gesamtausbeute der zweistufigen Synthese.

Anschließend wurde das *N*-methylierte T<sub>N</sub>-Threonin **19** gezielt in die *tandem repeat*-Sequenz des MUC1 in einer Festphasenpeptidsynthese eingebaut (Schema 4.2).



Schema 4.2: Synthese der MUC1-Antitumorvakzine

Die Glycosylaminosäuren wurden in die MUC1-Sequenz an zwei Stellen eingefügt, zum einen in der immundominanten PDTRP- und zum anderen in die STAPPA-Region. Dabei wurde die *N*-methylierte Glycosylaminosäure aufgrund der Labilität gegenüber den basischen Kupplungsbedingungen im Synthesizer in die *N*-terminale STAPPA-Region eingebaut.

Um einen direkten Vergleich bezüglich der *N*-Methylierung im MUC1-Glycopeptide und dem darauf folgenden Einfluss auf die Tumorselektivität der resultierenden Vakzine erhalten zu können, wurde ein Referenzpeptid aufgebaut mit zwei unmethylierten  $T_N$ -Threoninen **17** bei analogem Glycosylierungsmuster.

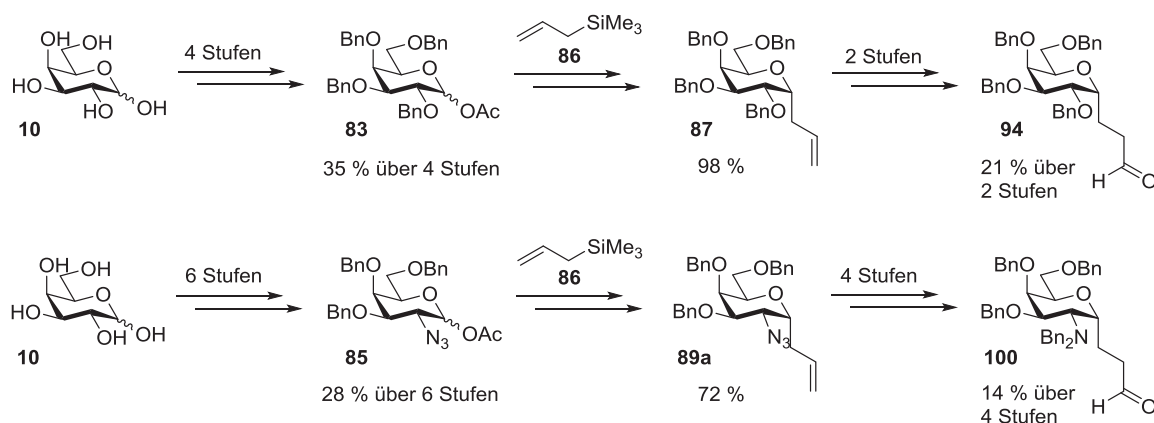
Die Synthese des Referenzpeptids **54** gelang ohne Schwierigkeiten, wohingegen sich die Einführung des *N*-Methyl- $T_N$ -Threonins als sehr schwierig erwies und mit großen Ausbeuteverlusten durch Abbruch- und Nebenreaktionen einherging. Jedoch konnten beide Glycopeptide **54** und **59** erfolgreich synthetisiert werden.

Der benötigte Abstandshalter **52** zwischen Glycopeptid und immunogenem Protein wurde in bereits beschriebener Weise aus Triethylenglycol **46** und Acrylsäure-*tert*-butylester **47** in einer Gesamtausbeute von 22 % erhalten und noch an fester Phase an die Glycopeptide gebunden. Nach Anknüpfung des Quadratsäurediethylesters **63** erfolgte die Konjugation der Glycopeptidantigene an die jeweiligen BSA- und TTox-Proteine.

Damit gelang erstmals die Synthese einer *N*-methylierten MUC1-Glycopeptid-Antitumorvakzine, die im nächsten Schritt immunologischen Studien unterzogen werden kann.

Ein alternativer Zugang zu hydrolysestabilen Glycopeptidbausteinen wurde im letzten Teil der Arbeit über die Synthese von C-Glycosiden erarbeitet. Dazu wurden  $\alpha$ -C-Glycosylaminosäuren analog zum natürlichen T<sub>N</sub>-Serin hergestellt. Der entwickelte Syntheseweg basiert auf einer Ugi-Vier-Komponenten-Reaktion aus Aldehyd, Amin, Nitril und Carbonsäure.

Als benötigte Aldehydkomponenten wurden zum einen ein einfaches Galactose-Derivat und zum anderen in Simulierung des natürlichen T<sub>N</sub>-Serins ein Galactosaminbaustein verwendet. (Schema 4.3).



Schema 4.3: Synthese der Aldehydbausteine zur Ugi-Reaktion

Aus D-Galactose (**10**) wurde ein Benzyl-geschütztes Galactosylacetat **83** hergestellt. Anschließend wurde zum Aufbau des C-glycosidischen Grundgerüsts mit Bortrifluorid-Etherat und TMS-Allyl (**86**) eine C-Allylierung durchgeführt. Nach Hydroborierung und Oxidation wurde schließlich der 3-Galactosylpropionaldehyd **94** in einer Gesamtausbeute von 7 % über sieben Stufen erhalten.

Die Synthese des analogen Galactosaminaldehyds **100** wurde über eine Azido-Galactose-Zwischenstufe erreicht. Dieses Azidogalactosylacetat **85** wurde nach bekanntem Verfahren in sechs Stufen aus D-Galactose **10** synthetisiert. Die C-Allylierung lieferte ein instabiles Produkt **89a**, welches unmittelbar in vier weiteren Stufen über Reduktion des Azids und N-Benzilylierung mit anschließender Hydroborierung und Oxidation zum Galactosaminaldehyd **100** umgesetzt wurde. Die Gesamtausbeute der Synthese betrug 3 % über insgesamt elf Stufen.

Neben der C-Allylierung bei 0 °C über mehrere Tage wurde außerdem eine Mikrowellen-unterstützte C-Allylierungsvariante im Durchfluss realisiert. Unter Verwendung eines Benzyl-geschützten Galactosylacetats **83** als Modellsubstrat wurden zwei Reaktoren für diese Umsetzung entwickelt (Abbildung 4.3)

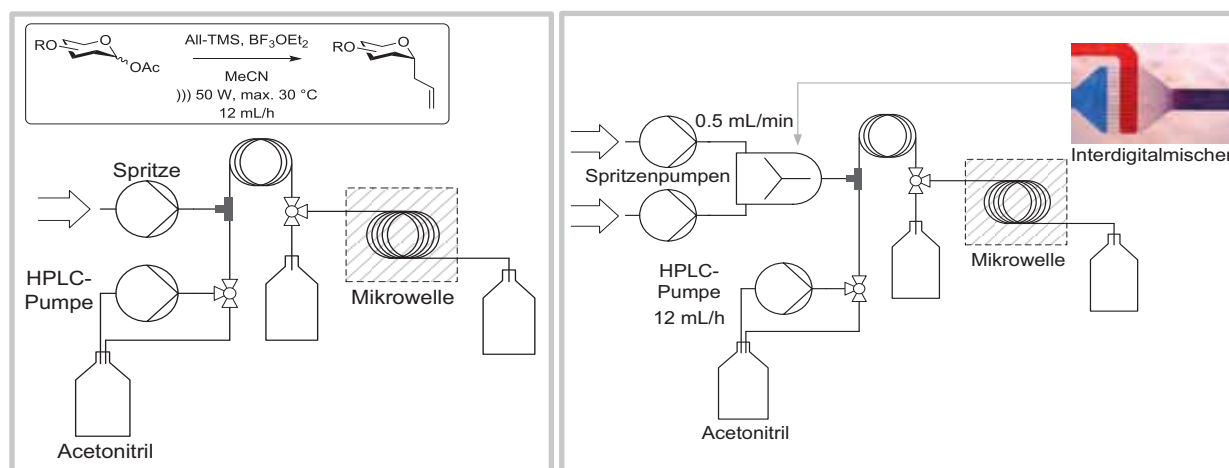
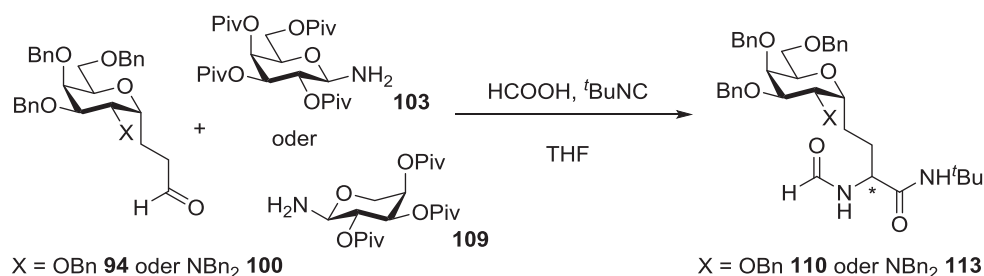


Abbildung 4.3: Mikrowellen-Reaktoren zur Saccharid-Allylierung

Während im Reaktor der ersten Generation (Abbildung 4.3, links) alle Substrate und Reagenzien zuvor vermischt und als Lösung injiziert wurden, ist im Reaktorsystem der zweiten Generation (Abbildung 4.3, rechts) eine leichtere und sichere Handhabung der Lewis-Säure und der Substratlösung durch separate Zudosierung vorgenommen worden.

Bei einer Mikrowellenleistung von max. 50 W bei max. 30 °C konnte das Modellsubstrat im Vergleich zur traditionellen Kolbensynthese in einer signifikant verkürzten Zeit von nur 20 Minuten in einer Ausbeute von 93 % C-allyliert werden. Einige weitere Saccharide wurden unter diesen optimierten Reaktionsbedingungen in Ausbeuten zwischen 51 % und 93 % erfolgreich umgesetzt. Dabei gelang auch die kritische Synthese des instabilen C-Azido-Allyl-Galactopyranosids **89a**, ohne dass unerwünschte Nebenreaktionen auftraten.

Die Galactose- und Galactosaminaldehyde **94** und **100** wurden danach in asymmetrischen Ugi-Reaktionen umgesetzt (Schema 4.4). Die benötigten Amine sind chirale Glycosylamine. Sie wurden aus D-Galactose **10** und D-Arabinose **104** hergestellt. Das Galactosylamin **103** wurde in einer Gesamtausbeute von 10 % und das Arabinosylamin **109** in 4 % Ausbeute erhalten.



Schema 4.4: Ugi-Reaktion der Zuckeraldehyde unter Verwendung verschiedener Auxiliare

Die Umsetzung des Galactosylaldehyds **94** mit Ameisensäure, *tert*-Butylnitril und Zinkchlorid in THF bei -21 °C lieferte sowohl unter der Verwendung des Galactosylamin- wie auch des

Arabinosyl-Auxiliars **103** und **109** das identische Produkt, was offenbar auf eine der Ugi-Reaktion vorgelagerte Hydrolyse der Glycosylamine zurückzuführen ist.

Somit ist in Rahmen dieser Arbeit neben der Synthese von *C*-Glycosylaminosäuren auch die *N*-Methylierung von Aminosäuren sowie Glycosylaminosäuren gelungen. Die Produkte stellen neue Bausteine für die Synthese hydrolysestabiler Antitumorvakzine dar.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeine Anmerkungen

#### 5.1.1 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Kommerziell erhältliche Chemikalien wurden mit einer Reinheit von mindestens 95 % bezogen und direkt eingesetzt. Ebenso wurden, falls nicht anders beschrieben, alle Lösungsmittel in *pro analysis* (p.a.) Qualität direkt verwendet. Andernfalls wurden zum Absolutieren Standardmethoden<sup>[233]</sup> verwendet und die Lösungsmittel anschließend über Molsieben gelagert. Hierfür verwendete Molsiebe (Porengröße 4Å) wurden zuvor mehrere Stunden im Hochvakuum ausgeheizt. Für alle Arbeiten unter Schutzgas wurden Standard-Schlenk-Techniken mit Stickstoff oder Argon als Schutzgas angewendet. Zum Entfernen der Lösungsmittel „im Vakuum“ oder „unter vermindertem Druck“ wurden Rotationsverdampfer (der Marke Büchi oder Heidolph) bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C eingesetzt. Hochvakuum wurde durch den Einsatz von Ölvakuumpumpen des Typs Vakuubrand erzeugt. Das verwendete BSA (Fettsäure- und Globulin-frei, A 0281) stammte von *Sigma Aldrich Biochemicals*, Taufkirchen, und das Tetanus-Toxoid (im Natriumchlorid-Puffer (17.5 mg Tetanus-Toxoid/mL)) von *CLS Behring*, Marburg. Beide wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

#### 5.1.2 Analytische Methoden

##### Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete Fertialuminiumpplatten der Fa. *Merck*, Darmstadt verwendet. Die Detektion erfolgte entweder durch UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) oder durch folgende Anfärbereagenzien:

- Seebach-Reagenz (1.0 g Cer(IV)-sulfat-tetrahydrat und 2.5 g Molybdätophosphorsäure in einer Mischung aus 94 mL Millipore-Wasser und 6 mL konz. Schwefelsäure). Entwicklung durch Wärmeeinwirkung.
- Zucker-Reagenz (1:1-Mischung aus 50 mL Ethanol mit 2.7 mL konz. Schwefelsäure und 50 mL Ethanol mit 0.1 mL *p*-Methoxyphenol). Entwicklung durch Wärmeeinwirkung.

##### Säulenchromatographische Methoden

Die Isolierung der Produkte erfolgte durch Flashchromatographie oder mit Hilfe des *Isolera*<sup>™</sup> *Prime* bzw. *Isolera*<sup>™</sup> *Dalton Systems* der Firma *Biotage*. Dieses System besteht aus einer

Chromatographiesäule mit Probenaufgabeeinheit und einem Fraktionssammler mit eingebautem UV- bzw. Massendetektor. Als Säulen können entweder kommerziell erhältliche *Biota-ge*<sup>®</sup> *SNAP*-Kartuschen (HP-SIL/KP-SIL in 10, 25, 50, 100 und 340 g) oder selbst befüllte Kartuschen verwendet werden. Mit Hilfe der Software können individuelle Parameter (Wellenlänge, Flussrate usw.) eingestellt, aber auch die Zusammensetzung der Laufmittel bestimmt werden, welche auch während der Trennung variiert werden können. Dabei erscheint das Detektorsignal in Echtzeit auf dem Display und ab einer bestimmten Signalintensität werden die einzelnen Fraktionen gesammelt. Standardmäßig wurden Ethylacetat und Cyclohexan als Laufmittel verwendet und über die gesamte Trennung ein Gradient beginnend bei 100 % *n*-Hex / 0 % EtOAc zu 0 % *n*-Hex / 100 % EtOAc erzeugt. Die Detektion erfolgte bei 254 und 280 nm. Als Säulenmaterial diente Kieselgel A60 mit einer Partikelgröße von 35 - 70  $\mu\text{m}$  der Firma *Acros Organics*, Nidderau.

#### Analytische RP-HPLC

Analytische HPLC wurden mit einer Anlage, bestehend aus einem *Merck Hitachi D-6000 Interface*, einem *Merck Hitachi L-4000 UV Detektor* bzw. einem *Merck Hitachi L-4200 UV/Vis Detektor*, einer *Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump* und einem *Labsource Solvent Degaser Unit SDU 2003* durchgeführt. Zur Steuerung und Analyse wurde die Software *Merck Hitachi Model D-7000 Chromatography Data Software Vers 4.1* verwendet. Es wurde folgende Säule eingesetzt: Aqua C18 (200A, 5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.60 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA. Die verwendete Standardmethode hatte folgende Parameter: Probenvolumen 20  $\mu\text{L}$ , Flussrate 1 mL/min, Wellenlänge variabel zwischen  $\lambda = 200 - 254$  nm, Gradient: Acetonitril/Wasser: 0 min (70 % MeCN / 30 % H<sub>2</sub>O)  $\rightarrow$  1 min (70 % MeCN / 30 % H<sub>2</sub>O)  $\rightarrow$  11 min (100 % MeCN), 20 min.

#### Präparative RP-HPLC

Präparative HPLC wurde mit einer Anlage bestehend aus zwei *Knauer Smartline 1000 HPLC-Pumpen*, einem *Knauer Smartline 2500 UV/Vis-Detektor*, einem 2-Wege-Entgaser und einem dynamischen Mischer durchgeführt. Zur Steuerung und Analyse wurde die Software *ChromGate Client/Server Version 3.3.1* verwendet. Es wurde folgende Säule eingesetzt: Luna C18 (100A, 10  $\mu\text{m}$  micron, 250  $\times$  30.00 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA. Die verwendete Standardmethode hatte folgende Parameter: Probenvolumen 2 mL, Flussrate 10 mL/min, Wellenlänge  $\lambda = 214$  nm, Gradient: Acetonitril/Wasser + je 0.1 % TFA: 0 min (5 % MeCN / 95 % H<sub>2</sub>O)  $\rightarrow$  30 min (40 % MeCN / 60 % H<sub>2</sub>O)  $\rightarrow$  40 min (100 % MeCN), 60 min.

### Kernresonanzspektroskopie

Alle  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente sowie zweidimensionale Spektren (COSY, HSQC, HMBC) wurden auf folgenden NMR-Geräten der Firma *Bruker*, Billerica, USA durchgeführt:

- Avance III HD 300 ( $^1\text{H}$ -Spektren 300 MHz und  $^{13}\text{C}$ -Spektren 75.5 MHz)
- Avance II 400 ( $^1\text{H}$ -Spektren 400 MHz und  $^{13}\text{C}$ -Spektren 100.6 MHz)
- Avance III HD 400 ( $^1\text{H}$ -Spektren 400 MHz und  $^{13}\text{C}$ -Spektren 100.6 MHz)
- Avance III 600 ( $^1\text{H}$ -Spektren 600 MHz und  $^{13}\text{C}$ -Spektren 150.9 MHz)

Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Verbindungen angegeben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ACD/NMR Processor Academic Edition, sowohl für einfache als auch für zweidimensionale Spektren. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels bei relativer Kalibrierung zu Tetramethylsilan als Standard und sind in  $\delta$  (ppm) angegeben. Die Multiplizitäten der Signale sind wie folgt abgekürzt: s - Singulett; br. s. - verbreitertes Singulett; d - Dublett; dd - Dublett vom Dublett; dt - Dublett vom Triplett; t - Triplett; q - Quartett; m - Multiplett. Ist die Lage eines Signals für ein bestimmtes Proton innerhalb eines Multipletts anhand der zweidimensionalen Spektren genauer bestimmbar, dann sind diese chemischen Verschiebungen in geschweiften Klammern hinter der jeweiligen Zuordnung angegeben. Es wurden folgende Abkürzungen im Index zur Kennzeichnung der verschiedenen Zuckereinheiten bei der Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale verwendet: Gal – D-Galactose; Glc – D-Glucose. Für die jeweiligen Aminosäuren wurde der 3-Buchstaben-Code als Abkürzung verwendet. Darüber hinaus wurden die Atome der Aminosäuren durch indizierte griechische Buchstaben gekennzeichnet. Die Abkürzung Oxa im Index bezieht sich auf Atomsignale im Oxazolidinonring

### Massenspektrometrie

- ESI-Massenspektren (ESI-MS) wurden mit einem *LCT-Spektrometer* von *Micromass*, Eschborn, gemessen. Die Proben wurden hierfür in Acetonitril/Methanol/Wasser gelöst.
- Hochaufgelöste HR-ESI-TOF-Spektren (HR-ESI) wurden mit einem *Q-TOF Ultima* Spektrometer der Firma *Micromass*, Eschborn, aufgenommen. Die Proben wurden hierfür in Acetonitril/Methanol/Wasser gelöst.
- MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem *Tofspec-E*-Gerät der Firma *Micromass*, Eschborn, bzw. einem *Bruker Time-of-flight REFLEX-Spektrometer* gemessen. Als Matrices

wurden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB, 17 mg/mL in H<sub>2</sub>O/Acetonitril 1:1, + 0.1 % TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/mL in H<sub>2</sub>O/Acetonitril 1:1, + 0.1 % TFA) verwendet.

- HPLC-Massenspektren (HPLC-MS) wurden auf einem *Agilent 6320 Ion Trap*-Gerät der Firma *Agilent*, Santa Clara, USA aufgenommen.

#### Drehwertbestimmung

Die spezifischen Drehwerte sind mit einem *Perkin-Elmer Polarimeter 241* bei einer Wellenlänge  $\lambda = 546$  und  $\lambda = 578$  gemessen worden. Die erhaltenen Werte wurden auf die Na-D-Linie (89.5 nm) extrapoliert. Die verwendeten Lösungsmittel sowie die Temperatur und Konzentration (in g/100 mL) sind für die jeweiligen Verbindungen angegeben.

### 5.1.3 Verwendete Geräte

#### Festphasensynthese

Die Glycopeptidsynthese an der Festphase wurden an einem *Perkin-Elmer ABI 433A-Peptidsynthesizer* der Firma *Applied Biosystems*<sup>®</sup>, Carlsbad, USA durchgeführt. Die Kontrolle des Syntheseverlaufs erfolgte über die gemessene UV-Absorption bei der Abspaltung der Fmoc-Gruppe, welche mittels eines *Perkin Elmer Series 200 UV/Vis-Detektors* von *Applied Biosystems* aufgezeichnet wurde. Der verwendete polymere Träger, ein mit Fmoc-geschütztes Serin beladenes Tentagel-Harz, wurde von der Firma *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, bezogen. Die verwendeten Lösungsmittel stammten von der Firma *Iris Biotech*, Martredwitz.

*Das Standardprotokoll zur Festphasenglycopeptidsynthese:* Zu Beginn wurde das Serin-Tentagel-Harz **38** in dem Reaktor vorgelegt und die eingesetzten Fmoc-Aminosäuren (10 Äquiv.) in die Kartuschen eingewogen. Die Aminosäuren wurden von der Firma *Orpegen Pharma* bezogen und hatten eine freie Carboxylfunktion, eine Fmoc geschützte Aminogruppe und säurelabile Seitenkettenschutzgruppen. Es wurden folgende Aminosäuren verwendet: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-Val-OH. Im Allgemeinen bestand die Kupplung aus drei aufeinanderfolgenden Schritten. Im ersten Schritt nach der Anbindung einer Aminosäure an der festen Phase wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit einer 20 %igen Piperidin in NMP-Lösung abgespalten (3 × 2.5 min). Darauf folgte die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren in der entsprechenden Reihenfolge mit Hilfe von HBTU (**39**) (1 mmol, 1 Äquiv. bezogen auf die AS), HOBt (**40**) (1 mmol) und DIPEA (2 mmol) in DMF. Hierbei wurde innerhalb von 30 min im Wechsel kräftig geschüttelt und inkubiert. Im letzten

Schritt wurden verbliebene freie Aminogruppen durch 10 minütiges Schütteln in einer Lösung aus  $\text{Ac}_2\text{O}$  (0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBt (0.015 M) in NMP acetyliert (Capping). Das Harz wurde danach mit NMP gewaschen und die verbliebenen Fmoc-geschützten Aminosäuren wiederholt dem Standardprozess unterworfen. Die Anknüpfung der Glycosylaminosäuren **17** und **19** sowie des Spacers **52** erfolgte manuell, d. h. dass nach Abspaltung der vorangegangenen Fmoc-Gruppe (s. oben) wurde eine Kartusche, gefüllt mit der Glycosylaminosäure (2 Äquiv.) bzw. dem Spacer (10 Äquiv.), HOAT (2.4 Äquiv.), HOAt (2.4 Äquiv.) und NMM (5 Äquiv.) gelöst in NMP in den Synthesizer eingelegt und nach Bedarf 3 - 8 Stunden im Wechsel kräftig geschüttelt und inkubiert. Nach dem anschließenden Capping wurde die darauf folgende Aminosäure doppelt gekuppelt, d. h. es wurde die gleiche Aminosäure in zwei Kupplungszyklen nach dem Standardprotokoll angebunden (mit je 10 Äquiv. AS). Hier erfolgte das Capping jedoch erst nach dem zweiten Kupplungsdurchlauf. Nach beendeter Synthese wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, das Harz mehrmals gründlich mit NMP und Dichlormethan gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

#### Ultrafiltration

Ultrafiltrationen wurden in einer Stirred Ultrafiltration Cell der Firma Millipore, Bedford, USA durchgeführt. Die hierfür verwendeten Membranen bestanden aus Polyethersulfonen mit einer Durchlässigkeit von 30 kDa.

#### Mikrowelle

Alle Mikrowellensynthesen wurden in einem *CEM-Discover*<sup>®</sup>-Gerät durchgeführt. Hierbei wurde die gewünschte Maximaltemperatur vor der Synthese eingegeben und über einen Infrarotsensor kontrolliert. Die Regulierung der Temperatur erfolgte ggf. durch Druckluftkühlung. Der Druck wurde während der Synthese mittels Piezo-Druck-Zelle kontrolliert.

#### Verwendete Geräte für die Durchflusssynthesen

- HPLC-Pumpe: *Gynkotek HPLC-Pumpe M 480 G* (Fördermenge: 0.002 – 8 mL/min)
- Spritzenpumpe von *kdScientific* (Fördermenge: 0.1  $\mu\text{l/h}$  – 423 mL/h)
- Membran: Teflon<sup>®</sup> AF 2400-Kapillare; AD: 1.00 mm, ID: 0.8 mm bezogen von *Biogeneral Inc.*, San Diego, USA
- Ultraschallbad: *VWR ultra sonic cleaner*, HF 45kHz, 30 W

## 5.2 N-Methylaminosäuresynthese

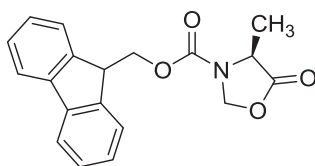
### 5.2.1 Oxazolidinonsynthese

#### *Allgemeine Versuchsdurchführung zur Oxazolidinonsynthese im Kolben*<sup>[54]</sup>

Die entsprechende Fmoc-L-Aminosäure (**1a-g**) wurde in 100 mL Toluol suspendiert. Anschließend wurden Paraformaldehyd und *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben und das Gemisch 2 h am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3 × 30 mL) gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Erhaltene Feststoff wurden aus Diethylether umkristallisiert.

#### **(4S)-3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-5-on (2a)**

(Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon)



#### Nach allgemeiner Synthesevorschrift

Fmoc-L-Ala-OH (**1a**) (1.65 g, 5.00 mmol), Paraformaldehyd (1.00 g) und *p*-Toluolsulfonsäure (100 mg, 0.58 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 1.61 g (4.98 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

#### Alternativmethode: Synthese im Tube-in-Tube-Reaktor

Fmoc-L-Ala-OH (**2a**) (100 mg, 0.32 mmol) und 23.7 mg (138 μmol) *p*-Toluolsulfonsäure wurden unter leichtem Erwärmen in 1.5 mL Acetonitril gelöst und in die Probenschleife injiziert. Die Apparatur wurde über den äußeren Schlauch der Tube-in-Tube-Zone mit gasförmigem Formaldehyd gespült, das durch Erhitzen von Paraformaldehyd in einem vorgeschalteten Gefäß erzeugt wurde. Mittels HPLC-Pumpe wurde Acetonitril mit 3 mL/h bei 0.5 bar über die Probenschleife bei 75 - 80 °C Wasserbadtemperatur befördert. Das Produkt wurde aufgefangen und nach beendeter Reaktion das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 95.2 mg (294 μmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs.

C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> [M = 323.35 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.57 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 3:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 346.11 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 346.11)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +76.8° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +66.7° (c = 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)<sup>[54]</sup>

Schmp.: 143.4 °C (Diethylether); Lit.: 142 - 144 °C [54]

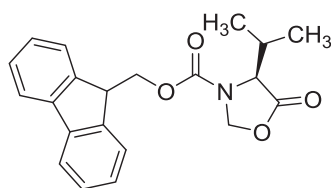
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=7.43 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=7.43 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.46 - 7.40 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.37 - 7.32 (m, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.51 - 5.27 (m, 0.2 H, H-2<sub>Oxa</sub>) 5.15 (s, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.75 - 4.94 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH,CH2</sub>=5.58 Hz, 1.4 H, CH-Fmoc, H-4<sub>Oxa</sub>), 4.03 - 3.76\* (m, 0.6 H, H-4<sub>Oxa</sub>) 1.62 - 1.38\* (m, 1.5 H, CH<sub>3</sub>), 1.30 - 1.05 (m, 1.5 H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 172.8 (C=O<sub>Oxa</sub>), 152.7 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.3 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.4 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 127.9 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 127.2 (C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 124.5 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.1 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 77.2 (C<sub>2</sub>-Oxa), 67.3 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 50.5 (C<sub>4</sub>-Oxa), 47.1 (CH-Fmoc), 16.3 (CH<sub>3</sub>).

\*Signale des Nebenrotamers

### (4S)-3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-4-isopropyl-1,3-oxazolidin-5-on (2b)

(Fmoc-L-Val-Oxazolidinon)



Fmoc-L-Val-OH (**1b**) (1.00 g, 2.95 mmol), Paraformaldehyd (600 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (280 mg, 1.63 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 0.93 g (2.65 mmol, 90 %) eines farblosen Feststoffs.

C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> [M = 351.40 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.59 (c<sub>Hex</sub>/EtOAc, 3:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 374.14 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 374.14)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +68.8° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +69.2° (c = 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)<sup>[54]</sup>

Schmp.: 73.7 °C (Diethylether); Lit.: 70 - 74 °C [54]

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.46 - 7.39 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.38 - 7.31 (m, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.55 - 5.18\* (m, 0.9 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 5.05 - 5.02 (m, 1.1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.89 - 4.51 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.29 - 4.17 (m, 1.4 H, CH-Fmoc, H-4<sub>Oxa</sub>), 3.47 - 3.73\* (m, 0.6 H, H-4<sub>Oxa</sub>), 1.93 - 1.65 (m, 1 H, H-<sup>i</sup>Pr), 1.24 - 0.67 (m, 6 H, 2 × CH<sub>3</sub>).

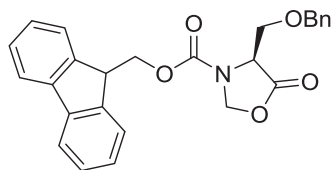
<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 171.57 (C=O<sub>Oxa</sub>), 153.57 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.67 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.79 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 128.30 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 127.55 (C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 124.84

(C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.44 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 78.57 (C<sub>2</sub>-Oxa), 67.4 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 60.19 (C<sub>4</sub>-Oxa), 47.52 (CH-Fmoc), 31.26 (C-<sup>*i*</sup>Pr), 18.08 (CH<sub>3</sub>).

\*Signale des Nebenrotamers

**(4*S*)-4-[(Benzyloxy)methyl]-3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (2c)**

(Fmoc-L-Ser(Bn)-Oxazolidinon)



Fmoc-L-Ser(Bn)-OH (**1c**) (1.58 g, 3.78 mmol), Paraformaldehyd (1.60 g) und *p*-Toluolsulfonsäure (116 mg, 0.64 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 1.60 g (3.73 mmol, 99 %) eines farblosen Öls.

C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub> [M = 429.47 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.44 (<sup>*c*</sup>Hex/EtOAc, 3:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 452.16 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 452.15)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +93.0° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +93.7° (c = 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)<sup>[54]</sup>

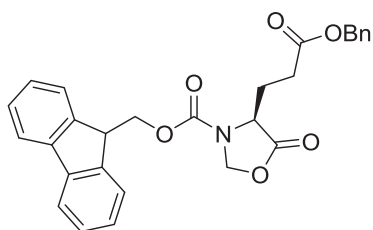
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=6.99 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.63 - 7.50 (m, 2 H, H<sub>Ar-Ph</sub>), 7.47 - 7.41 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.38 - 7.29 (m, 5 H, H<sub>Ar-Ph</sub>, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 7.27 - 7.13 (m, 2 H, H<sub>Ar-Ph</sub>, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 5.53 - 5.28\* (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 5.25 - 5.10 (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.75 - 4.44 (m, 3 H, H-2<sub>Oxa</sub>, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.44 - 4.25 (m, 1.5 H, CH<sub>2</sub>-Bn, H-4<sub>Oxa</sub>), 4.25 - 4.14 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.11 - 3.98\* (m, 0.5 H, -CH<sub>2</sub>-), 3.95 - 3.85\* (m, 0.5 H, -CH<sub>2</sub>), 3.85 - 3.69 (m, 1 H, H-4<sub>Oxa</sub>), 3.65 - 3.50 (m, 0.5 H, -CH<sub>2</sub>-), 3.25 - 3.11 (m, 0.5 H, -CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 170.93 (C=O<sub>Oxa</sub>), 152.02 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.29 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.24 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 137.24 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 128.34, 128.13, 127.85, 127.73, 127.28, 127.13 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph, C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc), 124.39 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.00 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 78.56 (C<sub>2</sub>-Oxa), 73.18 (CH<sub>2</sub>-Bn), 67.59 (-CH<sub>2</sub>-), 66.92 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 55.99 (C<sub>4</sub>-Oxa), 46.91 (CH-Fmoc).

\*Signale des Nebenrotamers

**(4S)-4-[(Benzylcarboxy)ethyl]-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (2d)**

(Fmoc-L-Glu(Bn)-Oxazolidinon)



Fmoc-L-Glu(Bn)-OH (**1d**) (2.31 g, 5.03 mmol), Paraformaldehyd (1.22 g) und *p*-Toluolsulfonsäure (120 mg, 0.70 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 2.33 g (4.94 mmol, 98 %) eines gelben Öls.

$C_{28}H_{25}NO_6$  [M = 471.51 g/mol]

$R_f = 0.39$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 3:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 494.17 ([M+Na] $^+$ , ber. 494.16)

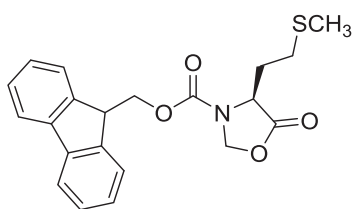
$[\alpha]_D^{23} = +57.9^\circ$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ )

$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.77 (d,  $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.35$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.54 (d,  $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.35$  Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.42 - 7.31 (m, 9 H, H<sub>Ar</sub>, H-2,3,6,7<sub>Fmoc</sub>), 5.47 - 5.16 (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 5.11 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 5.03 (d,  $^2J = 4.41$  Hz, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.75 - 4.50 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.23 (t,  $^3J_{CH,CH_2} = 5.15$  Hz, 1 H, CH-Fmoc), 3.95 - 3.68 (m, 1 H, H-4<sub>Oxa</sub>), 2.30 - 1.94 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-), 1.94 - 1.60 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-).

$^{13}C$ -NMR [HSQC] (101 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 171.72, 171.54 (C=O<sub>Oxa</sub>, C=OOBn), 152.80 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.19 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.34 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 135.58 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 128.55, 128.18, 127.94, 127.91, 127.21 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph, C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc), 124.48 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.06 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 77.21 (C<sub>2</sub>-Oxa), 67.31 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 66.52 (CH<sub>2</sub>-Bn), 53.75 (C<sub>4</sub>-Oxa), 47.04 (CH-Fmoc), 29.10 (-CH<sub>2</sub>-), 25.54 (-CH<sub>2</sub>-).

**(4S)-3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-4-[2-(methylthio)ethyl]-1,3-oxazolidin-5-on (2e)**

(Fmoc-L-Met-Oxazolidinon)



Fmoc-L-Met-OH (**1e**) (2.00 g, 5.38 mmol), Paraformaldehyd (1.20 g) und *p*-Toluolsulfonsäure (220 mg, 1.16 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 1.94 g (5.06 mmol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

$C_{21}H_{21}NO_4S$  [M = 383.47 g/mol]

$R_f = 0.47$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 3:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 406.10 ( $[M+Na]^+$ , ber. 406.11)

$[\alpha]_D^{23} = +114.9^\circ$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ )

Schmp.: 78.3 °C (Diethylether); Lit.: 74 - 77 °C <sup>[54]</sup>

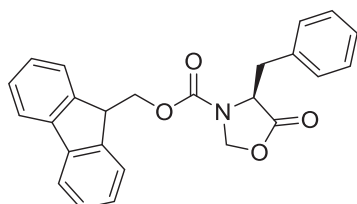
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.78 (d,  $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.35$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.55 (d,  $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.35$  Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.46 - 7.39 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.38 - 7.31 (m, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.50 - 5.15\* (m, 1H, H-2<sub>Oxa</sub>), 5.12 - 5.10 (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.94 - 4.45 (m, 2 H,  $CH_2$ -Fmoc), 4.23 (t,  $^3J_{CH,CH_2} = 4.96$  Hz, 1 H, CH-Fmoc), 3.91 - 3.72 (m, 1H, H-4<sub>Oxa</sub>), 2.64 - 1.50 (m, 7H, 2 ×  $CH_2$ , S- $CH_3$ ).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 172.08 (C=O<sub>Oxa</sub>), 152.73 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.17 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.30 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 127.88 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 127.13 (C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 124.40 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.05, (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 77.60 (C<sub>2</sub>-Oxa), 67.01 ( $CH_2$ -Fmoc), 53.38 (C<sub>4</sub>-Oxa), 47.06 (CH-Fmoc), 28.49, 28.35 (- $CH_2$ -), 14.69 (S- $CH_3$ ).

\*Signale des Nebenrotamers

#### (4S)-4-Benzyl-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (2f)

(Fmoc-L-Phe-Oxazolidinon)



Fmoc-L-Phe-OH (**1f**) (1.94 g, 5.00 mmol), Paraformaldehyd (1.00 g) und *p*-Toluolsulfonsäure (100 mg, 0.58 mmol) wurden gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 1.61 g (4.03 mmol, 81 %) eines farblosen Feststoffs.

$C_{25}H_{21}NO_4$  [M = 399.45 g/mol]

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

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 454.17 ( $[M+Na]^+$ , ber. 422.13)

$[\alpha]_D^{23} = +140.4^\circ$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ )

Schmp.: 93.2 °C (Diethylether)

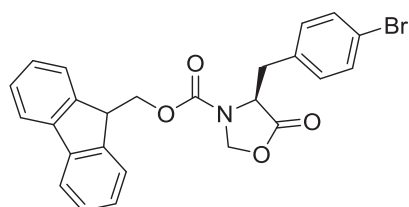
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.79 (d,  $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 6.99$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.76 - 7.49 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.48 - 7.32 (m, 4 H, H<sub>Ar-Ph</sub>, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.21 - 7.12 (m, 4 H, H<sub>Ar-Ph</sub>, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 6.85 - 6.61 (m, 1 H, H<sub>Ar-Ph</sub>), 5.14 (s, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 5.06 - 4.91 (m, 1 H,  $CH_2$ -Fmoc), 4.72 (dd,  $^2J_{CH_2,CH_2} = 10.66$  Hz,  $^3J_{CH_2,CH} = 5.15$  Hz, 1 H,  $CH_2$ -Fmoc), 4.61 - 4.40\* (m, 0.5 H, H-4<sub>Oxa</sub>), 4.28 (t,  $^3J_{CH,CH_2} = 4.78$  Hz, 1 H, CH-Fmoc), 4.15\* (s, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>),

4.10 - 3.89 (m, 1 H, H-4<sub>Oxa</sub>), 3.51 - 3.32\* (m, 0.5 H, CH<sub>2</sub>-Ph), 3.25 - 3.10\* (m, 0.5 H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.85 - 2.69 (m, 0.5 H, CH<sub>2</sub>-Ph), 2.49 - 2.30 (m, 0.5 H, CH<sub>2</sub>-Ph).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 171.82 (C=O<sub>Oxa</sub>), 152.26 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.35 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.42 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 129.51, 128.69, 128.03, 127.95, 127.42, 127.22 (C<sub>o,m,p</sub>-Phe, C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc), 124.43 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.11 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 77.79 (C<sub>2</sub>-Oxa), 66.64 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 56.24 (C<sub>4</sub>-Oxa), 47.18 (CH-Fmoc), 35.32 (CH<sub>2</sub>-Ph).

\*Signale des Nebenrotamers

**(4S)-4-[(4-Brom)benzyl]-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (2g)**  
(Fmoc-L-Phe(4-Br)-Oxazolidinon)



Fmoc-L-Phe(4-Br)-OH (**1g**) (258 mg, 0.55 mmol), Paraformaldehyd (200 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (10.0 mg, 58.1 mmol) wurden in 50 mL Toluol suspendiert und gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 250 mg (0.52 mmol, 95 %) eines farblosen Feststoffs.

C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>4</sub> [M = 478.34 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.45 (Hex/EtOAc, 3:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 501.07 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 501.03)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +140.5° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

Schmp.: 136.1 °C (Diethylether)

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ (ppm) = 7.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=6.99 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.78 - 7.58 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.47 - 7.32 (m, 8 H, H<sub>Ar</sub>-Ph, H-2,3,6,7<sub>Fmoc</sub>), 5.19 - 5.06 (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.65 - 4.52 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.51 - 4.36 (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.35 - 4.27 (m, 1 H, CH-Fmoc).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ (ppm) = 171.51 (C=O<sub>Oxa</sub>), 152.29 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.63 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 140.86 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 134.50, 131.56, 131.22 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 127.77, 127.70, 127.22 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph, C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc), 124.93 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.34/120.13\* (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 77.61 (CH<sub>2</sub>-Oxa), 68.87 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 55.73 (C<sub>4</sub>-Oxa), 46.67 (CH-Fmoc), 34.16 (-CH<sub>2</sub>-).

\*Signale des Nebenrotamers

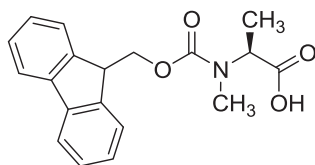
## 5.2.2 *N*-Methylaminosäuresynthese

### *Allgemeine Versuchsdurchführung zur N-Methylaminosäuresynthese im Tube-in-Tube-Reaktor*

Zu Beginn jeder Synthese wurde der Reaktor mit Acetonitril gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Das entsprechende Oxazolidinon (**3a-g**) wurde unter leichtem Erwärmen in 1.5 mL Acetonitril gelöst und Triethylsilan zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in die Probenschleife injiziert. Trifluoressigsäure (1.50 mL, 19.5 mmol) wurden in die Außenkapillare des Tube-in-Tube-Reaktors eingespritzt. Mittels Spritzenpumpe wurde Acetonitril über die Probenschleife bei 75 °C Wasserbadtemperatur befördert. Das Rohprodukt wurde gesammelt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit Dichlormethan und einmal mit Diethylether kodestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex / EtOAc 3:1).

### *N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*N*-methyl-L-alanin (**3a**)

(Fmoc-N-Me-L-Ala-OH)



#### Nach allgemeiner Synthesevorschrift

Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon (**2a**) (98.4 mg, 0.30 mmol) und Triethylsilan (0.10 mL, 0.63 mmol) wurden bei einer Flussrate von 6 mL/h gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt und ohne säulenchromatographische Reinigung analysenrein erhalten.

Ausbeute: 95.0 mg (0.29 mmol, 97 %) eines farblosen Feststoffs.

#### Alternativmethode: im Kolben nach Freidinger et al.<sup>[54]</sup>

Fmoc-L-Ala-Oxazolidinon (**2a**) (321 mg, 1.00 mmol) wurde in 5 mL Chloroform gelöst und Trifluoressigsäure (5.00 mL, 64.9 mmol), sowie Triethylsilan (0.50 mL, 3.13 mmol) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde vorsichtig mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde danach mit Dichlormethan (2 × 15 mL) gewaschen und mit 1 M HCl angesäuert (pH~2). Die saure, wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (2 × 15 mL) rück-extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der ausgefallene Feststoff wurde mit Diethylether kodestilliert und säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex / EtOAc 3:1).

Ausbeute: 320 mg (0.98 mmol, 98 %) eines farblosen Feststoffs.

$C_{19}H_{19}NO_4$  [ $M = 325.36$  g/mol]

$R_f = 0.45$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 348.13 ( $[M+Na]^+$ , ber. 348.12)

$[\alpha]_D^{23} = -16.4^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{25} = -21.4^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CH_2Cl_2$ )<sup>[54]</sup>

Schmp.: 152.9 °C (Diethylether); Lit.: 154.5 - 155.5 °C <sup>[54]</sup>

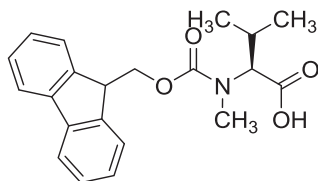
$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.89 (d,  $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.35$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.68 - 7.59 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.45 - 7.38 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.33 (t,  $^3J_{H2,H1,H3} = ^3J_{H7,H6,H8} = 7.17$  Hz, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 4.93 (q,  $^3J_{CH,CH3} = 7.23$  Hz, 0.7 H, Ala <sup>$\alpha$</sup> ), 4.63\* (q,  $^3J_{CH,CH3} = 7.23$  Hz, 0.3 H, Ala <sup>$\alpha$</sup> ), 4.54 - 4.37 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.33 - 4.21 (m, 1 H, CH-Fmoc), 2.94 (s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 1.29 (d,  $^3J_{CH3,CH} = 7.35$  Hz, 3 H, Ala <sup>$\beta$</sup> ).

$^{13}C$ -NMR [HSQC] (75 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm) = 173.29 (COOH), 155.90 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 144.11 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.04 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 127.98 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 127.43 (C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 125.35 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.43 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 67.13 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 54.28 (C-Ala <sup>$\alpha$</sup> ), 46.94 (CH-Fmoc), 30.70 (N-CH<sub>3</sub>), 14.77 (C-Ala <sup>$\beta$</sup> ).

\*Signale des Nebenrotamers

### *N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*N*-methyl-L-valin (**3b**)

(Fmoc-N-Me-L-Val-OH)



Fmoc-L-Val-Oxazolidinon (**2b**) (94.7 mg, 0.27 mmol) und Triethylsilan (0.15 mL, 0.94 mmol) wurden bei einer Flussrate von 3 mL/h gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 8.09 mg (0.22 mmol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

$C_{21}H_{23}NO_4$  [ $M = 353.42$  g/mol]

$R_f = 0.15$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 376.17 ( $[M+Na]^+$ , ber. 376.15)

$[\alpha]_D^{23} = -28.4^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{25} = -31.2^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CH_2Cl_2$ )<sup>[54]</sup>

Schmp.: 187.6 °C (Diethylether); Lit: 185 - 187 °C <sup>[54]</sup>

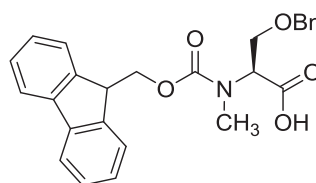
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.89 (d,  $^3J_{\text{H4,H3}}=^3J_{\text{H5,H6}}=6.25$  Hz, 2 H, H-4,5 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.65 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=^3J_{\text{H8,H7}}=4.78$  Hz, 2 H, H-1,8 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.45 - 7.37 (m, 2 H, H-3,6 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.36 - 7.28 (m, 2 H, H-2,7 $_{\text{Fmoc}}$ ), 4.51 - 4.20 (m, 3 H, CH $_2$ -Fmoc, CH-Fmoc), 4.14 (d,  $^3J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta}=10.3$  Hz, 0.6 H, Val $^a$ ), 3.85\* (d,  $^3J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta}=10.3$  Hz, 0.6 H, Val $^a$ ), 2.74/2.71\* (2  $\times$  s, 3 H, N-CH $_3$ ), 1.91 - 2.13 (m, 1 H, Val $^b$ ), 0.56 - 0.94 (m, 6 H, Val $^y$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC] (75 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm) = 171.93 (COOH), 152.97 (C=O $_{\text{Fmoc}}$ ), 143.86 (C $_{1a,8a}$ -Fmoc), 140.80 (C $_{4a,5a}$ -Fmoc), 128.93\*/127.65 (C $_{3,6}$ -Fmoc), 127.29\*/127.11 (C $_{2,7}$ -Fmoc), 124.93 (C $_{1,8}$ -Fmoc), 121.39\*/120.09 (C $_{4,5}$ -Fmoc), 66.74 (CH $_2$ -Fmoc), 63.74 (C-Val $^a$ ), 46.65 (CH-Fmoc), 30.15 (N-CH $_3$ ), 26.88 (C-Val $^b$ ), 19.71\*/18.81 (C-Val $^y$ ).

\*Signale des Nebenrotamers

### *N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*N*-methyl-*O*-(phenylmethyl)-*L*-serin (**3c**)

(Fmoc-*N*-Me-*L*-Ser)



Fmoc-*L*-Ser(Bn)-Oxazolidinon (**2c**) (105 mg, 0.24 mmol) und Triethylsilan (0.15 mL, 0.94 mmol) wurden bei einer Flussrate von 3 mL/h gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 100 mg (0.23 mmol, 95 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C $_{26}$ H $_{25}$ NO $_5$  [M = 431.49 g/mol]

R $_f$  = 0.17 ( $^c$ Hex/EtOAc, 1:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 454.22 ([M+K] $^+$ , ber. 454.14)

$[\alpha]_D^{23} = -3.1^\circ$  (c = 1.0, CHCl $_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{25} = -6.4^\circ$  (c = 1.0, CH $_2$ Cl $_2$ )<sup>[54]</sup>

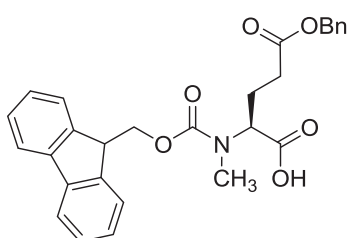
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz, CDCl $_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.81 - 7.71 (m, 2 H, H-4,5 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.66 - 7.52 (m, 2 H, H-1,8 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.47 - 7.28 (m, 9 H, H $_{\text{Ar-Fmoc}}$ , H $_{\text{Ar-Ph}}$ ), 5.03 (t,  $^3J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}_2}=5.88$  Hz, 0.6 H, Ser $^a$ ), 4.82 - 4.37 (m, 4.4 H, CH $_2$ -Fmoc, CH $_2$ -Bn, Ser $^a$ ), 4.30 (t,  $^3J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}_2}=7.5$  Hz, 0.6 H, CH-Fmoc), 4.22\* (t,  $^3J_{\text{CH},\text{CH}_2}=6.0$  Hz, 0.4 H, CH-Fmoc), 4.03 - 3.83 (m, 1.3 H, Ser $^b$ ), 3.82 - 3.60\* (m, 0.7 H, Ser $^b$ ), 3.06/2.98\* (2  $\times$  s, 3 H, N-CH $_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC] (75 MHz, CDCl $_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 174.25/174.09\* (COOH), 157.0/156.08\* (C=O $_{\text{Fmoc}}$ ), 143.80 (C $_{1a,8a}$ -Fmoc), 141.27 (C $_{4a,5a}$ -Fmoc), 137.42/137.32\* (C $_{\text{ipso-Ph}}$ ), 128.42, 127.82, 127.67, 127.04 (C $_{\text{o,m,p-Ph}}$ , C $_{2,3,6,7}$ -Fmoc), 125.05/124.75\*(C $_{1,8}$ -Fmoc), 119.94 (C $_{4,5}$ -Fmoc), 73.17 (CH $_2$ -Bn), 68.00 (C-Ser $^b$ ), 67.55 (CH $_2$ -Fmoc), 59.04 (C-Ser $^a$ ), 47.09 (CH-Fmoc), 32.47 (N-CH $_3$ ).

\*Signale des Nebenrotamers

***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*N*-methyl-*O*-(phenylmethyl)-*L*-glutaminsäure (3d)**

(Fmoc-N-Me-L-Glu-OH)



Fmoc-L-Glu(Bn)-Oxazolidinon (**2d**) (118 mg, 0.25 mmol) und Triethylsilan (0.10 mL, 0.63 mmol) wurden bei einer Flussrate von 3 mL/h gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 95.0 mg (0.20 mmol, 80 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

$C_{28}H_{27}NO_6$  [M = 473.53 g/mol]

$R_f = 0.51$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 496.20 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 496.17)

$[\alpha]_D^{23} = -11.5^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

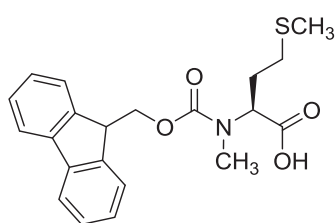
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.81 - 7.66 (m, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.63 - 7.50 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.46 - 7.27 (m, 9 H, H-2,3,6,7<sub>Fmoc</sub>, H<sub>Ar-Ph</sub>), 5.17 - 5.09 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.80 (dd, <sup>3</sup>J<sub>CH $\alpha$ ,CH $2\beta$ a</sub>=10.48 Hz, <sup>3</sup>J<sub>CH $\alpha$ ,CH $2\beta$ b</sub>=3.86 Hz, 0.6 H, Glu <sup>$\alpha$</sup> ), 4.62 - 4.53 (m, 0.4 H, Glu <sup>$\alpha$</sup> ), 4.51 - 4.38 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH,CH $2$</sub> =6.80 Hz, 0.6 H, CH-Fmoc), 4.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH,CH $2$</sub> =7.5 Hz, 0.4 H, CH-Fmoc), 2.87/2.84\* (2 × s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 2.48 - 2.32 (m, 2 H, Glu <sup>$\beta$</sup> , Glu <sup>$\gamma$</sup> ), 2.27 - 2.02 (m, 2 H, Glu <sup>$\beta$</sup> , Glu <sup>$\gamma$</sup> ).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 175.45/175.30\* (COOH), 172.41/172.24\* (C=OObn), 156.98/156.20\* (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.76\*/143.67 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.25 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 135.62 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 129.99, 128.51, 128.24, 128.21, 127.67, 127.03 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph, C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc), 124.93/124.67\* (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 119.90 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 67.80 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 66.47 (CH<sub>2</sub>-Bn), 58.25/57.96\* (C-Glu <sup>$\alpha$</sup> ), 47.13 (CH-Fmoc), 31.56\*/31.23 (N-CH<sub>3</sub>), 30.67/30.37\* (C-Glu <sup>$\gamma$</sup> ), 23.90\*/23.66 (C-Glu <sup>$\beta$</sup> ).

\*Signale des Nebenrotamers

***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*N*-methyl-L-methionin (**3e**)**

(Fmoc-N-Me-L-Met-OH)



Fmoc-L-Met-Oxazolidinon (**2e**) (98.7 mg, 0.26 mmol) und Triethylsilan (0.10 mL, 0.63 mmol) wurden bei einer Flussrate von 3 mL/h gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 43.0 mg (0.11 mmol, 42 %) eines gelben Öls.

$C_{21}H_{23}NO_4S$  [ $M = 385.48$  g/mol]

$R_f = 0.39$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 408.13 ( $[M+Na]^+$ , ber. 408.12), 424.12 ( $[M+Na]^+$ , ber. 424.10), 793.27 ( $[2M+Na]^+$ , ber. 793.26)

$[\alpha]_D^{23} = -4.4^\circ$  ( $c = 2.0$ ,  $CHCl_3$ )

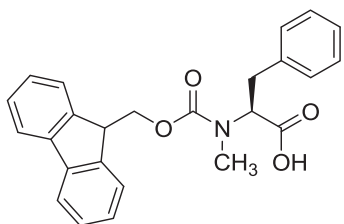
$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 8.45 (br. s. 1 H, OH), 7.82 - 7.71 (m, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.64 - 7.53 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.41 (t,  $^3J_{H3,H2,H4} = ^3J_{H6,H5,H7} = 7.72$  Hz, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.32 (t,  $^3J_{H2,H1,H3} = ^3J_{H7,H6,H8} = 7.72$  Hz, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 4.86\* (dd,  $^3J_{CH\alpha,CH\beta a} = 10.30$  Hz,  $^3J_{CH\alpha,CH\beta b} = 4.41$  Hz, 0.3 H, Met <sup>$\alpha$</sup> ), 4.74 - 4.37 (m, 2.5 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, Met <sup>$\alpha$</sup> ), 4.35 - 4.15 (m, 1.3 H, CH-Fmoc, Met <sup>$\alpha$</sup> ), 2.91/2.89\* ( $2 \times$  s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 2.61 - 2.43 (m, 2 H, Met <sup>$\beta,\gamma$</sup> ), 2.36 - 2.17 (m, 2 H, Met <sup>$\beta,\gamma$</sup> ), 2.11/2.10\* ( $2 \times$  s, 3 H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}C$ -NMR [HSQC] (75 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 176.35/176.02\* (COOH), 156.99/156.10\* (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.72/143.53\* (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.27\*/141.24 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 127.70\*/127.03 (C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 124.99\*/124.93 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.07\*/119.94 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 67.80\*/67.07 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 58.16\*/57.39 (C-Met <sup>$\alpha$</sup> ), 53.45\*/52.94 (C-Met <sup>$\alpha$</sup> ), 47.17\*/47.07 (CH-Fmoc), 31.76/31.42\* (N-CH<sub>3</sub>), 29.87/29.66\*, 28.05\*/27.95 (C-Met <sup>$\beta,\gamma$</sup> ), 15.34/15.24\* (CH<sub>3</sub>).

\*Signale des Nebenrotamers

***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*N*-methyl-L-phenylalanin (**3f**)**

(Fmoc-N-Me-L-Phe-OH)



Fmoc-L-Phe-Oxazolidinon (**2f**) (101 mg, 0.25 mmol) und Triethylsilan (0.15 mL, 0.94 mmol) wurden bei einer Flussrate von 3 mL/h gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 91.0 mg (0.23 mmol, 90 %) eines farblosen Feststoffs.

$C_{25}H_{23}NO_4$  [ $M = 401.46$  g/mol]

$R_f = 0.21$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 1:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 424.21 ( $[M+Na]^+$ , ber. 424.15)

$[\alpha]_D^{23} = -39.2^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ )

Schmp.:  $76.2$  °C (Diethylether)

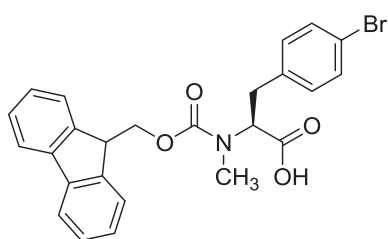
$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 10.18 (br. s., 1 H, OH), 7.80 (d,  $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 6.99$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.57 (d,  $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.35$  Hz, 1 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.48 - 7.27 (m, 9 H, H-2,3,6,7<sub>Fmoc</sub>, H<sub>Ar-Ph</sub>), 7.02 (d,  $^3J_{CH,CH} = 5.88$  Hz, 1 H, H<sub>Ar-Ph</sub>), 5.00 (dd,  $^3J_{CH\alpha,CH\beta a} = 11.03$  Hz,  $^3J_{CH\alpha,CH\beta b} = 4.78$  Hz, 0.6 H, Phe <sup>$\alpha$</sup> ), 4.75 - 4.52 (m, 1.4 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, Phe <sup>$\alpha$</sup> ), 4.48 - 4.39 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.32 - 4.15 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.58 - 3.38\* (m, 0.7 H, Phe <sup>$\beta$</sup> ), 3.30 - 3.08 (m, 1.3 H, Phe <sup>$\beta$</sup> ), 2.87/2.85\* ( $2 \times s$ , 3 H, N-CH<sub>3</sub>).

$^{13}C$ -NMR [HSQC] (75 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 175.57/175.28\* (COOH), 156.68/156.07\* (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.76/143.61\* (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.21/141.15\* (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 136.84/136.78\* (C<sub>ipso</sub>-Ph), 128.67, 128.58, 128.48, 127.56, 127.00, 126.94, 126.91, 126.71, 126.67 (C<sub>o,m,p</sub>-Phe, C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc), 124.96/124.61\* (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 119.84 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 67.73/67.38\* (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 60.51/60.37\* (C-Phe <sup>$\alpha$</sup> ), 47.03\*/46.91 (CH-Fmoc), 34.67\*/34.51 (C-Phe <sup>$\beta$</sup> ), 32.14 (N-CH<sub>3</sub>).

\*Signale des Nebenrotamers

### *N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*N*-methyl-L-4-brom-phenylalanin (**3g**)

(Fmoc-N-Me-L-Phe(4-Br)-OH)



Fmoc-L-Phe(4-Br)-Oxazolidinon (**2g**) (96.9 mg, 0.20 mmol) und Triethylsilan (0.10 mL, 0.63 mmol) wurden bei einer Flussrate von 3 mL/h gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt.

Ausbeute: 89.0 mg (0.19 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs.

$C_{25}H_{22}BrNO_4$  [ $M = 480.36$  g/mol]

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

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 503.10 ( $[M+Na]^+$ , ber. 503.05)

$[\alpha]_D^{23} = -26.4^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ )

Schmp.: 88.7 °C (Diethylether)

$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 9.11 (br. s., 1 H, OH), 7.82 - 7.73 (m, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.56 - 7.47 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.46 - 7.37 (m, 4 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>, H<sub>Ar-Ph</sub>), 7.36 - 7.30 (m, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 7.09 (d,  $^3J_{\text{CH,CH}}=8.09$  Hz, 1 H, H<sub>Ar-Ph</sub>), 6.76 (d,  $^3J_{\text{CH,CH}}=8.09$  Hz, 1 H, H<sub>Ar-Ph</sub>), 4.90 (dd,  $^3J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}_2\beta\text{a}}=10.58$  Hz,  $^3J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}_2\beta\text{b}}=4.96$  Hz, 0.6 H, CH $^\alpha$ ), 4.65\* (dd,  $^3J_{\text{CH,CH}_2\text{a}}=10.66$  Hz,  $^3J_{\text{CH,CH}_2\text{b}}=5.15$  Hz, 0.4 H, CH $^\alpha$ ), 4.50 - 4.35 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.28 - 4.15 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.35 (dd,  $^2J_{\text{CH}_2\text{a,CH}_2\text{b}}=10.58$  Hz,  $^3J_{\text{CH}_2\text{a,CH}}=4.96$  Hz, 0.7 H, CH<sub>2</sub> $^\beta$ ), 3.18 - 2.99 (m, 1.3 H, CH<sub>2</sub> $^\beta$ ), 2.79/2.75\* (2  $\times$  s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC] (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 175.31/174.97\* (COOH), 156.71/155.92\* (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.79\*/143.70 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.33\*/141.27 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 135.89 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 131.68, 131.61, 130.49, 130.37, 127.68, 127.10, 127.04 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph, C<sub>ipso</sub>-Ph, C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc), 124.87/124.48\* (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.72\*/119.94 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 67.83/67.23\* (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 55.91 (C $^\alpha$ ), 47.12\*/46.98 (CH-Fmoc), 34.15/34.00 (C $^\beta$ ), 32.46 (N-CH<sub>3</sub>).

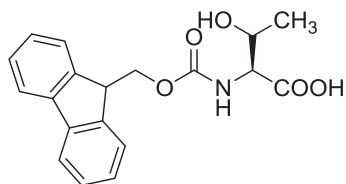
\*Signale des Nebenrotamers

## 5.3 Vakzinsynthesen

### 5.3.1 Synthese des T<sub>N</sub>-Threonins

*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin (**8**)<sup>[33,100]</sup>

(Fmoc-Thr-OH)



Zu einer Suspension aus 20.0 g (168 mmol) L-Threonin (**7**) und 14.3 g (170 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 800 mL Aceton/Wasser (1:1) wurden 56.9 g (169 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-succinimidylcarbonat portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die klare Reaktionslösung wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2 angesäuert und das Aceton anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 × 200 mL) und die vereinigten organischen Phasen zum einen mit 1N HCl (2 × 200 mL) und zum anderen mit Wasser (1 × 250 mL) gewaschen. Die über Magnesiumsulfat getrocknete Produktlösung wird unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand mit abs. Toluol (3 × 100 mL) und Dichlormethan (2 × 100 mL) kodestilliert. Ohne weitere Reinigung wurde es zu Fmoc-Thr-O<sup>t</sup>Bu umgesetzt.

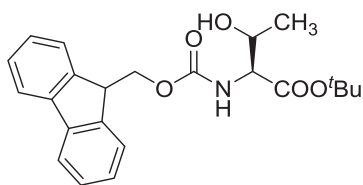
Ausbeute: 57.1 g (167 mmol, 99 %) eines leicht gelben, amorphen Feststoffs

C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub> [M = 341.36 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.7 (°Hex/EtOAc, 1:1)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.59 - 7.48 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.37 - 7.28 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.26 - 7.21 (m, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 6.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,Tα</sub>=9.19 Hz, 1 H, NH), 4.47 - 4.24 (m, 4 H, Thr<sup>α</sup>, Thr<sup>β</sup>, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH,CH2</sub>=6.99 Hz, 1 H, CH-Fmoc), 1.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>Tγ,Tβ</sub>=6.25 Hz, 3 H, Thr<sup>γ</sup>), 1.03 (s, 1 H, OH).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[234,235]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin-*tert*-butylester (9)**<sup>[236]</sup>(Fmoc-Thr-O<sup>t</sup>Bu)

In einen mit Argon gefluteten Rundkolben wurden 110.3 g (535 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 22.7 g (306 mmol) *tert*-Butanol und 1.27 g (12.8 mmol) wasserfreies Kupfer(I)-chlorid vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wurde 6 d unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 90 mL Dichlormethan verdünnt und auf 0 °C abgekühlt. Hierzu wurden 57.1 g (167 mmol) Fmoc-Thr-OH (**8**) in 60 mL Dichlormethan innerhalb von 30 min zugetropft. Das Gemisch wurde weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Suspension über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (3 × 200 mL) und ges. Natriumchloridlösung (2 × 200 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1) und anschließend zweimal aus Diethylether/Petrolether (1:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 29.2 g (73.5 mmol, 43 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub> [M = 397.47 g/mol]

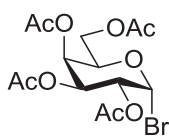
R<sub>f</sub> = 0.34 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +11.6° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +9.0 (c = 1.15 CHCl<sub>3</sub>)<sup>[101]</sup>

Schmp.: 81 °C (Diethylether/Petrolether 1:1); Lit.: 83 °C<sup>[101]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=6.99 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2,H4</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H6,H5,H7</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.32 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H7,H6,H8</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,Tα</sub>=8.46 Hz, 1 H, NH), 4.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>CH2,CH</sub>=6.99 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.39 - 4.30 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.29 - 4.21 (m, 2 H, Thr<sup>α</sup>, Thr<sup>β</sup>), 2.09 (br. s., 1 H, OH), 1.50 (s, 9 H, <sup>t</sup>Bu), 1.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>Tγ,Tβ</sub>=6.25 Hz, 3 H, Thr<sup>γ</sup>).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[101,237]</sup>

**2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosylbromid (11)**<sup>[102]</sup>**( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>GalBr)**

Es wurden 210 mL Acetanhydrid mit 1.25 mL Perchlorsäure versetzt. Anschließend wurde Galactose (**10**) (47.4 g, 263 mmol) portionsweise zugefügt, sodass die Innentemperatur 40 °C nicht überstieg. Das Reaktionsgemisch wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 233 mL Bromwasserstoffsäure in Eisessig (33 %ig) zugetropft und nach beendeter Zugabe 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 300 mL Dichlormethan verdünnt und anschließend vorsichtig auf 200 mL Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und danach mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (5 × 200 mL) und mit ges. Natriumchloridlösung (1 × 200 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

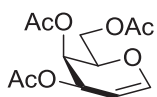
Ausbeute: 90.7 g (221 mmol, 84 %) eines gelben, hochviskosen Öls.

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>BrO<sub>9</sub> [M = 411.20 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.94 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc, 5:1)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 6.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=4.04 Hz, 1 H, H-1), 5.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=2.57 Hz, 1 H, H-4), 5.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=10.66, <sup>3</sup>J<sub>H3,H4</sub>=3.31 Hz, 1 H, H-3), 5.01 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2,H3</sub>=10.66, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1</sub>= 4.04 Hz, 1 H, H-2), 4.50 - 4.40 (m, 1 H, H-5), 4.20 - 4.03 (m, 2 H, H-6<sub>ab</sub>), 2.12 (s, 3 H, OAc), 2.08 (s, 3 H, OAc), 2.03 (s, 3 H, OAc), 1.98 (s, 3 H, OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[238]</sup>

**3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (12)**<sup>[102,103]</sup>**(Ac<sub>3</sub>Gal)**

Es wurden 350 mL Essigsäure und 470 mL Wasser vorgelegt und auf -5 °C abgekühlt. Anschließend wurden 130 g (1.99 mol) Zinkpulver und Kupfersulfatlösung (13.3 g (83.1 mmol) Kupfersulfat in 65 mL Wasser) zugegeben. Nachdem die Wasserstoffentwicklung einsetzte, wurde innerhalb von 60 min eine Lösung aus 90.9 g (221 mmol) Galactosylbromid (**11**) in 130 mL Dichlormethan zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf 10 °C erwärmt, über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und mit 150 mL eines Essigsäure/Wasser 1 : 1-Gemisches nachgewaschen. Die wässrige Phase wurde

mit Dichlormethan ( $3 \times 200$  mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit Eiswasser ( $1 \times 250$  mL) und mit kalter, ges. Natriumhydrogencarbonatlösung ( $2 \times 200$  mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 58.0 g (213 mmol, 96 %) eines farblosen, hoch viskosen Öls.

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

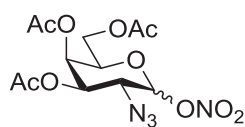
$R_f = 0.42$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 2:1)

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 6.45 (d,  $^3J_{H1,H2}=6.25$  Hz, 1 H, H-1), 5.55 - 5.53 (m, 1 H, H-3), 5.44 - 5.41 (m, 1 H, H-4), 4.74 - 4.68 (m, 1H, H-2), 4.36 - 4.27 (m, 1 H, H-5), 4.27 - 4.14 (m, 2 H, H-6<sub>ab</sub>), 2.11 (s, 3 H, OAc), 2.07 (s, 3 H, OAc), 2.01 (s, 3 H, OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[239]</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranosylnitrat (13)<sup>[104]</sup>

( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>N<sub>3</sub>GalONO<sub>2</sub>)



Es wurden 25.6 g (94.0 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal (**12**) in 400 mL absol. Acetonitril gelöst und auf  $-25$  °C gekühlt. Die gekühlte Lösung wurde anschließend mit 170 g (310 mmol) trockenem Cerammoniumnitrat und 10.3 g (158 mmol) trockenem Natriumazid versetzt. Die Suspension wurde 18 h bei  $-20$  °C gerührt, danach mit 350 mL Diethylether verdünnt und auf 350 mL Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde mit Wasser ( $3 \times 250$  mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch ( $^c$ Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt und anschließend aus Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 15.8 g (41.9 mmol, 45 %) eines blass gelben, amorphen Feststoffs.

$C_{12}H_{16}N_4O_{10}$  [ $M = 376.28$  g/mol]

$R_f = 0.77$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 1:1)

$[\alpha]_D^{23} = +82.5$  ° ( $c = 2.0$ ,  $CHCl_3$ ); Lit. vom  $\alpha$ -Anomer:  $[\alpha]_D^{25} = +125$  ° ( $c = 1.0$   $CHCl_3$ )<sup>[104]</sup>

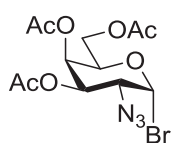
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 6.33 (d, 1H,  $^3J_{H1\alpha,H2\alpha}=4.41$  Hz, H-1 $\alpha$ ), 5.59 (d,  $^3J_{H1\beta,H2\beta}=8.83$  Hz, 1 H, H-1 $\beta$ ), 5.48 (d,  $^3J_{H4\alpha,H3\alpha}=2.21$  Hz, 1 H, H-4 $\alpha$ ), 5.37 (d,

$^3J_{H4\beta,H3\beta}=2.94$  Hz, 1 H, H-4 $\beta$ ), 5.22 (dd,  $^3J_{H3\alpha,H2\alpha}=11.40$  Hz,  $^3J_{H3\alpha,H4\alpha}=3.31$  Hz, 1 H, H-3 $\alpha$ ), 4.96 (dd,  $^3J_{H3\beta,H4\beta}=10.48$  Hz,  $^3J_{H3\beta,H4\beta}=3.13$  Hz, 1 H, H-3 $\beta$ ), 4.35 (t,  $^3J_{H5,H6a/b}=6.07$  Hz, 1 H, H-5 $\alpha$ ), 4.15 - 4.04 (m, 6 H, H-2 $\alpha$ , H-5 $\beta$ , H-6ab $^\alpha$ , H-6ab $^\beta$ ), 3.81 (dd,  $^3J_{H2\beta,H3\beta}=10.66$  Hz,  $^3J_{H2\beta,H1\beta}=8.82$  Hz, 1 H, H-2 $\beta$ ), 2.17 (s, 6H, OAc), 2.08 (s, 3 H, OAc), 2.04 (s, 3 H, OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[240]</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (**14**)<sup>[104]</sup>

( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>N<sub>3</sub>GalBr)



Es wurden 6.94 g (79.9 mmol) trockenes Lithiumbromid in 70 mL absol. Acetonitril vorgelegt. Danach wurde  $\alpha/\beta$ Ac<sub>3</sub>N<sub>3</sub>GalONO<sub>2</sub> (**13**) (5.68 g, 15.1 mmol) in 30 mL absol. Acetonitril gelöst und tropfenweise zugegeben.

Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde das Gemisch mit 120 mL Dichlormethan verdünnt, mit ges. Natriumchlorid Lösung (4 × 50 mL) gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch ( $^c$ Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.52 g (11.5 mmol, 76 %) eines gelben, hoch viskosen Öls.

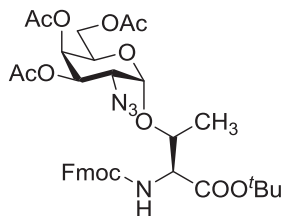
C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M = 394.18 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.7 ( $^c$ Hex/EtOAc, 1:1)

$[\alpha]_D^{23} = +185.2^\circ$  (c = 2.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.:  $[\alpha]_D^{20} = +188.6^\circ$  (c = 1.95 CHCl<sub>3</sub>)<sup>[104]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 6.47 (d,  $^3J_{H1,H2}=3.68$  Hz, 1 H, H-1), 5.51 - 5.46 (m, 1 H, H-4), 5.33 (dd,  $^3J_{H3,H4}=2.94$  Hz,  $^3J_{H3,H2}=10.66$  Hz, 1 H, H-3), 4.50 - 4.44 (m, 1 H, H-5), 4.10 (dd,  $^3J_{H6a/b,H5}=6.99$ , 2.57 Hz, 2 H, H-6a,b), 3.98 (dd,  $^3J_{H2,H1}=3.86$  Hz,  $^3J_{H2,H3}=10.85$  Hz, 1 H, H-2), 2.15 (s, 3 H, OAc), 2.05 (s, 3 H, OAc), 2.04 (s, 3 H, OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[104,241,242]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (15)<sup>[106]</sup>**(Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Gal)-O*t*Bu)

Eine Lösung aus 4.94 g (12.4 mmol) Fmoc-Thr-O*t*Bu (**9**) in 50 mL absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) wurde 1 h mit 15.2 g gepulvertem aktiviertem Molsieb (4 Å) bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen der Suspension auf 0 °C wurde unter Lichtausschluss 3.49 g (12.7 mmol) festes Silbercarbonat, sowie 0.55 g (2.65 mmol) Silberperchlorat, gelöst in 4 mL absol. Toluol, zugesetzt. Es wurde weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Danach wurde innerhalb von 90 min eine Lösung aus 4.53 g (11.5 mmol)  $\alpha$ Ac<sub>3</sub>N<sub>3</sub>GalBr (**14**) in 40 mL absol. Dichlormethan/absol. Toluol (1:1) bei 0 °C zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 24 h gerührt. Anschließend wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und über Hyflo<sup>®</sup> filtriert. Das Filtrat wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 × 80 mL), sowie mit ges. Natriumchlorid-Lösung (2 × 80 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.54 g (6.39 mmol, 56 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> [M = 710.74 g/mol]

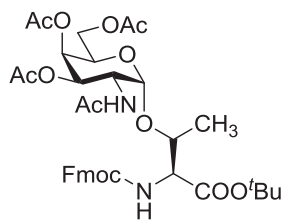
R<sub>f</sub> = 0.81 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc, 10:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 733.27 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 710.74), 1443.55 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1443.55)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +62.2° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +60.8 (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>)<sup>[132]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.43 - 7.38 (m, 2 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 7.36 - 7.31 (m, 2 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 5.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,T $\alpha$</sub> =9.56 Hz, 1 H, NH<sub>Fmoc</sub>), 5.50 - 5.47 (m, 1 H, H-4), 5.35 - 5.32 (m, 1 H, H-3), 5.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=3.31 Hz, 1 H, H-1), 4.48 - 4.46 (m, 1 H, Thr <sup>$\beta$</sup> ), 4.42 - 4.35 (m, 2 H, H-6a,b), 4.31 - 4.24 (m, 3 H, Thr <sup>$\alpha$</sup> , H-5, CH-Fmoc), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH</sub>=6.25 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 3.65 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1</sub>=3.68 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2,H3</sub>=11.03 Hz, 1 H, H-2), 2.16 (s, 3 H, OAc), 2.09 (s, 3 H, OAc), 2.06 (s, 3 H, OAc), 1.52 (s, 9 H, O*t*Bu), 1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>T $\gamma$ ,T $\beta$</sub> =6.25 Hz, 3 H, Thr <sup>$\gamma$</sup> ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[132,237]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (16)<sup>[107]</sup>**(Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-O<sup>t</sup>Bu)

Zunächst wurde das Zinkpulver (4.50 g, 69.0 mmol) durch mehrfaches Aufschlämmen in verd. Kupfersulfat-Lösung (3.20 g (12.8 mmol) Kupfersulfat-Pentahydrat, gelöst in 100 mL Wasser) aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet. Das aktivierte Zinkpulver wurde zu einer Lösung aus 2.33 g (3.28 mmol)

Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Gal)-O<sup>t</sup>Bu (**15**) in 160 mL eines Tetrahydrofuran/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1)-Gemisches gegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 500 mL Tetrahydrofuran verdünnt, über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Lösungsmittelreste wurden durch Kodestillation mit Toluol (4 × 30 mL) entfernt. Der Rückstand wurde in 220 mL Dichlormethan gelöst, mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (3 × 150 mL) und Natriumchlorid-Lösung (1 × 180 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 1.36 g (1.87 mmol, 57 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> [M = 726.78 g/mol]

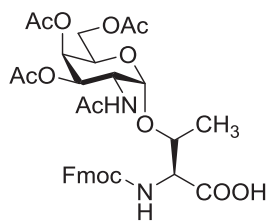
R<sub>f</sub> = 0.26 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:2)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 749.29 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 749.29), 1475.56 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1475.58)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +47.4° (c = 0.2, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +60.4 (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>)<sup>[132]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=7.35 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.47 - 7.39 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.36 (d, <sup>3</sup>J=6.99 Hz, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,T $\alpha$</sub> =9.93 Hz, 1 H, NH<sub>Fmoc</sub>), 5.51 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,H2</sub>=9.56 Hz, 1 H, NH<sub>Gal</sub>), 5.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H5</sub>=1.21 Hz, 1 H, H-4), 5.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H3,H4</sub>=2.94 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=11.03 Hz, 1 H, H-3), 4.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=3.31 Hz, 1 H, H-1), 4.68 - 4.58 (m, 1 H, H-2), 4.51 - 4.37 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.32 - 4.05 (m, 6 H, CH-Fmoc, H-5, H-6ab, Thr <sup>$\alpha$</sup> , Thr <sup>$\beta$</sup> ), 2.18 (s, 3 H, OAc), 2.05 (s, 3 H, NHAc), 2.02 (s, 6 H, 2 × OAc), 1.47 (s, 9 H, O<sup>t</sup>Bu), 1.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>T $\gamma$ ,T $\beta$</sub> =6.25 Hz, 3 H, Thr <sup>$\gamma$</sup> ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[106]</sup>

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonin (17)<sup>[22]</sup>**(Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH)

Es wurden 1.50 g (2.06 mmol) Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-O<sup>t</sup>Bu (**16**) in 8.00 mL Dichlormethan gelöst und mit 12 mL (162 mmol) Trifluoressigsäure und 2.50 mL dest. Wasser versetzt. Es wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 15 mL Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Toluol (2 × 15 mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 95:4:1).

Ausbeute: 1.03 g (1.54 mmol, 74 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> [M = 670.67 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.1 (EtOAc)

HPLC-MS: (m/z): 671.2 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 671.24)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +100.6° (c = 0.1, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +90.3° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[243]</sup>

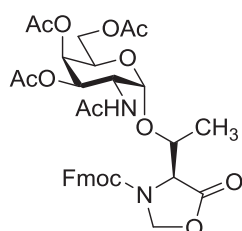
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.80 - 7.70 (m, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.63 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=7.34 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.44 - 7.29 (m, 4 H, H-2,3,6,7<sub>Fmoc</sub>), 6.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,T $\alpha$</sub> =6.60 Hz, 1 H, NH<sub>Fmoc</sub>), 5.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,H2</sub>=7.34 Hz, 1 H, NH<sub>Gal</sub>), 5.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H5</sub>=1.47 Hz, 1 H, H-4), 5.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H3,H4</sub>=2.74 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=11.37 Hz, 1 H, H-3), 5.06 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=1.83 Hz, 1 H, H-1), 4.57 - 4.51 (m, 1 H, H-2), 4.50 - 4.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.36 - 4.05 (m, 6 H, CH-Fmoc, H-5, H-6ab, Thr <sup>$\alpha$</sup> , Thr <sup>$\beta$</sup> ), 2.16 (s, 3 H, OAc), 2.05 (s, 3 H, NHAc), 2.03 (s, 3 H, OAc), 2.00 (s, 3 H, OAc), 1.29 (d, <sup>3</sup>J<sub>T $\gamma$ ,T $\beta$</sub> =5.87 Hz, 3 H, Thr <sup>$\gamma$</sup> ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[244]</sup>

### 5.3.2 Synthese der *N*-Methylglycosylaminosäuren

#### (4*S*)-4-[*O*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (**18**)

(Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Oxazolidinon)



#### Synthese ausgehend von Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**17**)

Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH (**17**) (32.7 mg, 48.8  $\mu$ mol) wurde in 2.00 mL Acetonitril gelöst. Paraformaldehyd (100 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (6.50 mg, 37.7  $\mu$ mol) wurden zugegeben und das Gemisch 6 d zwischen Raumtemperatur und 60 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Chloroform (3  $\times$  2 mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1  $\rightarrow$  <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2).

Ausbeute: 23.3 mg (34.1  $\mu$ mol, 70 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

#### Synthese ausgehend von Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-O<sup>t</sup>Bu (**16**)

Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-O<sup>t</sup>Bu (**16**) (50.2 mg, 69.1  $\mu$ mol) wurde in 2.00 mL Acetonitril gelöst. Paraformaldehyd (100 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (11.0 mg, 63.9  $\mu$ mol) wurden zugegeben und die Mischung 6 d zwischen Raumtemperatur und 60 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Die Reaktionslösung wurde anschließend über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, eingedunstet und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1  $\rightarrow$  <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2).

Ausbeute: 38.4 mg (56.2  $\mu$ mol, 81 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> [M = 682.68 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.24 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:2)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 705.24 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 705.23), 1387.51 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1387.46).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +113° (c = 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

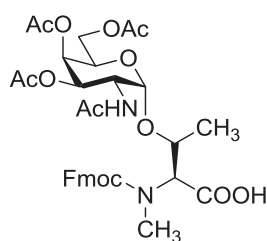
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=6.85 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=7.34 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.47 - 7.39 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.38 - 7.30 (m, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,H2</sub>=9.29 Hz, 1 H, NH<sub>Gal</sub>), 5.40 - 5.29 (m, 1 H, H-4), 5.10 - 5.02 (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.97 - 4.81 (m, 2 H, H-1, H-3), 4.70 - 4.65 (m, 2 H,

CH<sub>2</sub>-Fmoc, H-4<sub>Oxa</sub>), 4.58 - 4.44 (m, 1 H, H-2), 4.31 - 4.18 (m, 3 H, CH-Fmoc, CH<sup>β</sup>), 4.16 - 3.99 (m, 3 H, H-5, H-6ab), 2.17 (s, 3 H, OAc), 2.04 (s, 3 H, OAc), 1.99 (s, 6 H, OAc, NHAc), 1.26 (s, 3 H, CH<sub>3</sub><sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 170.76, 170.51, 169.99, 169.90 (C=O<sub>Oxa</sub>, C=O<sub>Ac</sub>), 153.38 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 141.08, 127.79, 127.73, 126.99, 124.14, 119.87 (C<sub>Ar-Fmoc</sub>), 99.54 (C-1), 78.70 (C<sub>2-Oxa</sub>), 67.56, 67.21, 66.92 (C-3, C-4, C-5, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sup>β</sup>), 61.56 (C-6), 59.06 (C<sub>4-Oxa</sub>), 47.52 (C-2), 46.87 (CH-Fmoc), 29.35, 26.57, 22.73 (CH<sub>3</sub>-Ac), 20.39 (CH<sub>3</sub><sup>γ</sup>), 20.34 (CH<sub>3</sub>-Ac).

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-*N*-methyl-L-threonin (19)**

(Fmoc-N-Me-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH)



Zunächst wurde Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Oxazolidinon (18) (80.1 mg, 117  $\mu$ mol) in 0.60 mL Chloroform gelöst. Danach wurden Trifluoressigsäure (1.00 mL, 13.0 mmol) und Triethylsilan (0.50 mL, 3.13 mmol) zugespritzt und das Gemisch 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden zur Umsatzsteigerung erneut 0.50 mL (3.13 mmol) Triethylsilan zugespritzt und weitere 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Chloroform (3  $\times$  2 mL) kdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1  $\rightarrow$  <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2  $\rightarrow$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 95:4:1).

Ausbeute: 70.8 mg (103  $\mu$ mol, 88 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> [M = 684.70 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.15 (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 707.2629 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 707.2416), 1391.5815 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1391.4935).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -88.2° (c = 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.81 - 7.72 (m, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.66 - 7.50 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.44 - 7.36 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.36 - 7.29 (m, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 6.42 - 6.26/6.20 - 6.07\* (2  $\times$  m, 1 H, NH<sub>Gal</sub>), 5.43 - 5.34 (m, 1 H, H-4), 5.22 - 5.12 (m, 1 H, H-3), 5.10 - 5.01 (m, 1 H, H-1), 4.59 - 4.38 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, Thr<sup>β</sup>, H-2), 4.33 -

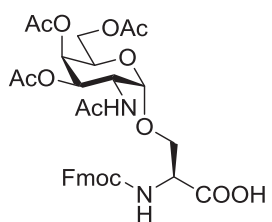
4.19 (m, 3 H, CH-Fmoc, Thr<sup>α</sup>, H-5), 4.17 - 4.01 (m, 2 H, H-6ab), 3.13/3.00\* (2 × s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3 H, OAc), 2.05 (s, 6 H, OAc, NHAc), 1.99 (s, 3 H, OAc), 1.28/1.09\* (2 × d, <sup>3</sup>J<sub>Tγ,Tβ</sub>=5.87 Hz, <sup>3</sup>J\*<sub>Tγ,Tβ</sub>=4.89 Hz, 3H, Thr<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 172.58 (COOH), 171.17, 171.02/170.98\*, 170.35/170.31\*, 170.22/170.16\* (C=O<sub>Ac</sub>), 157.25/156.63\* (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.81\*/143.60 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.27/141.18\* (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 127.68 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 127.01 (C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 124.92/124.67\* (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 119.95 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 99.82/99.67\* (C-1), 68.23, 68.01, 67.91/67.63\*, 67.16, 67.12 (C-3, C-4, C-5, CH<sub>2</sub>-Fmoc, C-Thr<sup>β</sup>), 63.19 (C-Thr<sup>α</sup>) 62.02/61.96\* (C-6), 48.46\*/48.27 (C-2), 47.12 (CH-Fmoc), 34.09/32.59\* (N-CH<sub>3</sub>), 22.68, 20.71, 20.66, 20.60 (CH<sub>3</sub>-Ac), 18.28/18.09\* (C-Thr<sup>γ</sup>).

\*Signale des Nebenrotamers

### ***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serin (21)<sup>[22]</sup>**

(Fmoc-Ser-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH)



Es wurden 82.0 mg (115  $\mu$ mol) Fmoc-Ser-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-O<sup>t</sup>Bu (**20**)<sup>[112]</sup> in 4.00 mL Dichlormethan gelöst und mit 1.00 mL (13.0 mmol) Trifluoressigsäure und 0.10 mL dest. Wasser versetzt. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 4 mL Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Toluol (3 × 10 mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 95:4:1).

Ausbeute: 74.9 mg (114  $\mu$ mol, 99 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> [M = 656.64 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.10 (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 679.21 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 679.21), 695.20 ([M+K]<sup>+</sup>, ber. 695.18).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +108.5° (c = 0.1, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +76.0° (c = 3.69, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[245]</sup>

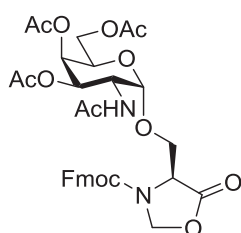
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=7.34 Hz, 2 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 7.63 - 7.56 (m, 1 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 7.55 - 7.48 (m, 1 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 7.43 - 7.35 (m, 2 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 7.34 - 7.30 (m, 2 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>), 6.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,S $\alpha$</sub> =9.17 Hz, 1 H, NH<sub>Fmoc</sub>), 6.37 (d,

$^3J_{\text{NH,H2}}=8.44$  Hz, 1 H,  $\text{NH}_{\text{Gal}}$ ), 5.37 (d,  $^3J_{\text{H4,H5}}=1.83$  Hz, 1 H, H-4), 5.24 - 5.19 (m, 1 H, H-3), 5.03 - 4.95 (m, 1 H, H-1), 4.56 - 4.39 (m, 4 H, H-2,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ,  $\text{Ser}^{\alpha}$ ), 4.27 - 3.94 (m, 6 H, H-5, H-6ab,  $\text{CH-Fmoc}$ ,  $\text{Ser}^{\beta}$ ), 2.15 (s, 3 H, OAc), 2.08 (s, 3 H, OAc), 1.99, 197 ( $2 \times$  s, 6 H, OAc, NHAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[245]</sup>

**(4S)-4-[O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (22)**

(Fmoc-Ser-( $\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$ )-Oxazolidinon)



Synthese ausgehend von Fmoc-Ser-( $\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$ )-OH (21)

Fmoc-Ser-( $\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$ )-OH (21) (60.0 mg, 91.4  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 2.0 mL Acetonitril gelöst. Paraformaldehyd (100 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (8.00 mg, 46.4  $\mu\text{mol}$ ) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde die Reaktionslösung über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1  $\rightarrow$   $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2).

Ausbeute: 50.1 mg (74.9  $\mu\text{mol}$ , 82 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

Synthese ausgehend von Fmoc-Ser-( $\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$ )-O<sup>t</sup>Bu (20)

Fmoc-Ser-( $\alpha\text{Ac}_3\text{GalNAc}$ )-O<sup>t</sup>Bu (20) (21.5 mg, 30.7  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 1.50 mL Acetonitril gelöst. Paraformaldehyd (100 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (8.1 mg, 47.0  $\mu\text{mol}$ ) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 6 d zwischen Raumtemperatur und 60 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Bei annähernd vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, eingeeengt und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1  $\rightarrow$   $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2).

Ausbeute: 14.3 mg (21.4  $\mu\text{mol}$ , 70 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{13}$  [ $M = 668.65$  g/mol]

$R_f = 0.30$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 691.2183 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 691.2104), 1359.5011 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber. 1359.4311)

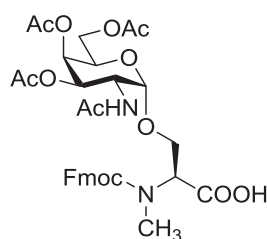
$[\alpha]_D^{23} = +98.0^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H5,H6</sub>=7.34 Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H8,H7</sub>=6.85 Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2,H4</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H6,H5,H7</sub>=7.34 Hz, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1,H3</sub>=<sup>3</sup>J<sub>H7,H6,H8</sub>=7.34 Hz, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.53 - 5.41 (m, 1 H, NH<sub>Gal</sub>), 5.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H5</sub>=2.93 Hz, 1 H, H-4), 5.20 - 5.15 (m, 1 H, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.99 (d, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=9.78 Hz, 1 H, H-3), 4.90 - 4.30 (m, 5 H, H-1, H-2, CH<sub>2</sub>-Fmoc, H-4<sub>Oxa</sub>), 4.30 - 4.20 (m, 3 H, CH-Fmoc, CH<sub>2</sub><sup>β</sup>), 4.15 - 3.93 (m, 3 H, H-5, H-6ab), 2.16 (s, 3 H, OAc), 2.01, 1.99 (2 × s, 6 H, OAc, NHAc), 1.96 (s, 3 H, OAc).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 170.96, 170.34, 170.18 (C=O<sub>Oxa</sub>, C=O<sub>Ac</sub>), 152.26 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 141.36, 128.07, 127.76, 127.27, 127.08, 124.46, 120.14 (C<sub>Ar-Fmoc</sub>), 98.58 (C-1), 78.34 (C<sub>2-Oxa</sub>), 67.85 (C-3, C-4, C-5, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2</sub><sup>β</sup>), 62.05 (C-6), 55.39 (C<sub>4-Oxa</sub>), 47.52 (C-2), 46.99 (CH-Fmoc), 23.13, 20.73, 20.69, 20.58 (CH<sub>3</sub>-Ac).

***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-*N*-methyl-L-serin (**23**)**

(Fmoc-N-Me-Ser-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH)



Zunächst wurde Fmoc-Ser-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Oxazolidinon (**22**) (50.1 mg, 74.9  $\mu$ mol) in 1.00 mL Chloroform gelöst. Danach wurden Trifluoressigsäure (1.00 mL, 13.0 mmol) und Triethylsilan (100  $\mu$ L, 626  $\mu$ mol) zugespritzt. Das Gemisch wurde anschließend 3 d zwischen Raumtemperatur und 40 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Chloroform (3 × 2 mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 95:4:1).

Ausbeute: 50.3 mg (75.0  $\mu$ mol, 99 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs

C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> [M = 670.67 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.12 (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 693.2247 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 693.2260), 1363.4928 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1363.4623)

$[\alpha]_D^{23} = -45.5^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

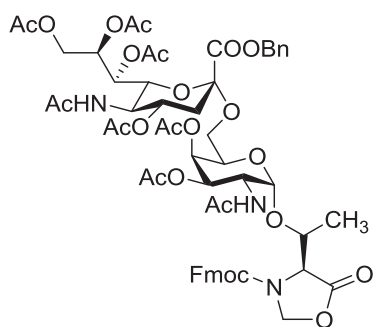
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.77 (d,  $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.34$  Hz, 2 H, H-4,5 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.65 - 7.53 (m, 2 H, H-1,8 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.44 - 7.36 (m, 2 H, H-3,6 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.31 (t,  $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_1,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_7,\text{H}_6,\text{H}_8} = 7.34$  Hz, 2 H, H-2,7 $_{\text{Fmoc}}$ ), 6.22/5.91\* ( $2 \times$  d,  $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.29$  Hz/ $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.80$  Hz\*, 1 H,  $\text{NH}_{\text{Gal}}$ ), 5.39 - 5.36 (m, 1 H, H-4), 5.11 (dd,  $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.25$  Hz,  $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 2.93$  Hz, 1 H, H-3), 5.00/4.98\* ( $2 \times$  d,  $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.42$  Hz/ $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.91$  Hz\*, 1 H, H-1), 4.89 (t,  $^3J_{\text{S}\alpha,\text{S}\beta} = 4.65$  Hz, 1 H,  $\text{Ser}^\alpha$ ), 4.63 - 4.36 (m, 3 H, H-2,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4.32 - 4.19 (m, 2 H,  $\text{CH-Fmoc}$ ,  $\text{Ser}^\beta$ ), 4.18 - 3.87 (m, 4 H, H-5, H-6ab,  $\text{Ser}^\beta$ ), 3.03/2.93\* ( $2 \times$  s, 3 H,  $\text{N-CH}_3$ ), 2.16 (s, 3 H,  $\text{OAc}$ ), 2.04 (s, 3 H,  $\text{OAc}$ ), 1.99, 1.96 ( $2 \times$  s, 6 H,  $\text{OAc}$ ,  $\text{NHAc}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 171.63, 171.27, 171.08, 170.53, 170.29 ( $\text{COOH}$ ,  $\text{C=O}_{\text{Ac}}$ ), 156.89 ( $\text{C=O}_{\text{Fmoc}}$ ), 143.69\*/143.62 ( $\text{C}_{1\text{a},8\text{a}}\text{-Fmoc}$ ), 141.28/141.26\* ( $\text{C}_{4\text{a},5\text{a}}\text{-Fmoc}$ ), 127.76 ( $\text{C}_{3,6}\text{-Fmoc}$ ), 127.05 ( $\text{C}_{2,7}\text{-Fmoc}$ ), 124.89/124.73\* ( $\text{C}_{1,8}\text{-Fmoc}$ ), 120.01 ( $\text{C}_{4,5}\text{-Fmoc}$ ), 98.58 (C-1), 68.20, 67.92, 67.16, 66.79, 66.26 (C-3, C-4, C-5,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ , C- $\text{Ser}^\beta$ ), 61.86 (C-6), 59.30/58.55\* (C- $\text{Ser}^\alpha$ ), 48.00 (C-2), 47.04 ( $\text{CH-Fmoc}$ ), 32.66/32.02\* ( $\text{N-CH}_3$ ), 22.78, 20.73, 20.69, 20.64 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ).

\*Signale des Nebenrotamers

**(4S)-4-[O-{2-Acetamido-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxyglycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}]-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (25)**

(Fmoc-Thr-( $\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn}$ -(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha\text{GalNAc}$ )-Oxazolidinon)



$\text{Fmoc-Thr-(}\alpha\text{Ac}_4\text{NeuNAcCOOBn-(2}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{GalNAc)-OH (24)}^{[22,113]}$  (50.0 mg, 42.4  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 2.00 mL Acetonitril gelöst. Paraformaldehyd (100 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (16.0 mg, 69.6  $\mu\text{mol}$ ) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 6 d zwischen Raumtemperatur und 40 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde die Reaktionslösung über

Hyflo<sup>®</sup> filtriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{EtOAc} \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ , 95:4:1).

Ausbeute: 26.3 mg (22.1  $\mu\text{mol}$ , 52 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{58}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_{24}$  [ $M = 1190.18$  g/mol]

$R_f = 0.20$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 1228.41 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 1228.37)

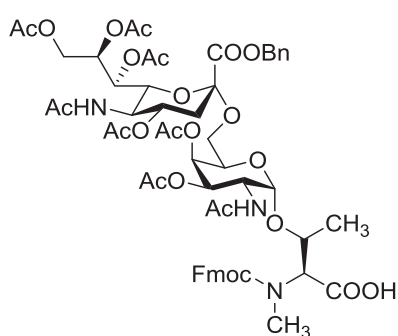
$[\alpha]_D^{23} = +56.6^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.79 (d,  $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.34$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.55 (d,  $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = ^3J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.34$  Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.46 - 7.40 (m, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.40 - 7.30 (m, 7 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>, H<sub>Ar-Ph</sub>), 5.54 (d,  $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.29$  Hz, 1 H, NH<sub>Gal</sub>), 5.38 - 5.29 (m, 2 H, H-7', H-8'), 5.27 - 5.07 (m, 3 H, H-4, CH<sub>2</sub>-Bn), 5.07 - 5.00 (m, 3 H, H-3, H-2<sub>Oxa</sub>), 4.95 - 4.69 (m, 4 H, H-1, H-4', CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.54 - 4.40 (m, 1 H, H-4<sub>Oxa</sub>), 4.29 - 4.21 (m, 4 H, H-2, H-6', H-9'a, CH <sup>$\beta$</sup> ), 4.11 - 4.00 (m, 4 H, CH-Fmoc, H-5', H-5, H-9'b), 3.86 - 3.73 (m, 1 H, H-6a), 3.17 - 3.07 (m, 1 H, H-6b), 2.57 (dd,  $^2J_{\text{H}_3'\text{äq},\text{H}_3'\text{ax}} = 12.47$  Hz,  $^3J_{\text{H}_3'\text{äq},\text{H}_4'} = 3.67$  Hz, 1 H, H-3'äq), 2.12, 2.10, 2.03, 1.99, 1.96, 1.88 (6  $\times$  s, 25 H, 8  $\times$  CH<sub>3</sub> (OAc, NHAc), {1.88 (H-3'ax)}), 1.28 - 1.19 (m, 3 H, CH<sub>3</sub> <sup>$\gamma$</sup> ).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.76, 170.51, 170.47, 170.15, 170.09 (C=O<sub>Ac</sub>, C=O<sub>Oxa</sub>), 167.29 (C-1'), 156.36 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 141.43, 134.70, 128.83, 128.67, 128.08, 127.34, 120.19 (C<sub>Ar-Ph</sub>, C<sub>Ar-Fmoc</sub>), 98.45 (C-1), 96.38 (C-2'), 77.85 (C<sub>2</sub>-Oxa), 72.57, 68.91, 68.11, 67.88, 67.50, 67.08 (C-3, C-4, C-5, C-4', C-6', C-7', C-8', CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Bn, CH <sup>$\beta$</sup> ), 62.33 (C6, C-9'), 60.64 (C<sub>4</sub>-Oxa), 49.17 (C-5'), 47.68 (C-2), 47.23 (CH-Fmoc), 34.80 (C-3'), 23.21, 23.12, 21.02, 20.83, 20.64 (CH<sub>3</sub>-Ac), 19.36 (CH<sub>3</sub> <sup>$\gamma$</sup> ).

***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl}]-*N*-methyl-*L*-threonin (26)**

(Fmoc-*N*-Me-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc)-OH)



Zunächst wurde Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc)-Oxazolidinon (**25**) (26.3 mg, 22.1  $\mu\text{mol}$ ) in 0.50 mL Chloroform gelöst. Danach wurden Trifluoressigsäure (0.50 mL, 6.49 mmol) und Triethylsilan (50  $\mu\text{L}$ , 313  $\mu\text{mol}$ ) zugespritzt. Das Gemisch wurde anschließend 3 d zwischen Raumtemperatur und 40  $^\circ\text{C}$  gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde das

Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Chloroform (3  $\times$  2 mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1  $\rightarrow$   $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2  $\rightarrow$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ , 95:4:1).

Ausbeute: 25.0 mg (21.0  $\mu\text{mol}$ , 95 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs

$\text{C}_{58}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_{24}$  [ $M = 1192.19$  g/mol]

$R_f = 0.11$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1214.4371 ( $[M+Na]^+$ , ber. 1214.4148)

$[\alpha]_D^{23} = -43.4^\circ$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ )

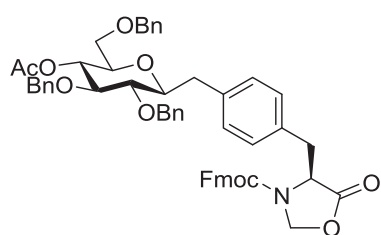
$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.81 - 7.72 (m, 2 H,  $H_{Ar-Fmoc}$ ), 7.63 (t,  $^3J_{p,o}=6.11$  Hz, 1 H,  $H_{Ar-Fmoc}$ ), 7.59 - 7.51 (m, 1 H,  $H_{Ar-Fmoc}$ ), 7.45 - 7.28 (m, 9 H,  $H_{Ar-Fmoc}$ ,  $H_{Ar-Ph}$ ), 6.16 - 6.01\*/5.87 (m\*/d,  $^3J_{NH,H2}=8.80$  Hz, 1H,  $NH_{Gal}$ ), 5.37 - 5.21 (m, 3 H, H-7', H-8',  $CH_2-Bn$ ), 5.20 - 5.08 (m, 2 H, H-4,  $CH_2-Bn$ ), 4.94 (dd,  $^3J_{H3,H2}=11.25$  Hz,  $^3J_{H3,H4}=2.93$  Hz, 1 H, H-3), 4.90 - 4.77 (m, 2 H, H-1, H-4'), 4.59 - 4.37 (m, 4 H,  $CH_2-Fmoc$ , H-2,  $Thr^\beta$ ), 4.32 - 4.21 (m, 3 H,  $CH-Fmoc$ , H-6', H-9'a), 4.14 - 3.92 (m, 4 H, H-5', H-5, H-9'b,  $Thr^\alpha$ ), 3.89 - 3.76 (m, 1 H, H-6a), 3.19 - 2.96 (m, 4 H {3.13/3.00\* (2  $\times$  s, 3 H, N- $CH_3$ )}, {3.19 - 3.07 (m, 1 H, H-6b)}), 2.56 (dd,  $^2J_{H3'_{\text{aq}},H3'_{\text{ax}}}=12.47$ ,  $^3J_{H3'_{\text{aq}},H4'_{\text{ax}}}=4.16$  Hz, 1 H, H-3'\_{\text{aq}}), 2.12, 2.10, 2.05, 2.04, 2.02, 2.00, (6  $\times$  s, 21 H, 7  $\times$   $CH_3$  (OAc, NHAc)), 1.90 - 1.85 (m, 4 H, OAc, H-3'\_{\text{ax}}), 1.32 - 1.21/1.09\* (m/d\*,  $^3J_{T\gamma,T\beta}=6.36$  Hz\*, 3 H,  $Thr^\gamma$ ).

$^{13}C$ -NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 172.38 (COOH), 171.21, 171.12, 170.83, 170.56, 170.34, 170.10, 169.55 (C=O<sub>Ac</sub>), 167.34 (C-1'), 157.30 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.92\*/143.73 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.28 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 134.70 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 128.97, 128.81, 128.67 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 127.72 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 127.06 (C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 124.98/124.75\* (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.20\*/119.98 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 99.76 (C-1), 98.51 (C-2'), 72.57, 68.88, 68.45, 68.32, 68.08, 68.01, 67.85, 67.65, 67.46, 67.09 (C-3, C-4, C-5, C-4', C-6', C-7', C-8',  $CH_2-Fmoc$ ,  $CH_2-Bn$ ,  $Thr^\beta$ ), 63.87 (C-6), 63.14, 62.34 (C-9',  $Thr^\alpha$ ), 49.16 (C-5'), 48.28 (C-2), 47.19 ( $CH-Fmoc$ ), 37.59 (C-3'), 33.83/32.46\* (N- $CH_3$ ), 23.13, 22.83, 20.99, 20.80, 20.70, 20.61 ( $CH_3$ -Ac), 18.27/18.09\* (C-  $Thr^\gamma$ ).

\*Signale des Nebenrotamers

**(4S)-4-[C-[4-O-Acetyl-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-1,3-oxazolidin-5-on (28)**

(Fmoc-C-Tyr- $[\beta$ -AcBn<sub>3</sub>Glc]-Oxazolidinon)



Fmoc-C-Tyr- $[\beta$ -AcBn<sub>3</sub>Glc]-OH (**27**)<sup>[39,40]</sup> (8.6 mg, 9.83  $\mu$ mol) wurde in 1.0 mL Acetonitril gelöst. Paraformaldehyd (50 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (3.20 mg, 18.6  $\mu$ mol) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 4 d zwischen Raumtemperatur und 40 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde die Reaktionslösung über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1  $\rightarrow$   $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1  $\rightarrow$   $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2  $\rightarrow$  EtOAc).

Ausbeute: 7.90 mg (8.90  $\mu\text{mol}$ , 91 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{55}\text{H}_{53}\text{NO}_{10}$  [ $M = 888.03$  g/mol]

$R_f = 0.67$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 910.38 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 910.35)

$[\alpha]_D^{23} = +56.1^{\circ}$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

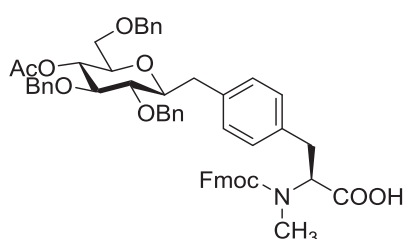
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H}-^1\text{H-COSY}$ ] (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.78 - 7.76 (m, 2 H, H-4,5 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.57 - 7.43 (m, 2 H, H-1,8 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.45 - 7.18 (m, 20 H, H-2,3,6,7 $_{\text{Fmoc}}$ , H $_{\text{Ar-Ph}}$ , H $_{\text{Ar-Tyr}}$ ), 7.15 - 6.94 (m, 2 H, H $_{\text{Ar-Tyr}}$ ), 6.71 - 6.53\* (m, 1 H, H $_{\text{Ar-Tyr}}$ ), 5.21 - 5.07 (m, 1 H, H-2 $_{\text{Oxa}}$ ), 4.99 (t,  $^3J_{\text{H4,H3,H5}}=9.29$  Hz, 1 H, H-4), 4.95 - 4.88 (m, 1 H, CH $_2$ -Bn), 4.85 - 4.78 (m, 1 H, CH $_2$ -Bn), 4.77 - 4.58 (m, 3 H, CH $_2$ -Bn, CH $_2$ -Fmoc), 4.57 - 4.31 (m, 3 H, CH $_2$ -Bn), 4.30 - 4.20 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.08 - 3.93 (m, 1 H, H-4 $_{\text{Oxa}}$ ), 3.68 (t,  $^3J_{\text{H3,H2,H4}}=9.05$  Hz, 1 H, H-3), 3.55 - 3.28 (m, 5 H, H-1, H-2, H-5, H-6ab), 3.20 - 3.02 (m, 1 H, CH $_2$ -exo), 2.83 - 2.70 (d,  $^2J_{\text{CH2,CH2}}=12.72$  Hz, 1 H, CH $_2^{\beta}$ ), 2.70 - 2.56 (m, 1 H, CH $_2$ -exo), 2.49 - 2.31 (m, 1 H, CH $_2^{\beta}$ ), 1.85 (s, 3 H, OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 169.86 (C=O $_{\text{Ac}}$ , C=O $_{\text{Oxa}}$ ), 143.38 (C $_{1a,8a}$ -Fmoc), 141.44 (C $_{4a,5a}$ -Fmoc), 138.17, 137.98, 137.92, 137.83 (C $_{\text{ipso-Ph}}$ , C $_{\text{ipso-Tyr}}$ ), 129.85, 129.31 (C $_{o,m}$ -Tyr), 128.54, 128.46, 128.27, 127.97, 127.76, 127.73, 127.56, 127.24 (C $_{2,3,6,7}$ -Fmoc, C $_{o,m,p}$ -Ph, C $_{o,m}$ -Tyr), 124.40 (C $_{1,8}$ -Fmoc), 120.13 (C $_{4,5}$ -Fmoc), 84.75 (C-3), 81.49 (C-2), 79.88 (C-1), 77.42 (C-5), 75.28, 75.21, 73.47 (CH $_2$ -Bn, C $_2$ -Oxa), 71.57 (C-4), 69.76 (C-6), 66.68 (CH $_2$ -Fmoc), 56.32 (C $_4$ -Oxa), 47.23 (CH-Fmoc), 37.31 (CH $_2$ -exo), 35.10 (CH $_2^{\beta}$ ), 20.89 (CH $_3$ -Ac).

\*Signale des Nebenrotamers

### ***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*C*-[4-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl]]-*N*-methyl-*L*-tyrosin (**29**)**

(Fmoc-N-Me-C-Tyr-[ $\beta$ -AcBn $_3$ Glc]-OH)



#### Standardmethode mit Trifluoressigsäure

Zunächst wurde Fmoc-C-Tyr-[ $\beta$ -AcBn $_3$ Glc]-Oxazolidinon (**28**) (7.90 mg, 8.90  $\mu\text{mol}$ ) in 0.50 mL Chloroform gelöst.

Danach wurden Trifluoressigsäure (0.50 mL, 6.49 mmol) und Triethylsilan (50  $\mu$ L, 313  $\mu$ mol) zugespritzt. Das Gemisch wurde anschließend 3 d zwischen Raumtemperatur und 40 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Chloroform (3  $\times$  2 mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^c$ Hex/EtOAc 2:1  $\rightarrow$   $^c$ Hex/EtOAc 1:1  $\rightarrow$   $^c$ Hex/EtOAc 1:2  $\rightarrow$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 95:4:1).

Ausbeute: 5.10 mg (5.73  $\mu$ mol, 64 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs

#### Alternativmethode mit AlCl<sub>3</sub>

Fmoc-C-Tyr-[ $\beta$ -AcBn<sub>3</sub>Glc]-Oxazolidinon (15.2 mg, 17.1  $\mu$ mol) und Aluminiumchlorid (5.2 mg, 38.9  $\mu$ mol) wurden mit 1.00 mL Chloroform versetzt. Danach wurde Triethylsilan (50  $\mu$ L, 313  $\mu$ mol) zugespritzt. Das Gemisch wurde anschließend 3 d zwischen Raumtemperatur und 50 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde die Reaktionslösung über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^c$ Hex/EtOAc 2:1  $\rightarrow$   $^c$ Hex/EtOAc 1:1  $\rightarrow$   $^c$ Hex/EtOAc 1:2  $\rightarrow$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH, 95:4:1).

Ausbeute: 10.8 mg (12.1  $\mu$ mol, 71 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs

C<sub>55</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>10</sub> [M = 890.04 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.11 (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 912.37 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 912.37)

$[\alpha]_D^{23} = -42.4^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.74 - 7.71 (m, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.58 - 7.43 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.43 - 7.17 (m, 21 H, H<sub>Ar-Fmoc</sub>, H<sub>Ar-Ph</sub>, H<sub>Ar-Tyr</sub>), 7.16 - 7.09 (m, 1 H, H<sub>Ar-Tyr</sub>), 6.85 (d, <sup>3</sup>J=7.83 Hz, 1 H, H<sub>Ar-Tyr</sub>), 5.03 - 4.93 (m, 1 H, H-4), 4.89 - 4.84 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.83 - 4.78 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.71 - 4.60 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>-Bn, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.59 - 4.45 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.46 - 4.33 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.30 - 4.23 (m, 1 H, Tyr <sup>$\alpha$</sup> ), 4.21 - 4.09 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.72 - 3.54 (m, 1 H, H-3), 3.53 - 3.32 (m, 4 H, H-1, H-2, H-6ab), 3.27 - 3.20 (m, 1 H, H-5), 3.15 - 3.00 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>-exo, Tyr <sup>$\beta$</sup> ), 2.82/2.76\* (2  $\times$  s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 2.72 - 2.56 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>-exo), 1.84 (s, 3 H, OAc).

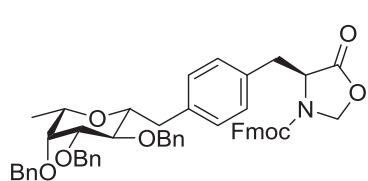
<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 175.26 (COOH), 169.89 (C=O<sub>Ac</sub>), 156.77 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.92\*/143.60 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.24 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 138.18, 138.01,

137.96, 137.22, ( $C_{\text{ipso-Ph}}$ ,  $C_{\text{ipso-Tyr}}$ ), 134.57 ( $C_{\text{ipso-Tyr}}$ ), 129.82, 129.76, 128.51, 128.48, 128.43, 128.23, 127.91\*, 127.78\*, 127.73, 127.65, 127.52, 127.05 ( $C_{2,3,6,7\text{-Fmoc}}$ ,  $C_{\text{o,m,p-Ph}}$ ,  $C_{\text{o,m-Tyr}}$ ), 125.14, 125.01/124.69\* ( $C_{1,8\text{-Fmoc}}$ ), 119.92 ( $C_{4,5\text{-Fmoc}}$ ), 84.75\*/84.65 (C-3), 81.44 (C-2), 79.96 (C-1), 77.20 (C-5), 75.25, 75.19, 75.09, 73.43 ( $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 71.39 (C-4), 69.57 (C-6), 67.81 ( $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 60.64/60.35\* ( $\text{Tyr}^{\alpha}$ ), 47.20\*/47.00 ( $\text{CH-Fmoc}$ ), 37.24 ( $\text{CH}_2\text{-exo}$ ), 34.27 (C-Tyr $^{\beta}$ ), 32.25 (N- $\text{CH}_3$ ), 20.87 ( $\text{CH}_3\text{-Ac}$ ).

\*Signale des Nebenrotamers

**(4S)-4-[C-(2,3,4-tri-O-Benzyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl)-L-tyrosin]-3-(9H-Fluoren-9-ylmethyl)-1,3-oxazolidin-5-on (31)**

(Fmoc-C-Tyr-[ $\beta$ -Bn $_3$ Fuc]-Oxazolidinon)



Fmoc-C-Tyr-[ $\beta$ -Bn $_3$ Fuc]-OH (**30**)<sup>[39,40]</sup> (10.0 mg, 12.3  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 1.00 mL Acetonitril gelöst. Paraformaldehyd (50.0 mg) und *p*-Toluolsulfonsäure (2.00 mg, 11.6  $\mu\text{mol}$ ) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 6 d zwischen Raumtemperatur und 40 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde die Reaktionslösung über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1  $\rightarrow$   $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1  $\rightarrow$   $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2  $\rightarrow$  EtOAc).

Ausbeute: 8.70 mg (10.5  $\mu\text{mol}$ , 85 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{53}\text{H}_{51}\text{NO}_8$  [ $M = 829.99$  g/mol]

$R_f = 0.66$  ( $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 868.35 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 868.32).

$[\alpha]_D^{23} = +48.1^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

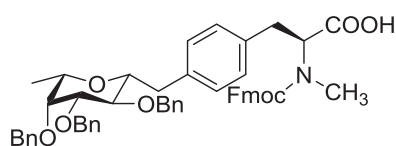
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.78 (d,  $^3J_{\text{H4,H3}} = ^3J_{\text{H5,H6}} = 7.34$  Hz, 2 H, H-4,5 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.70 - 7.48 (m, 2 H, H-1,8 $_{\text{Fmoc}}$ ), 7.46 - 7.30 (m, 19 H, H-2,3,6,7 $_{\text{Fmoc}}$ ,  $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$ ,  $\text{H}_{\text{Ar-Tyr}}$ ), 7.23 - 6.97 (m, 3 H,  $\text{H}_{\text{Ar-Tyr}}$ ), 6.67 - 6.53 (m, 1 H,  $\text{H}_{\text{Ar-Tyr}}$ ), 5.08 - 4.88 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ , H-2 $_{\text{Oxa}}$ ), 4.83 - 4.66 (m, 5 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4.63 - 4.41 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4.27 (t,  $^3J_{\text{CH,CH}_2\text{-Fmoc}} = 4.89$  Hz, 1 H,  $\text{CH-Fmoc}$ ), 4.20 - 3.95 (m, 1 H, H-4 $_{\text{Oxa}}$ ), 3.82 - 3.58 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4), 3.46 - 3.25 (m, 2 H, H-1, H-5), 3.22 - 3.02 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-exo}$ ), 2.83 - 2.62 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-exo}$ ,  $\text{CH}_2^{\beta}$ ), 2.50 - 2.30 (m, 1 H,  $\text{CH}_2^{\beta}$ ), 1.11 (d,  $^3J_{\text{H6abc,H5}} = 6.36$  Hz, 3 H, H-6abc).

$^{13}\text{C}$ -NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 171.97\*/171.69 (C=O<sub>Oxa</sub>), 156.12/155.39\* (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.94/143.79\*, 143.34 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.37\*/141.27 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 138.81, 138.57, 138.41, 138.33, 138.25\* (C<sub>ipso</sub>-Ph, C<sub>ipso</sub>-Tyr), 134.63 (C<sub>ipso</sub>-Tyr), 129.79, 129.03, 128.83, 128.42, 128.38, 128.14, 128.01, 127.91, 127.69, 127.63, 127.57, 127.53, 127.43, 127.38, 127.18, 127.05, 127.01 (C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc, C<sub>o,m,p</sub>-Ph, C<sub>o,m</sub>-Tyr), 125.0/124.86\*, 124.41/124.27\* (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 120.26\*/120.16, 120.07/119.94\* (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 85.33 (C-3), 80.54 (C-1), 78.59\*/78.52 (C-2), 76.26 (C-4), 75.34, 74.44 (CH<sub>2</sub>-Bn, C<sub>2</sub>-Oxa), 74.01 (C-5), 72.35 (CH<sub>2</sub>-Bn), 67.89/67.69\*, 66.52 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 56.32 (C<sub>4</sub>-Oxa), 47.20\*/47.16 (CH-Fmoc), 37.54\*/37.34 (CH<sub>2</sub>-exo), 35.07 (CH<sub>2</sub><sup>β</sup>), 17.17 (C-6).

\*Signale des Nebenrotamers

***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*C*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl]]-*N*-methyl-L-tyrosin (32)**

(Fmoc-N-Me-C-Tyr-[ $\beta$ -Bn<sub>3</sub>Fuc]-OH)



Standardmethode mit Trifluoressigsäure

Zunächst wurde Fmoc-C-Tyr-[ $\beta$ -Bn<sub>3</sub>Fuc]-Oxazolidinon (**31**) (7.00 mg, 8.43  $\mu\text{mol}$ ) in 0.50 mL Chloroform gelöst. Danach wurden Trifluoressigsäure (0.50 mL, 6.49 mmol) und Triethylsilan (50  $\mu\text{L}$ , 313  $\mu\text{mol}$ ) zugespritzt. Das Gemisch wurde anschließend 3 d zwischen Raumtemperatur und 40 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mit Chloroform (3  $\times$  2 mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1  $\rightarrow$   $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1  $\rightarrow$   $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2).

Ausbeute: 4.1 mg (4.93  $\mu\text{mol}$ , 59 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs

Alternativmethode mit  $\text{AlCl}_3$

Fmoc-C-Tyr-[ $\beta$ -AcBn<sub>3</sub>Glc]-Oxazolidinon (7.00 mg, 8.43  $\mu\text{mol}$ ) und Aluminiumchlorid (6.5 mg, 48.7  $\mu\text{mol}$ ) wurden mit 1.00 mL Chloroform versetzt. Danach wurde Triethylsilan (0.05 mL, 0.31 mmol) zugespritzt. Das Gemisch wurde anschließend 3 d zwischen Raumtemperatur und 50 °C gerührt. Dabei wurde der Umsatz stets mittels DC kontrolliert. Danach wurde die Reaktionslösung über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1  $\rightarrow$   $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1  $\rightarrow$   $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:2).

Ausbeute: 3.8 mg (4.57  $\mu\text{mol}$ , 54 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs

$\text{C}_{53}\text{H}_{53}\text{NO}_8$  [ $M = 832.01 \text{ g/mol}$ ]

$R_f = 0.10$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 854.36 ( $[M+\text{Na}]^+$ , ber. 845.37)

$[\alpha]_D^{23} = -30.2^\circ$  ( $c = 0.5$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

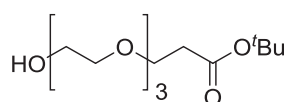
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.80 - 7.69 (m, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.59 - 7.43 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.43 - 7.24 (m, 18 H, H-2,3,6,7<sub>Fmoc</sub>, H<sub>Ar-Ph</sub>, H<sub>Ar-Tyr</sub>), 7.24 - 7.07 (m, 4 H, H<sub>Ar-Ph</sub>, H<sub>Ar-Tyr</sub>), 6.83 (d,  $^3J = 7.82 \text{ Hz}$ , 1 H, H<sub>Ar-Tyr</sub>), 5.04 - 4.96 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.92 - 4.62 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-Bn, Tyr <sup>$\alpha$</sup> ), 4.62 - 4.43 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.40 - 4.29 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.21 (t,  $^3J_{\text{CH,CH}_2\text{-Fmoc}} = 6.36 \text{ Hz}$ , 1 H, CH-Fmoc), 3.73 (t,  $^3J_{\text{H}_2, \text{H}_1, \text{H}_3} = 9.05 \text{ Hz}$ , 1 H, C-2), 3.68 - 3.54 (m, 2 H, C-3, C-4), 3.48 - 3.20 (m, 2 H, C-1, C-5), 3.18 - 3.04 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>-exo, Tyr <sup>$\beta$</sup> ), 2.83 - 2.58 (m, 4 H, {2.77/2.79\* ( $2 \times s$ , 3 H, N-CH<sub>3</sub>)}, CH<sub>2</sub>-exo), 1.07 (d,  $^3J_{\text{H}_{6\text{abc}}, \text{H}_5} = 6.36 \text{ Hz}$ , 3 H, H-6a,b,c).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 174.91 (COOH), 156.82 (C=O<sub>Fmoc</sub>), 143.83, 143.70 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.27 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 138.63, 138.47, 138.39 (C<sub>ipso</sub>-Ph, C<sub>ipso</sub>-Tyr), 134.26 (C<sub>ipso</sub>-Tyr), 129.79, 128.45, 128.42, 128.26, 128.16, 128.04, 127.97, 127.65, 127.56, 127.06 (C<sub>2,3,6,7</sub>-Fmoc, C<sub>o,m,p</sub>-Ph, C<sub>o,m</sub>-Tyr), 125.04, 124.70 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 119.92 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 85.38 (C-3), 80.60 (C-1), 78.62 (C-2), 76.32 (C-4), 75.34 (CH<sub>2</sub>-Bn), 74.44/74.01\* (C-5), 72.38 (CH<sub>2</sub>-Bn), 67.84 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 61.42/60.33\* (C-Tyr <sup>$\alpha$</sup> ), 47.20\*/47.10 (CH-Fmoc), 37.44 (CH<sub>2</sub>-exo), 34.28 (C-Tyr <sup>$\beta$</sup> ), 32.91 (N-CH<sub>3</sub>), 17.19 (C-6).

\*Signale des Nebenrotamers

### 5.3.3 Synthese des Triethylenglycol-Spacers

#### 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (48)<sup>[132]</sup>



Es wurden 12.3 mL (91.7 mmol) Triethylenglycol (**46**) in 60 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und unter Argon 19.9 mg (866 mmol) Natrium darin gelöst. Danach wurden 4.8 mL (33.1 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester (**47**) zugespritzt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 21 h gerührt. Anschließend wurde durch Zugabe von 3 mL 1 N Salzsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in 40 mL ges. Natriumchlorid-

Lösung aufgenommen und mit Ethylacetat ( $3 \times 50$  mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 mL Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 6.08 g (21.8 mmol, 66 %) eines gelben Öls.

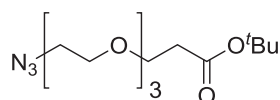
$C_{13}H_{26}O_6$  [ $M = 278.34$  g/mol]

$R_f = 0.50$  (EtOAc)

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 3.69 - 3.55 (m, 14 H,  $7 \times OCH_2$ ), 2.49 (t,  $^3J_{CH_2,CH_2}=6.0$  Hz, 2 H,  $CH_2-C=O$ ), 1.39 (s, 9 H,  $tBu$ ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[237]</sup>

### 12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (49)<sup>[132]</sup>



Es wurden 15.1 g (54.2 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (48) in 25 mL absol. Dichlormethan gelöst und 20.0 mL (145 mmol) Triethylamin zugegeben. Bei 0 °C wurden 9.00 mL (116 mmol) Methansulfonsäurechlorid zugetropft und unter langsamen Erwärmen auf Raumtemperatur 4 h gerührt. Das gebildete Triethylaminhydrochlorid wurde anschließend über Hyflo<sup>®</sup> abfiltriert und das Filtrat zweimal mit Eiswasser ( $2 \times 50$  mL) und ges. Natriumchloridlösung ( $1 \times 20$  mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 25 mL Dimethylformamid gelöst und mit 21.0 g (323 mmol) Natriumazid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 h bei 60 °C gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in 50 mL Wasser aufgenommen und mit Diethylether ( $4 \times 40$  mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Isolera, Gradienten 100 %  $^cHex \rightarrow 100$  % EtOAc).

Ausbeute: 10.0 g (33.0 mmol, 61 %) eines gelben Öls.

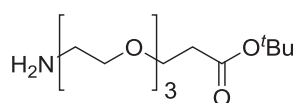
$C_{13}H_{25}N_3O_5$  [ $M = 303.36$  g/mol]

$R_f = 0.44$  ( $^cHex$ /EtOAc, 1:2)

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 3.76 - 3.59 (m, 12 H,  $6 \times OCH_2$ ), 3.44 - 3.36 (m, 2 H,  $N_3CH_2$ ), 2.51 (t,  $^3J_{CH_2,CH_2}=6.60$  Hz, 2 H,  $CH_2-C=O$ ), 1.45 (s, 9 H,  $tBu$ ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[237]</sup>

### 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (50)<sup>[132]</sup>



Ein Gemisch aus 7.44 g einer Aluminium-Nickel-Legierung in 220 mL dest. Wasser wurde solange mit festem Natriumhydroxid versetzt bis keine Gasentwicklung mehr auftrat. Die Katalysatormischung wurde zuerst 10 min bei Raumtemperatur und dann 30 min bei 70 °C gerührt. Durch Abdekantieren wurde das Raney-Nickel vom Lösungsmittel befreit, mit 200 mL Wasser neutral gewaschen und das Wasser anschließend durch mehrfaches Aufschlännen mit insg. 200 mL Isopropanol ausgespült. Im Anschluss wurde zum aktivierten Katalysator 10.0 g (33.0 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (49), gelöst in 50 mL Isopropanol, zugespritzt. Unter einer Wasserstoffatmosphäre wurde die Reaktion 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Raney-Nickel über Hyflo<sup>®</sup> abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Ohne weitere Reinigung wurde das erhaltene Rohprodukt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 5.00 g (18.0 mmol, 55 %) eines gelben Öls.

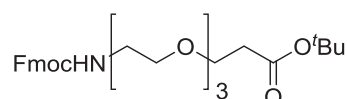
C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub> [M = 277.36 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.10 (PE/EtOAc, 1:2)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 3.76 - 3.45 (m, 12 H, 6 × OCH<sub>2</sub>), 2.85 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub> = 5.14 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>), 2.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub> = 6.42 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C=O), 1.43 (s, 9 H, <sup>t</sup>Bu).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[237]</sup>

### *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (51)<sup>[132]</sup>



In 100 mL einer 1 : 1 Aceton/Wasser-Mischung wurden 5.00 g (18.0 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (50) gelöst und mit 1.51 g (18.0 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter heftigem Rühren wurden 6.01 g (17.8 mmol) Fmoc-OSu portionsweise hinzugefügt und die Reaktionslösung anschließend 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 6 angesäuert, das Aceton unter vermindertem Druck entfernt und die verbliebene wässrige Phase mit Dichlormethan (4 × 75 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte

wurden anschließend mit je 175 mL 1 M Salzsäure-Lösung und Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 8.90 g (17.8 mmol, quant.) eines gelben, viskosen Öls.

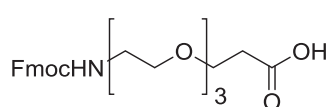
$C_{28}H_{37}NO_7$  [M = 499.60 g/mol]

$R_f = 0.84$  (PE/EtOAc, 10:1)

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.79 (d,  $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.34$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.63 (d,  $^3J_{H1,H2} = ^3J_{H8,H7} = 7.34$  Hz, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.42 (t,  $^3J_{H3,H2,H4} = ^3J_{H6,H5,H7} = 7.34$  Hz, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.34 (t,  $^3J_{H2,H1,H3} = ^3J_{H7,H6,H8} = 7.34$  Hz, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.32 (s, 1 H, NH), 4.43 (d,  $^3J_{CH_2,CH} = 6.97$  Hz, 2 H,  $CH_2$ -Fmoc), 4.30 - 4.20 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.78 - 3.54 (m, 12 H,  $6 \times OCH_2$ ), 3.38 - 3.47 (m, 2 H,  $NCH_2$ ), 2.51 (t,  $^3J_{CH_2,CH_2} = 6.42$  Hz, 2 H,  $CH_2$ -C=O), 1.46 (s, 9 H, 'Bu).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[237]</sup>

### ***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-decansäure (52)**<sup>[132]</sup>



Es wurden 8.90 g (17.8 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**51**) in einer Mischung aus 66.0 mL Trifluoressigsäure und 6 mL

Wasser 48 h gerührt. Anschließend wurde mit 50 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol ( $3 \times 30$  mL) und Dichlormethan ( $2 \times 30$  mL) kodestilliert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $CH_2Cl_2/MeOH/AcOH$  95:4:1).

Ausbeute: 7.80 g (17.6 mmol, 99 %) eines gelben, viskosen Öls.

$C_{24}H_{29}NO_7$  [M = 443.49 g/mol]

$R_f = 0.19$  (EtOAc)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 444.21 ( $[M+H]^+$ , ber. 444.20), 466.19 ( $[M+Na]^+$ , ber. 466.18), 482.16 ( $[M+K]^+$ , ber. 482.16)

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.77 (d,  $^3J_{H4,H3} = ^3J_{H5,H6} = 7.70$  Hz, 2 H, H-4,5<sub>Fmoc</sub>), 7.56 - 7.65 (m, 2 H, H-1,8<sub>Fmoc</sub>), 7.40 (t,  $^3J_{H3,H2,H4} = ^3J_{H6,H5,H7} = 7.34$  Hz, 2 H, H-3,6<sub>Fmoc</sub>), 7.32 (t,  $^3J_{H2,H1,H3} = ^3J_{H7,H6,H8} = 7.15$  Hz, 2 H, H-2,7<sub>Fmoc</sub>), 5.54 (br. s., 1 H, NH), 4.49 - 4.38 (m, 2 H,

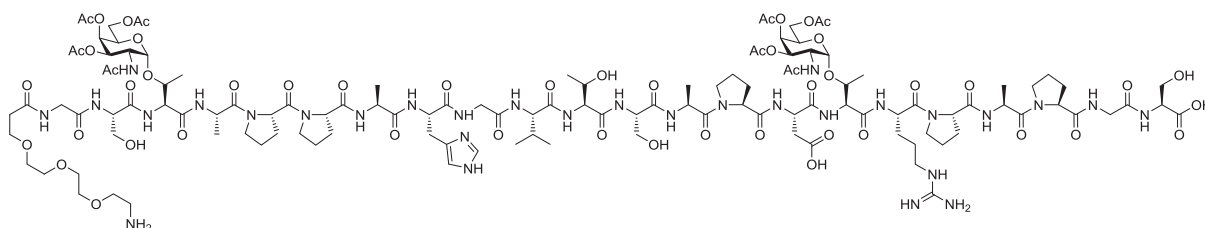
CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.23 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH,CH<sub>2</sub></sub>=6.79 Hz, 1 H, CH-Fmoc), 3.78 - 3.68 (m, 12 H, 6 × OCH<sub>2</sub>), 3.48 - 3.33 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>), 2.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub>=6.05 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-C=O).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 175.22 (COOH), 143.86 (C<sub>1a,8a</sub>-Fmoc), 141.24 (C<sub>4a,5a</sub>-Fmoc), 127.60 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 126.99 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 124.98 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 119.88 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 70.42, 70.32, 70.25, 70.09 (OCH<sub>2</sub>), 66.24 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 47.14 (CH-Fmoc), 34.71 (CH<sub>2</sub>-C=O).

### 5.3.4 Synthese der Glycopeptide

**12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (53)**

(H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Die Glycopeptidsynthese erfolgte am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll (siehe Kap. 5.1.3, Festphasensynthese) ausgehend von 588.2 mg (100  $\mu$ mol) eines mit Fmoc-Ser(Trt) vorbeladenen Tentagel-Harzes **38** (Beladung: 0.17 mmol/g). Nach der automatisierten Kupplung der Aminosäuren Gly, Pro, Ala, Pro und Arg (je 10 Äquiv.) wurde die Glycosylaminosäure manuell angeknüpft. Hierbei wurden 134.1 mg (200  $\mu$ mol, 2 Äquiv.) Fmoc-Thr-T<sub>N</sub>-OH **17** in 2 mL NMP gelöst und zusammen mit 91.2 mg (240  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HATU (**41**), 32.7 mg (240  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HOAt (**42**) und 55  $\mu$ L (500  $\mu$ mol) NMM in eine Kartusche überführt und 8 h im Synthesizer stark geschüttelt. Die Kupplung des nachfolgenden Aspartats (2  $\times$  10 Äquiv.) erfolgte über eine automatisierte Doppelkupplung. Danach wurde bis zur nächsten Glycosylaminosäure das Standardprotokoll mit je 10 Äquiv. der Fmoc-Aminosäuren wieder aufgenommen. Nach Anbindung des Alanins wurde erneut eine manuelle Kupplung eingeleitet, indem die Glycosylaminosäure **17** (134.1 mg, 200  $\mu$ mol, 2 Äquiv.), in 2 mL NMP gelöst, zusammen mit 91.2 mg (240  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HATU (**41**), 32.7 mg (240  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HOAt (**42**) und 55  $\mu$ L (500  $\mu$ mol) NMM in eine Kartusche überführt und 8 h im Synthesizer stark geschüttelt wurde. Ebenfalls wurde das nachfolgende Serin (2  $\times$  10 Äquiv.) über eine automatisierte Doppelkupplung angeknüpft, während Gly (10 Äquiv.) einfach gekuppelt wurde. Zuletzt wurde der Spacer manuell angebunden, indem 444 mg (1.0 mmol, 10 Äquiv.) der *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-decansäure (**52**) in 2 mL NMP gelöst und zusammen mit 91.2 mg (240  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HATU (**41**), 32.7 mg (240  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HOAt (**42**) und 55  $\mu$ L (500  $\mu$ mol) NMM in eine Kartusche überführt und 3 h im Synthesizer stark geschüttelt wurde. Nach dem Capping wurde lediglich die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten, das Harz gründlich mit

NMP und Dichlormethan nachgewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde das Harz in einem *Merrifield*-Glasreaktor mit 1 mL Wasser, 1 mL TIPS und 10 mL TFA versetzt und 2 h geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz mit TFA (3 × 3 mL) nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit 15 mL Toluol versetzt, im Vakuum eingengt und der Rückstand mit Toluol kodestilliert (2 × 15 mL). Das Rohprodukt wurde in 2 mL eines Wasser/MeOH-Gemischs gelöst und an der präparativen RP-HPLC gereinigt (Standardmethode, siehe Kap. 5.1.2, Präparative RP-HPLC).

Ausbeute: 235 mg (81.2  $\mu\text{mol}$ , 81 %) eines farblosen Lyophilisats.

$\text{C}_{122}\text{H}_{190}\text{N}_{30}\text{O}_{51}$  [ $M = 2893.02 \text{ g/mol}$ ] [ $2891.32 \text{ g/mol}$ ]

$R_t = 25.80 \text{ min}$

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 1446.68 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ber. 1446.66), 964.78 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 964.77)

$[\alpha]_D^{23} = -102.8^\circ$  ( $c = 1.0, \text{H}_2\text{O}$ )

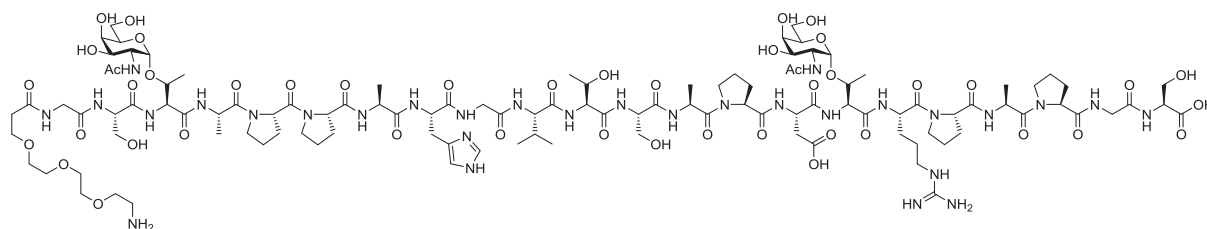
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$ ] (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm) = 8.55 (d,  $^3J_{\text{H}_2, \text{NH}} = 0.98 \text{ Hz}$ , 1 H, His<sup>H-2</sup>), 7.25 (s, 1 H, His<sup>H-4</sup>), 5.35 (d,  $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 2.45$ , 2 H, 2 × H-4), 5.17 - 4.99 (m, 4 H, 2 × H-2, 2 × H-3), 4.97 (d,  $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.91 \text{ Hz}$ , 2 H, 2 × H-1), 4.66 - 4.61 (m, 1 H, Asp <sup>$\alpha$</sup> ), 4.60 - 4.45 (m, 8 H, 2 × Ala <sup>$\alpha$</sup>  {4.54 - 4.45}, 2 × H-5 {4.60 - 4.49}, His <sup>$\alpha$</sup>  {4.52 - 4.47}, 3 × Ser <sup>$\alpha$</sup>  {4.52 - 4.45}), 4.44 - 4.20 (m, 12 H, Arg <sup>$\alpha$</sup>  {4.44 - 4.36}, Thr <sup>$\alpha$</sup> , 2 × T<sub>N</sub>Thr <sup>$\alpha$</sup>  {4.37 - 4.31}, 5 × Pro <sup>$\alpha$</sup>  {4.37 - 4.20}, 2 × T<sub>N</sub>Thr <sup>$\beta$</sup>  {4.31 - 4.27}, 1 × Ala <sup>$\alpha$</sup>  {4.29 - 4.20}), 4.20 - 4.00 (m, 9 H, 1 × Ala <sup>$\alpha$</sup>  {4.29 - 4.20}, Val <sup>$\alpha$</sup>  {4.16}, Thr <sup>$\beta$</sup>  {4.15}, 3 × Ser <sup>$\beta$</sup>  {4.14}), 3.97 - 3.86 (m, 6 H, 3 × Gly <sup>$\alpha$</sup> ), 3.86 - 3.66 (m, 14 H, 2 × H-6 {3.86 - 3.74}, 5 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.74 - 3.66}), 3.64 - 3.50 (m, 12 H, 1 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.64 - 3.59}, 5 × Pro <sup>$\delta$</sup>  {3.59 - 3.50}), 3.22 (dd,  $^3J_{\delta a, \delta b} = 15.6 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\delta, \gamma} = 5.60 \text{ Hz}$ , 1 H, Arg <sup>$\delta_a$</sup> ), 3.18 - 3.06 (m, 5 H, CH<sub>2</sub>O-Spacer, His <sup>$\beta$</sup> , Arg <sup>$\delta_b$</sup> ), 2.92 (dd,  $^3J_{\beta a, \beta b} = 16.8 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\beta, \alpha} = 6.40 \text{ Hz}$ , 1 H, Asp <sup>$\beta_a$</sup> ), 2.79 (dd,  $^3J_{\beta b, \beta a} = 16.8 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\beta, \alpha} = 7.20 \text{ Hz}$ , 1 H, Asp <sup>$\beta_b$</sup> ), 2.54 (t,  $^3J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2} = 5.87 \text{ Hz}$ , 2 H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>O-Spacer), 2.27 - 2.12 (m, 9 H, OAc {2.14}, 3 × Pro <sup>$\beta$</sup>  {2.27 - 2.12}), 2.05 - 1.87 (m, 32 H, 5 × OAc {2.03, 2.02, 2.00, 1.92, 1.90}, 2 × NHAc {1.92}, 5 × Pro <sup>$\gamma$</sup>  {1.98 - 1.89}, Val <sup>$\beta$</sup>  {2.06 - 1.98}), 1.86 - 1.77 (m, 5 H, Arg <sup>$\beta_a$</sup> , 2 × Pro <sup>$\beta$</sup> ), 1.68 - 1.56 (m, 3 H, Arg <sup>$\gamma$</sup> , Arg <sup>$\beta_b$</sup> ), 1.32 - 1.24 (m, 12 H, 4 × Ala <sup>$\beta$</sup>  {1.29, 1.28, 1.26, 1.25}), 1.23 - 1.16 (m, 6 H, 2 × T<sub>N</sub>Thr <sup>$\gamma$</sup> ), 1.13 (d,  $^3J_{\gamma, \beta} = 6.36 \text{ Hz}$ , 3 H, Thr <sup>$\gamma$</sup> ), 0.89 - 0.84 (m, 6 H, Val <sup>$\gamma$</sup> ).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm) = 174.82, 174.60, 174.57, 173.89, 173.86, 173.77, 173.57, 173.49, 173.46, 173.43, 173.35, 173.30, 173.13, 173.06, 173.00, 172.59, 172.56, 172.14, 172.07, 171.93, 171.48, 171.28, 171.10, 170.80, 170.74, 163.28,

162.91, 162.57, 162.22 ( $32 \times \text{C}=\text{O}$ ), 156.68 ( $\text{Arg}^{\delta}$ ), 133.44 ( $\text{His}^{\text{C}-2}$ ), 128.27 ( $\text{His}^{\text{C}-5}$ ), 117.29 ( $\text{His}^{\text{C}-4}$ ), 98.64 ( $2 \times \text{C}-1$ ), 76.89 ( $2 \times \text{T}_\text{N}\text{Thr}^{\beta}$ ), 69.58, 69.46 ( $4 \times \text{CH}_2\text{O}$ -Spacer), 69.43 ( $2 \times \text{C}-5$ ), 69.39 ( $2 \times \text{C}-4$ ), 68.18, 68.10 ( $2 \times \text{C}-3$ ), 66.98 ( $\text{Thr}^{\beta}$ ), 66.50, 66.30 ( $2 \times \text{CH}_2\text{O}$ -Spacer), 62.63, 62.55 ( $3 \times \text{Ser}^{\beta}$ ), 61.11 ( $2 \times \text{C}-6$ ), 61.07, 60.75, 60.32, 60.05, 59.89 ( $5 \times \text{Pro}^{\alpha}$ ), 59.51 ( $\text{Val}^{\alpha}$ ), 58.85 ( $\text{Thr}^{\alpha}$ ), 58.39 ( $2 \times \text{T}_\text{N}\text{Thr}^{\alpha}$ ), 56.89, 56.83 ( $3 \times \text{Ser}^{\alpha}$ ), 55.15 ( $\text{Arg}^{\alpha}$ ), 54.79 ( $\text{His}^{\alpha}$ ), 52.27 ( $\text{Asp}^{\alpha}$ ), 51.10 ( $2 \times \text{C}-2$ ), 49.85, 49.59 ( $2 \times \text{Ala}^{\alpha}$ ), 47.97, 47.90, 47.75, 47.65, 47.43 ( $2 \times \text{Ala}^{\alpha}$ ,  $5 \times \text{Pro}^{\delta}$ ), 42.37, 42.32 ( $3 \times \text{Gly}^{\alpha}$ ), 40.39 ( $\text{Arg}^{\delta}$ ), 39.05 ( $\text{CH}_2\text{O}$ -Spacer), 35.60 ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2$ -Spacer), 35.07 ( $\text{Asp}^{\beta}$ ), 30.09 ( $\text{Val}^{\beta}$ ), 29.33, 29.23, 29.17, 28.04 ( $5 \times \text{Pro}^{\beta}$ ), 27.26 ( $\text{Arg}^{\beta}$ ), 26.30 ( $\text{His}^{\beta}$ ), 24.76, 24.70, 24.63, 24.60 ( $5 \times \text{Pro}^{\gamma}$ ), 24.13 ( $\text{Arg}^{\gamma}$ ), 22.00, 21.98 ( $2 \times \text{NHAc}$ ), 21.13, 20.33, 20.14, 20.05, 20.01, 19.98 ( $6 \times \text{OAc}$ ), 18.65 ( $\text{Thr}^{\gamma}$ ), 18.36 ( $\text{Val}^{\gamma}_{\text{a}}$ ), 18.20, 18.09 ( $2 \times \text{T}_\text{N}\text{Thr}^{\gamma}$ ), 17.59 ( $\text{Val}^{\gamma}_{\text{b}}$ ), 16.35, 15.46, 15.03 ( $4 \times \text{Ala}^{\beta}$ ).

**12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (54)**

( $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -Gly-Ser-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Zunächst wurden 235 mg (81.2  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptids **53** in 15 mL absol. MeOH gelöst. Dazu wurde vorsichtig frisch hergestellte 2.5 %ige NaOMe-Lösung getropft, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht war. Das Gemisch wurde 40 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH-Wert regelmäßig kontrolliert und ggf. nachreguliert wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung durch drei Tropfen konz. Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rückstand wurde in 2 mL eines Wasser/MeOH-Gemischs gelöst und mittels präparativen RP-HPLC gereinigt (Standardmethode, s. Kap. 5.1.2, Präparative RP-HPLC).

Ausbeute: 176.4 mg (66.7  $\mu\text{mol}$ , 82 %) eines farblosen Lyophilisats.

$\text{C}_{110}\text{H}_{178}\text{N}_{30}\text{O}_{45}$  [ $M = 2640.80 \text{ g/mol}$ ] [ $2639.26 \text{ g/mol}$ ]

$R_t = 21.85$  min

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1320.64 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 1320.63), 880.75 ( $[M+3H]^{3+}$ , ber. 880.76)

HR-ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1320.6378 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 1320.6360)

$[\alpha]_D^{23} = -118.5^\circ$  (c = 1.0, H<sub>2</sub>O)

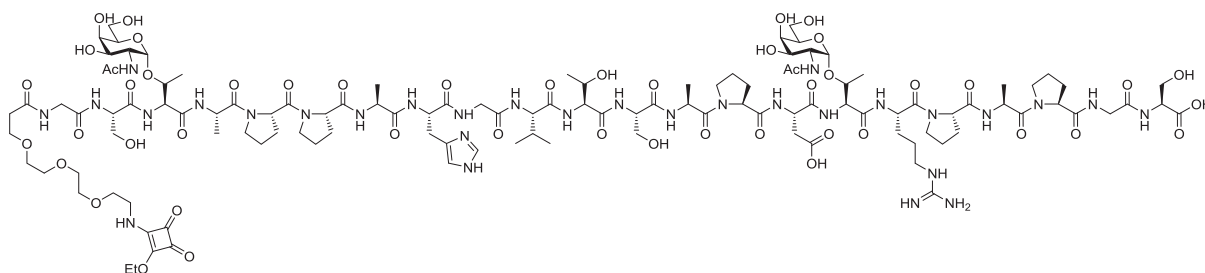
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) = 8.41 (s, 1 H, His<sup>H-2</sup>), 7.10 (s, 1 H, His<sup>H-4</sup>), 4.67 - 4.59 (m, 2 H, 2  $\times$  H-1), 4.49 (t, <sup>3</sup>J <sub>$\alpha,\beta$ =6.85 Hz, 1 H, Asp <sup>$\alpha$</sup> ), 4.44 - 4.39 (m, 2 H, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\alpha$</sup>  {4.43, 4.42}), 4.39 - 4.27 (m, 7 H, 1  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup> , 2  $\times$  H-2, His <sup>$\alpha$</sup> , 3  $\times$  Ser <sup>$\alpha$</sup> ), 4.28 - 4.09 (m, 9 H, Arg <sup>$\alpha$</sup>  {4.26, 4.24, 4.23}, Thr <sup>$\alpha$</sup>  {4.21, 4.19}, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\beta$</sup>  {4.15, 4.13, 4.12}, 5  $\times$  Pro <sup>$\alpha$</sup>  {4.21 - 4.09}), 4.05 - 3.98 (m, 2 H, Thr <sup>$\beta$</sup> , Val <sup>$\alpha$</sup> ), 3.90 - 3.83 (m, 2 H, 2  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup> ), 3.83 - 3.72 (m, 10 H, 3  $\times$  Gly <sup>$\alpha$</sup>  {3.77}, 2  $\times$  H-5 {3.79}, 2  $\times$  H-3 {3.74}), 3.72 - 3.49 (m, 23 H, 1  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup>  {3.72 - 3.61}, 3  $\times$  Ser <sup>$\beta$</sup>  {3.62, 3.61, 3.53, 3.52}, 5  $\times$  CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.58 - 3.49}, 2  $\times$  H-4 {3.55}, 2  $\times$  H-6 {3.53, 3.52}), 3.49 - 3.36 (m, 12 H, 5  $\times$  Pro <sup>$\delta$</sup>  {3.44 - 3.36}, 1  $\times$  CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.74 - 3.67}), 3.13 - 3.04 (m, 1 H, Arg <sup>$\delta_a$</sup> ), 3.03 - 2.93 (m, 5 H, 1  $\times$  CH<sub>2</sub>O-Spacer, His <sup>$\beta$</sup> , Arg <sup>$\delta_b$</sup> ), 2.78 (dd, <sup>3</sup>J <sub>$\beta_a,\beta_b$ =17.12 Hz, <sup>3</sup>J <sub>$\beta,\alpha$ =6.85 Hz, 1 H, Asp <sup>$\beta_a$</sup> ), 2.65 (dd, <sup>3</sup>J <sub>$\beta_b,\beta_a$ =17.12 Hz, <sup>3</sup>J <sub>$\beta,\alpha$ =6.85 Hz, , Asp <sup>$\beta_b$</sup> ), 2.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub>=5.87 Hz, 2 H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>O-Spacer), 2.18 - 1.99 (m, 5 H, 2.5  $\times$  Pro <sup>$\beta$</sup> ), 1.93 - 1.74 (m, 17 H, 2  $\times$  NHAc {1.82, 1.81}, Val <sup>$\beta$</sup>  {1.91, 1.89, 1.87, 1.85}, 5  $\times$  Pro <sup>$\gamma$</sup>  {1.93 - 1.74}), 1.74 - 1.58 (m, 6 H, Arg <sup>$\beta_a$</sup> , 2.5  $\times$  Pro <sup>$\beta$</sup> ), 1.54 - 1.42 (m, 3 H, Arg <sup>$\gamma$</sup> , Arg <sup>$\beta_b$</sup> ), 1.19 - 1.07 (m, 12 H, 4  $\times$  Ala <sup>$\beta$</sup>  {1.15, 1.14, 1.12, 1.10}), 1.07 - 1.00 (m, 6 H, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\gamma$</sup>  {1.04, 1.03, 1.01}), 0.98 (d, <sup>3</sup>J <sub>$\gamma,\beta$</sub> =6.36 Hz, 3 H, Thr <sup>$\gamma$</sup> ), 0.76 - 0.69 (m, 6 H, Val <sup>$\gamma$</sup> ).</sub></sub></sub></sub></sub>

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) = 174.71, 174.55, 173.80, 173.68, 173.66, 173.58, 173.35, 173.04, 172.93, 172.59, 172.45, 172.05, 171.94, 171.88, 171.82, 171.38, 171.19, 171.03, 170.93, 170.80, 170.68, 170.56, 162.79, 162.44, 162.08, 161.71 (26  $\times$  C=O), 156.58 (Arg <sup>$\epsilon$</sup> ), 133.35 (His<sup>C-2</sup>), 128.21 (His<sup>C-5</sup>), 117.37 (His<sup>C-4</sup>), 98.51, 98.42 (2  $\times$  C-1), 75.53, 75.42 (2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\beta$</sup> ), 71.28, 71.20 (2  $\times$  C-5), 69.47, 69.34, 69.29 (4  $\times$  CH<sub>2</sub>O-Spacer), 68.44 (2  $\times$  C-3), 68.00 (2  $\times$  C-4), 66.91 (Thr <sup>$\beta$</sup> ), 66.40, 66.19 (2  $\times$  CH<sub>2</sub>O-Spacer), 61.24, 61.18 (3  $\times$  Ser <sup>$\beta$</sup> ), 61.05 (2  $\times$  C-6), 60.10, 60.68, 60.26, 59.98, 59.81 (5  $\times$  Pro <sup>$\alpha$</sup> ), 59.46 (Val <sup>$\alpha$</sup> ), 58.76 (Thr <sup>$\alpha$</sup> ), 58.33 (2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\alpha$</sup> ), 56.98 (3  $\times$  Ser <sup>$\alpha$</sup> ), 55.07 (Arg <sup>$\alpha$</sup> ), 54.72 (His <sup>$\alpha$</sup> ), 52.18 (Asp <sup>$\alpha$</sup> ), 51.00 (2  $\times$  C-2), 49.72, 49.51 (2  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup> ), 47.84, 47.66, 47.60, 47.53, 47.36 (2  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup> , 5  $\times$  Pro <sup>$\delta$</sup> ), 42.25 (3  $\times$  Gly <sup>$\alpha$</sup> ), 40.36 (Arg <sup>$\delta$</sup> ), 38.99 (CH<sub>2</sub>O-Spacer), 35.52 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 35.01 (Asp <sup>$\beta$</sup> ), 29.99 (Val <sup>$\beta$</sup> ), 29.25, 29.16, 29.07, 27.90 (5  $\times$  Pro <sup>$\beta$</sup> ), 27.32 (Arg <sup>$\beta$</sup> ), 26.21 (His <sup>$\beta$</sup> ), 24.62, 24.57, 24.51 (5  $\times$  Pro <sup>$\gamma$</sup> ), 24.04 (Arg <sup>$\gamma$</sup> ),

22.10 ( $2 \times \text{NHAc}$ ), 18.57 ( $\text{Thr}^\gamma$ ), 18.28 ( $\text{Val}^{\text{a}}$ ), 18.24 ( $2 \times \text{T}_\text{N}\text{Thr}^\gamma$ ), 17.51 ( $\text{Val}^{\text{b}}$ ), 16.27, 15.38, 15.16, 14.96 ( $4 \times \text{Ala}^\beta$ ).

**12-(2-Ethylsquaramido)-amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-glycyl-L-seryl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (64)**

(EtO-Squarat-HN-( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ )<sub>3</sub> $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ -Gly-Ser-Thr( $\alpha\text{GalNAc}$ )-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha\text{GalNAc}$ )-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



In 20 mL eines Wasser/EtOH 1 : 1-Gemisches wurden 176.4 mg (66.7  $\mu\text{mol}$ ) des deblockierten Glycopeptids **54** gelöst und 11.4 mg (9.90  $\mu\text{L}$ , 67.0  $\mu\text{mol}$ ) des Quadratsäurediethylesters **63** zugespritzt. Anschließend wurde ges.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung zugegeben, bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht war. Das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit 1 N Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels präparativen RP-HPLC gereinigt (Standardmethode, s. Kap. 5.1.2, Präparative RP-HPLC).

Ausbeute: 133.8 mg (48.4  $\mu\text{mol}$ , 73 %) eines farblosen Lyophilisats.

$\text{C}_{116}\text{H}_{182}\text{N}_{30}\text{O}_{48}$  [ $M = 2764.89 \text{ g/mol}$ ] [2763.27 g/mol]

$R_t = 23.62 \text{ min}$

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1382.65 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ber. 1382.64), 922.12 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 922.10)

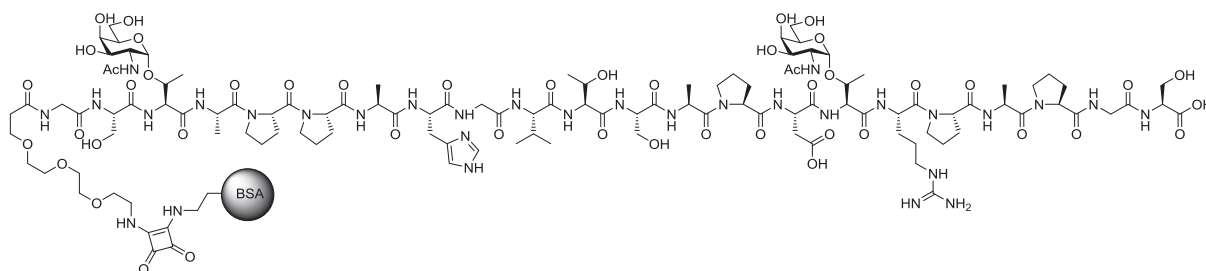
HR-ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1382.6404 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ber. 1382.6413)

$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H-COSY}$ ] (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm) = 8.44 (d,  $^3J_{\text{H}_2,\text{NH}}=0.98 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{His}^{\text{H}2}$ ), 7.14 (s, 1 H,  $\text{His}^{\text{H}4}$ ), 4.68 - 4.65 (m, 2 H,  $2 \times \text{H-1}$ , {4.69, 4.67, 4.65} z. T. im  $\text{D}_2\text{O}$  Signal), 4.58 - 4.49 (m, 3 H,  $\text{Asp}^\alpha$  {4.54, 4.52, 4.51},  $\text{CH}_2\text{-Squarat}$  {4.56, 4.54, 4.52}), 4.49 - 4.44 (m, 2 H,  $2 \times \text{T}_\text{N}\text{Thr}^\alpha$  {4.47, 4.46, 4.45}), 4.43 - 4.32 (m, 7 H,  $2 \times \text{H-2}$  {4.43},  $\text{His}^\alpha$  {4.41},  $1 \times \text{Ala}^\alpha$  {4.39, 4.38},  $3 \times \text{Ser}^\alpha$  {4.38, 4.34}), 4.31 - 4.13 (m, 9 H,  $\text{Arg}^\alpha$  {4.29, 4.27, 4.26},  $\text{Thr}^\alpha$  {4.25},  $5 \times \text{Pro}^\alpha$  {4.25 - 4.13},  $2 \times \text{T}_\text{N}\text{Thr}^\beta$  {4.17, 4.15}), 4.08 - 4.01 (m, 2 H,  $\text{Val}^\alpha$  {4.06,

4.05}, Thr<sup>β</sup> {4.04, 4.03}), 3.94 - 3.86 (m, 2 H, 2 × Ala<sup>α</sup> {3.93, 3.92, 3.91, 3.90, 3.89, 3.88}), 3.86 - 3.76 (m, 10 H, 3 × Gly<sup>α</sup> {3.86 - 3.76}, 2 × H-5 {3.82, 3.81}, 2 × H-3 {3.80, 3.79}), 3.75 - 3.52 (m, 21 H, 1 × Ala<sup>α</sup> {3.74, 3.73}, 2 × H-4 {3.71, 3.70, 3.69}, 2 × H-6 {3.65, 3.64}, 4 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.61, 3.60, 3.58}, 3 × Ser<sup>β</sup> {3.57, 3.55}), 3.52 - 3.40 (m, 16 H, 3 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.50, 3.49}, 5 × Pro<sup>δ</sup> {3.46}), 3.16 - 3.08 (m, 1 H, Arg<sup>δ</sup><sub>a</sub>), 3.07 - 2.97 (m, 3 H, His<sup>β</sup>, Arg<sup>δ</sup><sub>b</sub>), 2.81 (dd, <sup>3</sup>J<sub>βa,βb</sub>=17.12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>β,α</sub>=6.85 Hz, 1 H, Asp<sup>β</sup><sub>a</sub>), 2.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>βb,βa</sub>=17.12 Hz, <sup>3</sup>J<sub>β,α</sub>=6.85 Hz, 1 H, Asp<sup>β</sup><sub>b</sub>), 2.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub>=5.62 Hz, 2 H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>O-Spacer), 2.20 - 2.02 (m, 5 H, 2.5 × Pro<sup>β</sup>), 1.96 - 1.77 (m, 17 H, Val<sup>β</sup> {1.96, 1.94, 1.92, 1.90}, 2 × NHAc {1.85, 1.84}, 5 × Pro<sup>γ</sup> {1.85- 1.77}), 1.76 - 1.62 (m, 6 H, Arg<sup>β</sup><sub>a</sub>, 2.5 × Pro<sup>β</sup>), 1.58 - 1.47 (m, 3 H, Arg<sup>γ</sup>, Arg<sup>β</sup><sub>b</sub>), 1.27 - 1.21 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>-Squarat {1.27, 1.25, 1.23, 1.21}), 1.20 - 1.13 (m, 12 H, 4 × Ala<sup>β</sup> {1.19, 1.17, 1.15, 1.13}), 1.10 - 1.03 (m, 6 H, 2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup> {1.08, 1.06, 1.05}), 1.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>γ,β</sub>=6.36 Hz, 3 H, Thr<sup>γ</sup>), 0.78 - 0.73 (m, 6 H, Val<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm) = 188.73, 183.21 (2 × C=O<sub>Squarat</sub>), 174.75, 174.59, 173.83, 173.70, 173.64, 173.57, 173.4, 173.07, 172.97, 172.62, 172.52, 172.08, 171.98, 171.91, 171.86, 171.42, 171.24, 171.06, 170.96, 170.83, 170.71, 170.59, 163.00, 162.63, 162.28, 161.92 (26 × C=O, 2 × C=C<sub>Squarat</sub>), 156.61 (Arg<sup>ε</sup>), 133.38 (His<sup>C-2</sup>), 128.24 (His<sup>C-5</sup>), 117.26 (His<sup>C-4</sup>), 98.55, 98.46 (2 × C-1), 75.54, 75.44 (2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>β</sup>), 71.33, 71.22 (2 × C-5), 70.54 (CH<sub>2</sub>-Squarat), 69.55, 69.45 (4 × CH<sub>2</sub>O-Spacer), 68.45 (2 × C-3), 68.03 (2 × C-4), 66.94 (Thr<sup>β</sup>), 66.44 (2 × CH<sub>2</sub>O-Spacer), 61.27, 61.22 (3 × Ser<sup>β</sup>), 61.08 (2 × C-6), 61.02, 60.70, 60.27, 60.01, 59.82 (5 × Pro<sup>α</sup>), 59.47 (Val<sup>α</sup>), 58.79 (Thr<sup>α</sup>), 58.36 (2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>α</sup>), 57.33, 57.01 (3 × Ser<sup>α</sup>), 55.10 (Arg<sup>α</sup>), 54.75 (His<sup>α</sup>), 52.21 (Asp<sup>α</sup>), 51.02 (2 × C-2), 49.73, 49.54 (2 × Ala<sup>α</sup>), 47.85, 47.71, 47.63, 47.57, 47.38 (2 × Ala<sup>α</sup>, 5 × Pro<sup>δ</sup>), 43.70 (CH<sub>2</sub>O-Spacer), 42.37, 42.27 (3 × Gly<sup>α</sup>), 40.39 (Arg<sup>δ</sup>), 35.60 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 35.05 (Asp<sup>β</sup>), 30.02 (Val<sup>β</sup>), 29.29, 29.20, 29.11, 27.93 (5 × Pro<sup>β</sup>), 27.35 (Arg<sup>β</sup>), 26.24 (His<sup>β</sup>), 24.65, 24.59, 24.54 (5 × Pro<sup>γ</sup>), 24.07 (Arg<sup>γ</sup>), 22.16 (2 × NHAc), 18.60 (Thr<sup>γ</sup>), 18.31 (Val<sup>γ</sup><sub>a</sub>, 2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup>), 17.54 (Val<sup>γ</sup><sub>b</sub>), 16.68 (CH<sub>3</sub>-Squarat), 16.30, 15.41, 15.19, 14.97 (4 × Ala<sup>β</sup>).

**Konjugation von EtO-Squarat-HN-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (66)**



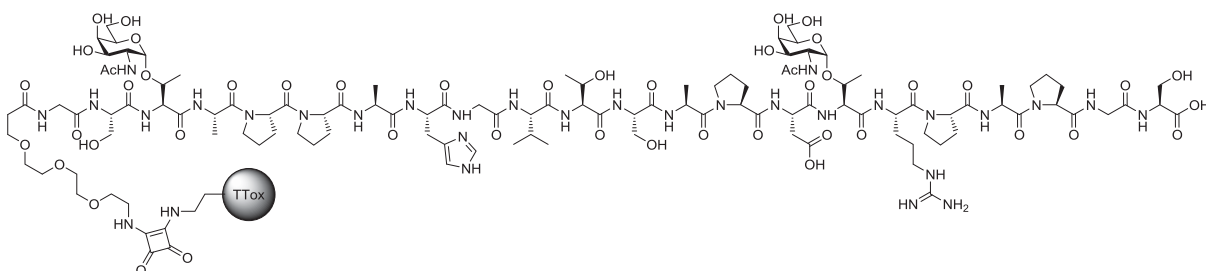
Es wurden 3.03 mg (1.10  $\mu$ mol) des Glycopeptid-Squaratmonoamids **64** und 2.02 mg (0.03  $\mu$ mol) des Rinderserumalbumins (BSA) in 2 mL einer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (130 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 2 mL Wasser) gelöst. Das Gemisch wurde 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle aus der Reaktionsmischung entfernt, indem das Gemisch in einer Ultrafiltrationsanlage durch eine Membran (30 kDa) filtriert und mit 4  $\times$  50 mL Wasser nachgewaschen wurde. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 2.5 mg eines farblosen Lyophilisats.

MALDI-TOF-MS (*Sinapinsäure, positiv*): (m/z): 69005.23 - 142763.70.

Aus dem MALDI-TOF ergibt sich eine Belegung von 1 - 28 Moleküle **64** pro BSA-Molekül.

**Konjugation von EtO-Squarat-HN-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH an Tetanus Toxoid (TTox) (68)**



Es wurden 2.56 mg (0.93  $\mu$ mol) des Glycopeptid-Squaratmonoamids **64** und 114  $\mu$ L (2.00 mg, 0.013  $\mu$ mol, c = 17.5 mg/mL) des Tetanus-Toxoids (TTox) in 2 mL einer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (130 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 2 mL Wasser) gelöst. Das Gemisch wurde 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle aus der Reaktionsmischung entfernt, indem das Gemisch in einer Ultrafiltrationsanlage durch eine Membran (30 kDa) filtriert und mit 4  $\times$  50 mL Wasser nachgewaschen wurde. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

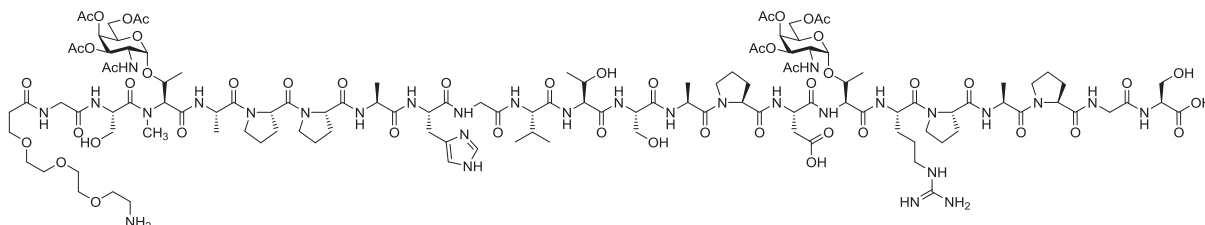
Ausbeute: 3.0 mg eines farblosen Lyophilisats.

MALDI-TOF-MS (*Sinapinsäure, positiv*): (m/z): 159122.87 - 210020.95.

Aus dem MALDI-TOF ergibt sich eine Belegung von 3 - 21 Moleküle **64** pro TTox-Molekül.

**12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-N-L-glycyl-L-seryl-[O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-N-methyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (**55**)**

(H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-N-MeThr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Die Glycopeptidsynthese erfolgte am Peptidsynthesizer nach dem Standardprotokoll (siehe Kap. 5.1.3, Festphasensynthese) ausgehend von 294.1 mg (50  $\mu$ mol) eines mit Fmoc-Ser(Trt) vorbeladenen Tentagel-Harzes (Beladung: 0.17 mmol/g). Nach der automatisierten Kupplung der Aminosäuren Gly, Pro, Ala, Pro und Arg (je 10 Äquiv.) wurde die Glycosylaminosäure manuell angeknüpft. Hierbei wurden 73.7 mg (110  $\mu$ mol, 2 Äquiv.) Fmoc-Thr-T<sub>N</sub>-OH **17** in 1 mL NMP gelöst und zusammen mit 45.7 mg (120  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HATU (**41**), 17.1 mg (120  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HOAt (**42**) und 27.5  $\mu$ L (250  $\mu$ mol) NMM in eine Kartusche überführt und 8 h im Synthesizer stark geschüttelt. Die Kupplung des nachfolgenden Aspartats (2  $\times$  10 Äquiv.) erfolgte über eine automatisierte Doppelkupplung. Danach wurde bis zur nächsten Glycosylaminosäure das Standardprotokoll mit je 10 Äquiv. der Fmoc-Aminosäuren wieder aufgenommen. Nach Anbindung des Alanins wurde erneut eine manuelle Kupplung eingeleitet, indem Fmoc-N-Me-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH **19** (70.8 mg, 100  $\mu$ mol, 2 Äquiv.), in 1 mL NMP gelöst, zusammen mit 45.6 mg (120  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HATU (**41**), 16.3 mg (120  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HOAt (**42**) und 27.5  $\mu$ L (250  $\mu$ mol) NMM in eine Kartusche überführt und 8 h im Synthesizer stark geschüttelt wurde. Ebenfalls wurde das nachfolgende Ser (2  $\times$  10 Äquiv.) über eine automatisierte Doppelkupplung angeknüpft. Zur Steigerung der Ausbeute wurde Fmoc-Ser(<sup>t</sup>Bu)-OH zusätzlich noch zweimal manuell gekuppelt. Dazu wurden 2  $\times$  50 mg (2  $\times$  130  $\mu$ mol) der Aminosäure in 1 mL NMP gelöst, zusammen mit je 50.0 mg (132  $\mu$ mol) HATU (**41**), 18.0 mg (132  $\mu$ mol) HOAt (**42**) und 27.5  $\mu$ L (250  $\mu$ mol)

NMM in eine Kartusche überführt und 3 h bzw. 2 h im Synthesizer stark geschüttelt. Im Anschluss wurde Gly (10 Äquiv.) automatisiert gekuppelt. Zuletzt wurde der Spacer manuell angebunden, indem 444 mg (1.0 mmol, 20 Äquiv.) der *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-amido-4,7,10-trioxa-decansäure (**52**) in 1 mL NMP gelöst und zusammen mit 45.6 mg (120  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HATU (**41**), 16.3 mg (120  $\mu$ mol, 2.4 Äquiv.) HOAt (**42**) und 27.5  $\mu$ L (250  $\mu$ mol) NMM in eine Kartusche überführt und 4 h im Synthesizer stark geschüttelt wurde. Nach dem Capping wurde lediglich die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten, das Harz gründlich mit NMP und Dichlormethan nachgewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde das Harz in einem *Merrifield*-Glasreaktor mit 1 mL Wasser, 1 mL TIPS und 10 mL TFA versetzt und 2 h geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz mit 3  $\times$  3 mL TFA nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit 15 mL Toluol versetzt, im Vakuum eingengt und der Rückstand mit Toluol kodestilliert (2  $\times$  15 mL). Das Rohprodukt wurde in 2 ml eines Wasser/MeOH-Gemischs gelöst und an der präparativen RP-HPLC gereinigt (Standardmethode, siehe Kap. 5.1.2, Präparative RP-HPLC). Es wurden fünf Fraktionen erhalten, vier Fraktionen bestehend aus Abbruchsequenzen und eine Fraktion als Mischfraktion aus Produktpeptid **55** und *N*-acetylierter Abbruchsequenz nach *N*-Me-Thr-T<sub>N</sub> **56**.

Ausbeute: 18.9 mg (max. 6.50  $\mu$ mol) eines farblosen Lyophilisats als Mischfraktion aus **55** und **56**.

C<sub>123</sub>H<sub>192</sub>N<sub>30</sub>O<sub>51</sub> [M = 2907.05 g/mol] [2905.34 g/mol]

R<sub>t</sub> = 26.00 min

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1453.76 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber. 1453.67), 969.51 ([M+3H]<sup>3+</sup>, ber. 969.45), 727.53 ([M+4H]<sup>4+</sup>, ber. 727.34)

HR-ESI-MS (*positiv*): m/z: 1453.6703 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber. 1453.6754)

Charakteristische Signale des Produkts:

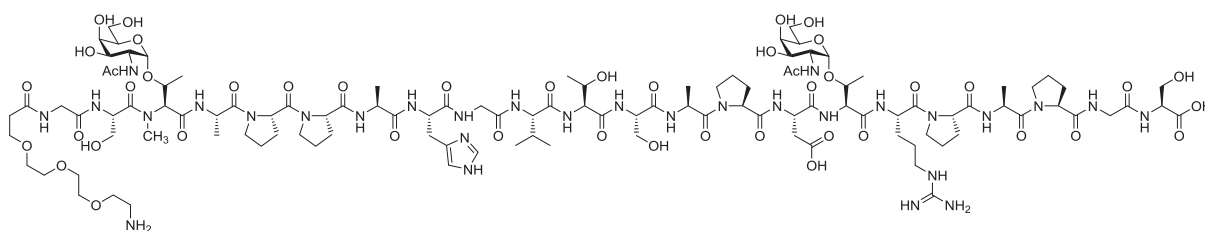
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) = 8.57 (s, 1 H, His<sup>H-2</sup>), 7.26 (s, 1 H, His<sup>H-4</sup>), 5.43 - 5.34 (m, 2 H, 2  $\times$  H-4), 5.18 - 4.96 (m, 6 H, 2  $\times$  H-2, 2  $\times$  H-3 {5.18 - 5.00}, 2  $\times$  H-1 {4.99, d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=4.99 Hz}), 4.68 - 4.62 (m, 1 H, Asp <sup>$\alpha$</sup> ), 4.59 - 4.46 (m, 9 H, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\alpha$</sup> , {4.59 - 4.56}, 1  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup> , {4.59 - 4.45}, 2  $\times$  H-5 {4.55 - 4.49}, His <sup>$\alpha$</sup>  {4.52 - 4.46}, 3  $\times$  Ser <sup>$\alpha$</sup>  {4.52 - 4.45}), 4.45 - 4.22 (m, 12 H, Arg <sup>$\alpha$</sup>  {4.45 - 4.35}, Thr <sup>$\beta$</sup>  {4.45 - 4.34}, 5  $\times$  Pro <sup>$\alpha$</sup>  {4.45 - 4.22}, Thr <sup>$\alpha$</sup>  {4.37 - 4.31}, 2  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup>  {4.33 - 4.22}, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\beta$</sup>  {4.31 - 4.27}), 4.22 - 4.03 (m, 8 H, Val <sup>$\alpha$</sup> , 3  $\times$  Ser <sup>$\beta$</sup> , 1  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup> ), 4.01 - 3.88 (m, 8 H, 3  $\times$  Gly <sup>$\alpha$</sup>  {4.01 - 3.88}, 2  $\times$  H-6a

{3.96 - 3.88}), 3.88 - 3.67 (m, 12 H, 2 × H-6b {3.88 - 3.73}, 1 × Pro<sup>δ</sup> {3.80 - 3.67}, 4 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.74 - 3.67}), 3.66 - 3.51 (m, 12 H, 4 × Pro<sup>δ</sup> {3.66 - 3.51}, 2 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.66 - 3.58}), 3.35 - 3.20 (m, 2 H, His<sup>β</sup>), 3.20 - 3.08 (m, 7 H, Arg<sup>δ</sup> {3.20 - 3.08}, N-CH<sub>3</sub> {3.16 - 3.11}, CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.14 - 3.11}), 2.98 - 2.89 (m, 1 H, Asp<sup>β<sub>a</sub></sup>), 2.87 - 2.76 (m, 1 H, Asp<sup>β<sub>b</sub></sup>), 2.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub>=5.62 Hz, 2 H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>O-Spacer), 2.35 - 2.17 (m, 6 H, 3 × Pro<sup>β</sup>), 2.16 (s., 6 H, 2 × OAc), 2.06 - 2.01 (m, 10 H, 3 × OAc {2.03, 2.02}, Val<sup>β</sup> {2.06 - 2.01}), 2.00 - 1.91 (m, 19 H, 1 × OAc {1.94}, 2 × NHAc {1.94}, 5 × Pro<sup>γ</sup> {2.00 - 1.91}), 1.88 - 1.77 (m, 5 H, Arg<sup>β<sub>a</sub></sup>, 2 × Pro<sup>β</sup>), 1.68 - 1.59 (m, 3 H, Arg<sup>γ</sup>, Arg<sup>β<sub>b</sub></sup>), 1.35 - 1.25 (m, 12 H, 4 × Ala<sup>β</sup> {1.33, 1.31, 1.30, 1.28, 1.26}), 1.25 - 1.17 (m, 6 H, 2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup>), 1.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>γ,β</sub>=5.87 Hz, 3 H, Thr<sup>γ</sup>), 0.92 - 0.85 (m, 6 H, Val<sup>γ</sup>).</sub>

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm) = 174.84, 173.89, 173.80, 173.75, 173.51, 173.34, 173.10, 173.02, 172.62, 172.45, 171.97, 171.79, 171.52, 171.31, 171.11, 163.05, 162.71 (32 × C=O), 156.70 (Arg<sup>ε</sup>), 133.45 (His<sup>C-2</sup>), 128.28 (His<sup>C-5</sup>), 117.31 (His<sup>C-4</sup>), 98.68, 98.48 (2 × C-1), 76.59, 75.59 (2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>β</sup>), 69.45, 69.41 (4 × CH<sub>2</sub>O-Spacer), 69.00 (2 × C-5), 68.93 (2 × C-4), 68.04, 68.00 (2 × C-3), 66.99 (Thr<sup>β</sup>), 66.32 (2 × CH<sub>2</sub>O-Spacer), 62.56, 62.52, 62.49 (3 × Ser<sup>β</sup>), 61.12, 61.07 (2 × C-6), 60.75, 60.30, 60.04, 59.97 (5 × Pro<sup>α</sup>), 59.52 (Val<sup>α</sup>), 58.87 (Thr<sup>α</sup>), 58.54 (2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>α</sup>), 56.91, 55.85, 55.82 (3 × Ser<sup>α</sup>), 55.16 (Arg<sup>α</sup>), 54.81 (His<sup>α</sup>), 52.29 (Asp<sup>α</sup>), 51.09 (2 × C-2), 49.87, 49.59 (2 × Ala<sup>α</sup>), 47.77, 47.74, 47.67, 47.62, 47.55, 47.52 (2 × Ala<sup>α</sup>, 5 × Pro<sup>δ</sup>), 42.31 (3 × Gly<sup>α</sup>), 40.40 (Arg<sup>δ</sup>), 39.06 (CH<sub>2</sub>O-Spacer), 35.59 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 35.12 (Asp<sup>β</sup>), 34.71 (N-CH<sub>3</sub>-T<sub>N</sub>), 30.09 (Val<sup>β</sup>), 29.37, 29.28, 29.19, 28.56, 28.00 (5 × Pro<sup>β</sup>), 27.25 (Arg<sup>β</sup>), 26.31 (His<sup>β</sup>), 24.72, 24.64, 24.60 (5 × Pro<sup>γ</sup>), 24.12 (Arg<sup>γ</sup>), 20.05, 20.11 (6 × OAc), 21.93 (2 × NHAc), 18.66 (Thr<sup>γ</sup>), 18.36 (Val<sup>γ<sub>a</sub></sup>), 18.22, 18.10 (2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup>), 17.59 (Val<sup>γ<sub>b</sub></sup>), 16.35, 15.45, 15.03 (4 × Ala<sup>β</sup>).

**12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-glycyl-L-seryl-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*N*-methyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (59)**

(H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-N-MeThr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



Zunächst wurden 18.9 mg (max. 6.50  $\mu$ mol) der Mischfraktion aus *N*-methyliertem Glycopeptid **55** und *N*-acetylierter Abbruchsequenz **56** in 2 mL absol. MeOH gelöst und danach vorsichtig frisch hergestellte 2.5 %ige NaOMe-Lösung zugetropft bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht war. Das Gemisch wurde 40 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH-Wert regelmäßig kontrolliert und ggf. nachreguliert wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung durch einen Tropfen konz. Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rückstand wurde in 2 mL eines Wasser/MeOH-Gemischs gelöst und mittels präparativen RP-HPLC gereinigt (Standardmethode, s. Kap. 5.1.2, Präparative RP-HPLC). Es wurden zwei Fraktionen erhalten, eine Fraktion mit dem  $\beta$ -Eliminierungsprodukt **62** und eine Mischfraktion aus Produktpeptid **59**, acetylierter Abbruchsequenz nach N-Me-Thr-T<sub>N</sub> **61** und  $\beta$ -Eliminierungsprodukt des Produktpeptids **60**.

Ausbeute: 12.5 mg (max. 4.71  $\mu$ mol) eines farblosen Lyophilisats als Mischfraktion aus **59**, **60**, **61**.

C<sub>111</sub>H<sub>180</sub>N<sub>30</sub>O<sub>45</sub> [M = 2654.83 g/mol] [2653.27 g/mol]

R<sub>t</sub> = 22.27 min

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1327.65 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber. 1327.63), 885.43 ([M+3H]<sup>3+</sup>, ber. 885.43)

HR-ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1327.6403 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber. 1327.6438)

Charakteristische Signale des Produkts:

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY] (600 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) = 8.49 (s, 1 H, His<sup>H-2</sup>), 7.19 (s, 1 H, His<sup>H-4</sup>), 4.75 - 4.73 (2  $\times$  H-1, im D<sub>2</sub>O Signal), 4.59 - 4.56 (m, 1 H, Asp <sup>$\alpha$</sup> ), 4.55 - 4.37 (m, 9 H, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\alpha$</sup>  {4.49, 4.47, 4.46}, 1  $\times$  Ala <sup>$\alpha$</sup>  {4.42}, 2  $\times$  H-2 {4.44}, His <sup>$\alpha$</sup>  {4.43}, 3  $\times$  Ser <sup>$\alpha$</sup>  {4.39}),

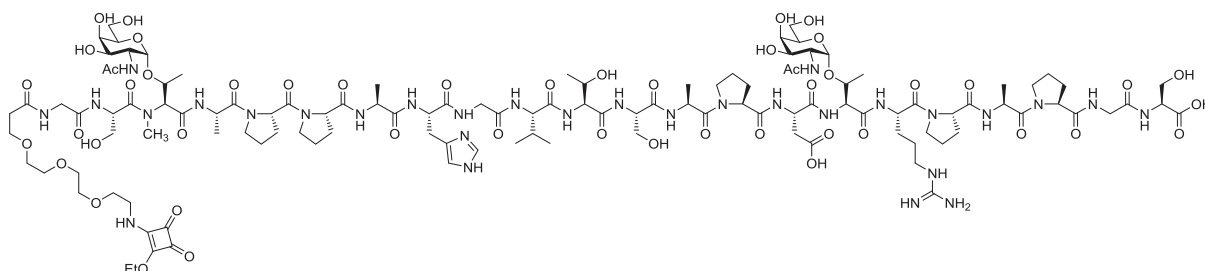
4.33 (t,  $^3J_{\alpha,\beta}=5.46$  Hz, 1 H, Arg<sup>α</sup>), 4.31 - 4.26 (m, 4 H, 3 × Pro<sup>α</sup> {4.30, 4.28}, Thr<sup>α</sup> {4.29}), 4.25 - 4.20 (m, 4 H, 2 × Pro<sup>α</sup> {4.23}, 2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>β</sup> {4.21}), 4.12 - 4.06 (m, 2 H, 1 × Ala<sup>α</sup> {4.10}, Val<sup>α</sup> {4.09}, Thr<sup>β</sup> {4.09, 4.07}), 3.99 - 3.44 (m, 49 H, 2 × Ala<sup>α</sup> {3.96, 3.94, 3.75, 3.74}, 2 × H-5 {3.88, 3.87}, 2 × H-3 {3.84}, 3 × Gly<sup>α</sup> {3.83, 3.81}, 6 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.72, 3.71, 3.57, 3.55}, 2 × H-4 {3.71, 3.70}, 2 × H-6 {3.68, 3.67}, 3 × Ser<sup>β</sup> {3.62, 3.61}, 5 × Pro<sup>δ</sup> {3.52 - 3.44}), 3.23 - 3.02 (m, 8 H, His<sup>β</sup> {3.23 - 3.13}, Arg<sup>δ</sup> {3.08}, CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.08}, N-CH<sub>3</sub> {3.05}), 2.89 - 2.81 (m, 1 H, Asp<sup>β</sup><sub>a</sub>), 2.77 - 2.70 (m, 1 H, Asp<sup>β</sup><sub>b</sub>), 2.52 - 2.45 (m, 2 H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>O-Spacer), 2.23 - 2.12 (m, 6 H, 3 × Pro<sup>β</sup>), 2.00 - 1.80 (m, 17 H, 5 × Pro<sup>γ</sup> {2.00 - 1.91}, Val<sup>β</sup> {1.99}, 2 × NHAc {1.90, 1.89}), 1.80 - 1.69 (m, 6 H, Arg<sup>β</sup><sub>a</sub>, 2 × Pro<sup>β</sup>), 1.60 - 1.53 (m, 3 H, Arg<sup>β</sup><sub>b</sub>, Arg<sup>γ</sup> {1.58, 1.56, 1.54}), 1.27 - 1.17 (m, 12 H, 4 × Ala<sup>β</sup> {1.24, 1.23, 1.21, 1.19}), 1.12 (d,  $^3J_{\gamma,\beta}=6.40$  Hz, 6 H, 2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup>), 1.07 (d,  $^3J_{\gamma,\beta}=6.40$  Hz, 3 H, Thr<sup>γ</sup>), 0.84 - 0.79 (m, 6 H, Val<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (151 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm) = 174.81, 173.88, 173.85, 173.78, 173.76, 173.66, 173.50, 173.12, 173.07, 172.67, 171.95, 171.92, 171.47, 171.25, 171.06, 170.96, 170.86, 170.76, 163.27, 163.03, 162.80, 162.57 (26 × C=O), 156.63 (Arg<sup>ε</sup>), 133.40 (His<sup>C-2</sup>), 128.21 (His<sup>C-5</sup>), 117.19 (His<sup>C-4</sup>), 98.48 (2 × C-1), 75.74<sup>#</sup>/75.44 (T<sub>N</sub>Thr<sup>β</sup>), 71.35 (2 × C-5), 69.55, 69.42, 69.38, 69.34 (4 × CH<sub>2</sub>O-Spacer), 68.44 (2 × C-3), 68.05 (2 × C-4), 66.96 (Thr<sup>β</sup>), 66.27 (2 × CH<sub>2</sub>O-Spacer), 61.30, 61.26, 61.20 (3 × Ser<sup>β</sup>), 61.07 (2 × C-6), 61.00, 60.99, 60.24, 59.99, 59.82 (5 × Pro<sup>α</sup>), 59.46 (Val<sup>α</sup>), 58.83 (Thr<sup>α</sup>), 58.53 (T<sub>N</sub>Thr<sup>α</sup>), 57.10, 57.04 (3 × Ser<sup>α</sup>), 55.11 (Arg<sup>α</sup>), 54.79 (His<sup>α</sup>), 52.27<sup>#</sup>/52.24 (Asp<sup>α</sup>), 51.03<sup>#</sup>/51.00 (2 × C-2), 49.76, 49.59<sup>#</sup>/49.55 (2 × Ala<sup>α</sup>), 47.72, 47.69, 47.66, 47.61 (2 × Ala<sup>α</sup>, 5 × Pro<sup>δ</sup>), 42.26 (3 × Gly<sup>α</sup>), 40.36 (Arg<sup>δ</sup>), 39.00 (CH<sub>2</sub>O-Spacer), 35.54 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 35.10<sup>#</sup>/35.08 (Asp<sup>β</sup>), 34.45<sup>#</sup>/34.42 (N-CH<sub>3</sub>-T<sub>N</sub>), 30.06 (Val<sup>β</sup>), 29.34, 29.23, 29.15, 27.99, 27.96 (5 × Pro<sup>β</sup>), 27.34 (Arg<sup>β</sup>), 26.26 (His<sup>β</sup>), 24.68, 24.64, 24.61, 24.57 (5 × Pro<sup>γ</sup>), 24.07 (Arg<sup>γ</sup>), 22.21, 21.11 (2 × NHAc), 18.63 (Thr<sup>γ</sup>), 18.34 (Val<sup>γ</sup><sub>a</sub>), 18.32 (T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup>), 17.57 (Val<sup>γ</sup><sub>b</sub>), 16.30, 15.36, 14.92 (4 × Ala<sup>β</sup>).

# Signale der Abbruchsequenz

**12-(2-Ethylsquaramido)-amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-glycyl-L-seryl-[O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-N-methyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (65)**

(EtO-Squarat-HN-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-N-MeThr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)



In 2.6 mL eines Wasser/EtOH 1 : 1-Gemisches wurden 12.5 mg (max. 4.71  $\mu$ mol) der Mischfraktion aus **59**, **60** und **61** gelöst und 0.80 mg (0.70  $\mu$ L, 4.7  $\mu$ mol) des Quadratsäurediethylesters **63** zugespritzt. Anschließend wurde ges. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht war. Das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und danach mit 1 N Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels präparativen RP-HPLC gereinigt (Standardmethode, s. Kap. 5.1.2, Präparative RP-HPLC). Es wurden drei Fraktionen erhalten: Fraktion mit acetylierter Abbruchsequenz **61**, Peptid mit einem fehlenden Kohlehydratrest und die Produktfraktion **65**.

Ausbeute: 5.1 mg (1.8  $\mu$ mol, 4 % über alle Stufen) eines farblosen Lyophilisats.

C<sub>117</sub>H<sub>184</sub>N<sub>30</sub>O<sub>48</sub> [M = 2778.92 g/mol] [2777.29 g/mol]

R<sub>t</sub> = 22.03 min

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1390.24 ([M+2H]<sup>2+</sup>, ber. 1390.15), 1394.23 ([M+½H<sub>2</sub>O+2H]<sup>2+</sup>, ber. 1394.15), 937.15 ([M+½H<sub>2</sub>O+3H]<sup>3+</sup>, ber. 937.10)

HR-ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1412.1345 ([M+2Na]<sup>2+</sup>, ber. 1412.1377)

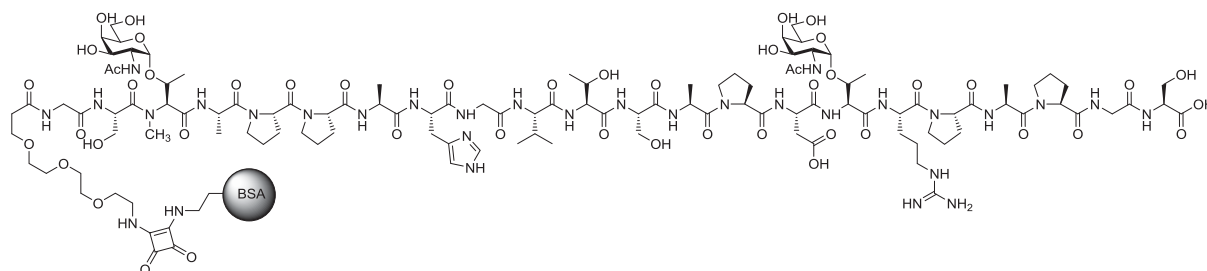
Aufgrund der geringen Probenmenge konnten keine gut aufgelösten NMR-Spektren gemessen werden. Daher werden nur die eindeutigen, charakteristischen Signale aufgeführt:

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY] (600 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) = 8.50 (s, 1 H, His<sup>H-2</sup>), 7.20 (s, 1 H, His<sup>H-4</sup>), 4.60 - 4.58 (m, 2 H, Asp <sup>$\alpha$</sup> , CH<sub>2</sub>-Squarat), 4.50 - 4.46 (m, 2 H, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\alpha$</sup>  {4.49, 4.48, 4.47}), 4.26 - 4.21 (m, 2  $\times$  T<sub>N</sub>Thr <sup>$\beta$</sup>  {4.24, 4.23, 4.24}), 3.92 - 3.81 (m, 2  $\times$  H-5 {3.88, 3.87}, 2  $\times$  H-3 {3.84, 3.83}), 3.80 - 3.47 (m, 2  $\times$  H-6 {3.70, 3.71, 3.63, 3.62, 3.61}), 3.21 - 3.04 (m,

7 H, N-CH<sub>3</sub> {3.20}, His<sup>β</sup> {3.16, 3.15, 3.06, 3.05}, Arg<sup>δ</sup> {3.09, 3.08}), 2.88 - 2.82 (m, 1 H, Asp<sup>β<sub>a</sub></sup> {2.87, 2.86, 2.84, 2.83}), 2.77 - 2.70 (m, 1 H, Asp<sup>β<sub>b</sub></sup> {2.75, 2.74, 2.72, 2.71}), 2.50 - 2.46 (m, 2 H, H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>O-Spacer), 2.04 - 1.83 (m, NHAc {1.91, 1.90}), 1.34 - 1.27 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>-Squarat {1.33, 1.31, 1.30, 1.29}), 1.25 - 1.19 (m, 12 H, 4 × Ala<sup>β</sup> {1.25, 1.24, 1.21, 1.20}), 1.16 - 1.10 (m, 6 H, 2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup> {1.14, 1.13, 1.12, 1.11}), 1.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>γ,β</sub>=6.02 Hz, 3 H, Thr<sup>γ</sup>), 0.84 - 0.79 (m, 6 H, Val<sup>γ</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (151 MHz, D<sub>2</sub>O), δ (ppm) = 128.30 (His<sup>C-5</sup>), 117.19 (His<sup>C-4</sup>), 98.46 (C-1), 75.41 (T<sub>N</sub>Thr<sup>β</sup>), 71.37 (C-5), 70.54 (CH<sub>2</sub>-Squarat), 69.48 (CH<sub>2</sub>O-Spacer), 66.97 (Thr<sup>β</sup>), 66.44 (CH<sub>2</sub>O-Spacer), 61.18 (C-6), 60.70 (Pro<sup>α</sup>), 58.83 (Thr<sup>α</sup>), 58.08 (2 × T<sub>N</sub>Thr<sup>α</sup>), 55.08 (Arg<sup>α</sup>), 52.23 (Asp<sup>α</sup>), 51.00 (C-2), 49.55, 47.64, 47.61 (Ala<sup>α</sup>, Pro<sup>δ</sup>), 42.27 (Gly<sup>α</sup>), 40.36 (Arg<sup>δ</sup>), 35.60 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 34.42 (N-CH<sub>3</sub>-T<sub>N</sub>), 30.04 (Val<sup>β</sup>), 29.14 (5 × Pro<sup>β</sup>), 26.16 (His<sup>β</sup>), 24.60, 24.57, 24.55 (Pro<sup>γ</sup>), 22.21 (2 × NHAc), 18.62 (Thr<sup>γ</sup>), 18.31 (Val<sup>γ<sub>a</sub></sup>, T<sub>N</sub>Thr<sup>γ</sup>), 17.54 (Val<sup>γ<sub>b</sub></sup>), 16.29, 15.36, 14.91 (4 × Ala<sup>β</sup>), 14.87 (CH<sub>3</sub>-Squarat).

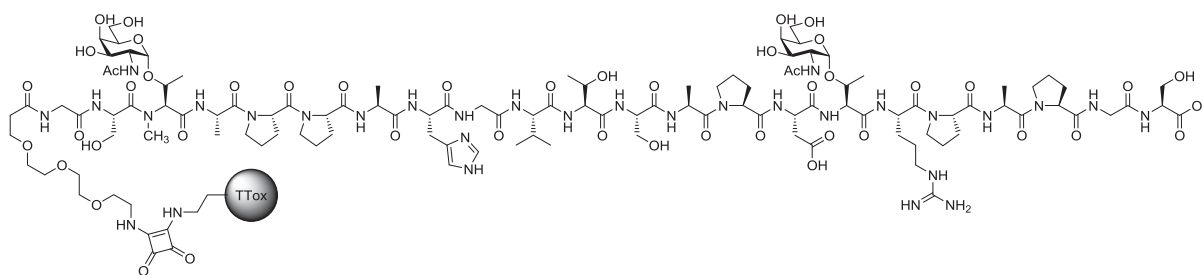
**Konjugation von EtO-Squarat-HN-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-N-MeThr(αGalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr(αGalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH an Rinderserumalbumin (BSA) (67)**



Es wurden 1.91 mg (0.69 μmol) des *N*-methylierten Glycopeptid-Squaratmonoamids **65** und 1.51 mg (0.023 μmol) des Rinderserumalbumins (BSA) in 2 mL einer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (130 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 2 mL Wasser) gelöst. Das Gemisch wurde 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle aus der Reaktionsmischung entfernt, indem das Gemisch in einer Ultrafiltrationsanlage durch eine Membran (30 kDa) filtriert und mit 4 × 50 mL Wasser nachgewaschen wurde. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 2.0 mg eines farblosen Lyophilisats.

**Konjugation von EtO-Squarat-HN-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-N-MeThr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH an Tetanus Toxoid (TTox) (69)**



Es wurden 2.00 mg (0.72  $\mu$ mol) des *N*-methylierten Glycopeptid-Squaratmonoamids **65** und 85.7  $\mu$ L (1.50 mg, 0.01  $\mu$ mol,  $c = 17.5$  mg/mL) des Tetanus-Toxoids (TTox) in 2 mL einer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (130 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 2 mL Wasser) gelöst. Das Gemisch wurde 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden nicht gekuppelte Glycopeptidmoleküle aus der Reaktionsmischung entfernt, indem das Gemisch in einer Ultrafiltrationsanlage durch eine Membran (30 kDa) filtriert und mit 4  $\times$  50 mL Wasser nachgewaschen wurde. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 3.0 mg eines farblosen Lyophilisats.

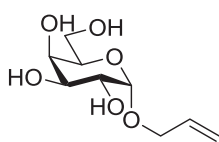
MALDI-TOF-MS (*Sinapinsäure, positiv*): ( $m/z$ ): 180956.31.

Aus dem MALDI-TOF ergibt sich eine Belegung von 1 - 11 Moleküle **65** pro TTox-Molekül.

## 5.4 C-Glycosylaminosäuresynthese

### 5.4.1 Synthese der Saccharidbausteine

#### Allyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**70**)<sup>[176]</sup>



Zunächst wurden 17.3 g Dowex-50 X-8 in 170 mL Allylkohol 30 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Ionentauscher abfiltriert und mit frischem Allylkohol nachgewaschen. Absol. Allylkohol (340 mL, 4.98 mol) wurde vorgelegt und 30 g (0.17 mol) D-Galactose (**10**) (zuvor im Hochvakuum getrocknet) darin suspendiert. Der filtrierte Ionentauscher wurde zugegeben und das Gemisch 90 min unter Rückfluss erhitzt. Die Suspension wurde heiß filtriert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Filtrat wurde mit Diethylether (1 × 150 mL) und Toluol (2 × 30 mL) kodestilliert und aus Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 34.6 g (0.16 mol, 94 %) eines farblosen, wachsartigen Feststoffs.

$C_9H_{16}O_6$  [M = 220.22 g/mol]

$R_f = 0.17$  (°Hex/ EtOAc, 2:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 243.09 ( $[M+Na]^+$ , ber. 243.08), 259.10 ( $[M+K]^+$ , ber. 259.06)

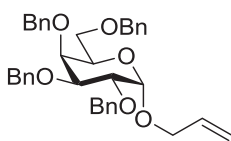
$[\alpha]_D^{23} = +100.1^\circ$  (c = 1.0, MeOH); Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +178.6^\circ$  (c = 1.0, H<sub>2</sub>O)<sup>[246]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) = 6.00 - 5.82 (m, 1 H, =CH-All), 5.34 - 5.13 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 4.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=2.9 Hz, 1 H, H-1), 4.21 - 4.09 (m, 1 H, O-CH<sub>2</sub>-All), 4.07 - 4.03 (m, 1 H, O-CH<sub>2</sub>-All), 4.02 - 3.95 (m, 1 H, H-4), 3.92 - 3.78 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.77 - 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.68 - 3.51 (m, 2 H, H-6ab).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm) = 133.38 (=CH-All), 117.98 (=CH<sub>2</sub>-All), 97.28 (C-1), 70.73 (C-5), 69.26 (C-3), 69.01 (C-4), 68.26 (C-2), 67.96 (O-CH<sub>2</sub>-All), 60.95 (C-6).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[247,248]</sup>

#### Allyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**71**)<sup>[177]</sup>



Es wurden 54.4 mg Allyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**70**) (0.25 mol) in Benzylbromid (185 mL, 1.56 mol) und Dichlormethan (65 mL) gelöst. Kaliumhydroxidpulver (83.2 g, 1.47 mol) und Tetrabutylammonium-bromid (2.0 g, 6.2 mmol) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 d bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Methanol verdünnt und weitere 18 h gerührt.

Danach wurde das Gemisch filtriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen (1 × 100 mL) über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (°Hex /EtOAc, 10:1).

Ausbeute: 58.8 g (0.10 mol, 41 %) eines gelben Öls.

C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> [M = 580.72 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.20 (°Hex/EtOAc, 10:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 603.27 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 603.71), 619.24 ([M+K]<sup>+</sup>, ber. 619.25)

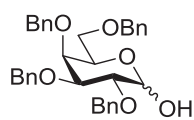
[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +11.9° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +22.4 (c = 2.0, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[249]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.47 - 7.30 (m, 20 H, H<sub>Ar</sub>), 6.03 - 5.92 (m, 1 H, =CH-All), 5.42 - 5.15 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 5.05 - 4.45 (m, 9 H, CH<sub>2</sub>-Bn, H-1), 4.27 - 3.85 (m, 6 H, H-2, H-3, H-4, H-5, O-CH<sub>2</sub>-All), 3.68 - 3.54 (m, 2 H, H-6).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 138.12, 138.65, 138.54, 137.96 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 133.93 (=CH-All), 128.33, 128.30, 128.24, 128.21, 128.15, 128.10, 127.95, 127.82, 127.73, 127.67, 127.64, 127.55, 127.48, 127.40 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 117.92 (=CH<sub>2</sub>-All), 96.22 (C-1), 75.13, 74.68, 73.38, 73.29, 73.21, 70.83, 70.10, 69.33, 68.94, 68.81 (O-CH<sub>2</sub>-All, C-2, C-3, C-4, C-5, CH<sub>2</sub>-Bn), 68.18 (C-6).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[250,251]</sup>

### 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (72)<sup>[177]</sup>



In 600 mL Methanol wurde Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (71) (58.8 g, 101 mmol) gelöst und Palladiumchlorid (6.5 g, 36.7 mmol) zugegeben. Um die Bildung des Methylglycosids zu verhindern, wurden einige Tropfen Wasser (ca. 5 mL) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, mit Dichlormethan nachgewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck vollständig entfernt. Der rot-braune Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (°Hex/EtOAc, 10:1).

Ausbeute: 51.7 g (95.6 mmol, 95 %) eines gelben Öls.

C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub> [M = 540.66 g/mol]

$R_f = 0.10$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 10:1)

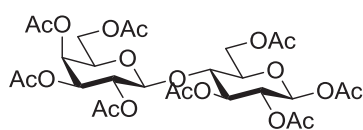
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 563.27 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 563.24), 579.24 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 579.21)

$[\alpha]_D^{23} = +13.0^{\circ}$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +20.0^{\circ}$  (c = 1.5,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[252]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.47 - 7.28 (m, 20 H,  $\text{H}_{\text{Ar-}\alpha\beta}$ ), 5.30 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=2.9$  Hz, 0.5 H, H-1 $\alpha$ ), 5.03 - 4.95 (m, 0.5 H, H-1 $\beta$ ), 4.84 - 4.60 (m, 6 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\alpha\beta$ ), 4.57 - 4.40 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\alpha\beta$ ), 4.12 - 3.90 (m, 3 H, H-2, H-3, H-5;  $-\alpha\beta$ ), 3.62 - 3.50 (m, 3 H, H-4, H-6;  $-\alpha\beta$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC] (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 138.54, 138.48, 138.42, 138.16, 137.81 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph-}\alpha\beta}$ ), 128.36, 128.29, 128.25, 128.20, 128.14, 128.07, 127.97, 127.90, 127.79, 127.75, 127.72, 127.59, 127.53, 127.46 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph-}\alpha\beta}$ ), 97.73 (C-1 $\beta$ ), 91.87 (C-1 $\alpha$ ), 82.13, 80.66, 78.68, 77.20, 75.06, 74.62, 74.52, 73.56, 73.50, 73.43, 72.92, 72.87 (C-2, C-3, C-4, C-5,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ;  $-\alpha\beta$ ), 69.48, 68.95 (C-6 $\alpha\beta$ ).

#### 4-O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-1,2,3,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranose (74)<sup>[178]</sup>



D-Lactose (73) (45.0 g, 131 mmol) und Natriumacetat (45.0 g, 549 mmol) wurden in 450 mL Acetanhydrid suspendiert und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Reaktionslösung

wurde auf Eiswasser (1.5 L) gegossen und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 103 g (131 mmol, 100 %) eines hell-braunen, amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$  [M = 678.60 g/mol]

$R_f = 0.45$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 4:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 701.24 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 701.19), 717.22 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 717.16)

$[\alpha]_D^{23} = +22.9^{\circ}$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{20} = +99.0^{\circ}$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[178]</sup>

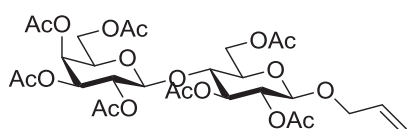
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 5.67 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=8.46$  Hz, 1 H, H-1 $_{\text{Glc}}$ ), 5.36 - 5.33 (m, 1 H, H-4 $_{\text{Gal}}$ ), 5.28 - 5.22 (m, 1 H, H-3 $_{\text{Glc}}$ ), 5.14 - 5.00 (m, 2 H, H-2 $_{\text{Glc}}$ , H-2 $_{\text{Gal}}$ ), 4.99 - 4.93 (m, 1 H, H-3 $_{\text{Gal}}$ ), 4.50 - 4.42 (m, 2 H, H-1 $_{\text{Gal}}$ , H-6 $_{\text{Glc}}$ ), 4.16 - 4.04 (m, 3 H, H-6 $_{\text{bGlc}}$ , H-6 $_{\text{abGal}}$ ),

3.91 - 3.74 (m, 3 H, H-4<sub>Glc</sub>, H-5<sub>Glc</sub>, H-5<sub>Gal</sub>), 2.15, 2.12, 2.09, 2.06, 2.05, 2.04, 2.03, 1.96 (8 × s, 24 H, 8 × OAc).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 170.34, 170.31, 170.12, 170.04, 169.61, 169.53, 168.99, 168.83 (8 × C=O<sub>Ac</sub>), 100.90 (C-1<sub>Gal</sub>), 91.47 (C-1<sub>Glc</sub>), 75.62 (C-4<sub>Glc</sub>), 73.42 (C-5<sub>Glc</sub>), 72.57 (C-3<sub>Glc</sub>), 70.92 (C-3<sub>Gal</sub>), 70.66 (C-5<sub>Gal</sub>), 70.45 (C-2<sub>Glc</sub>), 68.94 (C-2<sub>Gal</sub>), 66.55 (C-4<sub>Gal</sub>), 61.69 (C-6<sub>Glc</sub>), 60.79 (C-6<sub>Gal</sub>), 20.91, 20.79, 20.71, 20.59, 20.56, 20.46 (OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[178]</sup>

### Allyl-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid (75)<sup>[39]</sup>



Es wurde das Rohprodukt 4-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-1,2,3,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranose (74) (103 g, 131 mmol) in 300 mL Dichlormethan gelöst,

60 mL (878 mmol) Allylalkohol zugegeben und das Gemisch auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 20 mL (232 mmol) BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> zugetropft und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 3 h wurden weitere 20 mL (232 mmol) sowie erneut nach einer weiteren Stunde 40 mL (464 mmol) BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> zugegeben. Es wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch langsam in Wasser gegossen und mit Natriumhydroxid-Lösung ein pH von 6 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Toluol (2 × 80 mL) und Chloroform (3 × 80 mL) kodestilliert und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 84.4 g (125 mmol, 95 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>18</sub> [M = 676.63 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.75 (°Hex/EtOAc, 4:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 699.20 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 699.62), 715.18 ([M+K]<sup>+</sup>, ber. 715.18)

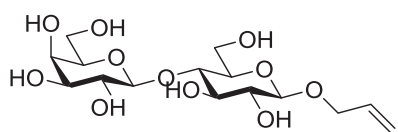
[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +28.9 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +30.2 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[253]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 6.03 - 5.68 (m, 1 H, =CH-All), 5.41 - 5.31 (m, 1 H, H-4<sub>Gal</sub>), 5.30 - 5.06 (m, 4 H, H-2<sub>Gal</sub>, H-3<sub>Glc</sub>, =CH<sub>2</sub>-All), 5.00 - 4.88 (m, 2 H, H-2<sub>Glc</sub>, H-3<sub>Gal</sub>), 4.57 - 4.25 (m, 4 H, H-1<sub>Glc</sub>, H-1<sub>Gal</sub>, H-6a<sub>Glc</sub>, O-CH<sub>2</sub>-All), 4.18 - 4.05 (m, 4 H, H-6b<sub>Glc</sub>, H-6ab<sub>Gal</sub>, O-CH<sub>2</sub>-All), 3.95 - 3.85 (m, 1 H, H-5<sub>Gal</sub>), 3.83 - 3.67 (m, 1 H, H-4<sub>Glc</sub>), 3.64 - 3.47 (m, 1 H, H-5<sub>Glc</sub>), 2.18, 2.16, 2.13, 2.06, 2.04, 2.01, 1.97 (7 × s, 21 H, 7 × OAc).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.31, 170.10, 170.03, 169.89, 169.56, 169.10, 169.04 ( $7 \times \text{C}=\text{O}_{\text{Ac}}$ ), 133.29 ( $=\text{CH}\text{-All}$ ), 117.60 ( $=\text{CH}_2\text{-All}$ ), 101.02 ( $\text{C}\text{-1}_{\text{Gal}}$ ), 99.24 ( $\text{C}\text{-1}_{\text{Glc}}$ ), 76.18 ( $\text{C}\text{-4}_{\text{Glc}}$ ), 72.78 ( $\text{C}\text{-5}_{\text{Glc}}$ ), 72.70 ( $\text{C}\text{-3}_{\text{Glc}}$ ), 72.55 ( $\text{C}\text{-3}_{\text{Gal}}$ ), 71.61 ( $\text{C}\text{-2}_{\text{Glc}}$ ), 70.95 ( $\text{C}\text{-1}_{\text{Gal}}$ ), 70.65 ( $\text{C}\text{-5}_{\text{Gal}}$ ), 70.47 ( $\text{O}\text{-CH}_2\text{-All}$ ), 69.06 ( $\text{C}\text{-2}_{\text{Gal}}$ ), 66.53 ( $\text{C}\text{-4}_{\text{Gal}}$ ), 61.96 ( $\text{C}\text{-6}_{\text{Glc}}$ ), 60.73 ( $\text{C}\text{-6}_{\text{Gal}}$ ), 21.06, 20.98, 20.91, 20.82, 20.67, 20.61, 20.47 ( $7 \times \text{OAc}$ ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[253]</sup>

### Allyl-4-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid (**76**)<sup>[39]</sup>



Zur Deacetylierung wurden 84.4 g (125 mmol) des Rohprodukts Allyl-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (**75**) in 750 mL Methanol gelöst und mit frischer Natriummethanolat-Lösung ein pH-Wert von 9 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und dabei der pH-Wert regelmäßig nachreguliert. Anschließend wurde Amberlyst® 15 zur Neutralisation zugegeben, filtriert und mehrfach mit heißem Methanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Toluol ( $1 \times 200$  mL) und Chloroform ( $2 \times 150$  mL) kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 51.5 g (max. 125 mmol) eines hell-braunen, amorphen Feststoffs.

$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$  [ $M = 382.36$  g/mol]

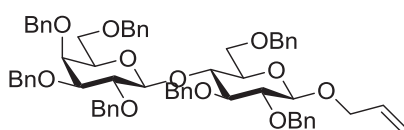
ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 405.15 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 405.14), 421.11 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 421.11)

Charakteristische Signale des Produkts:

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm) = 5.98 - 5.81 (m, 1 H,  $=\text{CH}\text{-All}$ ), 5.35 - 5.15 (m, 1 H,  $=\text{CH}_2\text{-All}$ ), 4.50 (d,  $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2}=8.09$  Hz, 1 H,  $\text{H}\text{-1}_{\text{Glc}}$ ), 4.42 (d,  $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2}=7.72$  Hz, 1 H,  $\text{H}\text{-1}_{\text{Gal}}$ ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[254]</sup>

### Allyl-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri- $\beta$ -D-glucopyranosid (**77**)<sup>[39]</sup>



Unter leichtem Erwärmen wurde das Rohprodukt Allyl-4-*O*-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid (**76**) (51.5 g, max. 125 mmol) in 500 mL DMF gelöst und anschließend auf

$11^\circ\text{C}$  abgekühlt. Portionsweise wurde eine 60%ige Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl (39.7 g, 993 mmol) zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde Benzylbromid (105 mL,

614 mmol) langsam zugetropft und danach 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurden 50 mL Methanol zugegeben und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (300 mL) aufgenommen und mit Wasser (100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan rück-extrahiert (3 × 150 mL) und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck und erhöhter Temperatur (60 °C) entfernt. Um den Großteil des Benzylbromids sowie des DMFs zu entfernen, wurde das Rohprodukt über Kieselgel filtriert (<sup>c</sup>Hex) und das Lösungsmittel eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 121 g (max. 119 mmol) eines braunen Öls.

C<sub>64</sub>H<sub>68</sub>O<sub>11</sub> [M = 1013.24 g/mol]

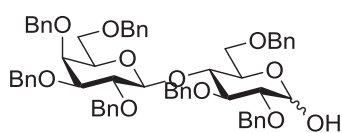
R<sub>f</sub> = 0.79 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 3:1)

Charakteristische Signale des Produkts:

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 6.04 - 5.82 (m, 1 H, =CH-All), 5.40 - 5.12 (m, 1 H, =CH<sub>2</sub>-All).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[255]</sup>

#### 4-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranose (78)



In 400 mL Methanol wurde das Rohprodukt Allyl-4-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-β-D-glucopyranosid (77) (60 g, max. 63 mmol) gelöst und Palladiumchlorid (1.94 g, 10.9 mmol) zugegeben. Um die Bildung des Methylglycosids zu verhindern, wurden einige Tropfen Wasser (ca. 3 mL) zugefügt. Nach 48 h wurden weitere 1.40 g (7.89 mmol) Palladiumchlorid zugegeben und erneut 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Hyflo<sup>®</sup> filtriert, mit Dichlormethan nachgewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Um das Rohprodukt von Pd-Resten zu befreien, wurde zunächst über Kieselgel filtriert und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 3:1).

Ausbeute: 24.5 g (25.2 mmol, 19 % über fünf Stufen) eines gelben, hochviskosen Öls.

$C_{61}H_{64}O_{11}$  [ $M = 973.17$  g/mol]

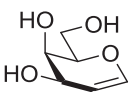
$R_f = 0.47$  ( $^{\circ}Hex/EtOAc$ , 3:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 995.49 ( $[M+Na]^+$ , ber. 995.43).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.47 - 7.11 (m, 35 H,  $H_{Ar}$ ), 5.29 - 4.14 (m, 16 H,  $CH_2-Bn-\alpha\beta$ , H-1 $\alpha$  {5.22 - 5.18}, H-1 $\beta$  {4.71}, H-1' $\alpha\beta$  {4.40 - 4.36}), 4.12 - 3.28 (m, 12 H, H-2 - H-6- $\alpha\beta$ , H-2' - H-6' $\alpha\beta$ ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[255]</sup>

### Galactal (79)<sup>[180]</sup>

 Es wurden 29.7 g (109 mmol) des 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactals (**12**, Kap. 5.3.1) in 250 mL Methanol gelöst und mit einer 1 %igen methanolischen Natriummethanolatlösung bis pH-Wert 8.5 - 9 versetzt. Es wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, bis dünn-schichtchromatographisch eine vollständige Deblockierung zu beobachten war. Das Gemisch wurde mit 100 mL Toluol verdünnt und die Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde ein farbloser, amorpher Feststoff erhalten. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 16.5 g (max. 109 mmol) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

$C_6H_{10}O_4$  [ $M = 146.14$  g/mol]

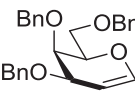
$R_f = 0.83$  ( $CHCl_3/MeOH/H_2O$ , 10:5:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 169.05 ( $[M+Na]^+$ , ber. 169.05)

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CH_3OD-d_4$ ),  $\delta$  (ppm) = 6.36 (dd,  $^3J_{H1,H2}=6.24$  Hz,  $^4J_{H1,H3}=1.47$  Hz, 1 H, H-1), 4.64 (dt,  $^3J_{H2,H3}=6.24$  Hz,  $^3J_{H2,H1}=1.83$  Hz, 1 H, H-2), 4.39 - 4.32 (m, 1 H, H-3), 3.96 - 3.73 (m, 4 H, H-4, H-5, H-6ab).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[256,257]</sup>

### 3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactal (80)<sup>[181]</sup>

 Das Rohprodukt aus der Galactalsynthese **79** (16.5 g, max. 109 mmol) wurde in 250 mL DMF gelöst und unter Eiskühlung portionsweise mit 22.8 g (570 mmol) Natriumhydrid (60 % in Mineralöl) versetzt. Danach wurden langsam 47.6 mL (401 mmol) Benzylbromid zugetropft und die Lösung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden zum Reaktionsgemisch 300 mL Wasser und 150 mL Toluol gegeben. Danach wurde

die wässrige Phase mit Toluol (3 × 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbliche Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (Isolera, Gradienten 100 % <sup>c</sup>Hex → 100 % EtOAc).

Ausbeute: 40.8 g (97.9 mmol, 90 % über zwei Stufen) farbloses, hochviskoses Öl.

C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub> [M = 416.52 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.80 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

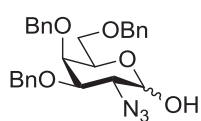
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 439.17 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 439.19), 455.18 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 455.16)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -3.4° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -4.0° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[258]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.47 - 7.30 (m, 15 H, H<sub>Ar</sub>), 6.45 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=6.24 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H1,H3</sub>=1.10 Hz, 1H, H-1), 4.95 - 4.91 (m, 1 H, H-2), 4.78 - 4.45 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.31 - 4.22 (m, 2 H, H-3, H-5), 4.05 - 3.98 (m, 1 H, 4-H), 3.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H6a,H5</sub>=10.27 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H6a,H6b</sub>=7.34 Hz, 1 H, H-6a), 3.73 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H6b,H5</sub>=10.27 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H6b,H6a</sub>=5.14 Hz 1 H, H-6b).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 144.06 (C-1), 138.37, 138.24, 137.86 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 128.27, 128.19, 128.03, 127.77, 127.65, 127.58, 127.51, 127.44, 127.30 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 99.86 (C-2), 75.56 (C-5), 73.28, 73.19 (CH<sub>2</sub>-Bn), 71.12 (C-4), 70.74 (CH<sub>2</sub>-Bn), 70.61 (C-3), 68.31 (C-6).

## 2-Azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-α/β-D-galactopyranose (**81**)<sup>[182]</sup>



Zu 8.80 g (21.1 mmol) des 3,4,6-Tri-*O*-benzylgalactals (**80**) gelöst in 100 mL Acetonitril wurden bei -25 °C, 34.3 g (62.6 mmol) Cer-Ammoniumnitrat, sowie 2.10 g (32.3 mmol) Natriumazid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h in der Kälte gerührt bis die Reaktionskontrolle mittels DC keine Veränderung mehr zeigte. Anschließend wurde das Gemisch mit 100 mL Diethylether und 100 mL Wasser versetzt. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser (3 × 50 mL) und anschließend mit ges. NaCl-Lösung (1 × 50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Isolera, Gradienten 100 % <sup>c</sup>Hex → 100 % EtOAc).

Ausbeute: 4.00 g (8.41 mmol, 40 %) eines schwach gelben Öls. Verhältnis α : β = 2 : 1

C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [M = 475.54 g/mol]

$R_f = 0.27$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

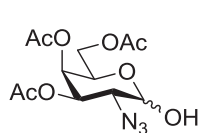
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 498.22 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 498.20), 514.20 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 514.17), 973.46 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 973.41)

$[\alpha]_D^{23} = +23.7^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +25^\circ$ , c = 0.9, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[181]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.46 - 7.25 (m, 15 H, H<sub>Ar</sub>- $\alpha\beta$ ), 5.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=2.20 Hz, 1 H, H-1 $\alpha$ ), 4.89 (d, <sup>2</sup>J<sub>CH2,CH2</sub>=11.37 Hz, 2 H, CH<sub>2</sub>-Bn- $\alpha\beta$ ), 4.76 - 4.68 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-Bn- $\alpha\beta$ ), 4.60 - 4.37 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>-Bn- $\alpha\beta$ , H-1 $\beta$ ), 4.21 - 4.11 (m, 1 H, H-5 $\alpha$ ), 4.00 - 3.92 (m, 2 H, H-4 $\alpha$ , H-5 $\beta$ ), 3.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3,H5</sub>=2.57 Hz, 0.5 H, H-4 $\beta$ ), 3.78 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2,H3</sub>=10.27 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1</sub>=7.70 Hz, 0.5 H, H-2 $\beta$ ), 3.63 - 3.43 (m, 4.5 H, H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ , H-6 $\alpha\beta$ ), 3.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=10.27 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3,H4</sub>=2.93 Hz, 0.5 H, H-3 $\beta$ ).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 138.12, 137.62, 137.48 (C<sub>ipso</sub>-Ph- $\alpha\beta$ ), 128.54, 128.42, 128.30, 128.23, 128.20, 127.98, 127.95, 127.91, 127.87, 127.81, 127.77, 126.98 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph- $\alpha\beta$ ), 96.43 (C-1 $\beta$ ), 92.40 (C-1 $\alpha$ ), 80.75 (C-3 $\beta$ ), 76.58 (C-3 $\alpha$ ), 74.67, 74.62, 73.78, 73.59 (CH<sub>2</sub>-Bn- $\alpha\beta$ ), 73.52 (C-4 $\alpha$ ), 73.37 (C-5 $\beta$ ), 72.54, 72.31 (C-4 $\beta$ ), 69.70 (C-5 $\alpha$ ), 69.11 (C-6 $\alpha$ ), 68.63 (C-6 $\beta$ ), 64.59 (C-2 $\beta$ ), 60.31 (C-2 $\alpha$ ).

### 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (92)



Zu 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranosylnitrat (**13**)

(29.4 mg, 78.1  $\mu$ mol), gelöst in 1 mL absol. Acetonitril, wurden unter Argon

zunächst Allyltrimethylsilan (**86**) (50.0  $\mu$ l, 312  $\mu$ mol, 4 Äquiv.) und tropfenweise

BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> 48%ig (27.0  $\mu$ l, 312  $\mu$ mol, 4 Äquiv.) zugegeben. Es wurde 16 h bei 0 °C gerührt. Danach wurde mit 1 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, mit Dichlormethan rück-extrahiert (3  $\times$  1 mL), die vereinigten Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 15.9 mg (44.7  $\mu$ mol, 57 %) eines braunen Öls. Verhältnis  $\alpha/\beta = 2 : 1$

C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M = 331.28 g/mol]

$R_f = 0.50$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

$[\alpha]_D^{23} = +40.6^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit. vom  $\alpha$ -Anomer:  $[\alpha]_D^{20} = +67.6^\circ$  (c = 1.3, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[259]</sup>

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 354.06 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 354.09), 370.07 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 370.06)

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 5.49 - 5.41 (m, 2.5 H, H-1 $\alpha$ , H-4 $\alpha\beta$ ), 5.37 (dd,  $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2}=11.37$  Hz,  $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4}=2.93$  Hz, 1 H, H-3 $\alpha$ ), 4.83 (dd,  $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2}=10.64$  Hz,  $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4}=3.30$  Hz, 0.5 H, H-3 $\beta$ ), 4.71 (d,  $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2}=8.07$  Hz, 0.5 H, H-1 $\beta$ ), 4.47 (t,  $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{ab}}=6.42$  Hz, 1 H, H-5 $\alpha$ ), 4.17 - 4.05 (m, 3 H, H-6 $\text{ab-}\alpha\beta$ ), 3.97 - 3.85 (m, 0.5 H, H-5 $\beta$ ), 3.76 (dd,  $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3}=11.00$  Hz,  $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_1}=3.67$  Hz, 1 H, H-2 $\alpha$ ), 3.67 (dd,  $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3}=10.82$  Hz,  $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_1}=7.89$  Hz, 0.5 H, H-2 $\beta$ ), 2.21 - 2.02 (m, 14 H, 3  $\times$  OAc- $\alpha\beta$ ).

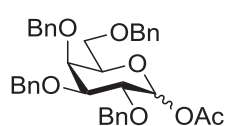
$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.54, 170.51, 170.08, 169.87 (C=O $_{\text{Ac}}$   $\alpha\beta$ ), 96.41 (C-1 $\beta$ ), 92.37 (C-1 $\alpha$ ), 71.14 (C-3 $\beta$ ), 70.92 (C-5 $\beta$ ), 68.30 (C-4 $\beta$ ), 67.65 (C-4 $\alpha$ ), 66.61, 66.42 (C-3 $\alpha$ , C-5 $\alpha$ ), 61.95 (C-2 $\beta$ ), 58.00 (C-2 $\alpha$ ), 20.67, 20.63, 20.60 (OAc- $\alpha\beta$ ).

## 5.4.2 Acetylierungen

### *Allgemeine Versuchsdurchführung zur Acetylierung*<sup>[194]</sup>

Die entsprechende Pyranose wurde in Acetanhydrid gelöst und Natriumacetat zugegeben. Das Gemisch wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über Kieselgel filtriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt ggf. säulenchromatographisch gereinigt.

### 1-*O*-Acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (83)



Nach allgemeiner Synthesevorschrift

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 234 mg (433  $\mu\text{mol}$ ) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (**72**) in 3.0 mL Acetanhydrid gelöst und mit 10.0 mg (122  $\mu\text{mol}$ ) Natriumacetat umgesetzt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung analysenrein erhalten.

Ausbeute: 240 mg (412  $\mu\text{mol}$ , 95 %) eines gelben, viskosen Öls.  $\alpha/\beta = 1 : 1.2$

### Alternativmethode in der Mikrowelle

Ein Gemisch aus 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (**72**) (64.4 mg, 119  $\mu\text{mol}$ ), 2.0 mL Acetanhydrid und 6.2 mg (75.6  $\mu\text{mol}$ ) Natriumacetat wurde 30 min in der Mikrowelle bei max. 50 W und 120  $^{\circ}\text{C}$  behandelt. Anschließend wurde über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 65.3 mg (112  $\mu\text{mol}$ , 94 %) eines gelben, viskosen Öls. Verhältnis  $\alpha/\beta = 1 : 1.1$

$\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_7$  [ $M = 582.69$  g/mol]

$R_f = 0.56$  ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

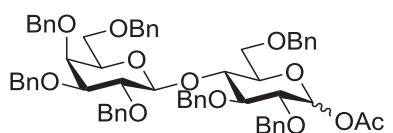
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 600.29 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , ber.: 600.29), 605.23 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 605.25), 621.21 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 621.22)

$[\alpha]_D^{23} = +27.0^\circ$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit.:  $\alpha$ -Anomer:  $[\alpha]_D^{23} = +95^\circ$  (c = 2.0,  $\text{C}_6\text{H}_6$ )<sup>[260]</sup>,  
 $\beta$ -Anomer:  $[\alpha]_D^{23} = +2.5^\circ$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[261]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.42 - 7.28 (m, 20 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}-\alpha\beta$ ), 6.39 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=3.67$  Hz, 0.5 H, H-1 $\alpha$ ), 5.59 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=8.07$  Hz, 0.5 H, H-1 $\beta$ ), 4.96 - 4.37 (m, 8 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $\alpha\beta$ ), 4.24 - 4.13 (m, 0.5 H, H-2 $\alpha$ ), 4.10 - 3.84 (m, 2.5 H, H-2 $\beta$ , H-3 $\alpha$ , H-4 $\alpha\beta$ , H-5 $\alpha$ ), 3.77 - 3.46 (m, 3 H, H-3 $\beta$ , H-5 $\beta$ , H-6 $\text{ab}-\alpha\beta$ ), 2.13 (s, 1.5 H, OAc- $\alpha$ ), 2.05 (s, 1.5 H, OAc- $\beta$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 169.58, 169.37 (C=O $_{\text{Ac}}-\alpha\beta$ ), 138.54, 138.41, 138.32, 138.12, 137.96, 137.65 ( $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-Ph}-\alpha\beta$ ), 129.72, 128.39, 128.32, 128.22, 128.19, 128.13, 127.97, 127.94, 127.91, 127.82, 127.79, 127.69, 127.61, 127.52, 127.34 ( $\text{C}_{\text{o,m,p}}\text{-Ph}-\alpha\beta$ ), 94.23 (C-1 $\beta$ ), 90.73 (C-1 $\alpha$ ), 82.34, 78.59, 78.11, 75.32, 75.28, 74.87, 74.64, 74.46, 74.01, 73.53, 73.47, 73.34, 73.01, 72.82, 71.77 (C-2, C-3, C-4, C-5,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ;  $-\alpha\beta$ ), 68.34, 67.89 (C-6- $\alpha\beta$ ), 21.18, 21.00 (OAc- $\alpha\beta$ ).

### 1-O-Acetyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose (84)



Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 251 mg (258  $\mu\text{mol}$ ) 4-O-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose (**78**) in 2.0 mL

Acetanhydrid gelöst und mit 10.0 mg (122  $\mu\text{mol}$ ) Natriumacetat umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $^c\text{Hex} \rightarrow ^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  10:1).

Ausbeute: 176 mg (173  $\mu\text{mol}$ , 67 %) eines gelben Öls. Verhältnis  $\alpha/\beta = 1 : 1.4$

$\text{C}_{63}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$  [M = 1015.21 g/mol]

$R_f = 0.54$  ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

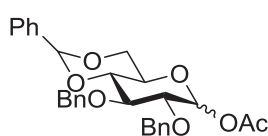
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 1037.46 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1037.44), 1053.47 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 1053.42)

$[\alpha]_D^{23} = +12.9^\circ$  (c = 2.5,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H}-^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.52 - 7.15 (m, 35 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}-\alpha\beta$ ), 5.15 - 4.27 (m, 17 H, H-1 $_{\text{Glc}}$ , H-4 $_{\text{Gal}}$ , H-3 $_{\text{Glc}}$ ,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ;  $-\alpha\beta$ ), 4.06 - 3.28 (m, 11 H, H-1 $_{\text{Gal}}$ , H-2 $_{\text{Glc}}$ , H-2 $_{\text{Gal}}$ , H-3 $_{\text{Gal}}$ , H-4 $_{\text{Glc}}$ , H-5 $_{\text{Glc}}$ , H-5 $_{\text{Gal}}$ , H-6 $_{\text{Glc}}$ , H-6 $_{\text{Gal}}$ ), 2.20, 2.13 (2  $\times$  s, 3 H, OAc- $\alpha\beta$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR [HSQC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.90, 169.49 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac-}\alpha\beta}$ ), 140.69, 139.16, 139.00, 138.81, 138.43, 138.33, 138.05 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph-}\alpha\beta}$ ), 129.71, 128.9, 128.53, 128.34, 128.31, 128.22, 128.12, 128.05, 128.00, 127.81, 127.79, 127.73, 127.49, 127.38, 127.17, 127.06 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph-}\alpha\beta}$ ), 102.71 ( $\text{C-1}_{\text{Gal}}$ ), 102.55 ( $\text{C-1}_{\text{Glc}}$ ), 82.50, 82.37, 79.92, 79.83, 77.96, 76.34, 75.89, 75.66, 75.12, 74.67, 73.50, 73.37, 73.14, 73.05, 72.86, 72.49 ( $\text{C-2,C-2}' - \text{C-5, C-5}'-\alpha\beta$ ), 68.06, 67.54 ( $\text{C-6}_{\text{Gal}}, \text{C-6}_{\text{Glc}}-\alpha\beta$ ), 21.18, 20.99 ( $\text{OAc-}\alpha\beta$ ).

### 1-O-Acetyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose (82a)



Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 99.6 mg (222  $\mu\text{mol}$ ) 2,3-Di-O-benzyl-4,6-O-benzyliden- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose in 1.0 mL Acetanhydrid gelöst und mit 8.0 mg (97.5  $\mu\text{mol}$ ) Natriumacetat umgesetzt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung analysenrein erhalten.

Ausbeute: 110 mg (222  $\mu\text{mol}$ , 100 %) eines gelben Öls. Verhältnis  $\alpha/\beta = 1 : 2$

$\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_7$  [ $M = 490.55$  g/mol]

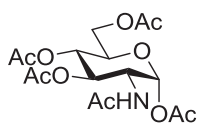
$R_f = 0.64$  ( $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 513.19 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 513.19), 529.17 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 529.16)

$[\alpha]_D^{23} = -6.3^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H}$ -NMR [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.55 - 7.28 (m, 23 H,  $\text{H}_{\text{Ar-}\alpha\beta}$ ), 6.30 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=4.03$  Hz, 0.5 H, H-1 $\alpha$ ), 5.73 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=8.07$  Hz, 1 H, H-1 $\beta$ ), 5.59 (s, 1.5 H, CH-Bnz- $\alpha\beta$ ), 4.98 (s, 0.5 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\alpha$ ), 4.95 (s, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\beta$ ), 4.90 - 4.86 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\alpha$ ), 4.86 - 4.83 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\beta$ ), 4.80 (s, 0.5 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\alpha$ ), 4.77 (s, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\beta$ ), 4.73 - 4.70 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}\beta$ ), 4.39 (dd,  $^3J_{\text{H3,H2}}=10.45$  Hz,  $^3J_{\text{H3,H4}}=4.95$  Hz, 1 H, H-3 $\beta$ ), 4.32 (dd,  $^3J_{\text{H3,H2}}=10.27$  Hz,  $^3J_{\text{H3,H4}}=4.77$  Hz, 0.5 H, H-3 $\alpha$ ), 3.92 - 3.54 (m, 7.5 H, H-2, H-4, H-5, H-6) $^{\alpha\beta}$ , 2.20 (s, 1.5 H, OAc- $\alpha$ ), 2.08 (s, 3 H, OAc- $\beta$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR [HSQC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 169.15 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}\alpha}$ ), 169.06 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Ac}\beta}$ ), 138.20, 137.95, 137.07, 134.45 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph-}\alpha\beta}$ ), 129.74, 129.01, 128.98, 128.67, 128.63, 128.53, 128.47, 128.40, 128.34, 128.31, 128.25, 128.08, 128.05, 128.02, 127.99, 127.95, 127.90, 127.83, 127.77, 127.64, 125.98, 125.95 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph-}\alpha\beta}$ ), 101.26 (CH-Bnz- $\alpha$ ), 101.22 (CH-Bnz- $\beta$ ), 94.07 (C-1 $\beta$ ), 90.40 (C-1 $\alpha$ ), 84.00, 81.51, 81.27, 81.10, 80.86, 80.65, 78.59, 78.28, 78.05, 75.82, 75.40, 75.15, 74.96, 73.70, 69.90, 69.69, 66.65, 64.74, 62.11 (C-2, C-4, C-5, C-6,  $\text{CH}_2\text{-Bn-}$ ;  $\alpha\beta$ ), 68.73 (C-3 $\alpha$ ), 68.50 (C-3 $\beta$ ), 21.08, 20.88 (OAc- $\alpha\beta$ ).

**1-O-Acetyl-2-N-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose (82b)**<sup>[262]</sup>

Es wurde das Glucosamin-Hydrochlorid (295 mg, 1.65 mmol) in 4 mL Acetanhydrid gelöst und Natriumacetat (311 mg, 3.79 mmol) zugegeben.

Das Gemisch wurde 4 h bei 80 °C und danach 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Ohne weitere Reinigung wurde das Produkt rein erhalten.

Ausbeute: 566 mg (1.45 mmol, 88 %) eines farblosen, viskosen Öls.

$C_{16}H_{23}NO_{10}$  [M = 389.36 g/mol]

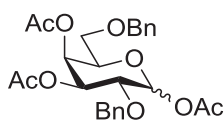
$R_f = 0.20$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:2)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 412.12 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 412.12), 428.11 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 428.09), 801.25 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 801.25)

$[\alpha]_D^{23} = +50.6^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.:  $\alpha$ -Anomer:  $[\alpha]_D^{23} = +92^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[263]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 6.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=3.30 Hz, 1 H, H-1), 5.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH,H2</sub>=8.80 Hz, 1 H, NH), 5.30 - 5.04 (m, 2 H, H-3, H-4), 4.54 - 4.40 (m, 1 H, H-2), 4.23 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H6a,H6b</sub>=12.47, <sup>3</sup>J<sub>H6a,H5</sub>=4.03 Hz, 1 H, H-6a), 4.07 - 3.95 (m, 2 H, H-5, H-6b), 2.17, 2.07, 2.03, 2.02 (4 × s, 12 H, 4 × OAc), 1.92 (s, 3 H, NHAc).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 171.75, 170.69, 169.94, 169.07, 168.60 (C=O<sub>Ac</sub>), 90.65 (C-1 $\alpha$ ), 70.64 (C-3), 69.68 (C-5), 67.41 (C-4), 61.49 (C-6), 51.03 (C-2), 23.04 (NHAc), 20.94, 20.72, 20.68, 20.56 (OAc).

**1,3,4-Tri-O-acetyl-2,6-di-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (82c)**

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 241 mg (537  $\mu$ mol)

2,6-Di-O-benzyl-3,4-O-benzyliden-D-galactopyranose<sup>[39]</sup> in 2.0 mL

Acetanhydrid gelöst und mit 10.0 mg (122  $\mu$ mol) Natriumacetat umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex → <sup>c</sup>Hex/EtOAc 10:1).

Ausbeute: 152 mg (310  $\mu$ mol, 58 %) eines orangenen Öls. Verhältnis  $\alpha/\beta = 1 : 3$

$C_{29}H_{30}O_9$  [M = 486.52 g/mol]

$R_f = 0.54$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

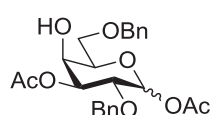
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 509.15 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 509.18), 525.15 ( $[M+K]^+$ , ber.: 525.15), 995.35 ( $[2M+Na]^+$ , ber.: 995.37)

$[\alpha]_D^{23} = +3.6^\circ$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ )

$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.37 - 7.27 (m, 14 H,  $H_{Ar-\alpha\beta}$ ), 6.24 (d,  $^3J_{H1,H2}=4.40$  Hz, 0.3 H, H-1 $\alpha$ ), 5.70 (d,  $^3J_{H1,H2}=8.07$  Hz, 1 H, H-1 $\beta$ ), 5.51 (d,  $^3J_{H4,H3}=2.93$  Hz, 1 H, H-4 $\beta$ ), 5.30 (dd,  $^3J_{H3,H2}=10.64$  Hz,  $^3J_{H3,H4}=3.30$  Hz, 0.3 H, H-3 $\alpha$ ), 5.08 (dd,  $^3J_{H3,H2}=10.09$  Hz,  $^3J_{H3,H4}=3.48$  Hz, 1 H, H-3 $\beta$ ), 4.70 - 4.45 (m, 5.5 H,  $CH_2$ -Bn- $\alpha\beta$ ), 4.19 (dd,  $^3J_{H2,H3}=7.34$  Hz,  $^3J_{H2,H1}=4.40$  Hz, 1 H, H-2 $\alpha$ ), 4.03 - 3.95 (m, 1 H, H-5 $\beta$ ), 3.80 (dd,  $^3J_{H2,H3}=10.09$  Hz,  $^3J_{H2,H1}=8.25$  Hz, 1 H, H-2 $\beta$ ), 3.72 - 3.63 (m, 1.5 H, H-5 $\alpha$ , H-6 $\alpha$ ), 3.56 (dd,  $^2J_{H6a,H6b}=9.35$  Hz,  $^3J_{H6,H5}=5.69$  Hz, 1 H, H-6 $\beta$ ), 3.46 (dd,  $^2J_{H6a,H6b}=9.54$  Hz,  $^3J_{H6,H5}=7.34$  Hz, 1 H, H-6 $\beta$ ), 2.10, 2.08, 2.05, 1.98 (4  $\times$  s, 12 H, OAc- $\alpha\beta$ ).

$^{13}C$ -NMR [HSQC] (101 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.42, 169.90, 169.75, 169.53, 168.82 (C=O<sub>Ac</sub>- $\alpha\beta$ ), 137.80, 137.76, 137.35 ( $C_{ipso}$ -Ph- $\alpha\beta$ ), 128.44, 128.37, 128.31, 127.93, 127.89, 127.77, 127.63, 127.51, 127.35 ( $C_{o,m,p}$ -Ph- $\alpha\beta$ ), 93.94 (C-1 $\beta$ ), 93.52 (C-1 $\alpha$ ), 86.01 (C-5 $\alpha$ ), 81.61 (C-2 $\alpha$ ), 75.61 (C-2 $\beta$ ), 74.91, 74.29, 73.38, 73.09 ( $CH_2$ -Bn- $\alpha\beta$ ), 72.68 (C-3 $\beta$ ), 72.47 (C-5 $\beta$ ), 71.90 (C-4 $\alpha$ ), 70.48 (C-3 $\alpha$ ), 68.2 (C-6 $\alpha$ ), 67.60 (C-4 $\beta$ ), 66.82 (C-6 $\beta$ ), 21.20, 21.08, 20.88, 20.79, 20.62, 20.59 (OAc- $\alpha\beta$ ).

### 1,3-Di-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (82d)



Das Produkt wurde als Nebenprodukt aus der Umsetzung von 2,6-Di-*O*-benzyl-3,4-*O*-benzyliden-D-galactopyranose<sup>[39]</sup> erhalten.

Ausbeute: 66.6 mg (150  $\mu$ mol, 28 %) eines gelben Öls. Verhältnis  $\alpha/\beta = 1 : 5$

$C_{24}H_{28}O_8$  [M = 444.48 g/mol]

$R_f = 0.29$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 2:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 467.14 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 467.17), 483.14 ( $[M+K]^+$ , ber.: 483.14), 911.34 ( $[2M+Na]^+$ , ber.: 911.35)

$[\alpha]_D^{23} = +32.2^\circ$  (c = 2.0,  $CHCl_3$ )

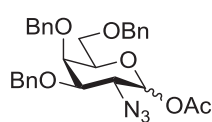
$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.42 - 7.20 (m, 12 H,  $H_{Ar-\alpha\beta}$ ), 6.44 (d,  $^3J_{H1,H2}=3.67$  Hz, 0.2 H, H-1 $\alpha$ ), 5.65 (d,  $^3J_{H1,H2}=8.07$  Hz, 1 H, H-1 $\beta$ ), 5.20 (dd,  $^3J_{H3,H2}=10.64$  Hz,  $^3J_{H3,H4}=2.93$  Hz, 0.2 H, H-3 $\alpha$ ), 4.95 (dd,  $^3J_{H3,H2}=10.09$  Hz,  $^3J_{H3,H4}=3.12$  Hz, 1 H, H-3 $\beta$ ), 4.48 - 4.76 (m, 5 H,  $CH_2$ -Bn- $\alpha\beta$ ), 4.32 (d,  $^3J_{H4,H3}=2.57$  Hz, 0.2 H, H-4 $\alpha$ ), 4.24 (d,

$^3J_{H_4,H_3}=2.93$  Hz, 1 H, H-4 $\beta$ ), 4.15 (dd,  $^3J_{H_2,H_3}=10.45$  Hz,  $^3J_{H_2,H_1}=3.85$  Hz, 0.2 H, H-2 $\alpha$ ), 3.98 (dd,  $^3J_{H_2,H_3}=9.90$  Hz,  $^3J_{H_2,H_1}=8.07$  Hz, 1 H, H-2 $\beta$ ), 3.70 - 3.84 (m, 3.8 H, H-5 $\alpha\beta$ , H-6 $\alpha\beta$ ), 2.15, 2.12 (2  $\times$  s, 2  $\times$  0.6 H, 2  $\times$  OAc- $\alpha$ ), 2.09, 2.08 (2  $\times$  s, 2  $\times$  3 H, 2  $\times$  OAc- $\beta$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR [HSQC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.13, 169.09 (C=O<sub>Ac</sub>), 137.96, 137.07 (C<sub>ipso</sub>-Ph- $\alpha\beta$ ), 129.68, 128.94, 128.47, 128.37, 128.34, 127.95, 127.84, 127.80, 127.74, 127.60 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph- $\alpha\beta$ ), 94.29 (C-1 $\beta$ ), 90.41 (C-1 $\alpha$ ), 75.45 (C-2), 74.96 (C-3), 73.89, 73.79 (CH<sub>2</sub>-Bn), 72.99 (C-5), 70.31 (C-6 $\alpha$ ), 69.45 (C-6 $\beta$ ), 68.97 (C-4 $\alpha$ ), 68.22 (C-4 $\beta$ ), 21.04, 20.95 (OAc).

Signale des  $\alpha$ -Anomers waren im  $^{13}\text{C}$ -NMR kaum sichtbar.

### 1-O-Acetyl-2-azido-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**85**)<sup>[264]</sup>



Es wurde 3,4,6-Tri-O-benzyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**81**) (2.41 g, 5.07 mmol) in 40 mL Pyridin gelöst und 10.0 mL (106 mmol) Acetanhydrid zugegeben. Das Gemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur

gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel filtriert (EtOAc).

Ausbeute: 2.50 g (4.83 mmol, 95 %) eines gelben Öls. Verhältnis  $\alpha/\beta = 3 : 1$

$\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$  [M = 517.58 g/mol]

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

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 540.24 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 540.21), 556.22 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 556.18), 535.31 ([M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, ber.: 535.25), 1057.50 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1057.43)

$[\alpha]_D^{23} = +49.7^\circ$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit.:  $[\alpha]_D^{20} = +48.0^\circ$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[258]</sup>

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.45 - 7.26 (m, 20 H, H<sub>Ar</sub>- $\alpha\beta$ ), 6.25 (d,  $^3J_{H_1,H_2}=3.67$  Hz, 1 H, H-1 $\alpha$ ), 5.42 (d,  $^3J_{H_1,H_2}=8.44$  Hz, 0.3 H, H-1 $\beta$ ), 4.90 (d,  $^3J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2}=11.37$  Hz, 1.3 H, CH<sub>2</sub>-Bn- $\alpha\beta$ ), 4.80 - 4.39 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>-Bn- $\alpha\beta$ ), 4.18 - 4.07 (m, 2.3 H, H-2 $\alpha$ , H-4 $\alpha$ , H-5 $\beta$ ), 4.04 - 3.96 (m, 2.6 H, H-2 $\beta$ , H-4 $\beta$ , H-5 $\alpha$ , H-6 $\alpha$ ), 3.92 (dd,  $^3J_{H_3,H_2}=12$  Hz,  $^3J_{H_3,H_4}=4$  Hz, 0.3 H, H-3 $\alpha$ ), 3.69 - 3.48 (m, 0.6 H, H-6 $\beta$ ), 3.45 (dd,  $^3J_{H_3,H_2}=10.27$  Hz,  $^3J_{H_3,H_4}=2.93$  Hz, 0.3 H, H-3 $\beta$ ), 2.14 (s, 3 H, OAc- $\alpha$ ), 2.06 (s, 1 H, OAc- $\beta$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 169.07 (C=O<sub>Ac</sub>  $\alpha\beta$ ), 138.09, 137.58, 137.31, 137.26 (C<sub>ipso</sub>-Ph- $\alpha\beta$ ), 128.54, 128.47, 128.33, 128.28, 128.22, 128.04, 127.98, 127.93, 127.82, 127.78 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph- $\alpha\beta$ ), 93.07 (C-1 $\beta$ ), 91.11 (C-1 $\alpha$ ), 80.70 (C3- $\beta$ ), 77.60 (C-3 $\alpha$ ), 74.92, 74.75, 74.20

(CH<sub>2</sub>-Bn), 73.63 (C-4 $\alpha$ ), 73.53 (C-5 $\beta$ ), 72.68, 72.49 (C-4 $\beta$ ), 71.77 (C-5 $\alpha$ ), 71.65 (C-6 $\alpha$ ), 67.99, 67.64 (C-6 $\beta$ ), 61.87 (C-2 $\beta$ ), 58.95 (C-2 $\alpha$ ), 21.06, 20.99 (OAc- $\alpha\beta$ ).

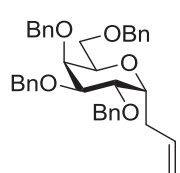
Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[265]</sup>

### 5.4.3 Allylierungen

#### *Allgemeine Versuchsdurchführung zur C-Allylierung im Mikrowellen-Durchfluss-Reaktor*

Es wurde die entsprechende Pyranose in 0.5 mL absol. Acetonitril gelöst und zuerst 8 Äquiv. Allyl-TMS zugespritzt. Die Reaktionslösung wurde homogenisiert. Dann wurden 16 Äquiv. 48%ige BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> in THF tropfenweise zugegeben. Das Gemisch wurde in die Probenschleife injiziert, und es wurde mit 0.5 mL absol. MeCN nachgespült. Mit 12 mL/h wurde das Lösungsmittel durch die Probenschleifen in den Reaktor befördert. Die Verweilzeit im Reaktor betrug 20 min bei einer Mikrowellenleistung von max. 50 W bei 30 °C. Die Produktlösung wurde in ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung aufgefangen. Anschließend wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 × 5 mL), die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ggf. säulenchromatographisch gereinigt.

#### 1-Allyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-1-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (87)



Nach allgemeiner Synthesevorschrift

Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 14.9 mg (25.6  $\mu$ mol) 1-O-Acetyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (**83**), Allyl-TMS (**86**) (36.0  $\mu$ L, 205  $\mu$ mol) und 48%ige BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> in THF (39.0  $\mu$ L, 452  $\mu$ mol) umgesetzt. Das Produkt wurde analysenrein erhalten.

Ausbeute: 13.4 mg (23.7  $\mu$ mol, 93 %) eines gelben Öls.

#### Alternativmethode im Kolben<sup>[191]</sup>

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre und Rühren wurde zur 1-O-Acetyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl-D-galactopyranose (**83**) (38.0 mg, 65.2  $\mu$ mol) in 1 mL absol. Acetonitril Allyl-TMS (**86**) (20.0  $\mu$ L, 126  $\mu$ mol, 2 Äquiv.) zugespritzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und 48%ige BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> in THF (32.0  $\mu$ L, 254  $\mu$ mol, 4 Äquiv.) tropfenweise zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde 24 h bei 0 °C weiter gerührt. Anschließend wurde ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (2 × 5 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub>

getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt ohne weitere Reinigung analysenrein erhalten.

Ausbeute: 36.0 mg (63.7  $\mu\text{mol}$ , 98 %) eines gelben Öls.

$\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_5$  [M = 564.72 g/mol]

$R_f = 0.72$  ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

$[\alpha]_D^{23} = +31.6^{\circ}$  (c = 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{20} = +34.2^{\circ}$  (c = 1.02,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[191]</sup>

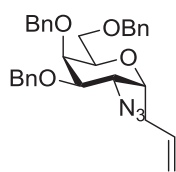
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 565.31 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 565.29), 582.30 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , ber.: 582.32), 587.27 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 587.28), 603.28 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 603.25)

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.44 - 7.17 (m, 20 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.90 - 5.64 (m, 1 H, =CH-All), 5.14 - 5.02 (m, 2 H, = $\text{CH}_2$ -All), 4.78 - 4.39 (m, 8 H,  $\text{CH}_2$ -Bn), 4.14 - 3.97 (m, 3 H, H-1, H-4, H-2), 3.92 - 3.82 (m, 1 H, H-3), 3.81 - 3.64 (m, 3 H, H-5, H-2), 2.50 - 2.29 (m, 2 H, - $\text{CH}_2$ -All).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 138.55, 138.44, 138.41, 138.23 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$ ), 135.08 (=CH-All), 128.32, 128.26, 128.17, 127.90, 127.84, 127.72, 127.56, 127.50, 127.43 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$ ), 116.76 (=CH<sub>2</sub>-All), 76.39, 74.20, 73.15, 73.03, 72.98, 72.52 (C-1, C-2, C-3, C-3, C-4, C-5,  $\text{CH}_2$ -Bn), 67.19 (C-6), 29.68 (- $\text{CH}_2$ -All).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[191]</sup>

### 1-Allyl-2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-didesoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (89a)



Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 15.5 mg (29.9  $\mu\text{mol}$ ) 1-*O*-Acetyl-2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**85**), Allyl-TMS (**86**) (38  $\mu\text{L}$ , 239  $\mu\text{mol}$ ) und 48%ige  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  in THF (43  $\mu\text{L}$ , 489  $\mu\text{mol}$ ) umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  10:1  $\rightarrow$   $^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1).

Ausbeute: 7.6 mg (15.2  $\mu\text{mol}$ , 51 %) eines farblosen Öls.

#### Alternativmethode im Kolben<sup>[266]</sup>

Zunächst wurde 1-*O*-Acetyl-2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**85**) (108 mg, 209  $\mu\text{mol}$ ) in 1 mL absol. Acetonitril gelöst und dann Allyl-TMS (**86**) (64.0  $\mu\text{L}$ , 403  $\mu\text{mol}$ , 2 Äquiv.) zugespritzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0  $^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und 48 %ige  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  Lösung in THF (36.0  $\mu\text{L}$ , 417  $\mu\text{mol}$ , 2 Äquiv.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 6 d bei 7  $^{\circ}\text{C}$  gelagert. Danach wurde mit 1 mL ges. Natriumhydrogencar-

bonatlösung neutralisiert, mit Dichlormethan rück-extrahiert ( $3 \times 1$  mL), die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (in der Kälte!). Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^c$ Hex/EtOAc, 10:1).

Ausbeute: 75.6 mg (151  $\mu$ mol, 72 %) eines farblosen Öls.\*

#### Alternativmethoden in Mikrowelle/Ultraschall im batch

Zu 53.0 mg (102  $\mu$ mol) 1-*O*-Acetyl-2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose (**85**) in 1 mL absol. Acetonitril wurden unter einer Ar-Atmosphäre Allyl-TMS (**86**) (32.0  $\mu$ l, 202  $\mu$ mol, 2 Äquiv.) und 48 %ige  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  Lösung in THF (18.0  $\mu$ l, 209  $\mu$ mol, 2 Äquiv.) zugespritzt. Die Reaktionsmischung wurde 30 min im Ultraschallbad (50/60 Hz  $\times$  230 V) bzw. in der Mikrowelle (50 W, max. 25  $^\circ\text{C}$ ) behandelt. Danach wurde mit 1 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, mit Dichlormethan rück-extrahiert ( $3 \times 1$  mL), die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (in der Kälte!). Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $^c$ Hex/EtOAc, 10:1).

Ausbeute: Ultraschallbad: 18.0 mg (36.0  $\mu$ mol, 35 %), Mikrowelle: 19.5 mg (39.0  $\mu$ mol, 39 %)

$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$  [M = 499.61 g/mol]

$R_f = 0.56$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 2:1)

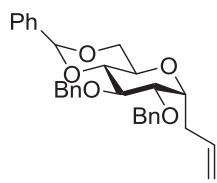
HPLC-MS (*positiv*): (m/z): 500.3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 500.25), 517.3 ( $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , ber.: 517.28), 522.3 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 522.24)

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.41 - 7.28 (m, 15 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.88 - 5.68 (m, 1 H, =CH-All), 5.19 - 5.04 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 4.84 - 4.40 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.12 - 3.96 (m, 4 H, H-1, H-2, H-3, H-5), 3.76 - 3.63 (m, 3 H, H-4, H-6), 2.40 - 2.28 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-All).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 138.25, 138.22, 138.09, 137.84, 137.65, 137.59, 137.44 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$ ), 134.17 (=CH-All), 128.54, 128.47, 128.44, 128.37, 128.32, 128.24, 128.05, 127.94, 127.90, 127.86, 127.80, 127.68, 127.61 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$ ), 117.34 (=CH<sub>2</sub>-All), 75.08, 74.87, 74.81, 73.90, 73.56, 73.36, 73.17, 72.77, 72.47, 72.13, 71.67, 71.29, 70.17, 68.33 (C-2, C-3, C-4, C-5, CH<sub>2</sub>-Bn), 64.80 (C-1), 60.96 (C-6), 59.31 (C-2), 26.90 (-CH<sub>2</sub>-All).

\*Bei Raumtemperatur ist das Produkt sehr instabil, sodass keine vollständige Analytik durchgeführt werden konnte.

### 1-Allyl-2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden-1-desoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosid (**90a**)



Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 49.4 mg (0.10 mmol) 1-*O*-Acetyl-2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose (**82a**), Allyl-TMS (**86**) (125  $\mu$ L, 0.79 mmol) und 48%ige  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  in THF (135  $\mu$ L, 1.56 mmol) umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( ${}^c\text{Hex} \rightarrow {}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  10:1) und als Edukt/Produkt-Gemisch (1 : 1.6) erhalten.

Ausbeute: 48.7 mg (max. 0.10 mmol) eines gelben Öls.

$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_5$  [ $M = 472.58$  g/mol]

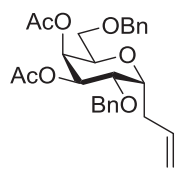
$R_f = 0.70$  ( ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 495.20 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 495.21), 511.19 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 511.19)

Charakteristische Signale des Produkts:

${}^1\text{H-NMR}$  [ ${}^1\text{H-}{}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 5.91 - 5.73 (m, 1 H,  $=\text{CH}_2\text{-All}$ ), 5.49 - 5.42 (m, 1 H, CH-Bnz), 5.11 - 4.99 (m, 2 H,  $=\text{CH}_2\text{-All}$ ), 2.76 - 2.59 (m, 1 H,  $-\text{CH}_2\text{-All}$ ), 2.51 - 2.38 (m, 1 H,  $-\text{CH}_2\text{-All}$ ).

### 3,4-Di-*O*-acetyl-1-allyl-2,6-di-*O*-benzyl-1-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**90c**)



Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 45.1 mg (92.7  $\mu$ mol) 1,3,4-Tri-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (**82c**), Allyl-TMS (**86**) (115  $\mu$ L, 724  $\mu$ mol) und 48%ige  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  in THF (125  $\mu$ L, 1.45 mmol) umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  10:1).

Ausbeute: 28.4 mg (60.6  $\mu$ mol, 65 %) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_7$  [ $M = 468.55$  g/mol]

$R_f = 0.43$  ( ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

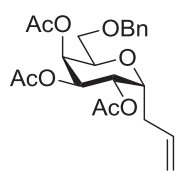
ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 491.19 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 491.20), 507.18 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 507.18), 959.42 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 959.42)

$[\alpha]_D^{23} = +13.4^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +60.0^\circ$  ( $c = 0.5$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )<sup>[267]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.42 - 7.20 (m, 10 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.88 - 5.71 (m, 1 H, =CH-All), 5.53 - 5.44 (m, 1 H, H-4), 5.42 - 5.33 (m, 1 H, H-2), 5.24 - 5.17 (m, 1 H, H-3), 5.12 - 5.03 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 4.69 - 4.50 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.22 - 4.16 (m, 1 H, H-1), 4.06 - 3.99 (m, 1 H, H-5), 3.51 (dd,  $^2J_{\text{H6a,H6b}}=9.90$  Hz,  $^3J_{\text{H6,H5}}=6.24$  Hz, 1 H, H-6a), 3.42 (dd,  $^2J_{\text{H6a,H6b}}=9.54$  Hz,  $^3J_{\text{H6,H5}}=6.24$  Hz, 1 H, H-6b), 2.63 - 2.42 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-All), 2.03, 2.00 (2  $\times$  s, 6 H, 2  $\times$  OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$  {HSQC} (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.10, 170.07 (C=O<sub>Ac</sub>), 137.95, 137.73 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 134.36 (=CH-All), 128.50, 128.38, 128.34, 127.90, 127.79, 127.57, 127.54 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 117.21 (=CH<sub>2</sub>-All), 73.84 (C-1), 73.34, 73.11 (CH<sub>2</sub>-Bn), 70.96 (C-2), 70.02 (C-3), 68.72 (C-4), 68.53 (C-5), 67.76 (C-6), 29.67 (-CH<sub>2</sub>-All), 20.85, 20.69 (OAc).

### 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-allyl-6-*O*-benzyl-1-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (90d)



Gemäß der allgemeinen Synthesevorschrift wurden 54.0 mg (123  $\mu\text{mol}$ ) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose,<sup>[201]</sup> Allyl-TMS (86) (153  $\mu\text{L}$ , 963  $\mu\text{mol}$ ) und 48%ige  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  in THF (165  $\mu\text{L}$ , 1.91 mmol) umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  10:1  $\rightarrow$   $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1).

Ausbeute: 41.8 mg (99.4  $\mu\text{mol}$ , 81 %) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_8$  [ $M = 420.46$  g/mol]

$R_f = 0.32$  ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 443.14 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 443.17), 459.14 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 459.14), 863.36 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 863.36)

$[\alpha]_D^{23} = +56.1^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

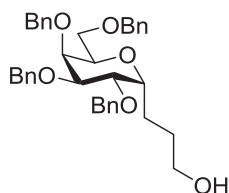
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.37 - 7.23 (m, 5 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.89 - 5.70 (m, 1 H, =CH-All), 5.55 - 5.46 (m, 1 H, H-4), 5.34 - 5.27 (m, 1 H, H-2), 5.25 - 5.16 (m, 1 H, H-3), 5.15 - 5.07 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 4.59 - 4.52 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.47 - 4.39 (m, 1 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.35 - 4.25 (m, 1 H, H-1), 4.03 (td,  $^3J_{\text{H5,H4}}=6.24$  Hz,  $^3J_{\text{H5,H6}}=1.47$  Hz, 1 H, H-5), 3.53 (dd,  $^2J_{\text{H6a,H6b}}=9.54$  Hz,  $^3J_{\text{H6,H5}}=6.24$  Hz, 1 H, H-6a), 3.43 (dd,  $^2J_{\text{H6a,H6b}}=9.72$  Hz,  $^3J_{\text{H6,H5}}=6.42$  Hz, 1 H, H-6b), 2.62 - 2.41 (m, 1 H, -CH<sub>2</sub>-All), 2.37 - 2.23 (m, 1 H, -CH<sub>2</sub>-All), 2.05 (2  $\times$  s, 6 H, 2  $\times$  OAc), 2.00 (s, 3 H, OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 170.06 (C=O<sub>Ac</sub>), 137.63 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 133.52 (=CH-All), 128.37, 127.84, 127.80, 127.74 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 117.59 (=CH<sub>2</sub>-All), 73.40 (CH<sub>2</sub>-Bn),

72.28 (C-1), 68.79 (C-5), 68.27, 68.21 (C-2, C-3, C-4), 67.52 (C-6), 30.44 (-CH<sub>2</sub>-All), 20.79, 20.70, 20.64 (OAc).

#### 5.4.4 Synthese des Galactosylaldehydbausteins

##### 3-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanol (**93**)<sup>[214]</sup>



Es wurde 1-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**87**) (60.0 mg, 106  $\mu$ mol) unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre vorgelegt und mit 0.5 mL (250  $\mu$ mol) 9-BBN-Lösung (0.5 M in THF) versetzt. Das Gemisch wurde 8 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde mit EtOH (0.5 mL) verdünnt, und bei 0 °C wurden je 0.5 mL 3 N NaOH und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben. Danach wurde 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurden je 2 mL ges. NaCl-Lösung und Diethylether zugeben und die wässrige Phase mit Diethylether (2  $\times$  2 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (2  $\times$  2 mL) erneut gewaschen und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 10:1  $\rightarrow$  <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 44.1 mg (62.5  $\mu$ mol, 74 %) eines farblosen Öls.

C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub> [M = 582.74 g/mol]

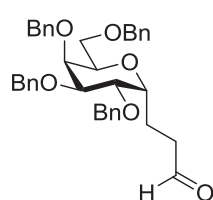
R<sub>f</sub> = 0.20 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 605.25 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 605.29), 1187.51 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1187.58)

$[\alpha]_D^{23} = +21.5^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +50.1^\circ$  (c = 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)<sup>[212]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.42 - 7.21 (m, 20 H, H<sub>Ar</sub>), 4.79 - 4.44 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.09 - 3.93 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>-OH, H-3), 3.90 - 3.77 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.73 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2,H3</sub>=7.15 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1</sub>=2.38 Hz, 1 H, H-2), 3.69 - 3.54 (m, 3 H, H-6, H-1), 2.06 (br. s., 1 H, OH), 1.82 - 1.55 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>' , CH<sub>2</sub>'').

<sup>13</sup>C-NMR {HSQC} (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 138.52, 138.34, 138.24, 138.05 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 128.41, 128.32, 128.25, 128.08, 127.92, 127.84, 127.71, 127.61, 127.54, 127.46 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 76.91 (C-3), 74.32 (C-4), 73.27, 73.21, 73.14, 73.03 (CH<sub>2</sub>-Bn), 72.09 (C-1), 67.80 (C-2, C-5, C-6), 62.36 (CH<sub>2</sub>OH), 29.70 (CH<sub>2</sub>''), 23.48 (CH<sub>2</sub>').

**3-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanal (94)**

Ein Gemisch aus 44.1 mg (75.7  $\mu$ mol) 3-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanol (**93**), trockenem Dichlormethan und pulverförmigen Molsieben 4 Å wurden unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre zunächst 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 2.00 mg (9.27  $\mu$ mol) Pyridiniumchlorochromat zugegeben und eine weitere Stunde gerührt. Danach wurde über Kieselgel filtriert, mit Dichlormethan nachgewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 10:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 5:1).

Ausbeute: 12.3 mg (21.2  $\mu$ mol, 28 %) eines farblosen Öls.

C<sub>37</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> [M = 580.72 g/mol]

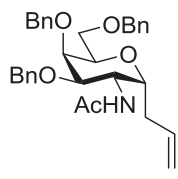
R<sub>f</sub> = 0.45 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +13.9 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 603.24 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 603.27), 619.23 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 619.26), 1183.54 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1183.55)

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 9.75 (s, 1 H, CHO), 7.38 - 7.28 (m, 20 H, H<sub>Ar</sub>), 4.79 - 4.46 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.02 - 3.88 (m, 3 H, H-1, H-3, H-4), 3.86 - 3.70 (m, 3 H, H-2, H-5, H-6a), 3.65 - 3.56 (m, 1 H, H-6b), 2.62 - 2.35 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>''), 2.05 - 1.78 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>').

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 202.21 (C=O), 138.49, 138.40, 138.24, 138.15 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 128.37, 128.30, 127.96, 127.90, 127.77, 127.63, 127.58, 127.49 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 76.61 (C-3), 74.27, 73.28, 73.17, 73.03 (C-1, C-2, C4, C-5, CH<sub>2</sub>-Bn), 67.62 (C-6), 40.40 (CH<sub>2</sub>''), 20.11 (CH<sub>2</sub>').

**5.4.5 Synthese des Galactosaminaldehydbausteins****1-Allyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (95)**

Unter Eiskühlung wurde zu einer Lösung aus 75.6 mg (151  $\mu$ mol) 1-Allyl-2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**89a**) in 1.5 mL eines Tetrahydrofuran/Acetanhydrid/Essigsäure (3:2:1)-Gemisches aktiviertes Zinkpulver gegeben. Das Zinkpulver (15.8 mg, 242  $\mu$ mol) wurde zuvor durch mehrfaches Aufschlämmen in verd. Kupfersulfat Lösung (1.13 g Kupfersulfat-Pentahydrat,

gelöst in 10 mL Wasser) aktiviert, mit Wasser gewaschen und mit Diethylether getrocknet. Zunächst wurde 2 h bei 0 °C gerührt und die Temperatur schrittweise auf Raumtemperatur erhöht. Nach 20 h wurde mit 1.0 mL Tetrahydrofuran verdünnt, über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Lösungsmittelreste wurden durch Ko-distillation mit Toluol (2 × 1.0 mL) entfernt. Der Rückstand wurde in 1.5 mL Dichlormethan aufgenommen und mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 × 2.0 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan rück-extrahiert (3 × 1.5 mL), die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (<sup>c</sup>Hex/EtOAc 10:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc 2:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 34.0 mg (65.9 μmol, 44 %) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub> [M = 515.65 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.15 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

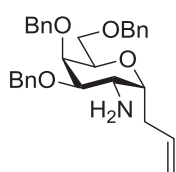
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 516.32 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 516.27), 538.28 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 538.26), 554.28 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 554.23)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +31.7 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.40 - 7.24 (m, 15 H, H<sub>Ar</sub>), 5.61 - 5.76 (m, 1 H, =CH-All), 5.14 - 4.99 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 4.81 - 4.38 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.33 - 4.22 (m, 1 H, H-3), 4.21 - 4.12 (m, 2 H, H-2, H-4), 4.12 - 4.05 (m, 1 H, H-1), 3.90 - 3.84 (m, 1 H, H-5), 3.81 - 3.72 (m, 2 H, H-6), 2.34 - 2.22 (m, 1 H, -CH<sub>2</sub>-All), 2.15 - 2.05 (m, 1 H, -CH<sub>2</sub>-All), 1.97 (s, 3 H, NHAc).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 169.72 (C=O<sub>Ac</sub>), 138.41, 138.30, 138.24, 137.72, 137.63 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 133.49 (=CH-All), 128.56, 128.43, 128.34, 128.30, 128.24, 128.02, 127.98, 127.87, 127.76, 127.73, 127.54, 127.49 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 117.33 (=CH<sub>2</sub>-All), 76.17, 75.02, 74.61, 74.38, 73.62, 73.06, 72.63, 72.49, 71.93, 71.68, 71.02, 68.12 (C-2, C-3, C-4, C-5, CH<sub>2</sub>-Bn), 65.99 (C-1), 65.51 (C-6), 49.85 (C-2), 34.83 (-CH<sub>2</sub>-All), 23.21 (Ac).

### 1-Allyl-2-amino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-didesoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**96**)<sup>[219]</sup>



Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 118 mg (236 μmol) 1-Allyl-2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**89a**) in 3 mL trockenem THF gelöst. Anschließend wurden 10.3 mg (277 μmol) LiAlH<sub>4</sub> zugegeben und das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von EtOAc

(0.5 mL) wurde die Reaktion beendet. Anschließend wurde mit 3 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen und die wässrige Phase mit Diethylether ( $2 \times 3$  mL) rück-extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch ( ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  10:1  $\rightarrow$   ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  5:1  $\rightarrow$   ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  2:1  $\rightarrow$   ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$  1:1) gereinigt.

Ausbeute: 109 mg (230  $\mu\text{mol}$ , 97 %) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{NO}_5$  [ $M = 473.61$  g/mol]

$R_f = 0.10$  ( ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

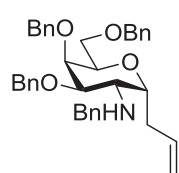
ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 474.24 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 474.26), 496.26 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 496.24), 947.45 ( $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , ber.: 947.52)

$[\alpha]_D^{23} = +58.5^\circ$  ( $c = 2.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

${}^1\text{H-NMR}$  [ ${}^1\text{H}-{}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.43 - 7.25 (m, 15 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.95 - 5.65 (m, 1 H, =CH-All), 5.20 - 5.02 (m, 2 H, = $\text{CH}_2$ -All), 4.81 - 4.71 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ -Bn), 4.67 - 4.45 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ -Bn), 4.12 - 4.02 (m, 1 H, H-1), 4.02 - 3.96 (m, 1 H, H-4), 3.93 - 3.81 (m, 1 H, H-3), 3.80 - 3.68 (m, 1 H, H-2), 3.67 - 3.56 (m, 1 H, H-5), 3.42 - 3.12 (m, 2 H, H-6), 2.49 - 2.21 (m, 2 H, - $\text{CH}_2$ -All), 1.54 (br. s., 2 H,  $\text{NH}_2$ ).

${}^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 138.31, 138.02, 137.90, 137.58, 137.44 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$ ), 134.49 (=CH-All), 128.15, 128.02, 127.95, 127.89, 127.81, 127.65, 127.55, 127.52, 127.42, 127.33, 127.29, 127.20 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$ ), 116.38 (=CH $_2$ -All), 79.30 (C-1), 73.87, 73.14 ( $\text{CH}_2$ -Bn), 72.89 (C-5), 72.33 (C-4), 71.71 (C-3), 71.17, 71.01 ( $\text{CH}_2$ -Bn), 68.72 (C-5), 67.11 (C-2), 50.39 (C-6), 36.39 (- $\text{CH}_2$ -All).

### 1-Allyl-2-benzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-didesoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**97**)



Das Produkt wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von 1-Allyl-2-dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranose (**96**) erhalten.

Ausbeute: 12.4 mg (22.0  $\mu\text{mol}$ , 10 %) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{NO}_4$  [ $M = 563.74$  g/mol]

$R_f = 0.58$  ( ${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

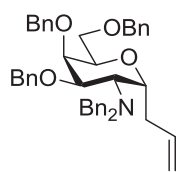
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 564.31 ( $[M+H]^+$ , ber.: 564.31), 586.31 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 586.29), 1149.65 ( $[2M+Na]^+$ , ber.: 1149.65)

$[\alpha]_D^{23} = +69.6^\circ$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ )

$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (600 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.41 - 7.24 (m, 20 H,  $H_{Ar}$ ), 5.93 - 5.70 (m, 1 H, =CH-All), 5.18 - 5.02 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 4.82 - 4.36 (m, 7 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.22 - 4.11 (m, 1 H, H-1), 4.07 - 4.01 (m, 1 H, H-3), 3.98 - 3.88 (m, 1 H, H-4), 3.75 - 3.60 (m, 3 H, H-2, H-5, H-6), 2.51 - 2.33 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-All), 1.73 (br. s., 1 H, NH).

$^{13}C$ -NMR [HSQC, HMBC] (151 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 138.50, 138.15, 138.00 ( $C_{ipso-Ph}$ ), 135.48 (=CH-All), 128.54, 128.43, 128.35, 128.24, 128.08, 127.88, 127.83, 127.71, 127.64, 127.54, 126.95 ( $C_{o,m,p-Ph}$ ), 116.56 (=CH<sub>2</sub>-All), 73.37 (CH<sub>2</sub>-Bn), 72.46 (C-1, C-3, C-4), 71.74 (CH<sub>2</sub>-Bn), 68.18 (C-5, C-6), 51.99 (C-2).

### 1-Allyl-2-dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-dideoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**98**)



Es wurde 1-Allyl-2-amino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-1,2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (**96**) (109 mg, 230  $\mu$ mol) wurden in 0.5 mL DMF gelöst und Kaliumcarbonat (9.70 mg, 70.2  $\mu$ mol) zugegeben. Anschließend wurde 0.5 mL (4.21 mmol) Benzylbromid vorsichtig zugetropft und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 1 mL Wasser und 1 mL Toluol zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige mit Toluol (2  $\times$  2 mL) rück-extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es entstanden zwei Produkte, die säulenchromatographisch ( $^c$ Hex  $\rightarrow$   $^c$ Hex/EtOAc 10:1) getrennt wurden.

Ausbeute: 74.6 mg (114  $\mu$ mol, 50 %) eines farblosen Öls.

$C_{44}H_{47}NO_4$  [M = 653.86 g/mol]

$R_f = 0.63$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 2:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 654.38 ( $[M+H]^+$ , ber.: 654.36), 676.36 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 676.34), 1329.75 ( $[2M+Na]^+$ , ber.: 1329.69)

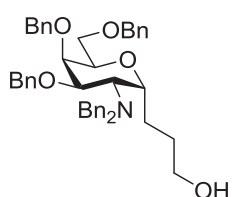
$[\alpha]_D^{23} = -1.3^\circ$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ )

$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (600 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.59 - 7.21 (m, 25 H,  $H_{Ar}$ ), 5.94 - 5.77 (m, 1 H, =CH-All), 5.21 - 5.04 (m, 2 H, =CH<sub>2</sub>-All), 4.99 - 4.79 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.72 - 4.44 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.28 - 4.21 (m, 1 H, NCH<sub>2</sub>-Bn), 4.11 - 4.05 (m, 1 H, NCH<sub>2</sub>-Bn),

4.03 - 3.90 (m, 3 H, H-1, H-3, NCH<sub>2</sub>-Bn), 3.90 - 3.74 (m, 2 H, H-2, H-4), 3.74 - 3.46 (m, 3 H, H-5, H-6), 2.68 - 2.43 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-All).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC, HMBC] (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 140.15, 138.78, 138.70, 138.10, 138.04, 137.99, 136.63 (C<sub>ipso</sub>-Ph), 135.84 (=CH-All), 129.64, 128.70, 128.59, 128.55, 128.47, 128.40, 128.36, 128.32, 128.21, 128.11, 128.06, 128.00, 127.95, 127.92, 127.81, 127.77, 127.70, 127.63, 127.50, 127.38, 126.79 (C<sub>o,m,p</sub>-Ph), 116.19 (=CH<sub>2</sub>-All), 82.32 (C-3), 78.94 (NCH<sub>2</sub>-Bn), 77.21 (C-1), 76.57, 74.06, 73.52, 73.43, 72.08, 70.08 (C-4, C-5, CH<sub>2</sub>-Bn), 68.97 (C-6), 66.63, 65.63 (CH<sub>2</sub>-Bn), 56.28 (C-2), 36.72 (-CH<sub>2</sub>-All).

### 3-(2-Dibenzylamino-3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-propanol (99)



Es wurde 1-Allyl-2-dibenzylamino-3,4,6-tri-O-benzyl-1,2-didesoxy-α-D-galactopyranosid (**98**) (74.6 mg, 114 μmol) unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre vorgelegt und 1 mL einer 0.5 M 9-BBN-Lösung in THF (500 μmol) zugespritzt. Das Gemisch wurde 8 h bei 65 °C erhitzt. Anschließend

wurde auf 0 °C herabgekühlt und zunächst 0.5 mL Ethanol sowie 0.5 mL einer wässrigen, 3 M NaOH-Lösung zugegeben. Danach wurden vorsichtig 0.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugetropft. Es wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurden je 2 mL ges. NaCl-Lösung und Diethylether zugeben und die wässrige Phase mit Diethylether (2 × 2 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden erneut mit einer ges. NaCl-Lösung (2 × 2 mL) gewaschen und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 10:1 → <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 77.2 mg (114 μmol, 100 %) eines farblosen Öls.

C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>5</sub> [M = 671.88 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.28 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

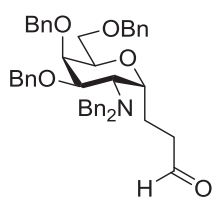
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 672.32 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 672.37), 694.34 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 694.35), 1365.71 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 1365.71)

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -9.6 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.62 - 7.14 (m, 25 H, H<sub>Ar</sub>), 5.00 - 4.76 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.75 - 4.38 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.22 - 4.12 (m, 1 H, NCH<sub>2</sub>-Bn), 4.08 - 3.98 (m, 1 H, NCH<sub>2</sub>-Bn), 3.97 - 3.76 (m, 5 H, CH<sub>2</sub>-OH, H-2, H-3, H-4), 3.72 - 3.50 (m, 4 H, H-1, H-5, H-6), 1.91 - 1.78 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>''), 1.74 - 1.63 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>').

$^{13}\text{C}$ -NMR [HSQC, HMBC] (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 140.22, 138.66, 138.59, 138.07, 137.96, 137.85, 137.77 ( $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-Ph}$ ), 128.46, 128.40, 128.34, 128.19, 128.11, 127.96, 127.90, 127.86, 127.77, 127.70, 127.65, 127.58, 127.46, 127.39, 126.88, 126.78 ( $\text{C}_{\text{o,m,p}}\text{-Ph}$ ), 82.25 (C-3), 76.40, 74.00, 73.52, 72.84, 72.10, 71.98, 70.12, 69.10 (C-1, C-4, C-5,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 62.89 (C-6), 62.33 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 56.32 (C-2), 29.85 ( $\text{CH}_2'$ ), 27.35 ( $\text{CH}_2''$ ).

### 3-(2-Dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanal (100)



Unter einer Ar-Atmosphäre wurde 3-(2-Dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanol (**99**) (63.7 mg, 94.8  $\mu\text{mol}$ ) vorgelegt. Es wurde absol. Dichlormethan mit aktiviertem Molsiebpulver 4 Å zugespritzt und zunächst 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde Pyridiniumchlorochromat (3.00 mg, 13.9  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden je 1 mL Cyclohexan und Diethylether zugegeben und über Kieselgel filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt ( $^c\text{Hex/EtOAc}$ , 10:1).

Ausbeute: 18.2 mg (27.2  $\mu\text{mol}$ , 29 %) eines farblosen Öls.

$\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{NO}_5$  [ $M = 669.86$  g/mol]

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

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 670.24 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 670.35), 692.26 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 692.33)

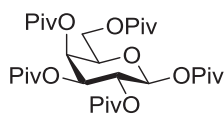
$[\alpha]_D^{23} = -11.9^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

$^1\text{H}$ -NMR [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 9.78 (s, 1 H, CHO), 7.49 - 7.19 (m, 25 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 4.94 - 4.79 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.69 - 4.42 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.23 - 4.14 (m, 1 H,  $\text{NCH}_2\text{-Bn}$ ), 4.08 - 3.99 (m, 1 H,  $\text{NCH}_2\text{-Bn}$ ), 3.98 - 3.88 (m, 2 H, H-3,  $\text{NCH}_2\text{-Bn}$ ), 3.85 - 3.71 (m, 3 H, H-2, H-4, H-5), 3.66 - 3.42 (m, 2.5 H, H-1, H-6), 3.35 - 3.18 (m, 0.5 H, H-6), 2.65 - 2.40 (m, 2 H,  $\text{CH}_2''$ ), 2.16 - 2.01 (m, 2 H,  $\text{CH}_2'$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 202.26 (HC=O), 140.08, 138.62, 138.02 ( $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-Ph}$ ), 128.51, 128.46, 128.41, 128.37, 128.27, 128.15, 127.95, 127.86, 127.80, 127.76, 127.70, 127.64, 127.57, 127.42, 126.85 ( $\text{C}_{\text{o,m,p}}\text{-Ph}$ ), 82.29 (C-3), 76.21, 74.10, 73.49, 72.09, 70.13 (C-1, C-4, C-5,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 68.85 (C-6), 56.27 (C-2), 40.87 ( $\text{CH}_2'$ ,  $\text{CH}_2''$ ).

## 5.4.6 Synthese der Auxiliare

### 1,2,3,4,6-Penta-*O*-pivaloyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (**101**)<sup>[225]</sup>



Zu einer Lösung aus 35.7 mL (290 mmol) Pivaloylchlorid in 150 mL Pyridin und 90 mL Chloroform wurde 8.40 g (46.6 mmol) D-Galactose (**10**) zugegeben und 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 150 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde zunächst mit 2 N Schwefelsäure neutralisiert und danach mit je 50 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das reine  $\beta$ -Produkt wurde nach der Umkristallisation aus Methanol erhalten.

Ausbeute: 6.10 g (10.2 mmol, 22 %) eines farblosen Feststoffs.

C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>11</sub> [M = 600.74 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.90 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

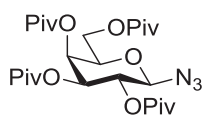
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +10.8 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = +8.3 ° (c = 1.5, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[225]</sup>

Schmp.: 115 °C, Lit.: 117 °C<sup>[225]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 5.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=8.44 Hz, 1 H, H-1), 5.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>H2,H3</sub>=2.93 Hz, 1 H, H-2), 5.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H4,H3</sub>=10.27 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H4,H5</sub> = 8.44 Hz, 1 H, H-4), 5.20 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=10.27 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3,H4</sub>=3.30 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=3.33 Hz, 1 H, H-3), 4.25 - 3.97 (m, 3 H, H-5, H-6ab), 1.29, 1.21, 1.18, 1.14, 1.13 (5 × s, 45 H, 5 × Piv).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[225,227,268]</sup>

### 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- $\beta$ -D-galactopyranosylazid (**102**)<sup>[227]</sup>



Es wurden 6.10 g (10.2 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-pivaloyl- $\beta$ -D-galactopyranose (**101**) in 200 mL Dichlormethan gelöst und 1.50 mL (11.3 mmol) Trimethylsilylazid sowie 1.00 mL (8.56 mmol) Zinntetrachlorid zugegeben. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit je 100 mL Wasser, 1 M Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Umkristallisation aus Methanol wurde ein Produktgemisch erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe verwendet.

Ausbeute: 5.60 g (max. 10.2 mmol) eines farblosen Feststoffs als Produktgemisch.

$C_{26}H_{43}N_3O_9$  [ $M = 541.63$  g/mol]

$R_f = 0.50$  ( $^6\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 564.24 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 564.29), 580.25 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 580.26), 1105.56 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1105.59)

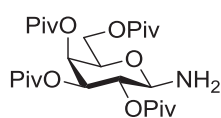
Charakteristische Signale des Produkts:

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 5.46 - 5.42 (m, 1 H, H-4), 5.26 - 5.10 (m, 2 H, H-2, H-3), 4.65 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}} = 8.44$  Hz, 1 H, H-1), 4.25 - 3.99 (m, 3 H, H-5, H-6ab), 1.28, 1.20, 1.14, 1.13 ( $4 \times s$ , 36 H,  $4 \times \text{Piv}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 88.53 (C-1).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[225,227]</sup>

### 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- $\beta$ -D-galactopyranosylamin (103)<sup>[227]</sup>



Zuerst wurde der Katalysator aktiviert, indem 4.60 g einer Aluminium-Nickel Legierung in Wasser aufgenommen und solange mit festem Natriumhydroxid versetzt wurde bis keine Gasentwicklung mehr auftrat. Das

Katalysatorgemisch wurde 30 min auf 70 °C erhitzt, danach neutral gewaschen ( $\text{pH} = 7.5$ ) und mehrfach in Methanol aufgeschlämmt. Der aktivierte Katalysator wurde mit 50 mL Methanol vorgelegt. Unter einer Wasserstoffatmosphäre wurden 5.60 g (max. 10.2 mmol) des Rohprodukts 2,3,4,6-Tetra-*O*- $\beta$ -D-galactopyranosylazids (**102**), gelöst in 50.0 mL Methanol mit 1 % Dichlormethan, zugespritzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol wurde ein farbloser Feststoff als Produktgemisch erhalten, welcher säulenchromatographisch gereinigt wurde (Isolera, Gradienten 100 %  $^6\text{Hex} \rightarrow$  100 % EtOAc).

Ausbeute: 2.28 g (4.42 mmol, 43 % über zwei Stufen) eines farblosen, amorphen Feststoffs.

$C_{26}H_{46}NO_9$  [ $M = 516.31$  g/mol]

$R_f = 0.55$  ( $^6\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 539.26 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 539.30), 555.23 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 555.28), 1055.55 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1055.62), 1071.55 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1071.60).

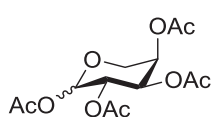
$[\alpha]_D^{23} = +8.5^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), Lit.:  $[\alpha]_D^{22} = +8.1^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[227]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 5.57 - 5.46 (m, 2 H, H-3, H-4), 5.24 - 5.03 (m, 1 H, H-2), 4.72 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=7.70$  Hz, 1 H, H-1), 4.50 (t,  $^3J_{\text{H5,H6ab}}=7.15$  Hz, 1 H, H-5), 4.18 - 3.93 (m, 2 H, H-6), 1.26, 1.19, 1.18, 1.13 ( $4 \times \text{s}$ , 36 H,  $4 \times \text{Piv}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 177.97, 177.78, 177.21, 177.17, 176.88, 176.79 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{Piv}}$ ), 96.20 (C-1 $\beta$ ), 70.28 (C-2), 68.48 (C-3), 67.27 (C-4), 66.49 (C-5), 61.17 (C-6), 39.06, 38.93, 38.78, 38.74, 38.71 ( $\text{C}_{\text{quart.}}\text{-Piv}$ ), 27.19, 27.15, 27.10, 27.06, 27.03 ( $\text{CH}_3\text{-Piv}$ ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[225,227]</sup>

### 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-arabinopyranosid (**105**)<sup>[227]</sup>



Es wurden 8.00 g (53.3 mmol) D-Arabinose (**104**) in 100 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C langsam mit 60 mL Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 18 h gerührt. Unter vermindertem Druck wurde die Lösung eingengt. Der Rückstand wurde in 50 mL Dichlormethan gelöst und in folgender Reihenfolge gewaschen: mit 2 N Salzsäure ( $2 \times 50$  mL), Wasser ( $1 \times 50$  mL), verd. Natriumhydrogencarbonatlösung ( $2 \times 50$  mL), Wasser ( $1 \times 100$  mL). Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 16.9 g (53.2 mmol, 92 %) gelbes, hochviskoses Öl. Verhältnis  $\alpha/\beta = 2 : 3$

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_9$  ( $M = 318.28$  g/mol)

$R_f = 0.59$  ( $^c\text{Hex/EtOAc}$ , 2:1)

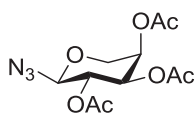
ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 341.05 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 341.08), 357.06 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 357.06), 659.18 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 659.18)

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 6.34 (br. s, 1 H, H-1 $\beta$ ), 5.65 (d,  $^3J_{\text{H1,H2}}=6.97$  Hz, 1 H, H-1 $\alpha$ ), 5.36 - 5.33 (m, 2 H, H-2 $\beta$ , H-4 $\alpha$ ), 5.29 (br. s, 1 H, H-2 $\alpha$ ), 5.10 (dd,  $^3J_{\text{H3,H2}}=8.99$  Hz,  $^3J_{\text{H3,H4}}=3.48$  Hz, 1 H, H-3 $\alpha$ ), 4.43 - 4.31 (m, 1 H, H-4 $\beta$ ), 4.28 - 4.16 (m, 1 H, H-3 $\beta$ ), 4.10 - 3.99 (m, 2 H, H-5 $\beta$ ), 3.86 - 3.73 (m, 2 H, H-5 $\alpha$ ), 2.15, 2.13, 2.12, 2.11, 2.06, 2.03, 2.02 ( $8 \times \text{s}$ , 24 H,  $8 \times \text{OAc-}\alpha/\beta$ ).

Charakteristische Signale der Anomere:

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 92.11 (C-1 $\alpha$ ), 90.15 (C-1 $\beta$ ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[269]</sup>

**2,3,4-Tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosylazid (106)**<sup>[227]</sup>

In 150 mL absolutem Dichlormethan wurden 16.9 g (53.2 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha/\beta$ -D-arabinopyranose (**105**) gelöst. Danach wurden 8.50 mL (64.0 mmol) Trimethylsilylazid und 1.00 mL (8.56 mmol) Zinnchlorid zugegeben und das Gemisch 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Wasser (3  $\times$  50 mL), verd. Natriumhydrogencarbonatlösung (1  $\times$  50 mL) und erneut mit Wasser (1  $\times$  50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 16.4 g (53.7 mmol, 100 %) eines farblosen, viskosen Öls.

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (M = 301.26 g/mol)

R<sub>f</sub> = 0.51 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

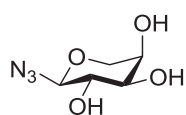
ESI-MS (*positiv*): (m/z): 324.05 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 324.08), 340.09 ([M+K]<sup>+</sup>, ber.: 340.05)

Charakteristische Signale des Produkts:

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 5.29 - 5.24 (m, 1 H, H-4), 5.12 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2,H3</sub>=9.72 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1</sub>=7.89 Hz, 1 H, H-2), 5.02 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H3,H2</sub>=9.72 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3,H4</sub>=3.48 Hz, 1 H, H-3), 4.57 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=7.70 Hz, 1 H, H-1), 4.08 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5a,H5b</sub>=13.20 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5,H4</sub>=2.57 Hz, 1 H, H-5a), 3.73 (dd, <sup>2</sup>J<sub>H5a,H5b</sub>=18.70 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5,H4</sub>=1.50 Hz, 1 H, H-5b), 2.13, 2.06, 1.99 (3  $\times$  s, 9 H, 3  $\times$  OAc).

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 170.24, 170.03, 169.41 (C=O<sub>Ac</sub>), 88.52 (C-1), 70.15 (C-3), 68.41 (C-2), 67.54 (C-4), 65.67 (C-5), 20.92, 20.73, 20.64 (3  $\times$  OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[227,231]</sup>

 **$\alpha$ -D-Arabinopyranosylazid (107)**<sup>[227,229]</sup>

Es wurden 12.1 g (40.2 mmol) des Rohprodukts 2,3,4-Tri-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosylazids (**106**) in 100 mL Methanol gelöst und mit einer 1%igen Natriummethanolatlösung versetzt bis ein pH-Wert von 8.5 - 9 erreicht war. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit Amberlyst<sup>®</sup> 15 neutralisiert, danach filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe verwendet.

Ausbeute: 6.9 g (39.4 mmol, 98 %) eines farblosen Öls.

C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M = 175.14 g/mol)

$R_f = 0.83$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 95:5:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 198.04 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 198.05)

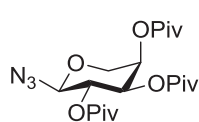
Charakteristische Signale des Produkts:

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 4.26 - 4.15 (m, 1 H, H-1), 3.90 - 3.77 (m, 1 H, H-5a), 3.76 - 3.66 (m, 1 H, H-4), 3.46 - 3.29 (m, 3 H, H-2, H-3, H-5b).

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 90.85 (C-1), 73.36, 70.86, 68.05, 68.02 (C-2, C-3, C-4, C-5).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[227,229]</sup>

### 2,3,4-Tri-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosylazid (**108**)<sup>[227,229]</sup>



In 100 mL Pyridin wurden 6.90 g (39.4 mmol)  $\alpha$ -D-Arabinopyranosylazid (**107**) gelöst und unter Eiskühlung mit 16.0 mL (130 mmol) Pivaloylchlorid versetzt. Das Gemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde in

50 mL Dichlormethan gelöst und in folgender Reihenfolge gewaschen: mit 2 N Salzsäure ( $2 \times 100$  mL), ges. Natriumhydrogencarbonatlösung ( $5 \times 50$  mL) und ges. NaCl-Lösung ( $1 \times 50$  mL). Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol wurde ein farbloser Feststoff als Produktgemisch erhalten, welcher säulenchromatographisch gereinigt wurde (Isolera, Gradienten 100 %  $^c\text{Hex} \rightarrow 100$  % EtOAc).

Ausbeute: 2.27 g (5.30 mmol, 13 %) eines farblosen, viskosen Öls.

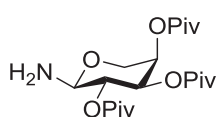
$\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7$  (M = 427.50 g/mol)

$R_f = 0.62$  ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 450.22 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 450.22), 466.20 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber.: 466.19)

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 5.28 - 5.17 (m, 1 H, H-4), 5.14 - 5.08 (m, 1 H, H-2), 5.02 (d,  $^3J_{\text{H}3,\text{H}4}=4.03$  Hz, 1 H, H-3), 4.57 (d,  $^3J_{\text{H}1,\text{H}2}=7.70$  Hz, 1 H, H-1), 4.09 (dd,  $^2J_{\text{H}5a,\text{H}5b}=13.02$  Hz,  $^3J_{\text{H}5a,\text{H}4}=2.75$  Hz, 1 H, H-5a), 3.79 - 3.71 (m, 1 H, H-5b), 1.26, 1.20, 1.14 ( $3 \times$  s, 27 H,  $3 \times$  Piv).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[227,229]</sup>

**2,3,4-Tri-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosylamin (109)**<sup>[227,229]</sup>

Zuerst wurde der Katalysator aktiviert, indem 1.23 g einer Aluminium-Nickel Legierung in Wasser aufgenommen und solange mit festem Natriumhydroxid versetzt wurde bis keine Gasentwicklung mehr auftrat. Das Katalysatorgemisch wurde 30 min auf 70 °C erhitzt, danach neutral gewaschen (pH = 7.0) und mehrfach in Methanol aufgeschlämmt. Der aktivierte Katalysator wurde in 10 mL Methanol vorgelegt. Unter einer Wasserstoffatmosphäre wurden 2.27 g (5.30 mmol) des Produktgemischs aus der vorherigen Stufe (**108**), gelöst in 10 mL Methanol mit 1 % Dichlormethan, zugespritzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde über Hyflo<sup>®</sup> filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol wurde ein farbloser Feststoff als Produktgemisch erhalten, welcher säulenchromatographisch gereinigt wurde (Isolera, Gradienten 100 % <sup>c</sup>Hex → 100 % EtOAc).

Ausbeute: 616 mg (1.53 mmol, 29 %) eines braunen Öls.

C<sub>20</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>7</sub> [M = 401.50 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.47 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 2:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 402.26 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 402.25), 424.25 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 424.23), 803.52 ([2M+H]<sup>+</sup>, ber.: 803.49), 825.51 ([2M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 825.47).

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -57.5 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = -46.7 ° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[227]</sup>

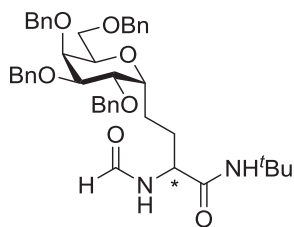
<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 5.28 - 5.21 (m, 1 H, H-4), 5.17 - 5.08 (m, 2 H, H-2, H-3), 4.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub>=6.97 Hz, 1 H, H-1), 3.93 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H5a,H5b</sub>=13.39 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H5,H4</sub>=2.02 Hz, 1 H, H-5a), 3.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>H5,H4</sub>=12.84 Hz, 1 H, H-5b), 2.02 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 1.27, 1.19, 1.14 (3 × s, 27 H, 3 × Piv).

<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 177.77, 177.49, 177.33 (C=O<sub>Piv</sub>), 85.72 (C-1), 71.02 (C-3), 70.00 (C-2), 68.59 (C-4), 65.19 (C-5), 38.93, 38.74 (C<sub>quart.</sub>-Piv), 27.15, 27.10, 27.06 (CH<sub>3</sub>-Piv).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[227,229]</sup>

### 5.4.7 Ugi-Reaktion

#### *N*-(*tert*-Butyl)-2-formamido-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-butanamid (110)



Unter einer Argon-Atmosphäre wurden 3-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanal (**94**) (7.80 mg, 13.4  $\mu$ mol) und 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- $\beta$ -D-galactopyranosylamin (**103**) (7.00 mg, 13.6  $\mu$ mol) in 0.5 mL trockenem THF gelöst. Danach wurden 2  $\mu$ L (17.5  $\mu$ mol) *tert*-Butylisocyanid und 1  $\mu$ L (26.5  $\mu$ mol) Ameisensäure zugespritzt und das Gemisch auf  $-21$  °C herab gekühlt. Es wurden 10  $\mu$ L Zinkchlorid-Ether-Lösung (2.2 M) zugetropft und die Reaktion bei  $-21$  bis  $-14$  °C 3 d gerührt. Anschließend wurde die Rohlösung eingedampft und in 2 mL Dichlormethan gelöst. Daraufhin wurde mit ges. NaCl-Lösung ( $2 \times 2$  mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Dichlormethan ( $3 \times 2$  mL) rück-extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $^c$ Hex/EtOAc, 10:1  $\rightarrow$   $^c$ Hex/EtOAc, 5:1).

Ausbeute: 6.00 mg (8.46  $\mu$ mol, 63 %) eines farblosen Öls.

$C_{43}H_{53}N_2O_7$  [M = 709.38 g/mol]

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

$[\alpha]_D^{23} = +22.0$  ° (c = 0.5,  $CHCl_3$ )

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 710.37 ( $[M+H]^+$ , ber.: 710.39), 732.33 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 732.37), 748.33 ( $[M+K]^+$ , ber.: 748.35), 1441.67 ( $[2M+Na]^+$ , ber.: 1441.75), 1457.69 ( $[2M+K]^+$ , ber.: 1457.73)

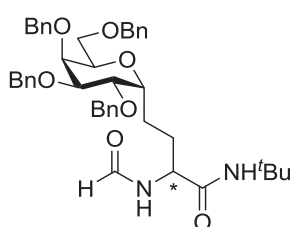
$^1H$ -NMR [ $^1H$ - $^1H$ -COSY] (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 8.08/8.08 (s, 1 H, CHO)\*, 7.37 - 7.26 (m, 20 H,  $H_{Ar}$ ), 6.06/5.86 (s, 1 H, NH)\*, 5.17 (t,  $^3J_{H_{\alpha},CH_2} = 6.15$  Hz, 1 H,  $H_{\alpha}$ ), 4.75 - 4.64 (m, 2 H,  $CH_2$ -Bn), 4.64 - 4.44 (m, 6 H,  $CH_2$ -Bn), 4.09 - 3.84 (m, 4 H, H-1, H-2, H-3, H-5), 3.75 - 3.59 (m, 3 H, H-4, H-6), 2.05 - 1.83 (m, 2 H,  $CH_2''$ ), 1.80 - 1.49 (m, 2 H,  $CH_2'$ ), 1.33/1.31 (s, 9 H,  $t$ Bu)\*.

$^{13}C$ -NMR [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 168.12/168.01 (HC=O)\*, 159.69/159.54 (C=O $_{NH/tBu}$ )\*, 138.49, 138.39, 138.30, 138.18, 138.04 ( $C_{ipso}$ -Ph), 128.37, 128.31, 128.21, 128.16, 127.98, 127.93, 127.86, 127.73, 127.65, 127.61, 127.55, 127.49, 127.45 ( $C_{o,m,p}$ -Ph), 76.80/76.56 (C-4)\*, 74.10\*/74.01 (C-1), 73.76, 73.28, 73.21, 73.11, 73.02,

72.98, 72.25 (C-2, C-3, C-5, C<sup>α</sup>, CH<sub>2</sub>Bn), 69.90 (C-6), 51.40/51.28 (<sup>t</sup>Bu-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)\*, 28.61, 28.56 (CH<sub>2</sub>', CH<sub>2</sub>''), 27.07 (<sup>t</sup>Bu-CH<sub>3</sub>).

\*Signalverdopplung bedingt durch vorhandene Rotamere oder Diastereomere

***N*-(*tert*-Butyl)-2-formamido-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-butanamid (110')**



Analog zur Synthese von **110** wurden 13.4 mg (23.1  $\mu$ mol) 3-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanal (**94**), 10.9 mg (27.1  $\mu$ mol) 2,3,4-Tri-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosylamin (**109**), 3.00  $\mu$ L (26.2  $\mu$ mol) *tert*-Butylisonitril, 1  $\mu$ L (26.5  $\mu$ mol) Ameisensäure und 10  $\mu$ L Zinkchlorid-Ether-Lösung

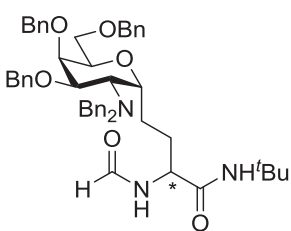
(2.2 M) miteinander umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 10:1  $\rightarrow$  <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 5:1).

Ausbeute: 15.7 mg (max. 22.1  $\mu$ mol) eines farblosen Öls als Produktgemisch.

C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M = 709.38 g/mol]

Die vorhandenen analytischen Daten (R<sub>F</sub>-Wert, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR) sind identisch zu Produkt **100**. Durch das Vorliegen eines chromatographisch nicht trennbaren Produktgemisches konnte kein Drehwert bestimmt werden.

***N*-(*tert*-Butyl)-2-formamido-4-(2-dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-butanamid (113)**



Unter einer Argon-Atmosphäre wurden 3-(2-dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-propanal (**100**) (16.2 mg, 24.2  $\mu$ mol) und 2,3,4-Tri-*O*-pivaloyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosylamin (**109**) (12.8 mg, 31.9  $\mu$ mol) in 0.5 mL trockenem THF gelöst. Danach wurden 3  $\mu$ L (26.2  $\mu$ mol)

*tert*-Butylisonitril zugegeben und das Gemisch auf  $-21$  °C herab gekühlt. Es wurden 10  $\mu$ L Zinkchlorid-Ether-Lösung (2.2 M) zugetropft und zum Schluss 1  $\mu$ L (26.5  $\mu$ mol) Ameisensäure zugespritzt. Die Reaktion wurde bei  $-21$  bis  $-14$  °C 3 d gerührt. Anschließend wurde die Rohlösung eingengt und in 2 mL Dichlormethan gelöst. Daraufhin wurde mit ges. NaCl-Lösung (2  $\times$  2 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3  $\times$  2 mL) rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 10:1  $\rightarrow$  <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 5:1).

Ausbeute: 31.0 mg (max. 22.1  $\mu\text{mol}$ ) eines farblosen Öls als Produktgemisch.

$\text{C}_{50}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_6$  [ $M = 798.04$  g/mol]

$R_f = 0.52$  ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 2:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 799.42 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 799.45), 821.41 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 821.44), 1620.84 ( $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 1619.88)

Charakteristische Signale des Produkts:

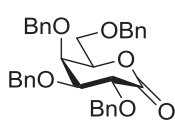
$^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H}-^1\text{H-COSY}$ ] (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 8.06/8.00 (s, 1 H, CHO)\*, 5.16 - 5.09 (m, 1 H,  $\text{H}^a$ ), 3.92 - 3.81 (m, 1 H, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$  [HSQC, HMBC] (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 168.12/167.96 (HC=O)\*, 159.59/159.43 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{NHtBu}}$ )\*, 68.67/68.94 ( $\text{C}^a$ )\*, 56.21 (C-1).

\*Signalverdopplung bedingt durch vorhandene Rotamere oder Diastereomere

## 5.4.8 Weitere Saccharidbausteine

### 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-galactono- $\delta$ -lacton (114)<sup>[39]</sup>



Es wurden 2.03 g (3.75 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranose vorgelegt und 60 mL Dimethylsulfoxid, sowie 30 mL Acetanhydrid zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend wurde mit Wasser (1  $\times$  50 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Ethylacetat (3  $\times$  50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 4:1).

Ausbeute: 1.24 g (2.30 mmol, 61 %) eines gelben Öls.

$\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_6$  [ $M = 538.64$  g/mol]

$R_f = 0.53$  ( $^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 4:1)

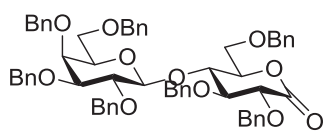
ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 539.25 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 539.24), 561.24 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 561.22), 577.23 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 577.20)

$[\alpha]_D^{23} = +33.6^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{20} = +75.2^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[270]</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.50 - 7.23 (m, 20 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 5.27 - 4.28 (m, 9 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ , H-2), 4.24 - 3.89 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5), 3.80 - 3.64 (m, 2 H, H-6).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 169.74 (C-1), 137.49, 137.23, 137.08 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$ ), 128.19, 128.16, 128.10, 128.07, 127.71, 127.66, 127.61, 127.58, 127.52, 127.39, 127.23 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$ ), 79.80 (C-3), 76.36, 75.00, 74.42, 73.34, 72.49, 72.23, 72.07 (C-2, C-4, C-5,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 67.23 (C6).

**4-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-benzyl-D-gluconolacton (115)**<sup>[39,40]</sup>



Es wurden 1.52 g (max. 1.56 mmol) des Rohprodukts 4-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-2,3,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranose vorgelegt und 50 mL Dimethylsulfoxid sowie

30 mL Acetanhydrid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit Wasser (50 mL) versetzt und die wässrige Phase mit Ethylacetat ( $3 \times 50$  mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt ( $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 3:1).

Ausbeute: 1.28 g (1.32 mmol, 85 %) eines gelben, viskosen Öls.

$\text{C}_{61}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$  [ $M = 971.16$  g/mol]

$R_f = 0.36$  ( $^{\text{c}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ , 3:1)

ESI-MS (*positiv*): ( $m/z$ ): 993.52 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 993.42), 1009.50 ( $[\text{M}+\text{K}]^+$ , ber. 1009.39)

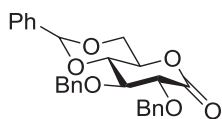
$[\alpha]_D^{23} = +28.3^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +30.1^\circ$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ )<sup>[39]</sup>

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.39 - 7.19 (m, 35 H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 4.97 (d,  $^2J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 11.74$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.88 - 4.76 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.75 - 4.68 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.68 - 4.60 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $\text{H-5}_{\text{Glc}}$ ), 4.52 - 4.46 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ), 4.48 - 4.31 (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-Bn}$ ,  $\text{H-1}_{\text{Gal}}$ ), 4.19 (dd,  $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 8.25$  Hz,  $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 3.85$  Hz, 1 H,  $\text{H-4}_{\text{Glc}}$ ), 4.13 - 4.05 (m, 2 H,  $\text{H-2}_{\text{Glc}}$ ,  $\text{H-3}_{\text{Glc}}$ ), 3.91 (d,  $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 2.57$  Hz, 1 H,  $\text{H-4}_{\text{Gal}}$ ), 3.79 (dd,  $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 9.35$  Hz,  $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 7.89$  Hz, 1 H,  $\text{H-2}_{\text{Gal}}$ ), 3.72 (dd,  $^2J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_6\text{b}} = 11.00$  Hz,  $^3J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_5} = 3.67$  Hz, 1 H,  $\text{H-6a}_{\text{Glc}}$ ), 3.67 - 3.56 (m, 2 H,  $\text{H-6b}_{\text{Glc}}$ ,  $\text{H-6a}_{\text{Gal}}$ ), 3.51 - 3.39 (m, 3 H,  $\text{H-3}_{\text{Gal}}$ ,  $\text{H-5}_{\text{Gal}}$ ,  $\text{H-6b}_{\text{Gal}}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 168.84 (C-1 $_{\text{Glc}}$ ), 138.63, 138.42, 138.26, 137.84, 137.71, 137.66, 136.85 ( $\text{C}_{\text{ipso-Ph}}$ ), 128.36, 128.32, 128.23, 128.19, 128.09, 128.06, 127.95, 127.84, 127.79, 127.77, 127.65, 127.61, 127.53, 127.49, 127.46, 127.36 ( $\text{C}_{\text{o,m,p-Ph}}$ ), 103.97 (C-1 $_{\text{Gal}}$ ), 82.22 (C-3 $_{\text{Gal}}$ ), 80.00 (C-3 $_{\text{Glc}}$ ), 79.29 (C-2 $_{\text{Gal}}$ ), 78.12 (C-5 $_{\text{Glc}}$ ), 76.94 (C-2 $_{\text{Glc}}$ ), 76.31

(C-4<sub>Glc</sub>), 75.29, 74.67 (CH<sub>2</sub>-Bn), 73.43, 73.37, 73.28, 73.25, 73.12 (C-4<sub>Gal</sub>, C-5<sub>Gal</sub>, CH<sub>2</sub>-Bn), 72.74 (CH<sub>2</sub>-Bn), 68.34 (C-6<sub>Gal</sub>), 68.11 (C-6<sub>Glc</sub>).

### 2,3-Di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden- $\alpha,\beta$ -D-glucono-1,5-lacton (116)<sup>[39]</sup>



In 10 mL DMSO wurde 2,3-Di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzyliden- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranose<sup>[39]</sup> (0.78 g, 1.74 mmol) gelöst und 5 mL Ac<sub>2</sub>O zugespritzt. Das Gemisch wurde 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 10 mL Ethylacetat verdünnt und mit Wasser gewaschen (1 × 15 mL). Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat rück-extrahiert (2 × 20 mL), die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (°Hex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 0.59 g (1.32 mmol, 76 %) eines gelben Öls.

C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub> [M = 446.50 g/mol]

R<sub>f</sub> = 0.54 (°Hex/EtOAc, 2:1)

ESI-MS (*positiv*): (m/z): 447.19 ([M+H]<sup>+</sup>, ber. 447.18), 469.18 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 469.16), 485.16 ([M+K]<sup>+</sup>, ber. 485.14)

$[\alpha]_D^{23} = +44.3^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>); Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +45.0^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)<sup>[39]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.57 - 7.29 (m, 15 H, H<sub>Ar</sub>), 5.61 (s, 1 H, CH-Bnz), 4.89 (d, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub>=11.37 Hz, 1 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.75 - 4.61 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>-Bn), 4.57 - 4.46 (m, 2 H, H-5, H-6a), 4.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>,H<sub>3</sub></sub>=3.30 Hz, 1 H, H-2), 4.09 - 4.03 (m, 1 H, H-3), 3.98 - 3.86 (m, 1 H, H-4), 3.85 - 3.78 (m, 1 H, H-6b).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.<sup>[39]</sup>



## 6 Literatur

- [1] C. Tomasetti, B. Vogelstein, *Science* **2015**, *347*, 78–81.
- [2] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward, *CA. Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 277–300.
- [3] P. Moningeon, *Vaccine* **2001**, *19*, 1305–1326.
- [4] Z. Yu, N. P. Restifo, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 289–294.
- [5] H. zur Hausen, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5910–5920.
- [6] S. Zotter, P. C. Hageman, A. Lossnitzer, W. J. Mooi, J. Hilgers, *Cancer Rev.* **1988**, *11-12*, 55–101.
- [7] J. Perez-Vilar, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31751–31754.
- [8] J. R. Gum, *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 795–799.
- [9] A. P. Corfield, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 236–252.
- [10] J. Dekker, J. W. A. Rossen, H. A. Büller, A. W. C. Einerhand, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 126–131.
- [11] S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard, J. Burchell, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12820–12823.
- [12] K. Engelmann, S. E. Baldus, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27764–27769.
- [13] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. M. Burchell, L. Pemberton, E. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286–15293.
- [14] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439–449.
- [15] I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 67–95.
- [16] G. F. Springer, P. R. Desai, I. Banatwala, *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *54*, 335–339.
- [17] G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198–1206.
- [18] M. J. L. Ligtenberg, F. Buijs, H. L. Vos, J. Hilkens, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2318–2324.
- [19] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354–355.
- [20] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379–382.
- [21] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4150–4162.
- [22] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, *4*, 525–542.
- [23] S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, *11*, 1623–1626.

- [24] S. Dziadek, H. Kunz, *The Chemical Record* **2004**, *3*, 308–321.
- [25] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798–7803.
- [26] S. Wittrock, T. Becker, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5319–5323.
- [27] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662–7667.
- [28] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688–7692.
- [29] U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8413–8417.
- [30] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772–3776.
- [31] A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8676–8681.
- [32] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10153–10157.
- [33] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *20*, 3685–3689.
- [34] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4421–4442.
- [35] J. Renukuntla, A. D. Vadlapudi, A. Patel, S. H. S. Boddu, A. K. Mitra, *Int. J. Pharm.* **2013**, *447*, 75–93.
- [36] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- [37] A. Rügger, M. Kuhn, H. Lichhti, H.-R. Loosli, R. Huguenin, C. Quiquerez, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075–1092.
- [38] S. Wittrock, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2006**.
- [39] S. Koch, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2012**.
- [40] S. Koch, D. Schollmeyer, H. Löwe, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7020–7041.
- [41] T. Schwalbe, V. Autze, M. Hohmann, W. Stirner, *Org. Proc. Res. Dev.* **2004**, *8*, 440–454.
- [42] J. Kobayashi, Y. Mori, S. Kobayashi, *Chem. Asian J.* **2006**, *1-2*, 22–35.
- [43] K. Jähnisch, V. Hessel, H. Löwe, M. Baerns, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 410–451.
- [44] T. Fukuyama, T. Rahman, M. Sato, I. Ryu, *Synlett* **2008**, *2*, 151–163.

- [45] B. Ahmed-Omer, J. C. Brandt, T. Wirth, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 733–740.
- [46] B. P. Mason, K. E. Price, J. L. Steinbacher, A. R. Bogdan, D. T. McQuade, *Chem. Rev.* **2004**, *107*, 2300–2318.
- [47] K. Geyer, J. D. C. Codée, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8434–8442.
- [48] K. Geyer, T. Gustafsson, P. H. Seeberger, *Synlett* **2009**, *15*, 2382–2391.
- [49] P. Watts, C. Wiles, *Chem. Commun.* **2007**, 443–467.
- [50] T. Richter, A. Wolf, K. P. Jäckel, O. Würz, *Chem. Ing. Tech.* **1999**, *71*, 973–974.
- [51] O. Würz, K.-P. Jäckel, T. Richter, A. Wolf, *Chem. Eng. Technol.* **2001**, *24*, 138–142.
- [52] B. L. Hayes, *Microwave Synthesis. Chemistry at the Speed of Light*, CEM Publishing, USA, **2002**.
- [53] T. J. Mason, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 443–451.
- [54] R. M. Freidinger, J. S. Hinkle, D. S. Perlow, B. H. Arison, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77–81.
- [55] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164–15172.
- [56] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 237–253.
- [57] B. Laufer, *Dissertation*, TU München, München, **2009**.
- [58] B. Vitoux, A. Aubry, M. T. Cung, G. Boussard, M. Marraud, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1981**, *17*, 469–479.
- [59] J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331–1342.
- [60] C. Gilon et al., *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2002**.
- [61] L. Aurelio, R. T. C. Brownlee, A. B. Hughes, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5823–5846.
- [62] E. Fischer, L. V. Mechel, *Chem. Ber.* **1916**, *49*, 1355–1366.
- [63] F. Effenberger, U. Burkard, J. Willfahrt, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 314–333.
- [64] E. Fischer, W. Lipschitz, *Chem. Ber.* **1915**, *48*, 360–378.
- [65] B. C. Das, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *29*, 211–215.
- [66] R. K. Olsen, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1912–1915.
- [67] S. Coulton, G. A. Moore, R. Ramage, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *44*, 4005–4008.
- [68] R. E. Bowman, H. H. Stroud, *J. Chem. Soc.* **1950**, 1342–1345.

- [69] R. E. Bowman, *J. Chem. Soc.* **1950**, 1346–1349.
- [70] P. Quitt, J. Hellerbach, K. Vogler, *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 327–333.
- [71] D. Ben-Ishai, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5736–5738.
- [72] J. Auerbach, M. Zamore, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 725–726.
- [73] M. A. Blaskovich, M. Kahn, *Synthesis* **1998**, *4*, 379–380.
- [74] P. Allevi, M. Anastasia, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7663–7665.
- [75] L. Aurelio, J. S. Box, R. T. C. Brownlee, A. B. Hughes, M. M. Sleeb, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2652–2667.
- [76] S. Zhang, T. Govender, T. Norström, P. I. Arvidsson, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6918–6920.
- [77] T. Govender, P. I. Arvidsson, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1691–1694.
- [78] A. Polyzos, M. O'Brien, T. P. Petersen, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1222–1225.
- [79] A. E. Buba, S. Koch, H. Kunz, H. Löwe, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4509–4513.
- [80] I. Pinnau, L. G. Toy, *J. Membr. Sci.* **1996**, *109*, 123–133.
- [81] P. R. Resnick, W. H. Buck, *Modern Fluoropolymers: High Performance Polymers for Diverse Applications*, Wiley, Chichester, **1997**.
- [82] H. Zhao, J. Zhang, N. Wu, X. Zhang, K. Crowley, S. G. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15112–15119.
- [83] T. C. Merkel, V. I. Bondar, K. Nagai, B. D. Freeman, Y. P. Yampolskii, *Macromolecules* **1999**, *32*, 8427–8440.
- [84] T. C. Merkel, V. I. Bondar, B. D. Freeman, *Macromolecules* **1999**, *32*, 370–374.
- [85] A. Y. Alentiev, V. P. Shantarovich, T. C. Merkel, V. I. Bondar, B. D. Freeman, Y. P. Yampolskii, *Macromolecules* **2002**, *35*, 9513–9522.
- [86] Y. P. Yampolskii, *Russ. J. Gen. Chem.* **2009**, *79*, 657–665.
- [87] M. O'Brien, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1596–1598.
- [88] P. Koos, U. Gross, A. Polyzos, M. O'Brien, I. Baxendale, S. V. Ley, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6903–6908.
- [89] M. O'Brien, N. Taylor, A. Polyzos, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1250–1257.

- [90] S. Newton, S. V. Ley, E. Casas Arcé, D. M. Grainger, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1805–1812.
- [91] P. B. Cranwell, M. O'Brien, D. L. Browne, P. Koos, A. Polyzos, M. Peña-López, S. V. Ley, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5774–5779.
- [92] U. Gross, P. Koos, M. O'Brien, A. Polyzos, S. V. Ley, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 6418–6430.
- [93] F. Mastronardi, B. Gutmann, C. O. Kappe, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5590–5593.
- [94] M. Brzozowski, J. A. Forni, G. P. Savage, A. Polyzos, *Chem. Commun.* **2015**, 334–337.
- [95] H. Zhao, K. Ismail, S. G. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13184–13185.
- [96] Y. Luo, G. Evindar, D. Fishlock, G. A. Lajoie, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3807–3809.
- [97] H. Wieland, G. Scheuing, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1921**, *54*, 2527–2555.
- [98] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89–107.
- [99] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629–631.
- [100] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976–980.
- [101] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751–769.
- [102] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863–870.
- [103] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129–132.
- [104] R.U. Lemieux, R.M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244–1251.
- [105] W. Königs, E. Knorr, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957–981.
- [106] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473–1482.
- [107] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, *10*, 985–993.
- [108] D. N. Kursanov, Z. N. Parnes, N. M. Loim, *Synthesis* **1974**, *9*, 633–651.
- [109] D. Rolf, G. R. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3539–3541.
- [110] G. L. Larson, *Silicon-Based Reducing Agents*. Supplement to the Gelest Catalog, "Silicon, Germanium & Tin Compounds, Metal Alkoxides and Metal Diketonates".
- [111] A. Bösch, *Dissertation*, TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, **2008**.
- [112] M. Glaffig, *Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2013**.
- [113] S. Hartmann, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2014**.

- [114] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [115] T. W. Green, P. G. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. Aufl., Wiley, New York, **1999**.
- [116] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1978**, *11*, 246–249.
- [117] F. C. McKay, N. F. Albertson, *J. Am. Chem. Soc.* **19757**, *79*, 4686–4690.
- [118] G. W. Anderson, A. C. McGregor, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 6180–6183.
- [119] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748–5749.
- [120] P. M. St. Hilaire, M. Meldal, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1210–1228.
- [121] M. Rothe, J. Mazanek, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 439–459.
- [122] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
- [123] S.-Y. Han, Y.A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- [124] V. Dourtoglou, J. C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269–1272.
- [125] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, *7*, 572–574.
- [126] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
- [127] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.
- [128] M. Teixido, F. Albericio, E. Giralt, *J. Peptide Res.* **2005**, *65*, 156–166.
- [129] Y. M. Angell, C. Garcia-Echeverria, D. Rich, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5981–5984.
- [130] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901–904.
- [131] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813–826.
- [132] S. Dziadek, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2004**.
- [133] M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, *Biochem. J.* **1992**, *284*, 137–144.
- [134] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386–5394.
- [135] J. A. Mollick, F. S. Hodi, R. J. Soiffer, L.M. Nadler, G. Dranoff, *Cancer Immunity* **2003**, *3*, 3–21.
- [136] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Bishell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691–696.
- [137] M. R. Price, F. Hudecz, C. O'Sullivan, R. W. Baldwin, P. M. Edwards, S. J. B. Tendler, *Mol. Immunol.* **1990**, *27*, 795–802.

- [138] U. Karsten, C. Diotel, G. Klich, H. Paulsen, S. Goletz, S. Müller, F.-G. Hanisch, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 2541–2549.
- [139] P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. B. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531–1545.
- [140] G. Zemplén, A. Kunz, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1923**, *56*, 1705–1710.
- [141] K. Wakabayashi, W. Pigman, *Carbohydr. Res.* **1974**, *35*, 3–14.
- [142] S. Dzaidek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981–4993.
- [143] J. Urban, T. Vaisar, R. Shen, M. S. Lee, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1996**, *47*, 182–189.
- [144] H. Kunz, S. Birnbach, P. Wernig, *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 207–223.
- [145] K. v. d. Bruch, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 87–89.
- [146] A. F. S. A. Habeeb, R. Hiramoto, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 16–26.
- [147] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215–1221.
- [148] K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K. Fukuhara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *173*, 639–646.
- [149] F. Schweizer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 240–264.
- [150] L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1384–1390.
- [151] B. Ernst, J. L. Magnani, *Nature Rev.* **2009**, *8*, 661–677.
- [152] A. Dondoni, A. Marra, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4395–4421.
- [153] C. R. Bertozzi, P. D. Hoeplich, M. D. Bednarski, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6092–6094.
- [154] B. J. Dorgan, R. F. W. Jackson, *Synlett* **1996**, *9*, 859–861.
- [155] L. Lay, M. Meldal, F. Nicotra, L. Panza, G. Russo, *Chem. Commun.* **1997**, 1469–1470.
- [156] S. D. Debenham, J. S. Debenham, M. J. Burk, E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9897–9898.
- [157] R. N. Ben, A. Orellana, P. Arya, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4817–4820.
- [158] P. Arya, R. N. Ben, H. Qin, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6131–6134.
- [159] A. Dondoni, A. Marra, A. Massi, *Chem. Commun.* **1998**, 1741–1742.
- [160] A. Dondoni, A. Marra, A. Massi, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2827–2832.
- [161] T. Fuchss, R. R. Schmidt, *Synthesis* **1998**, *5*, 753–758.

- [162] D. Urban, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2507–2516.
- [163] A. Dondoni, A. Marra, A. Massi, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 933–944.
- [164] A. D. Campbell, D. E. Paterson, T. M. Raynham, R. J. K. Taylor, *Chem. Commun.* **1999**, 1599–1600.
- [165] A. Dondoni, P. P. Giovannini, A. Marra, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2380–2388.
- [166] E. G. Nolan, A. J. Kurish, K. A. Wong, M. D. Orlando, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2449–2453.
- [167] A. Nuzzi, A. Massi, A. Dondoni, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4485–4488.
- [168] E. G. Nolan, A. J. Kurish, J. M. Potter, L. A. Donahue, M. D. Orlando, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3383–3386.
- [169] T. Gustafsson, M. Saxin, J. Kihlberg, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2506–2509.
- [170] N. Bragnier, R. Guillot, M.-C. Scherrmann, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3918–3921.
- [171] D. Urban, T. Skrydstrup, J.-M. Beau, *Chem. Commun.* **1998**, 955–956.
- [172] C. H. Röhrig, M. Takhi, R. R. Schmidt, *Synlett* **2001**, *7*, 1170–1172.
- [173] J. Cui, D. Horton, *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 319–330.
- [174] T.-C. Wu, P. G. Goekjian, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4823–4825.
- [175] T. Haneda, P. G. Goekjian, S. H. Kim, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 490–498.
- [176] H. A. El-Shenawy, C. Schuerch, *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 227–238.
- [177] J. Liaigre, D. Dubreuil, J.-P. Pradere, J.-F. Bouhours, *Carbohydr. Res.* **2000**, *325*, 265–277.
- [178] R. Šardžik, G. T. Noble, M. J. Weissenborn, A. Martin, S. Webb, S. L. Flitsch, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 699–703.
- [179] F. Burkhart, H. Kessler, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 255–256.
- [180] G. E. Keck, D. F. Kachensky, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2487–2493.
- [181] S. Koto, K. Asami, M. Hirooka, K. Nagura, M. Takizawa, S. Yamamoto, N. Okamoto, M. Sato, H. Tajima, T. Yoshida, N. Nonaka, T. Sato, S. Zen, K. Yago, F. Tomonaga, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 765–777.
- [182] F. Gauffeny, A. Marra, L. Shun, P. Sinay, C. Tabeur, *Carbohydr. Res.* **1991**, *219*, 237–240.
- [183] A. Hosomi, Y. Sakata, H. Sakurai, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2383–2386.

- [184] A. Hosomi, Y. Sakata, H. Sakurai, *Carbohydr. Res.* **1987**, *171*, 223–232.
- [185] M. D. Lewis, J. K. Cha, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4976–4978.
- [186] S. Danishefsky, J. F. Kerwin, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3805–3806.
- [187] A. P. Kozikowski, K. L. Sorgi, B. C. Wang, Z. Xu, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1563–1566.
- [188] A. Giannis, K. Sandhoff, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1479–1482.
- [189] F. Nicotra, L. Panza, G. Russo, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5627–5630.
- [190] C. Bertozzi, M. D. Bednarski, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3109–3112.
- [191] E. Brenna, C. Fuganti, P. Grasselli, S. Serra, S. Zambotti, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 1872–1878.
- [192] D. V. Jarikote, C. O'Reilly, P. V. Murphy, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6776–6778.
- [193] S.-C. Hung, C.-C. Lin, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5419–5422.
- [194] K. Takeo, *Carbohydr. Res.* **1980**, *87*, 147–152.
- [195] H. Paulsen, M. Paal, *Carbohydr. Res.* **1985**, *137*, 39–62.
- [196] C. Limousin, J. Cléopax, A. Petit, A. Loupy, G. Lukacs, *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 327–342.
- [197] J. Antoinette, C. Romero, S. A. Tabacco, K. A. Woerpel, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 168–169.
- [198] L. Ayala, C. G. Lucero, J. Antoinette, C. Romero, S. A. Tabacco, K. A. Woerpel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15521–15528.
- [199] J. R. Krumper, W. A. Salamant, K. A. Woerpel, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4907–4910.
- [200] R. J. Woods, C. W. Andrews, J. P. Bowen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 859–864.
- [201] F. Syed, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2012**.
- [202] I. Ugi, *Angew. Chem.* **1962**, *74*, 9–22.
- [203] I. Ugi, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 826–835.
- [204] M. Passerini, *Gazz. Chim. Ital.* **1921**, *51*, 126.
- [205] C. Iacobucci, S. Reale, J.-F. Gal, F. De Angelis, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7087–7090.
- [206] H. Cao, H. Liu, A. Dömling, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12296–12298.
- [207] T. N. Le, W. M. De Broggraevae, P. Grelier, V. C. Pham, W. Dehaen, V. H. Nguyen, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 4892–4894.

- [208] B. Alcaide, P. Almendros, C. Araoncillo, R. Callejo, M. P. Ruiz, M. R. Torres, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1387–1394.
- [209] W. Pfrengle, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **1988**.
- [210] H. C. Brown, E. F. Knights, C. G. Scouten, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 7765–7770.
- [211] C. Bertozzi, M. D. Bednarski, *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 243–253.
- [212] C. Palomo, M. Oiarbide, A. Landa, M. C. Gonzalez-Rego, J. M. García, A. González, J. M. Odriozola, M. Martín-Pastor, A. Linden, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8637–8643.
- [213] S. Fletcher, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4245–4248.
- [214] B. N. Cook, S. Bhakta, T. Biegel, K. G. Bowman, J. I. Armstrong, S. Hemmerich, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8612–8622.
- [215] E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2647–2650.
- [216] A. Dondoni, M.-C. Scherrmann, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6404–6412.
- [217] T. Rosen, I. M. Lico, D. T. Chu, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1580–1582.
- [218] Ranjit S. Dhillon, *Hydroboration and Organic Synthesis. 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN)*, Springer, Heidelberg, **2007**.
- [219] L. Cipolla, L. Lay, F. Nicotra, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6678–6681.
- [220] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Chem. Commun.* **1989**, 1640–1641.
- [221] D. A. Evans, M. D. Ennis, D. J. Mathre, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1737–1739.
- [222] H. Kunz, W. Sager, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 595–597.
- [223] H. Kunz, W. Sager, W. Pfrengle, D. Schanzenbach, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4397–4400.
- [224] H. Kunz, D. Schanzenbach, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1042–1043.
- [225] H. Kunz, W. Sager, D. Schanzenbach, M. Decker, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 649–654.
- [226] H. Kunz, W. Sager, W. Pfrengle, S. Laschat, D. Schanzenbach, *Chem. Pept. Prot.* **1993**, *12*, 91–98.
- [227] W. Sager, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **1987**.
- [228] H. Kunz, W. Pfrengle, W. Sager, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4109–4110.
- [229] H. Kunz, W. Pfrengle, K. Rück, W. Sager, *Synthesis* **1991**, *11*, 1039–1042.
- [230] H. Kunz, W. Pfrengle, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 651–652.
- [231] H. Paulsen, Z. Györgydeák, M. Friedmann, *Chem. Ber.* **1974**, *107*, 1590–1613.

- [232] K. Oertel, G. Zech, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1489–1491.
- [233] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. Aufl., Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [234] S. Nowshuddin, N. M. A. Rao, A. Ram Reddy, *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 2022–2031.
- [235] P. Palian, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7178–7183.
- [236] G. Braun, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **1991**.
- [237] A. Kaiser, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2009**.
- [238] J. A. Himanen, P. M. Pihko, *J. Org. Chem.* **2012**, *20*, 3765–3780.
- [239] P. A. Levene, R. S. Tipson, *J. Biol. Chem.* **1931**, *93*, 631–644.
- [240] R. Bukowski, L.M. Morris, R. J. Woods, T. Weimer, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *14*, 2697–2705.
- [241] Y. Saito, T. Watanabe, H. Hashimoto, J. Yoshimura, *Carbohydr. Res.* **1987**, *169*, 171–188.
- [242] S. Sabesan, R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 644–654.
- [243] T. Becker, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2006**.
- [244] L. Nagel, N. Sewald, C. Budke, A. Dreyer, T. Koop, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1657–1667.
- [245] A. Kuhn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **2005**.
- [246] P. M. Collins, H. Eder, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, *7*, 1525–1530.
- [247] T. T. Fang, B. Bendiak, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9721–9736.
- [248] K. R. Holme, L. D. Hall, *Carbohydr. Res.* **1992**, *225*, 291–306.
- [249] S. Kasprzycka, *Pol. J. Chem.* **2005**, *79*, 329–333.
- [250] J. Zeng, S. Vedachalam, S. Xiang, X.-W. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 42–45.
- [251] D. J. Wardrop, W. Zhang, J. Fritz, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 489–492.
- [252] L. Kaesbeck, H. Kessler, *Liebigs Ann. Chem.* **1997**, *1*, 169–173.
- [253] S. Kopitzki, K. J. Jensen, J. Thiem, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7017–7029.
- [254] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5919–5928.
- [255] S. Koto, N. Morishima, S. Shichi, H. Haigoh, M. Hirooka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 3257–3274.

- [256] M. Van Der Kaaden, E. Breukink, R. J. Pieters, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 732–737.
- [257] S. Shafizadeh, M. Stacey, *J. Chem. Soc.* **1952**, 3608–3610.
- [258] N. V. Bovin, S. E. Zurabyan, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1981**, *98*, 25–36.
- [259] H. Paulsen, B. Sumfleth, *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 3203–3213.
- [260] P. W. Austin, F. E. Hardy, J. G. Buchanan, J. Baddiley, *J. Chem. Soc.* **1965**, 1419–1424.
- [261] R. Cribiu, B. Eszter I. Cumpstey, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2022–2031.
- [262] L. Yang, X.-S. Ye, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1713–1721.
- [263] O. Westphal, H. Holzmann, *Chem. Ber.* **1942**, *75*, 1274–1282.
- [264] H. Paulsen, M. Maar, *Carbohydr. Res.* **1985**, *137*, 39–62.
- [265] K. Briner, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1341–1356.
- [266] C. R. Bertozzi, M. D. Bednarski, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3109–3112.
- [267] J. Xie, M. Menanda, J.-M. Valery, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 481–487.
- [268] M. Decker, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, **1984**.
- [269] E. E. Lee, J. O. Wood, *Carbohydr. Res.* **1981**, *89*, 329–333.
- [270] S. Dondoni, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6404–6412.

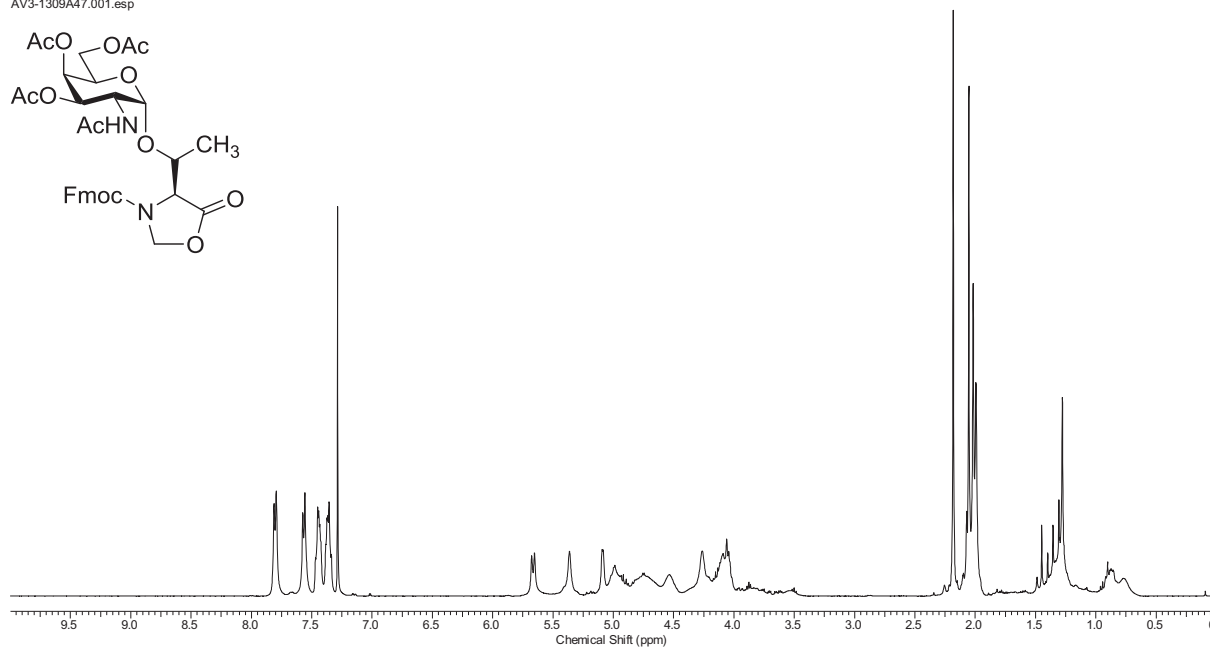
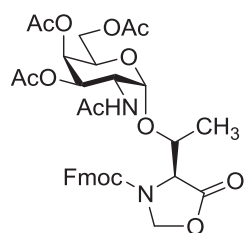
## 7 Spektrenanhang

### (4*S*)-4-[*O*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-5-oxo-1,3-oxazolidin (18)

(Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Oxazolidinon)

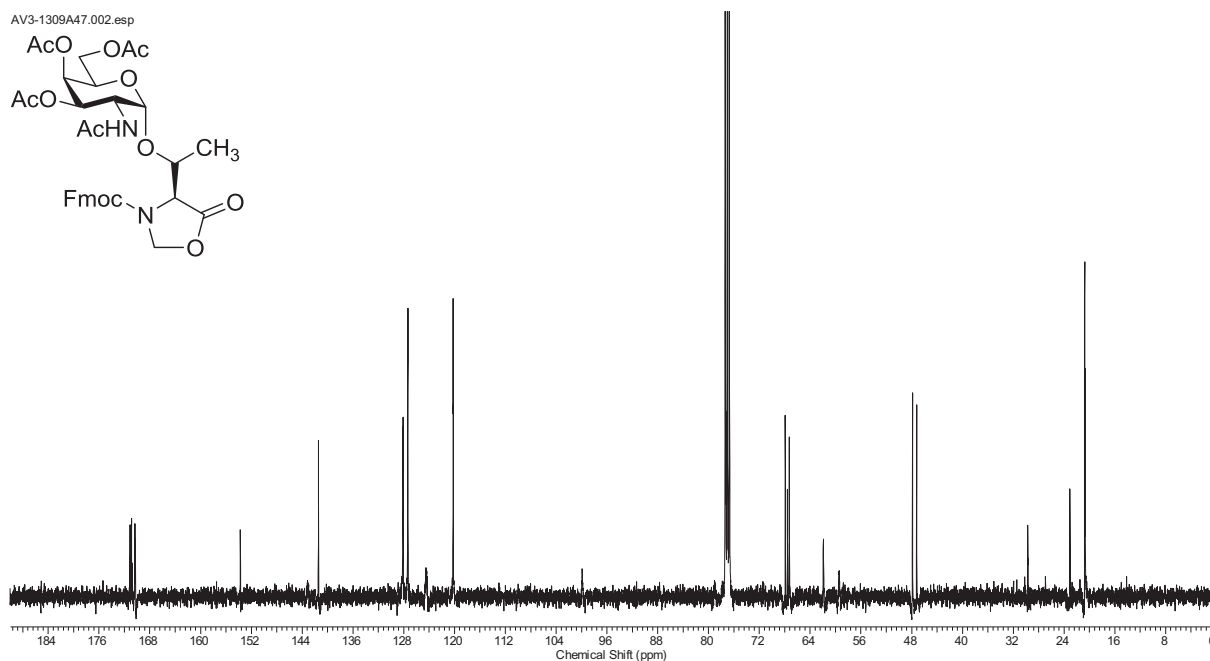
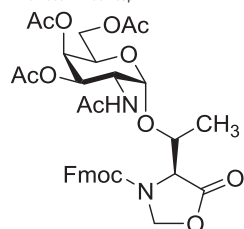
<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>

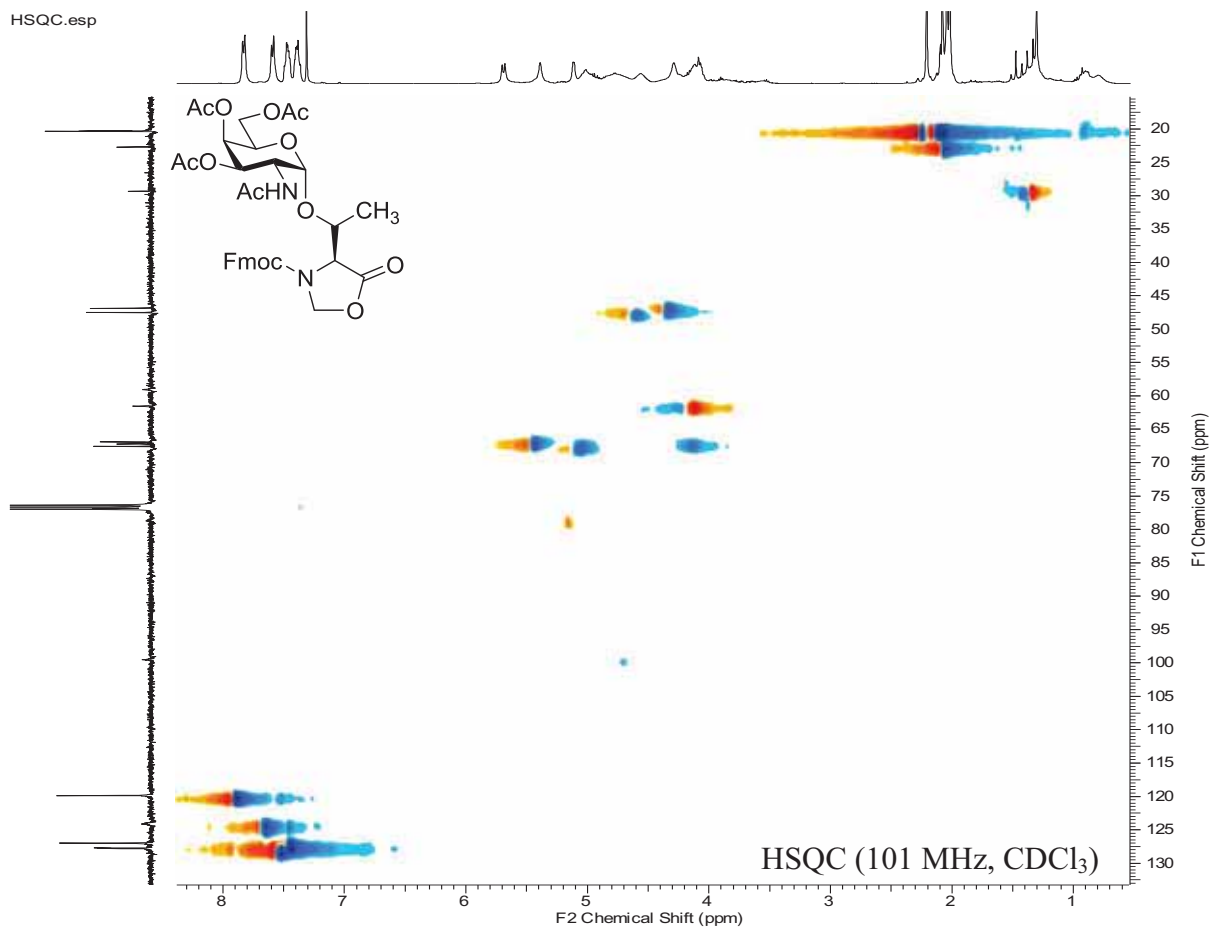
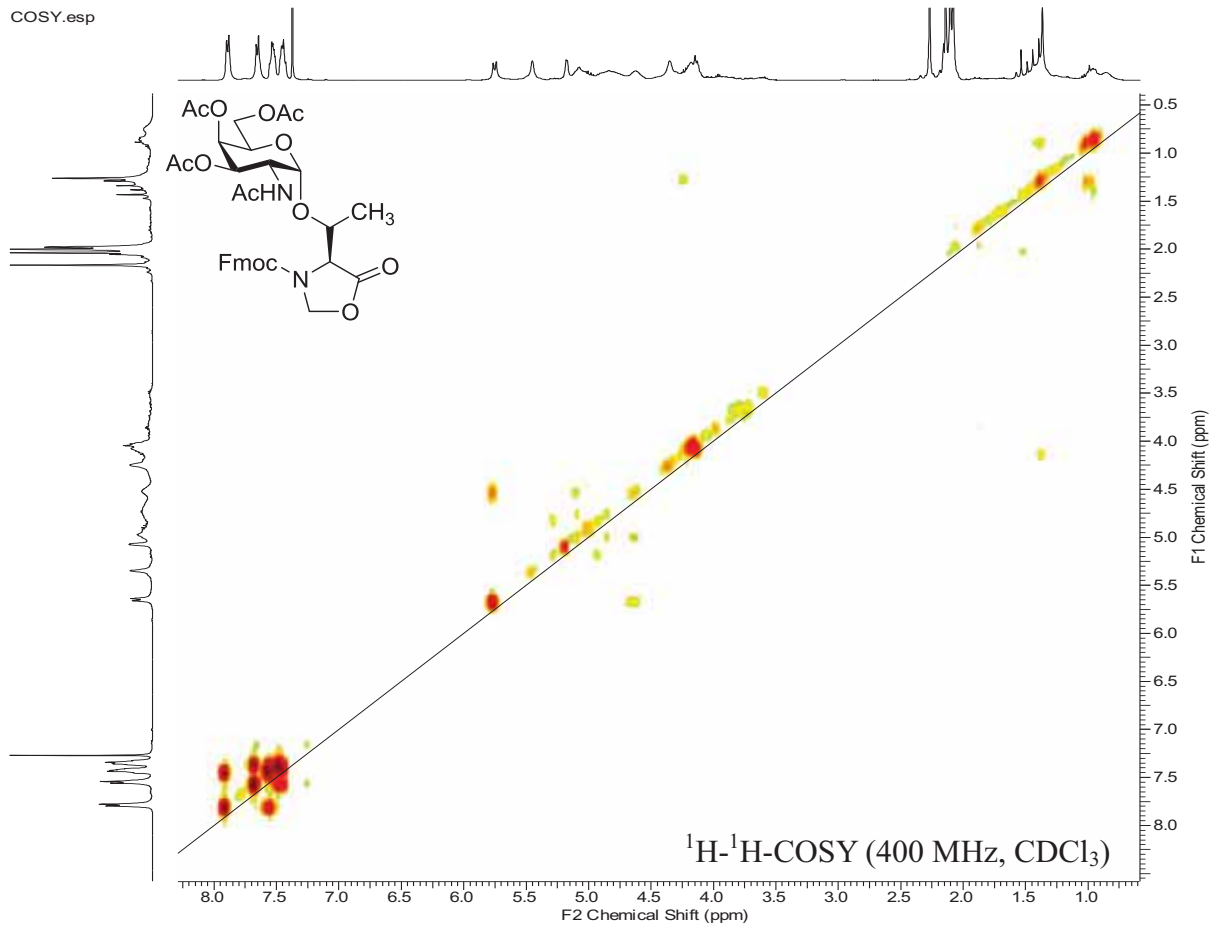
AV3-1309A47.001.esp



<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

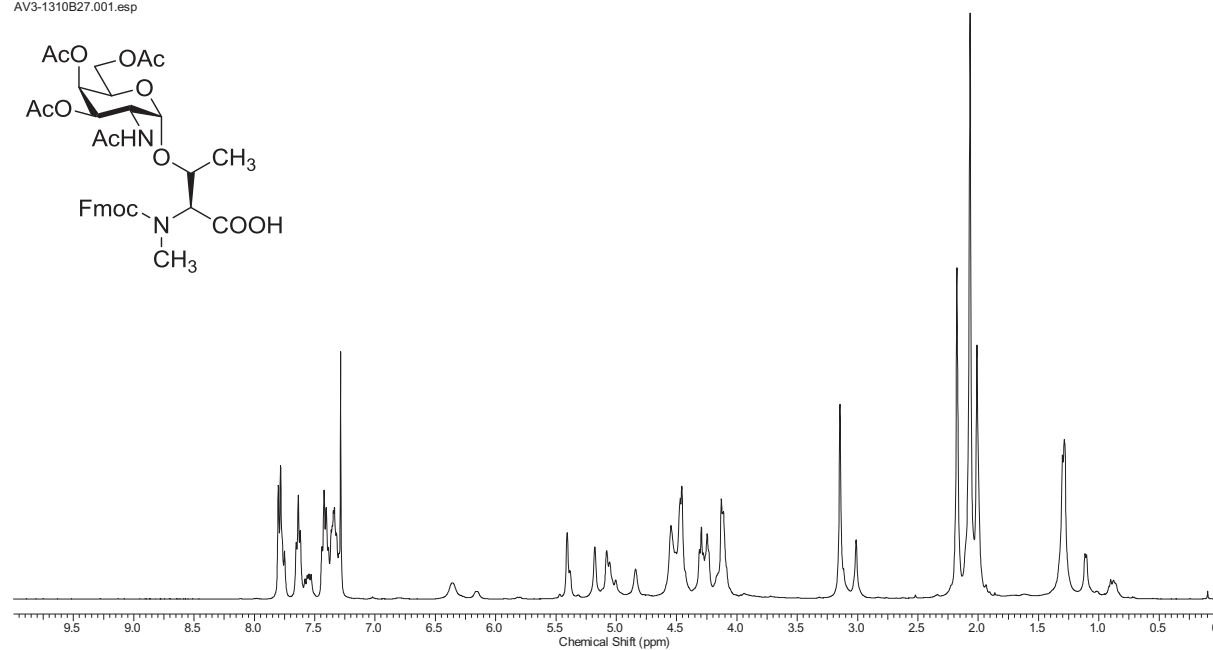
AV3-1309A47.002.esp



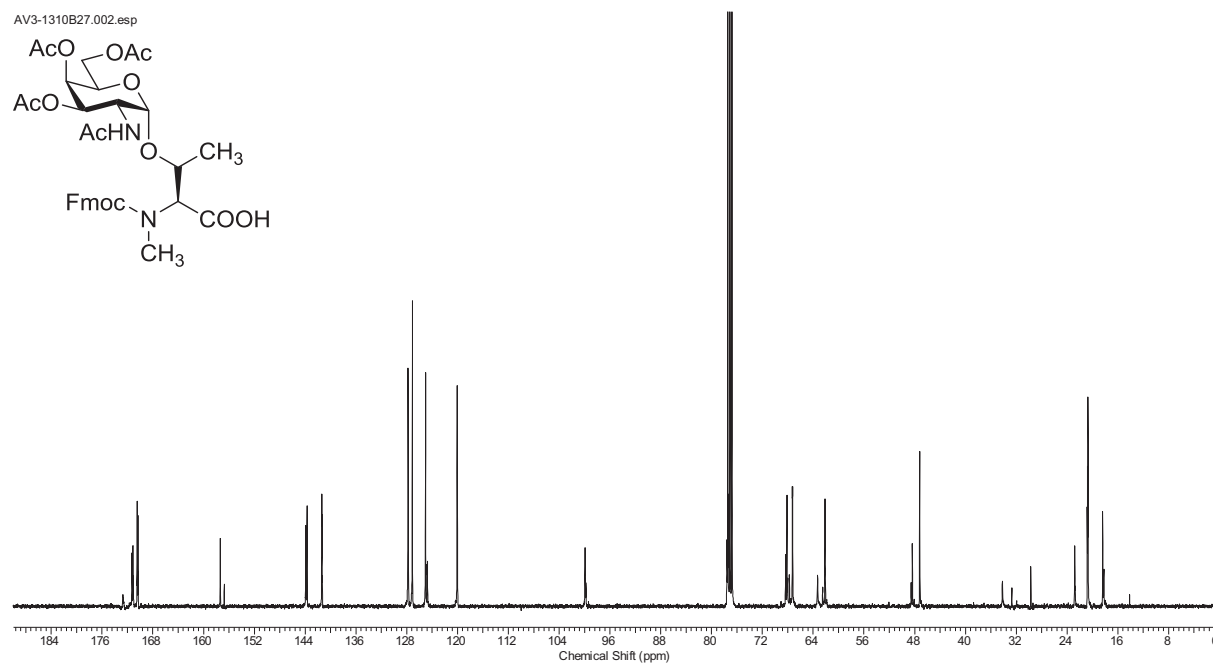


***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-*N*-methyl-L-threonin (19)**(Fmoc-N-Me-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH)<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>

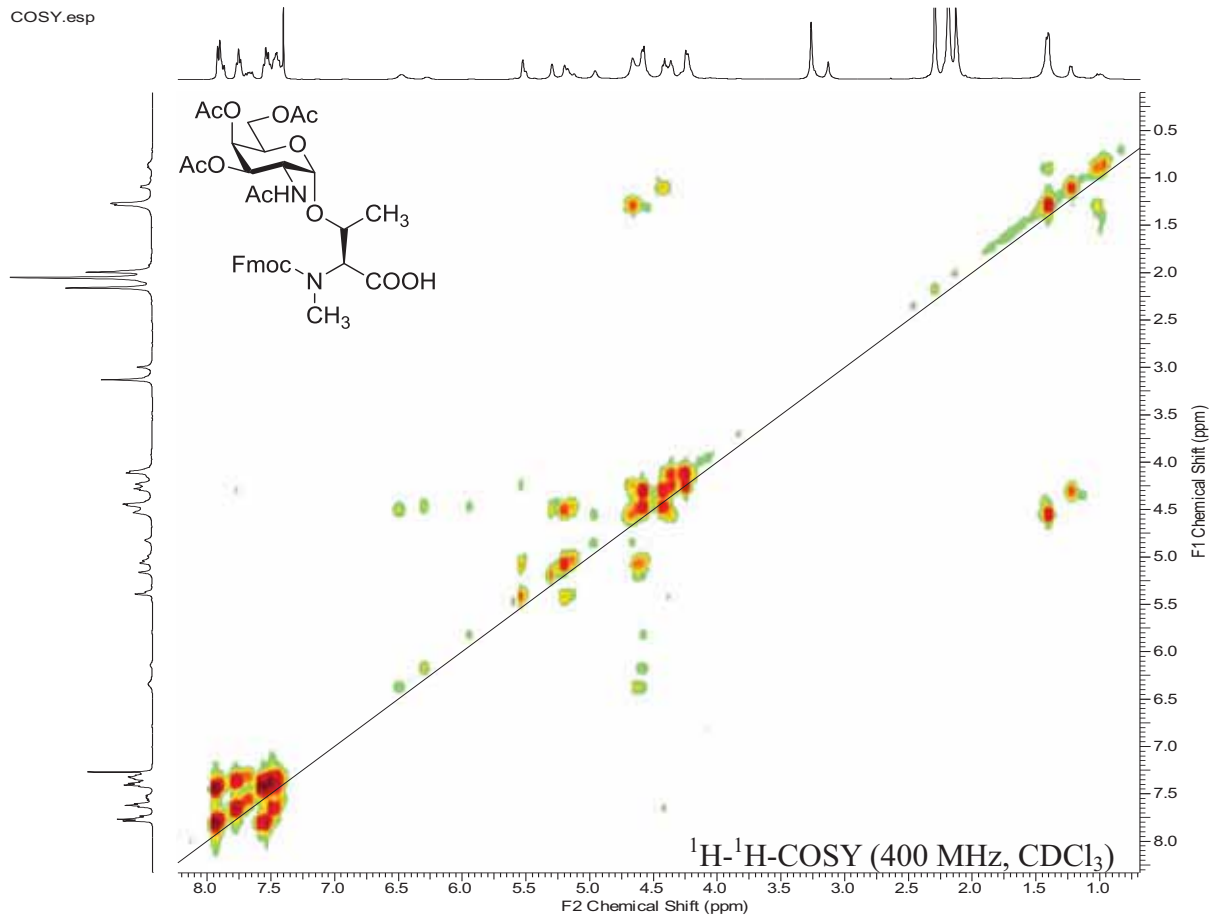
AV3-1310B27.001.esp

<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

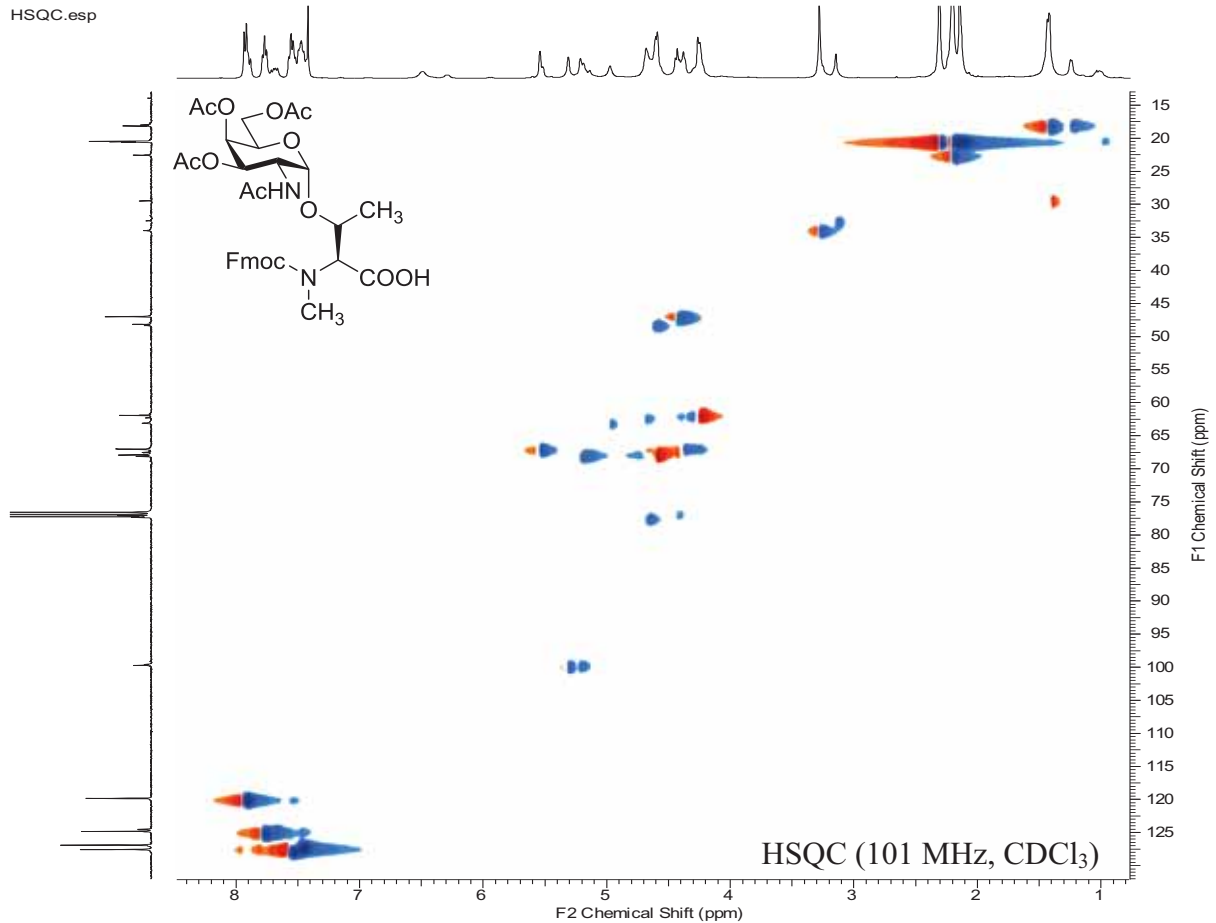
AV3-1310B27.002.esp



COSY.esp

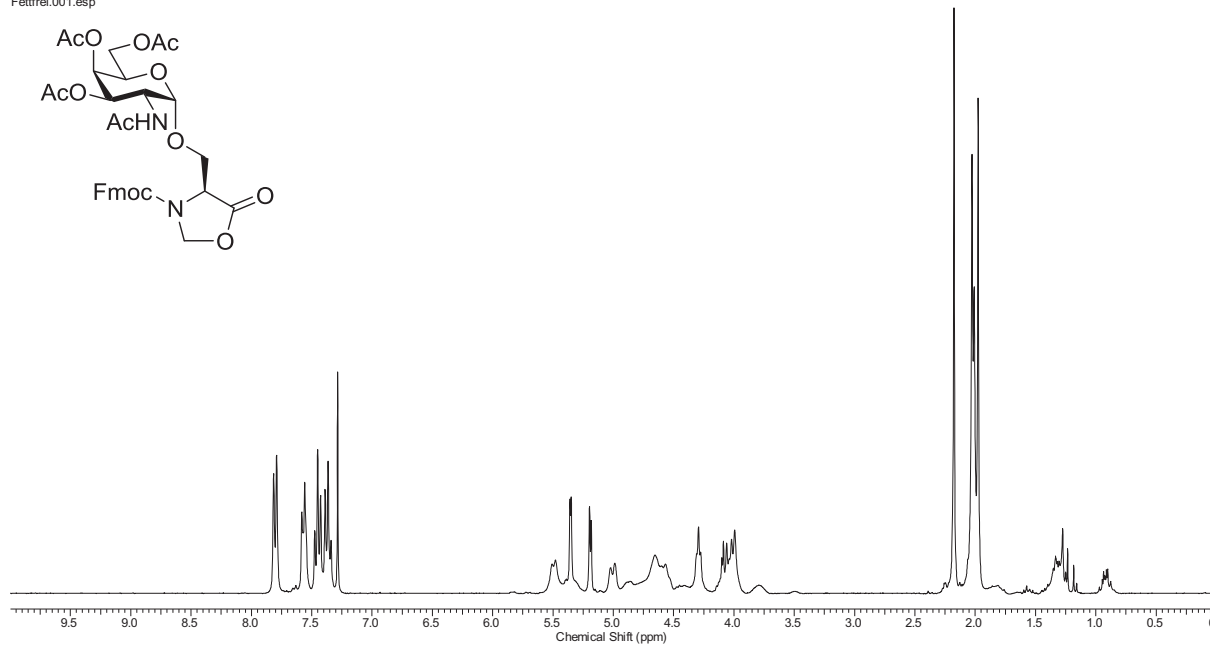


HSQC.esp

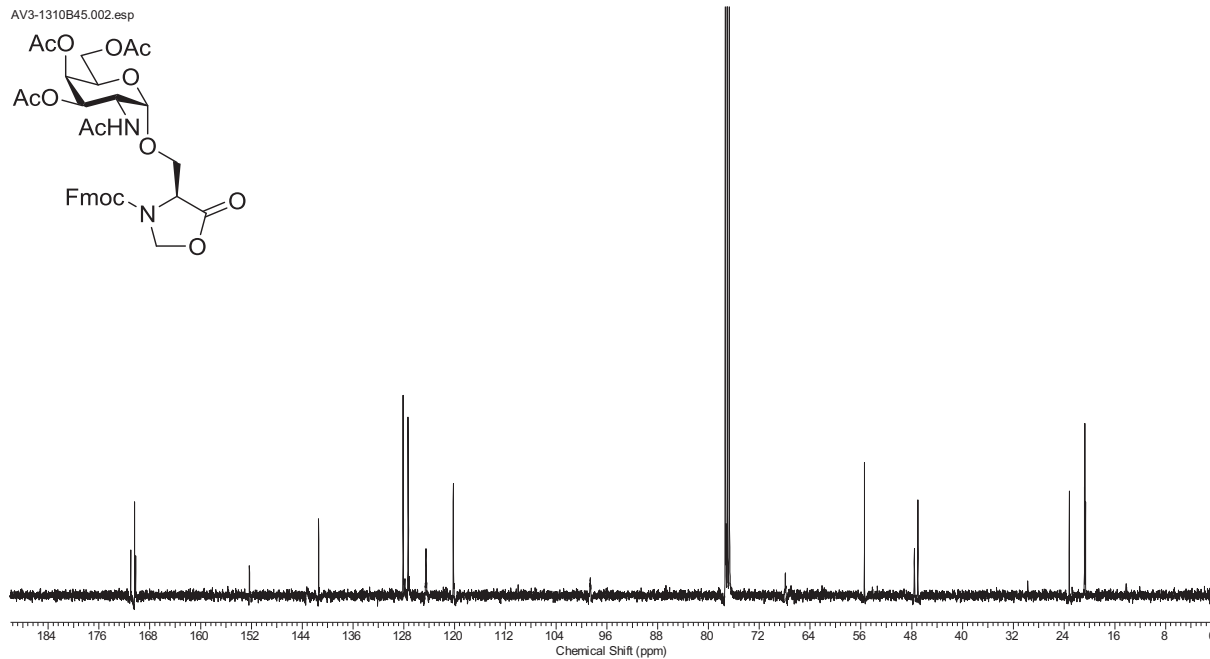


**(4S)-4-[O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-5-oxo-1,3-oxazolidin (22)**(Fmoc-Ser-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Oxazolidinon)<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>

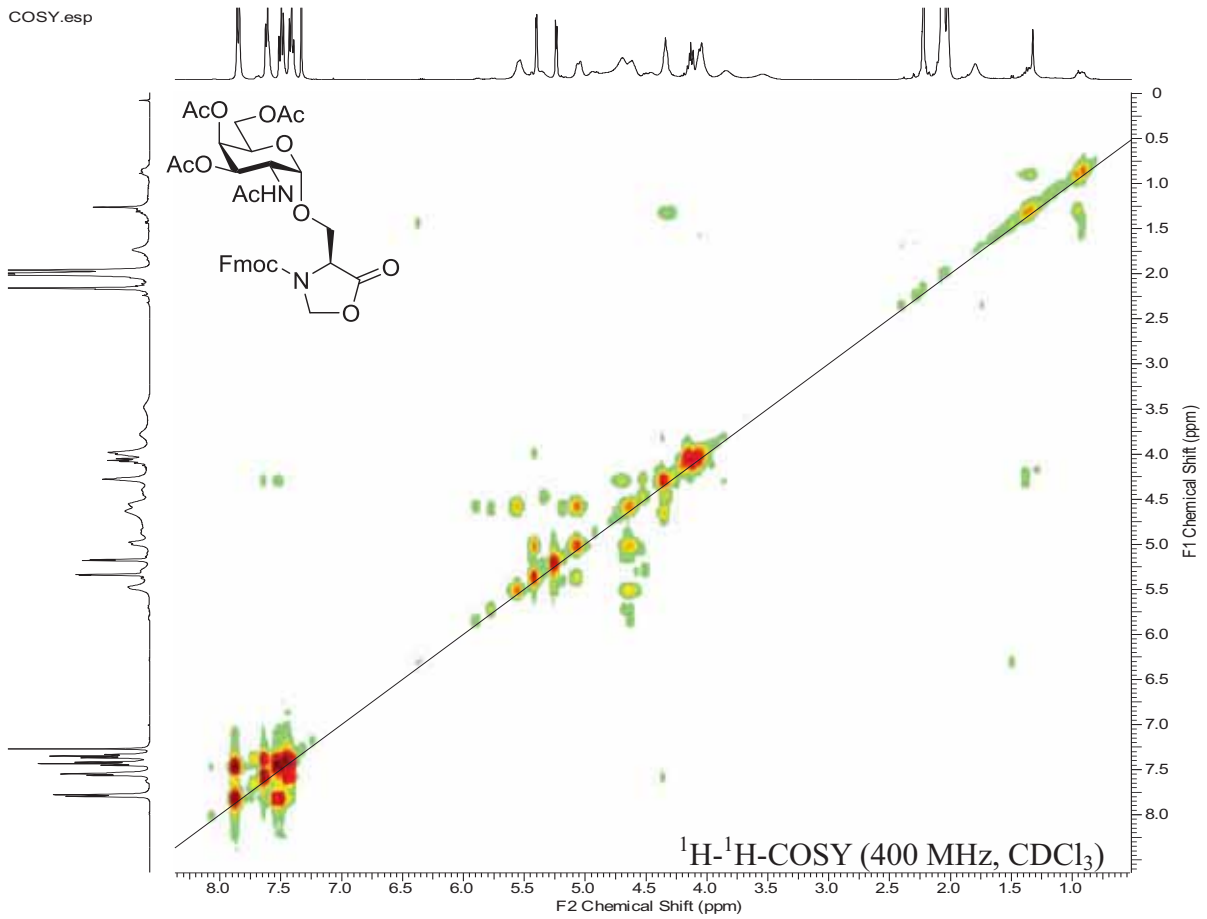
Fettfrei.001.esp

<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

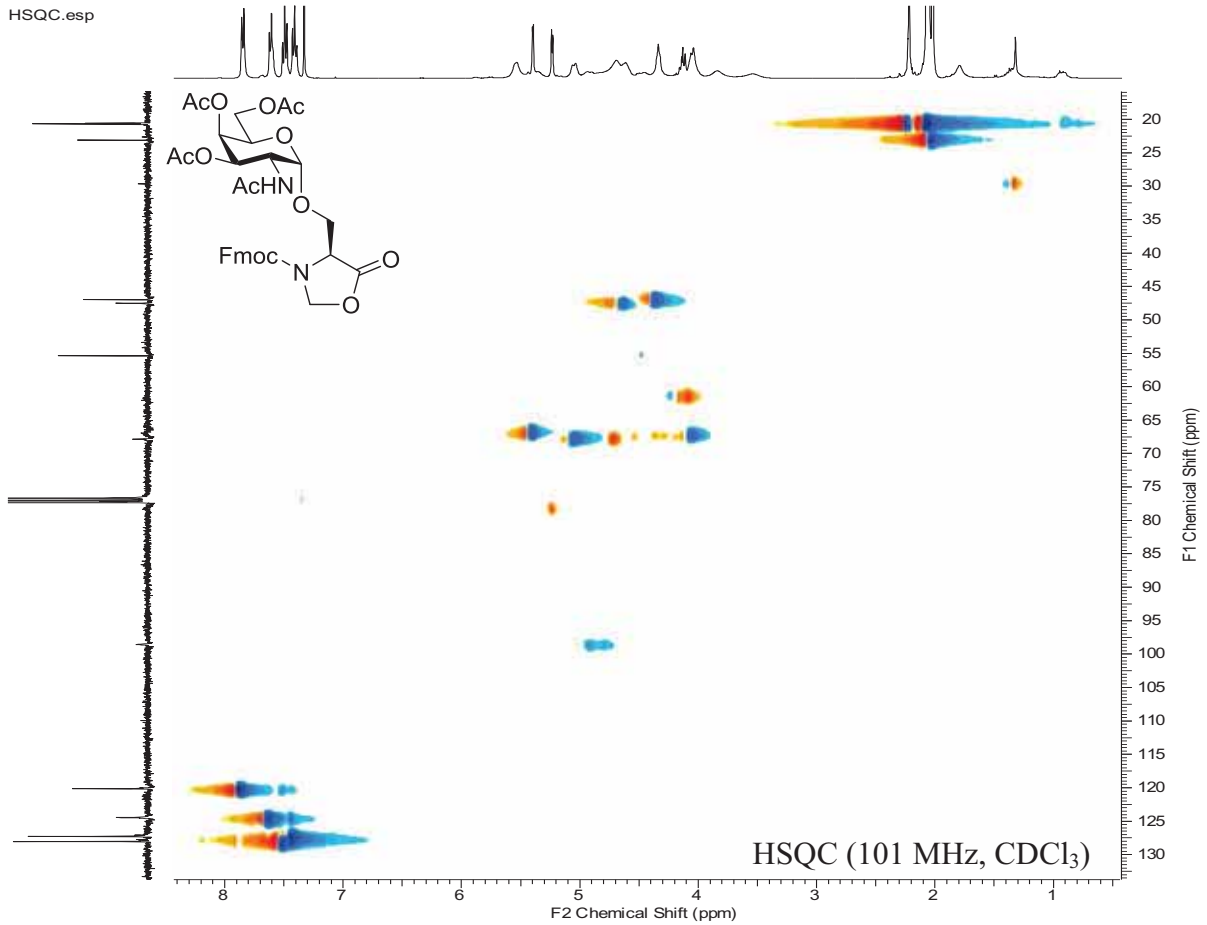
AV3-1310B45.002.esp



COSY.esp

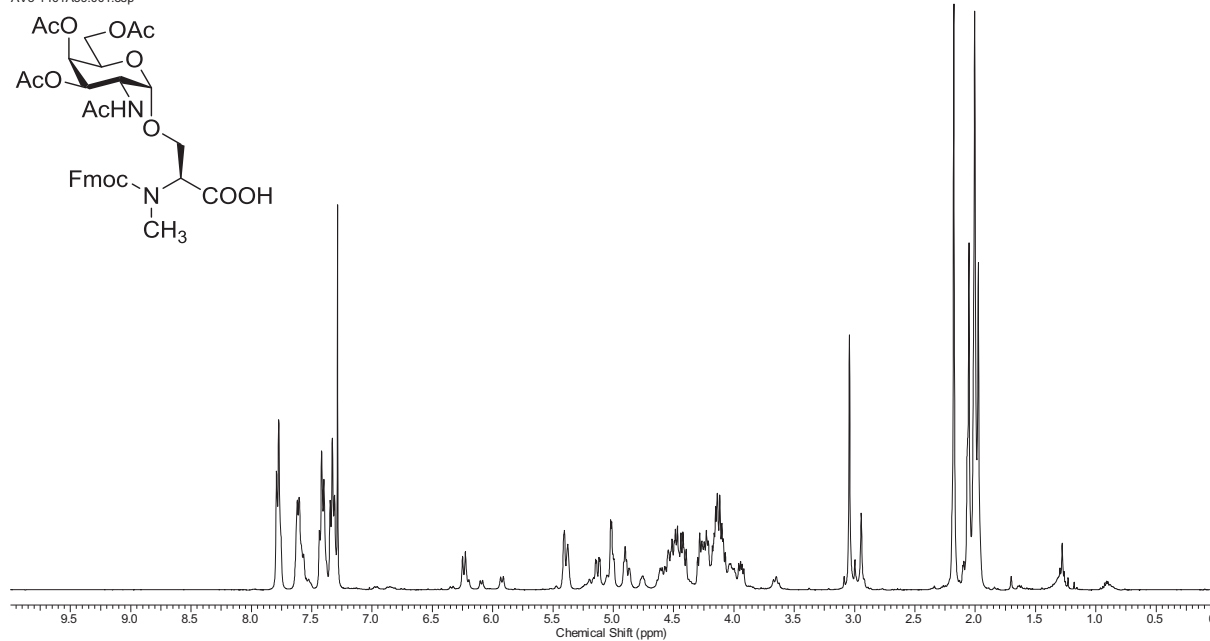


HSQC.esp

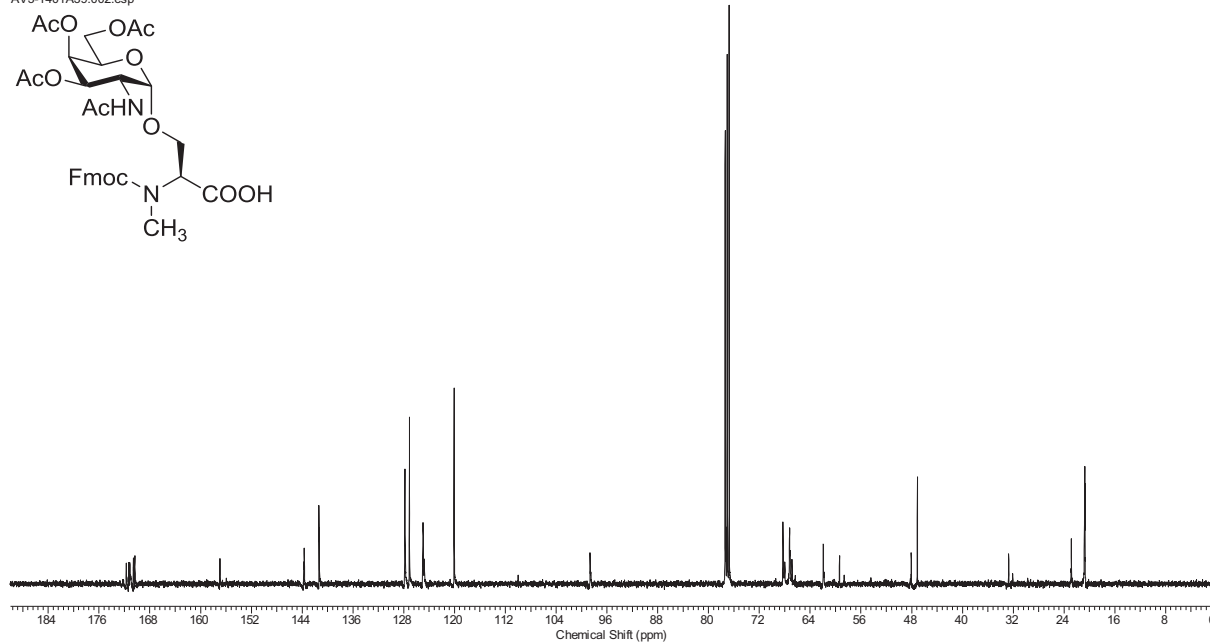


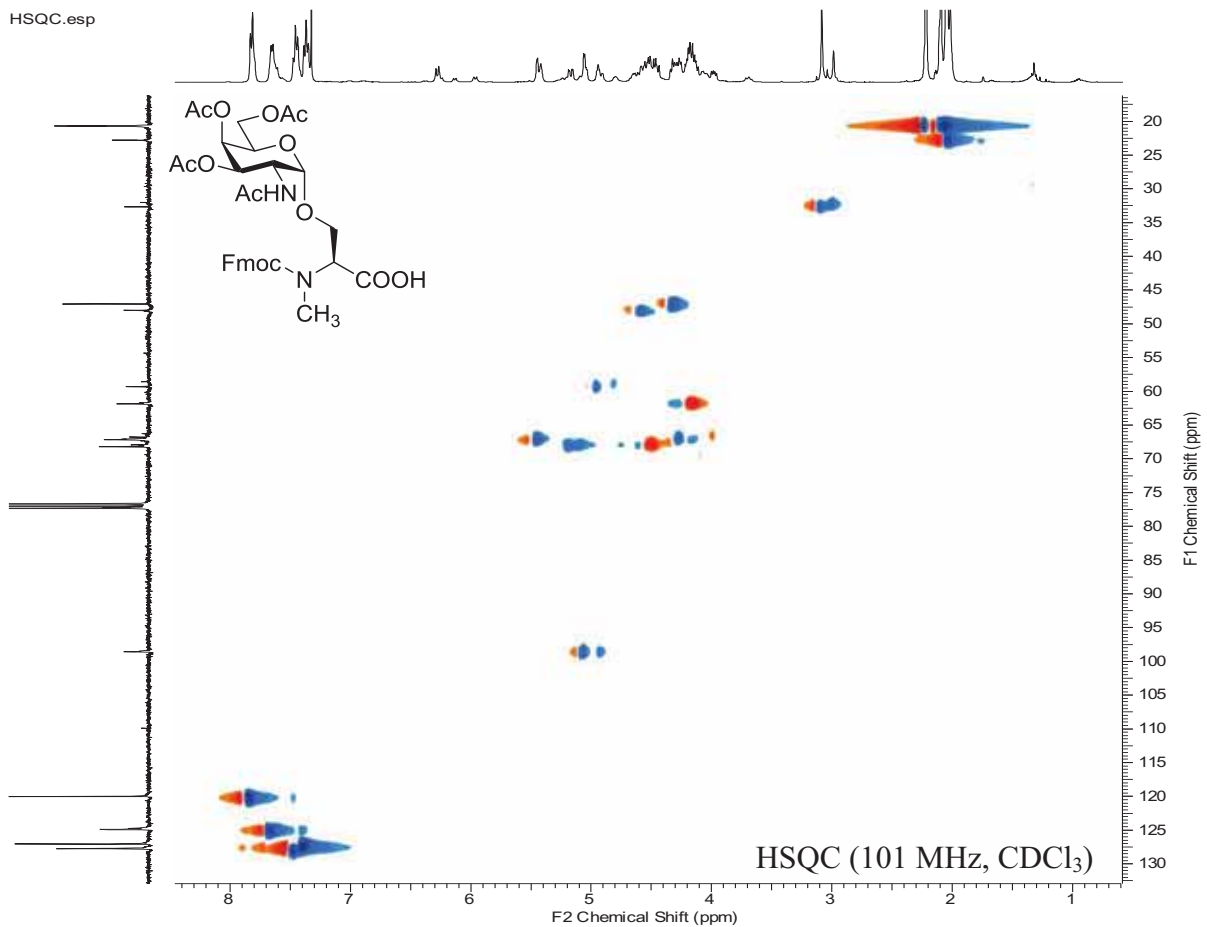
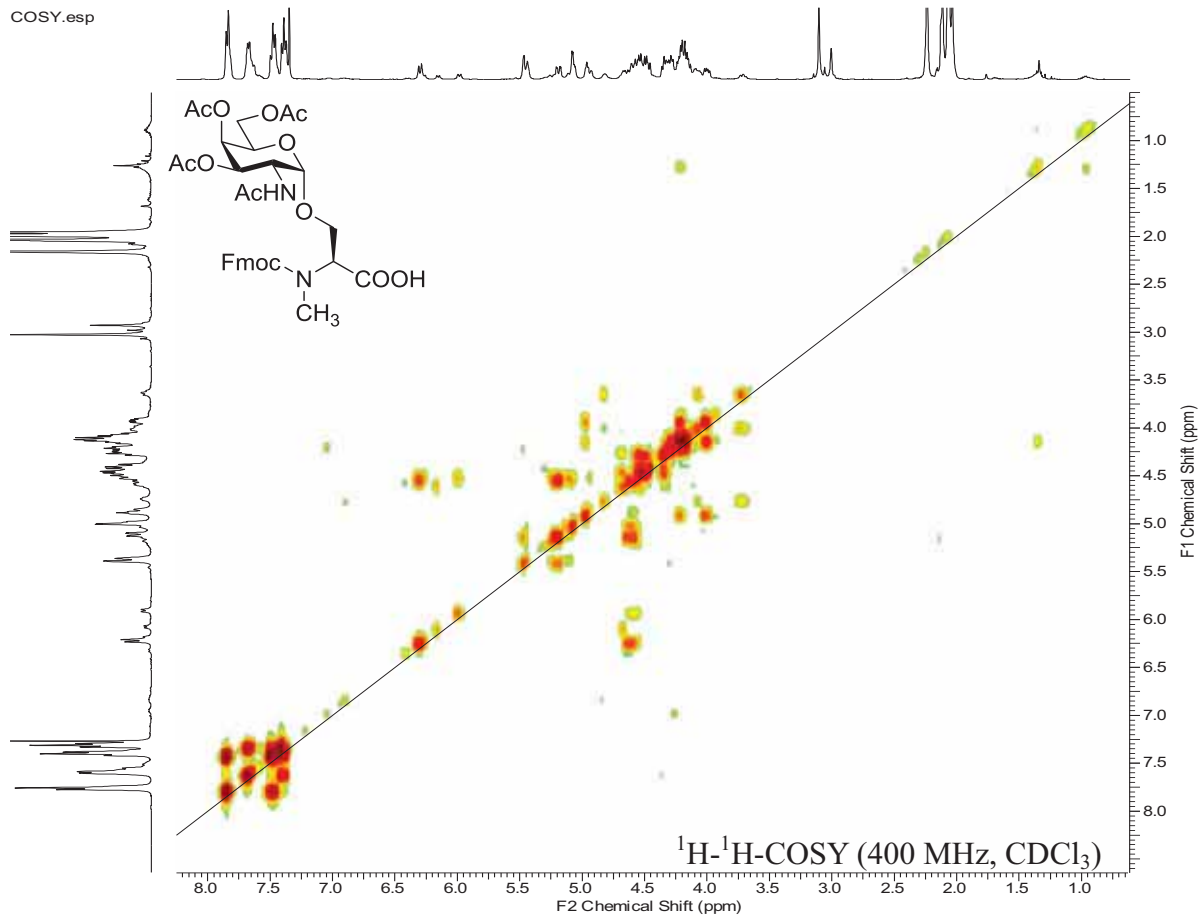
***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)]-*N*-methyl-L-serin (23)**(Fmoc-N-Me-Ser-( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH)<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>

AV3-1401A39.001.esp

<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

AV3-1401A39.002.esp

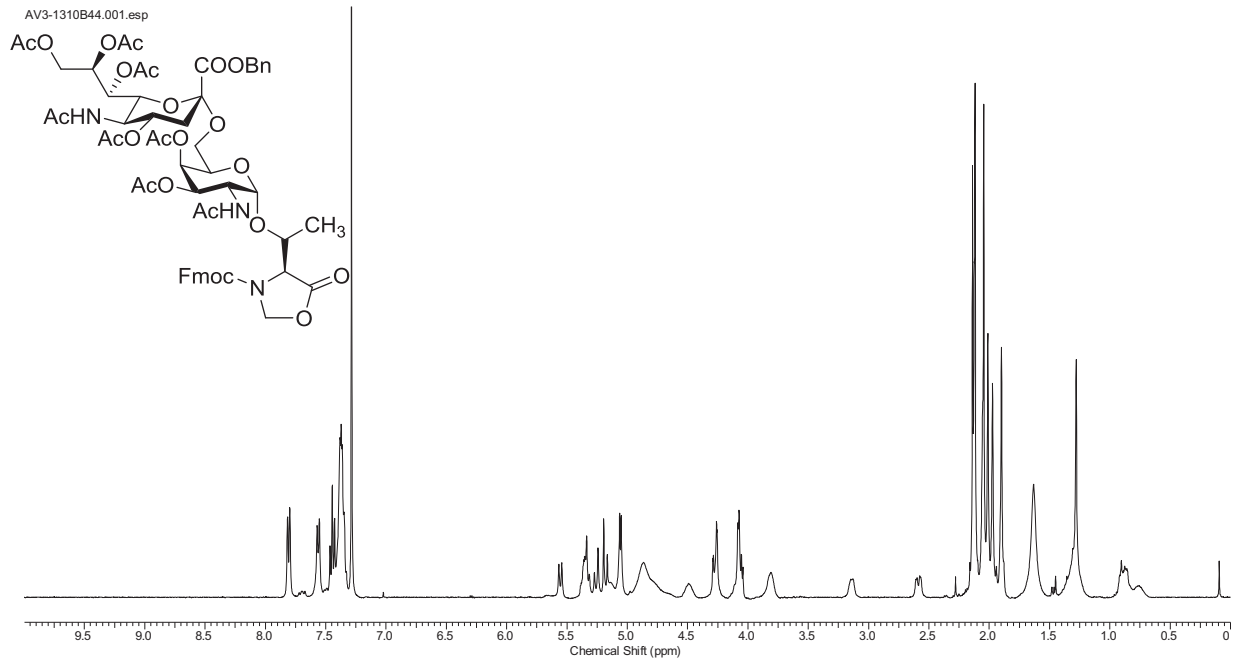




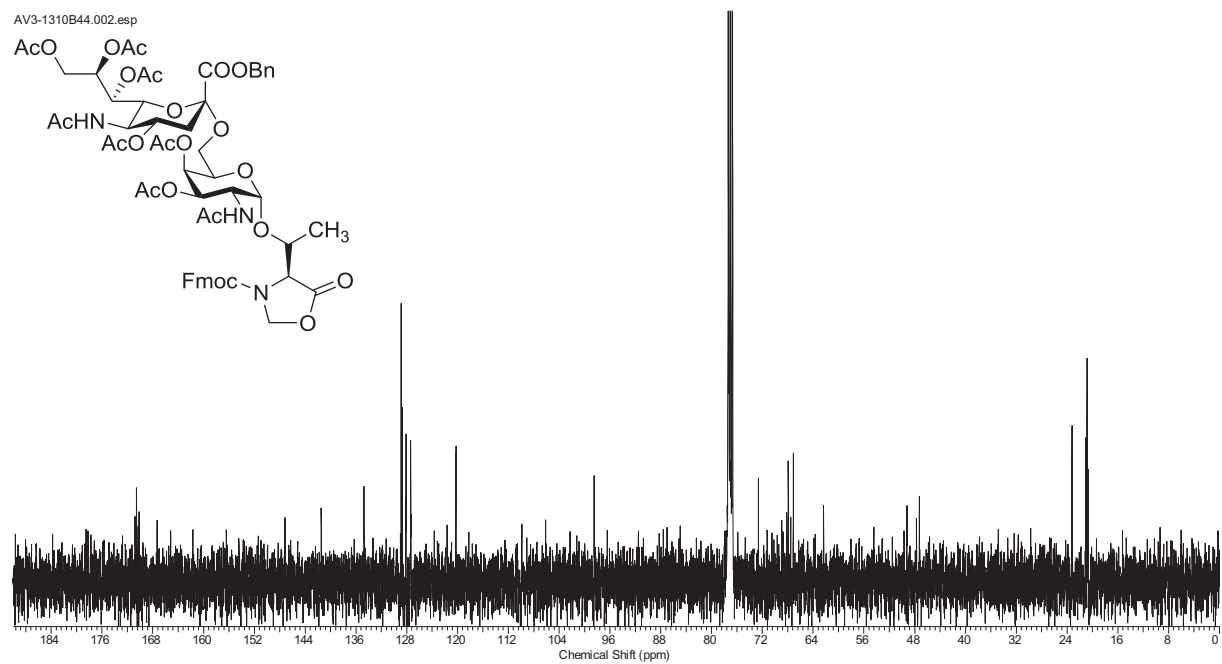
**(4S)-4-[O-{2-Acetamido-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxyglycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}]-3-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-5-oxo-1,3-oxazolidin (25)**

(Fmoc-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2→6)- $\alpha$ GalNAc)-Oxazolidinon)

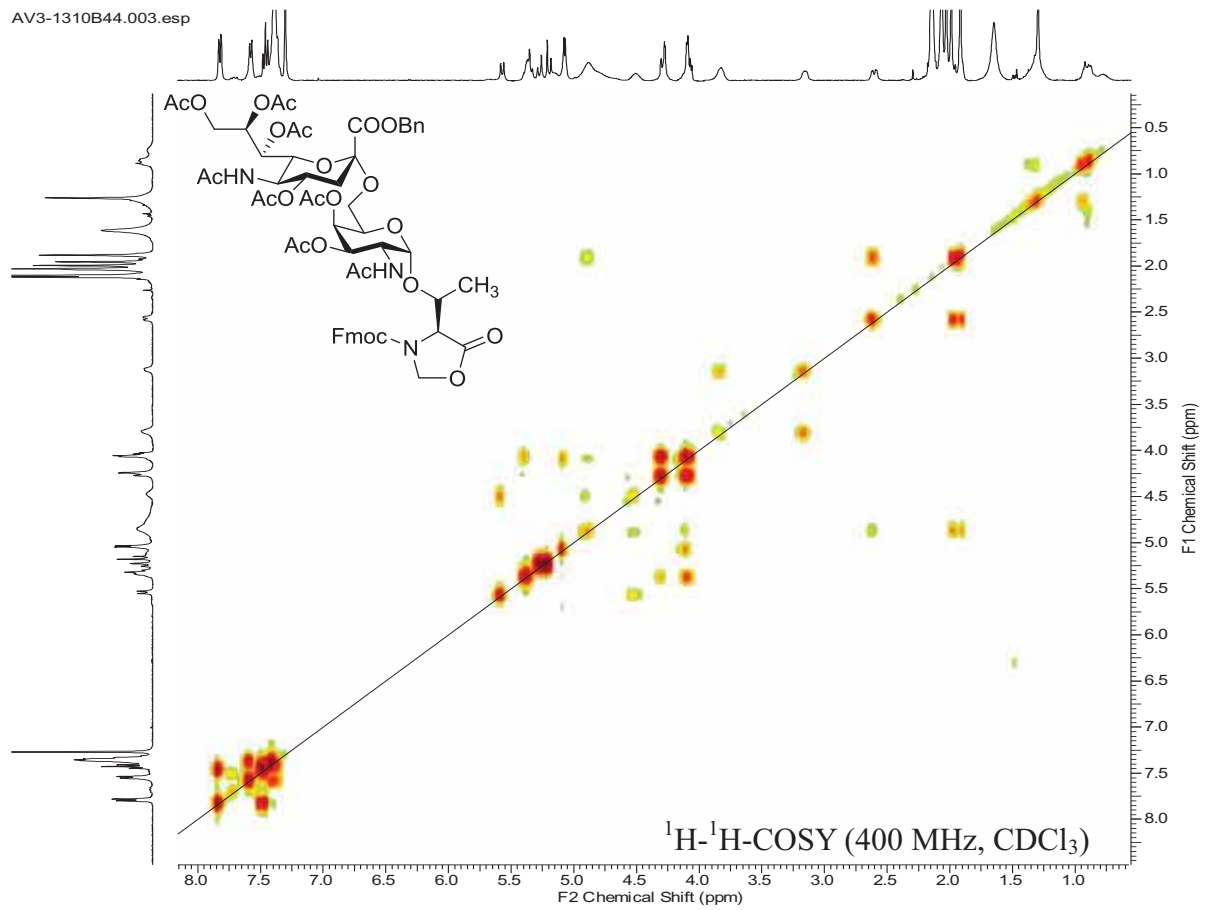
<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>



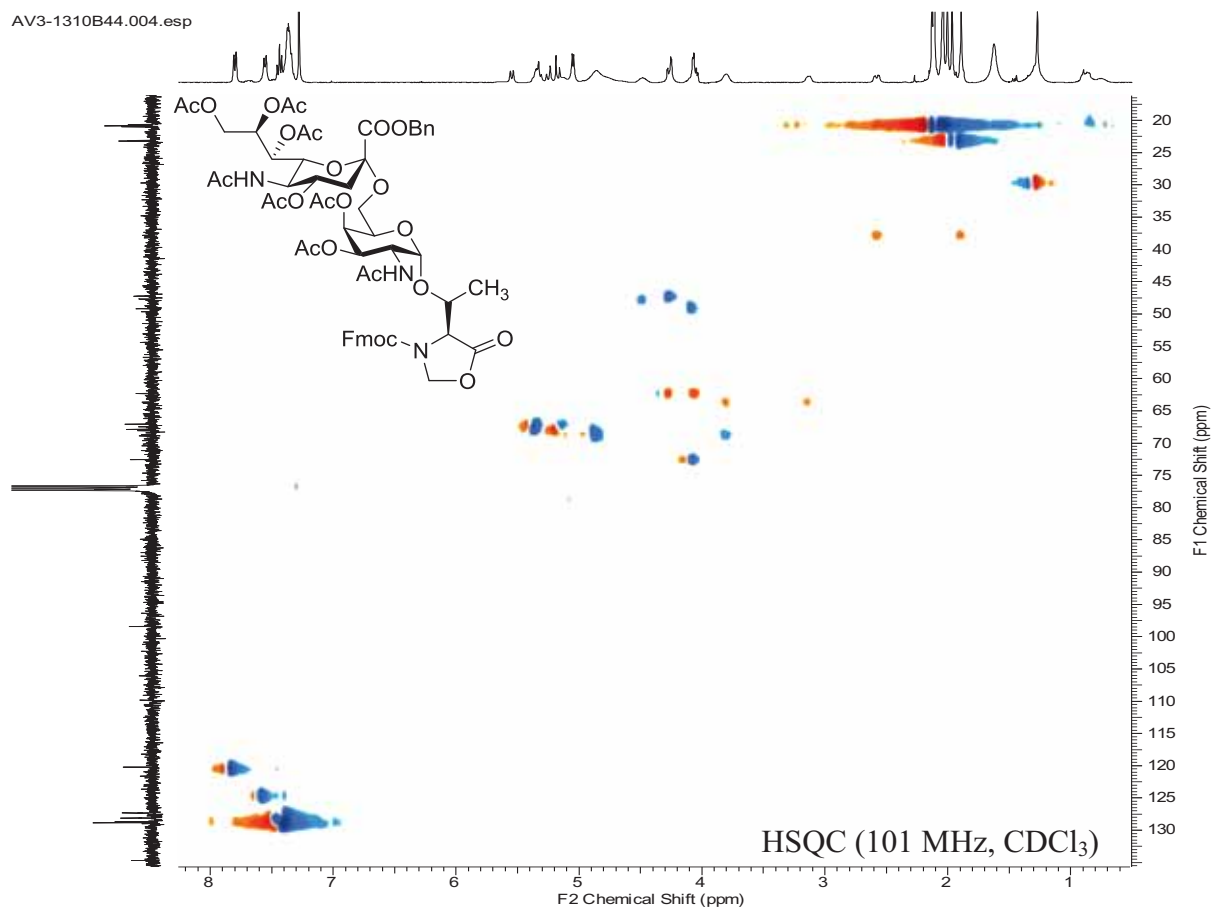
<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>



AV3-1310B44.003.esp



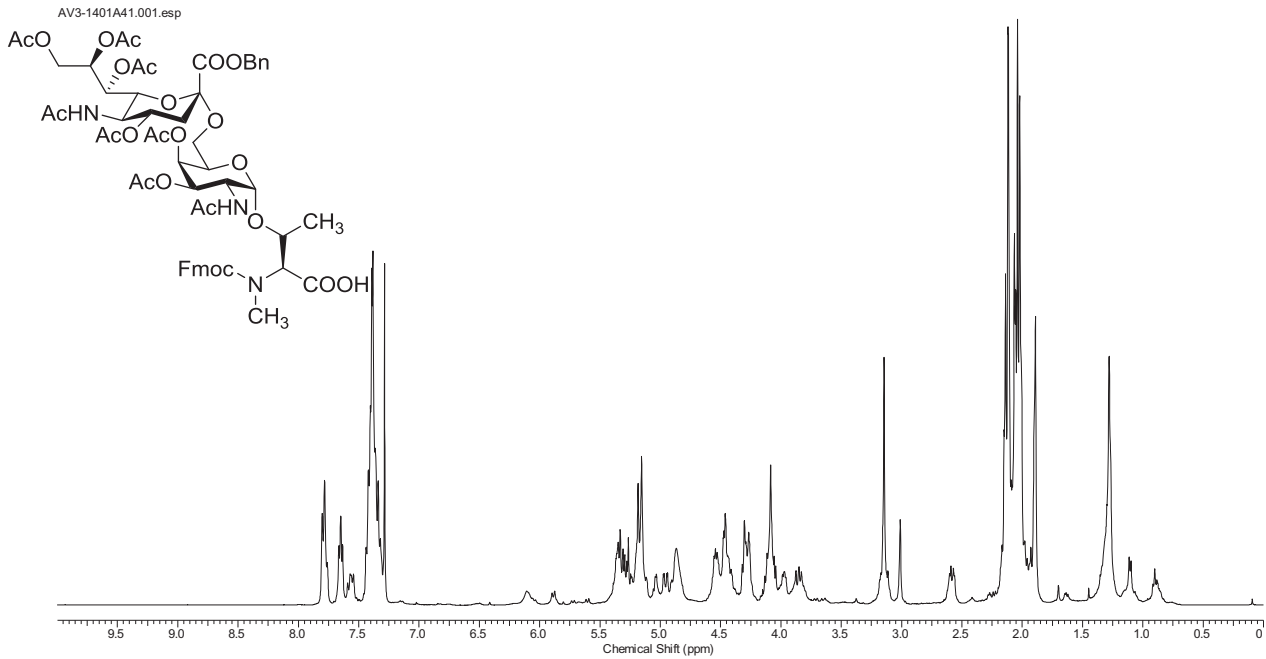
AV3-1310B44.004.esp



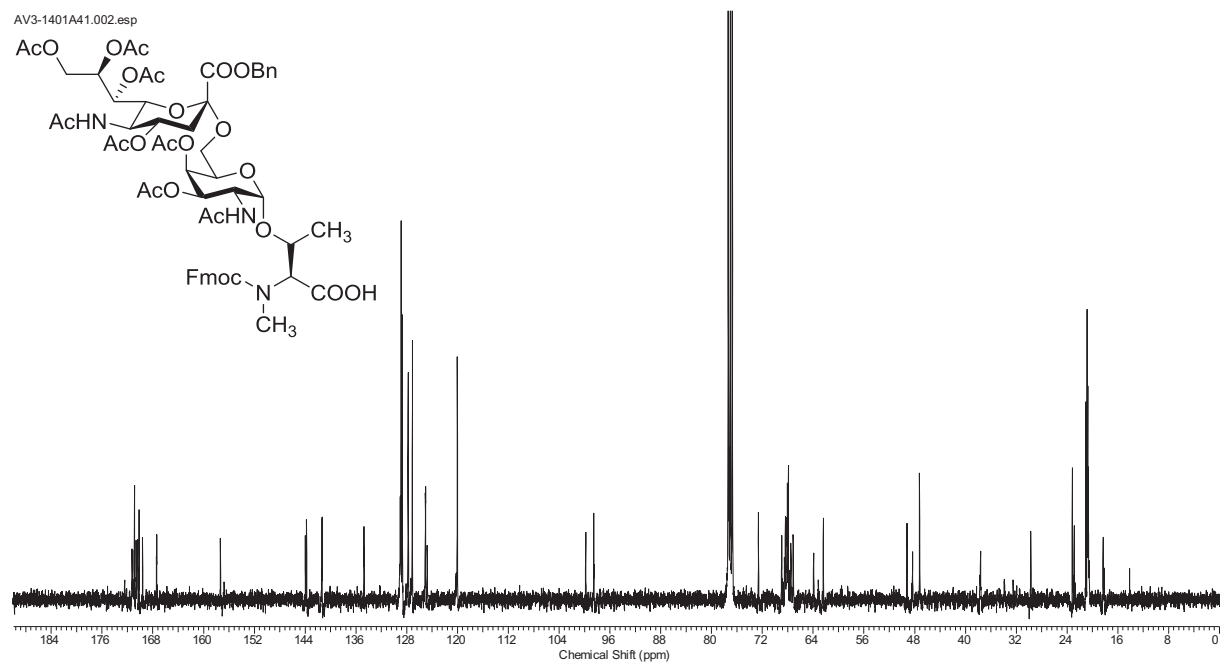
***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)-*on*]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}]-*N*-methyl-L-threonin (26)**

(Fmoc-N-Me-Thr-( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ GalNAc)-OH)

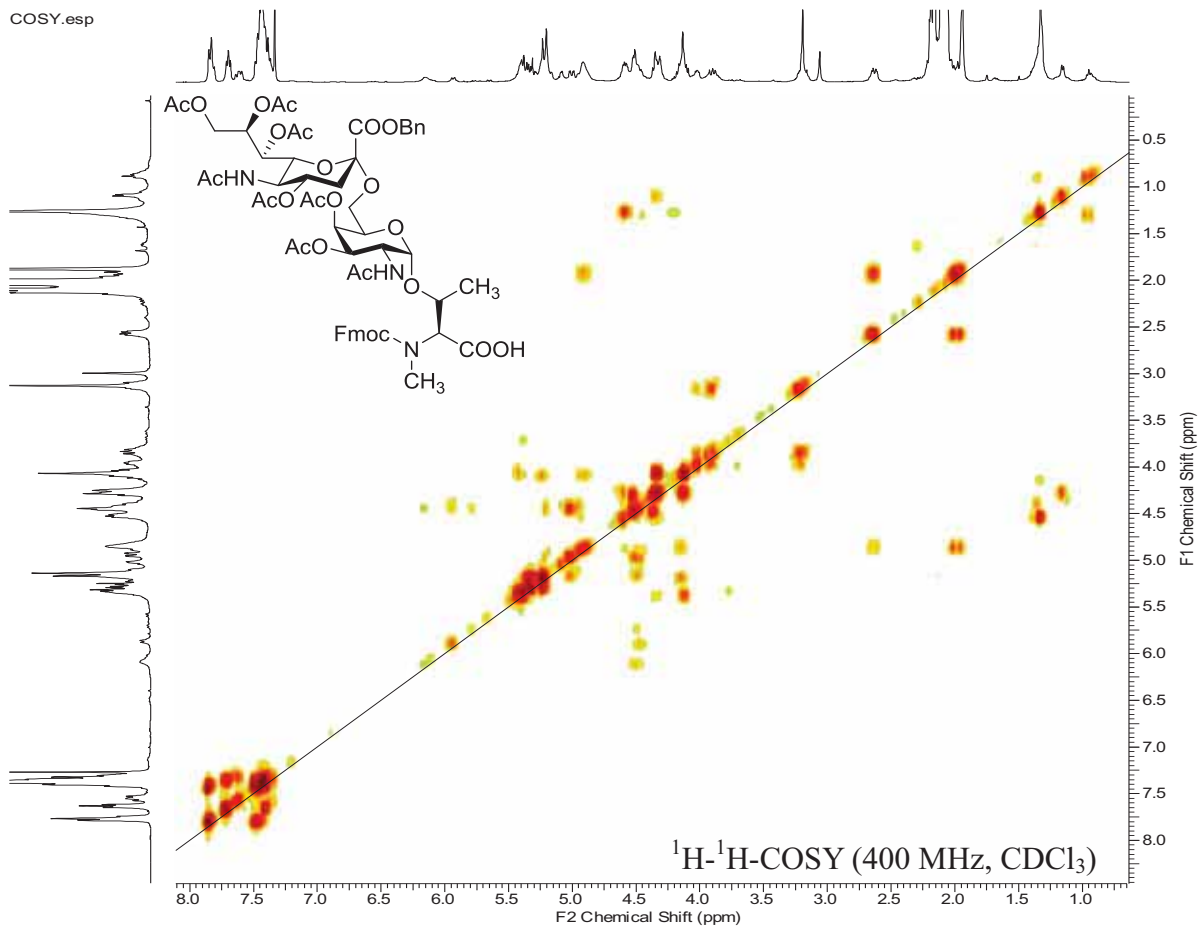
<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>



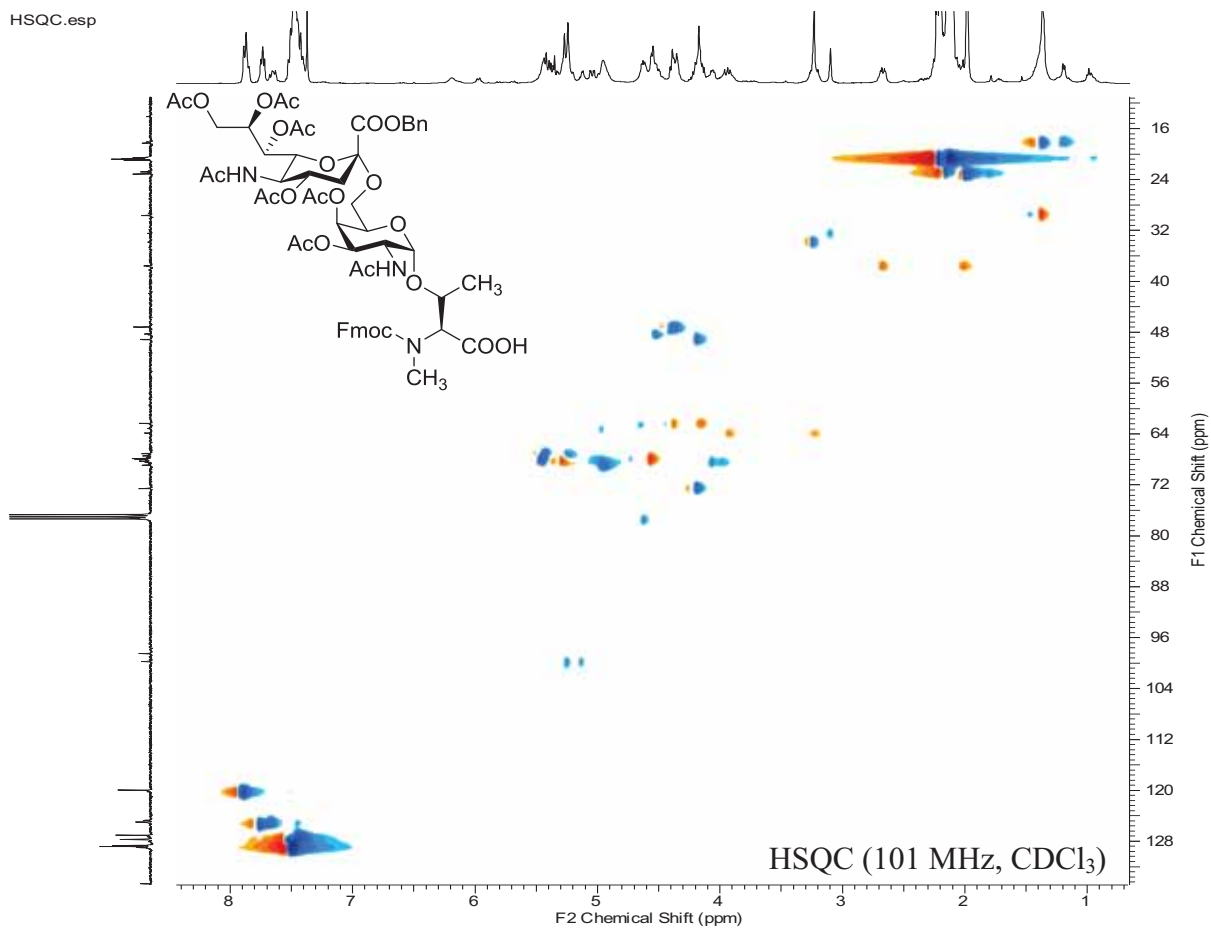
<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

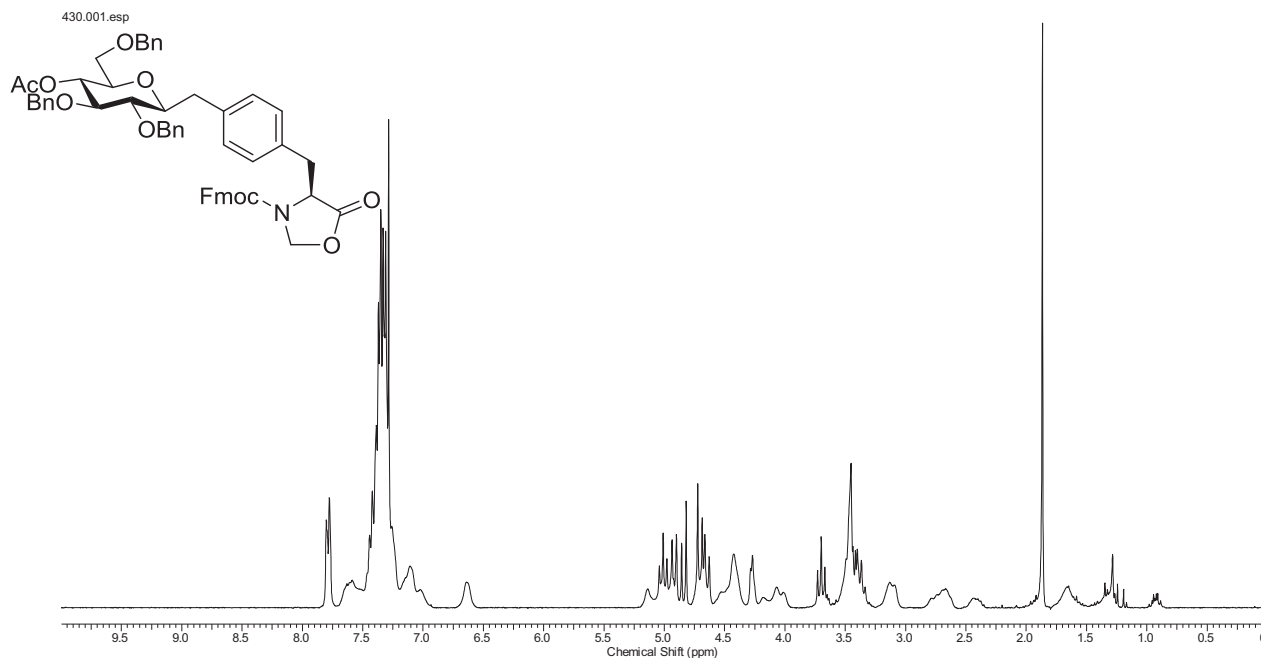
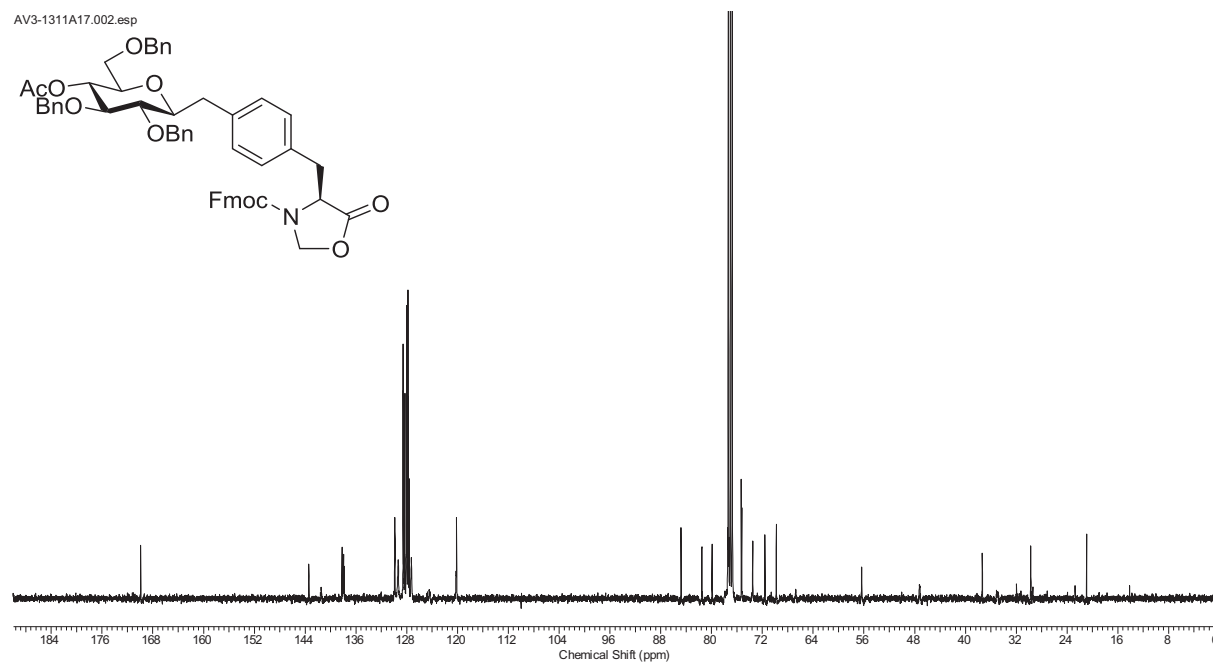


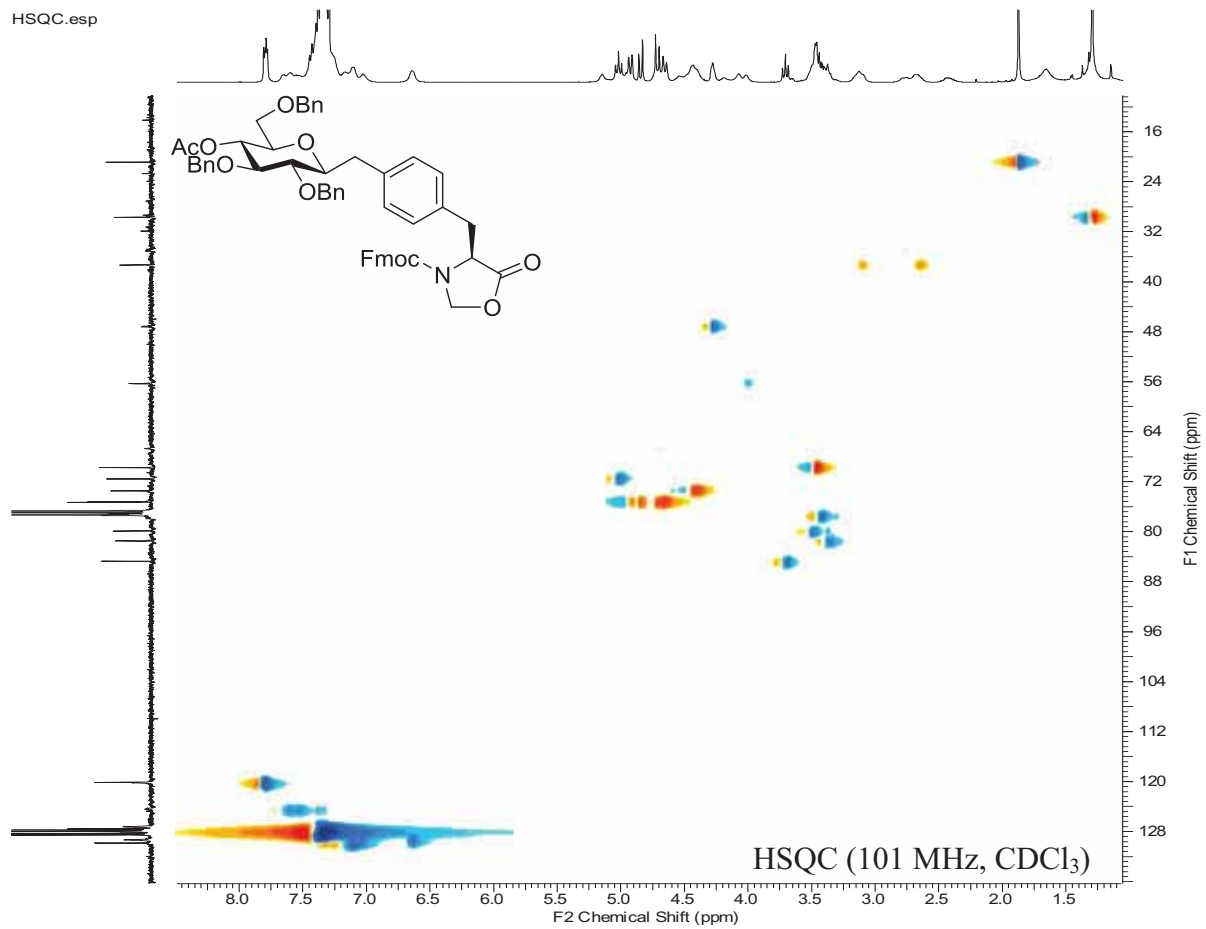
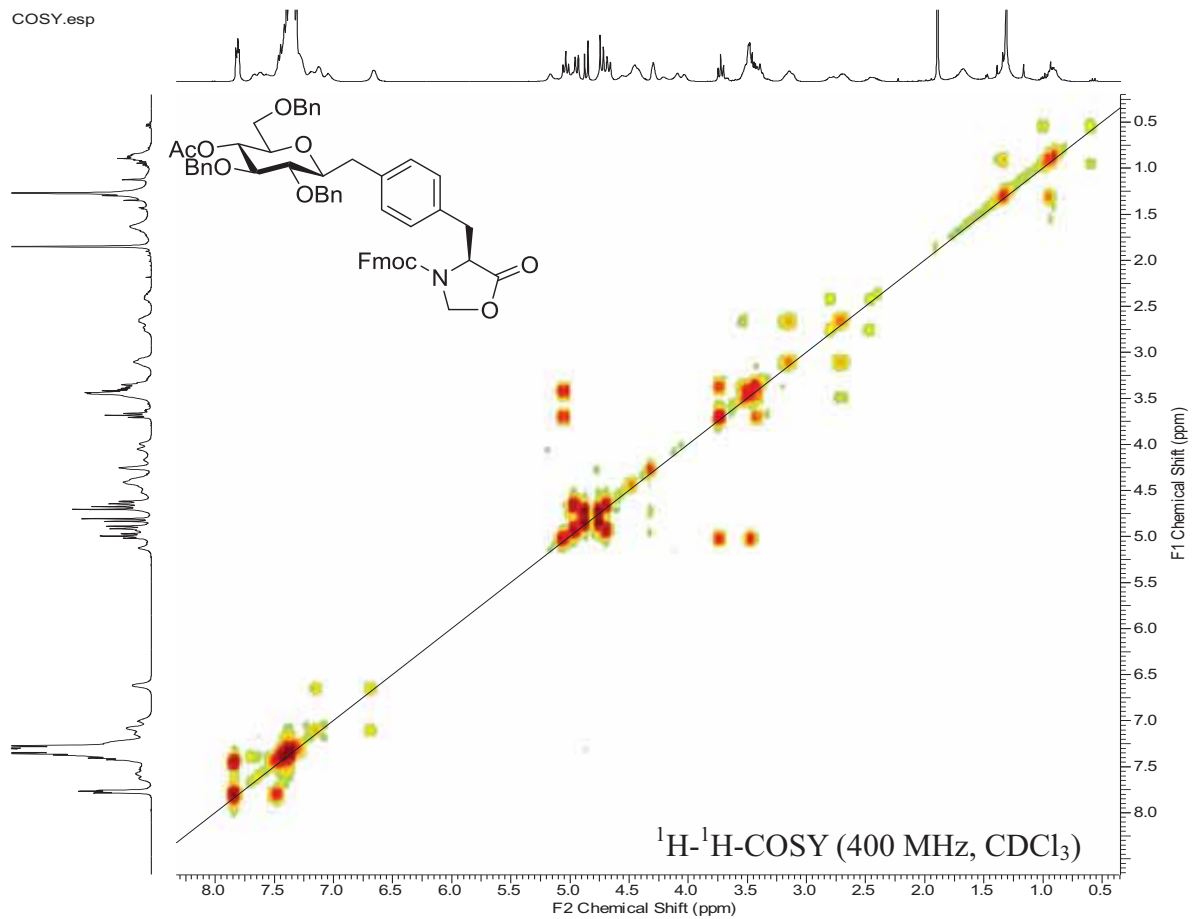
COSY.esp

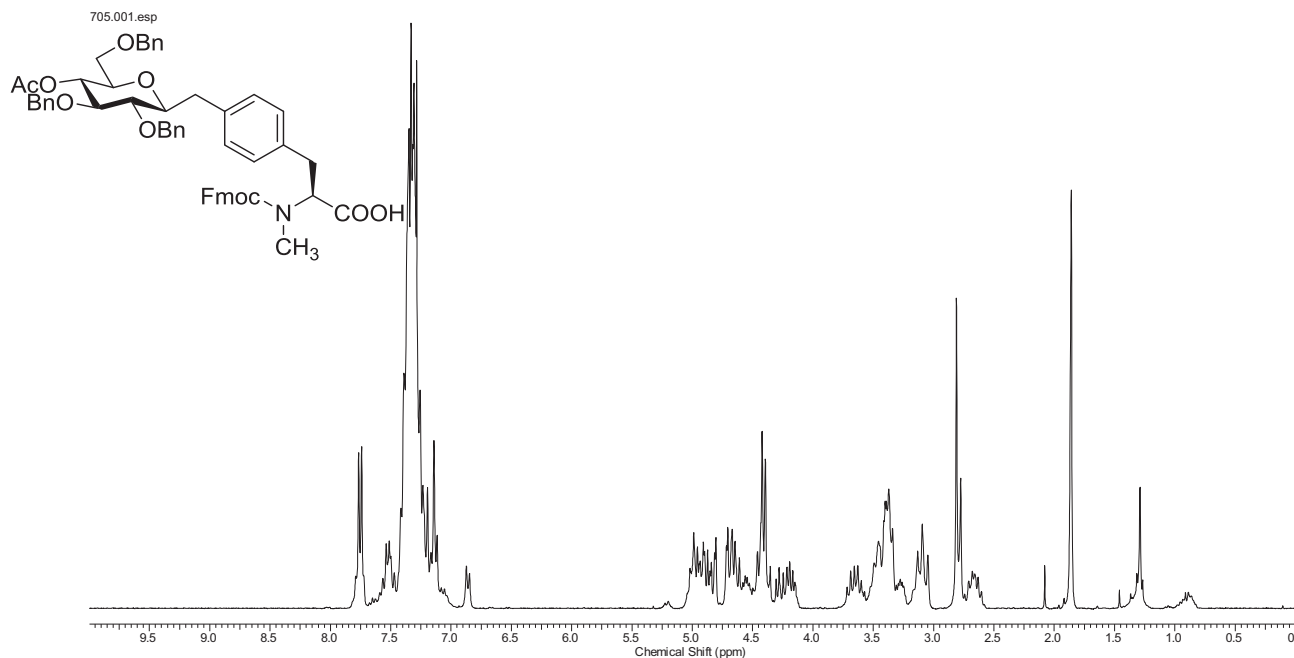
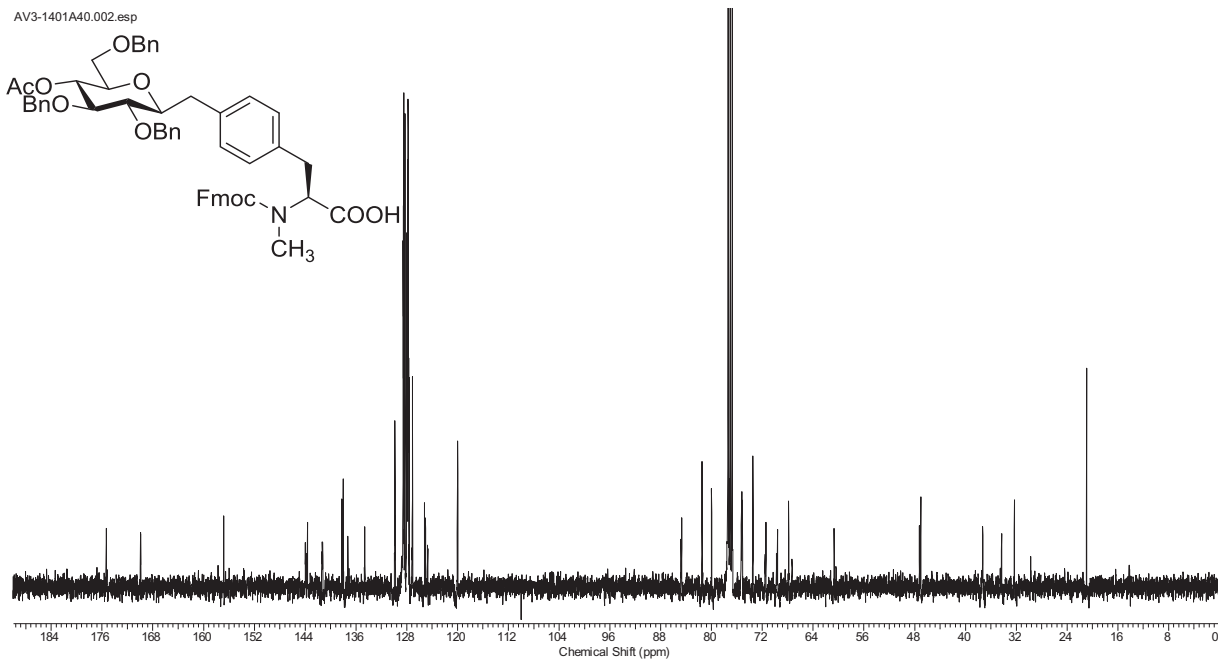


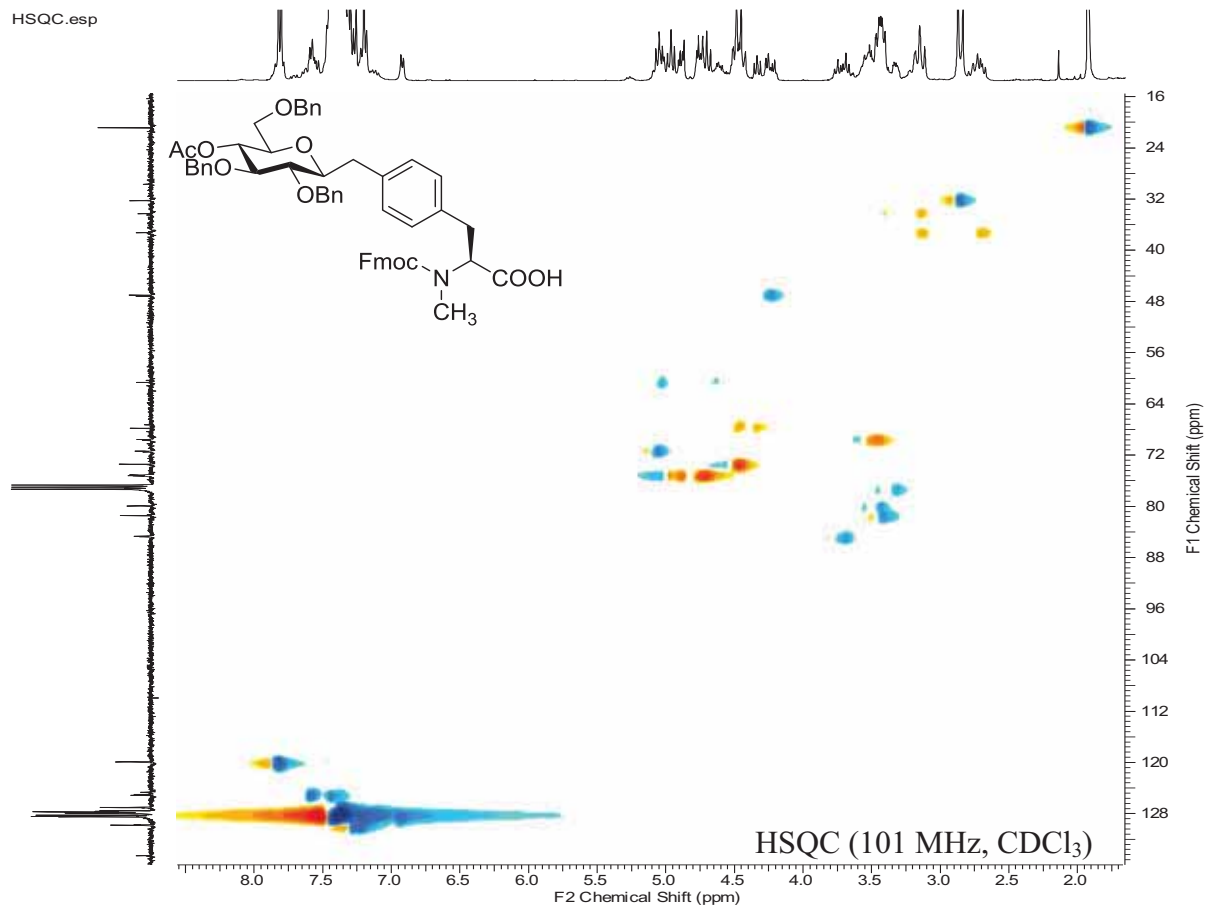
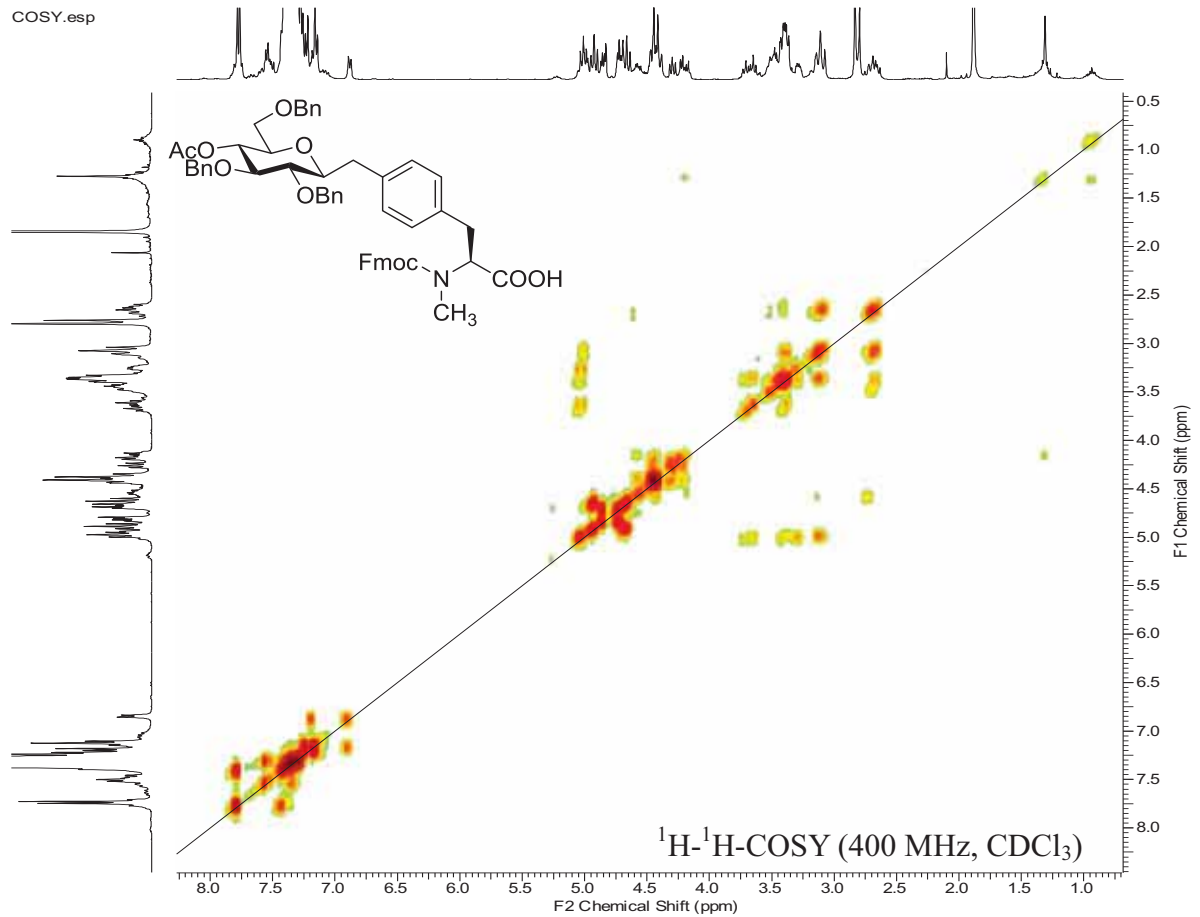
HSQC.esp



**(4*S*)-4-[C-[4-*O*-Acetyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -D-gluco-*pyranosyl*]-3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-5-oxo-1,3-oxazolidin (28)**(Fmoc-C-Tyr- $[\beta$ -AcBn<sub>3</sub>Glc]-Oxazolidinon)<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub><sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

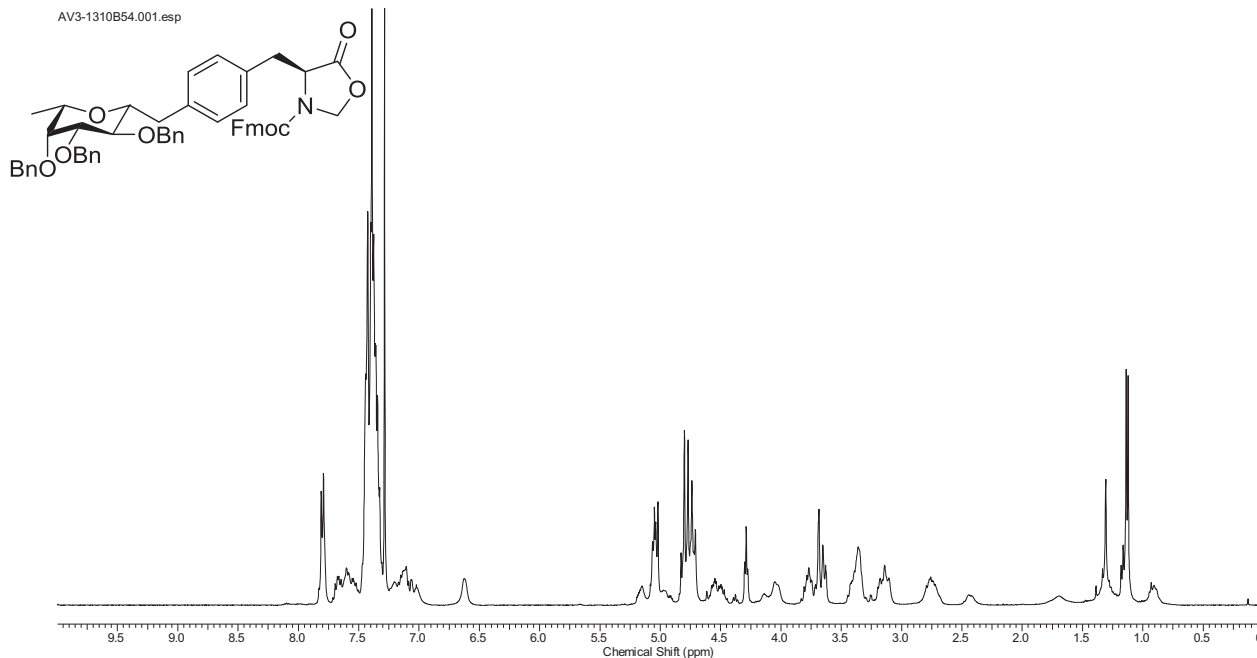


***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl]-*C*-[4-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl]]-*N*-methyl-*L*-tyrosin (29)**(Fmoc-N-Me-C-Tyr-[ $\beta$ -AcBn<sub>3</sub>Glc]-OH)<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub><sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

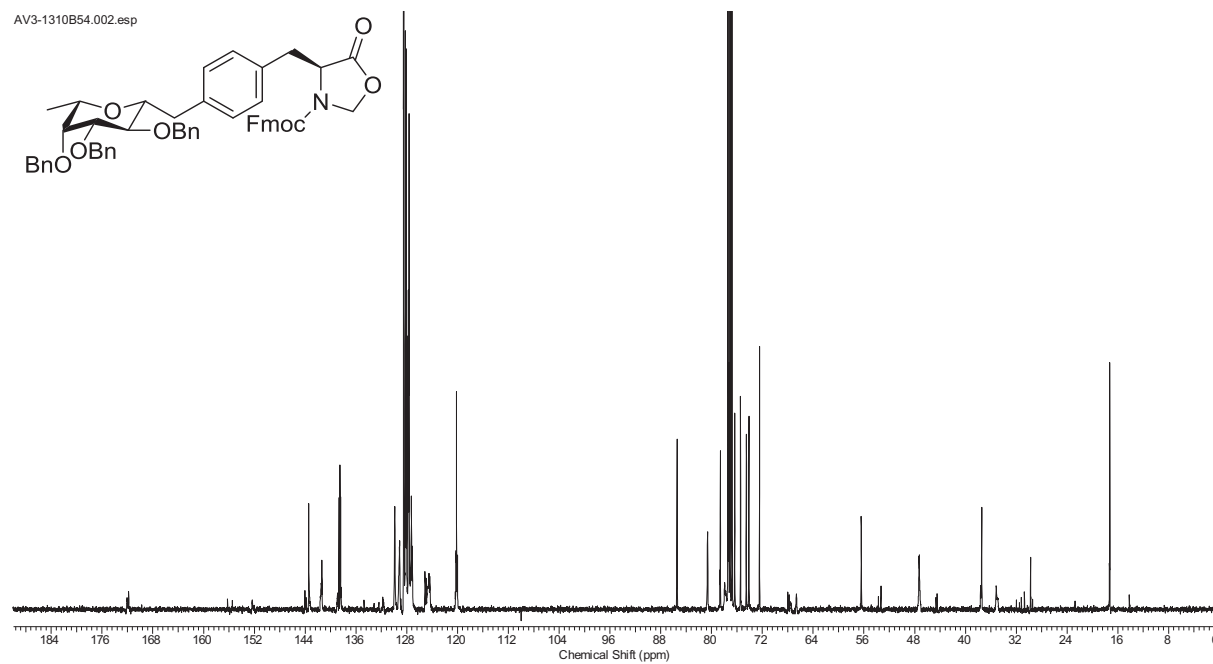


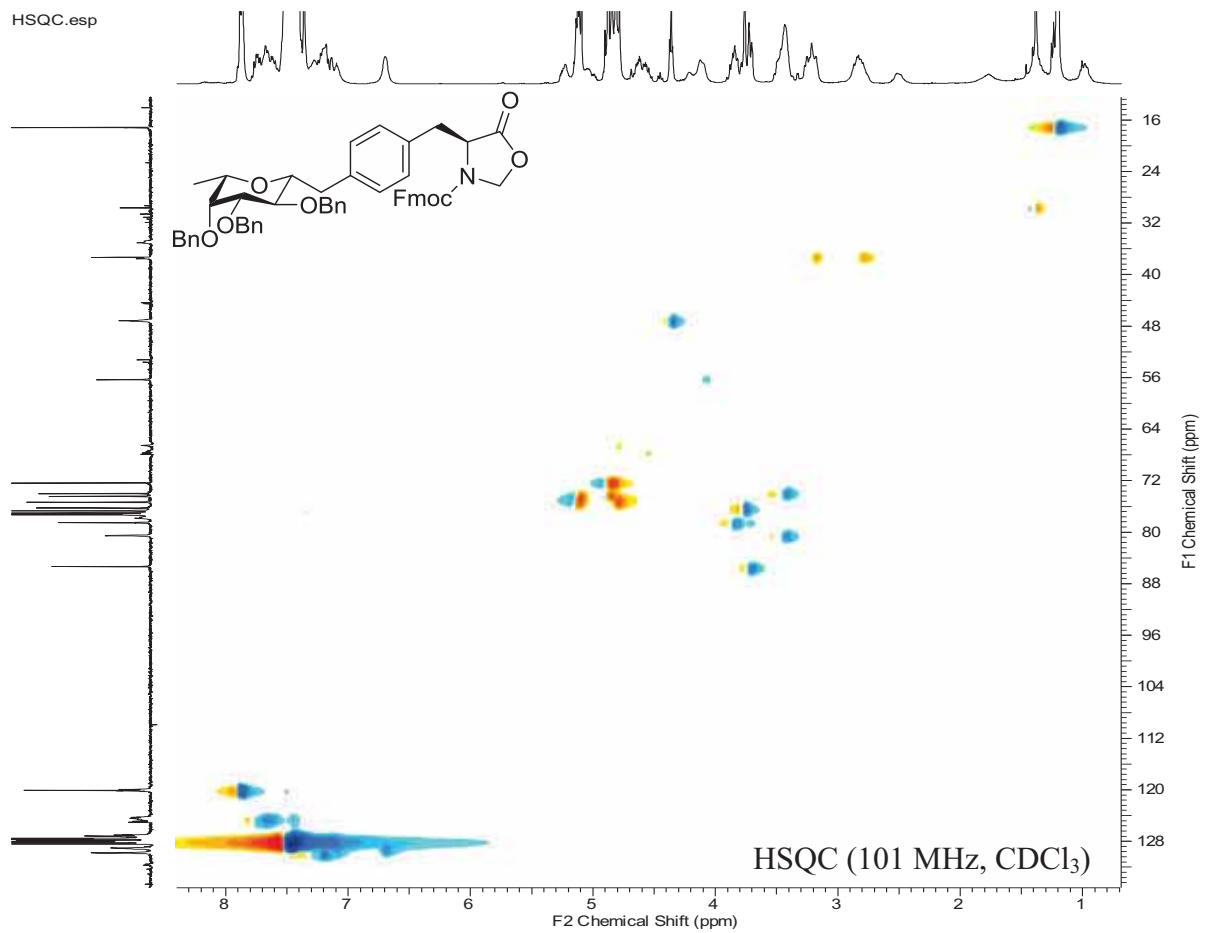
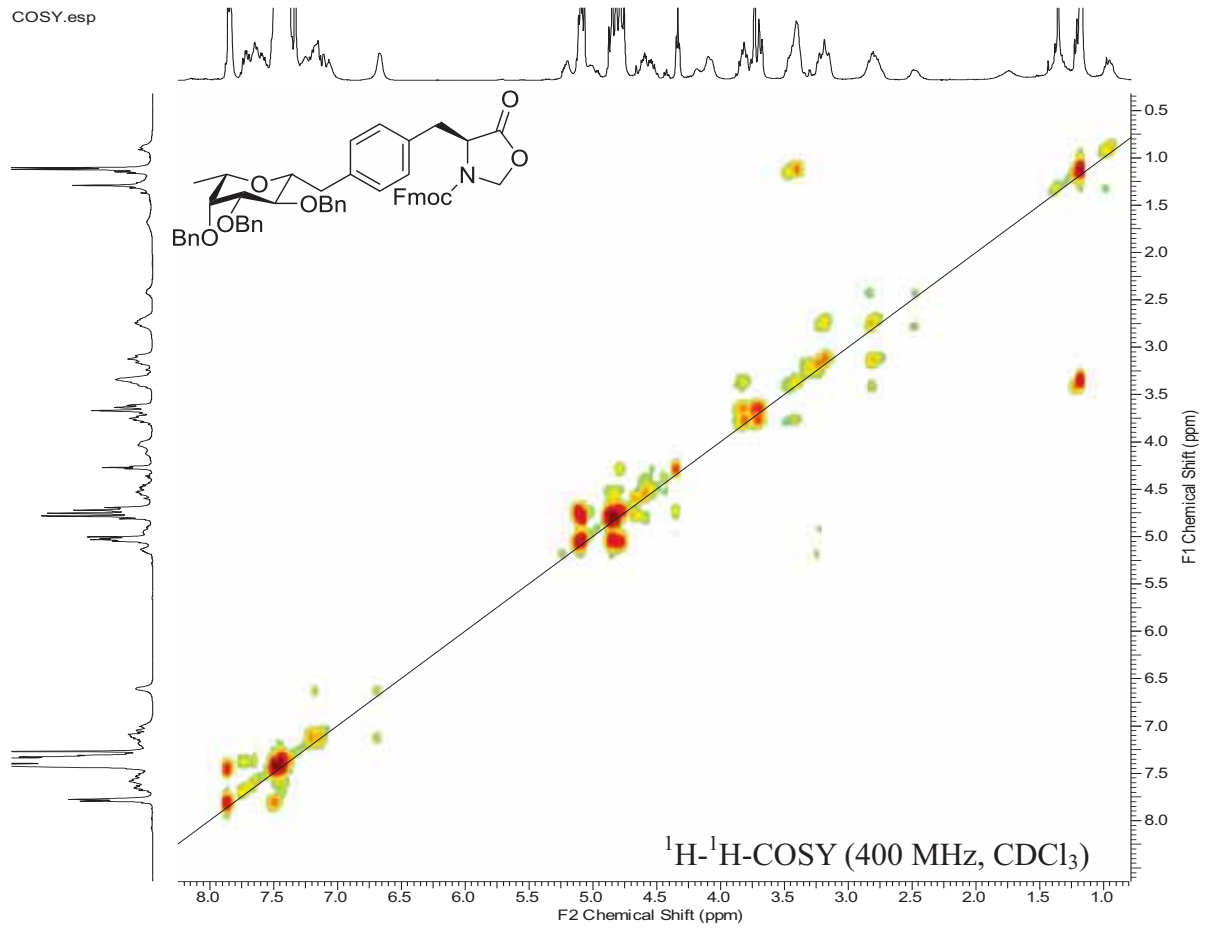
**(4S)-4-[C-(2,3,4-tri-O-Benzyl-β-L-fucopyranosyl)-L-tyrosin]-3-(9H-Fluoren-9-ylmethyl)-5-oxo-1,3-oxazolidin (31)**(Fmoc-C-Tyr-[β-Bn<sub>3</sub>Fuc]-Oxazolidinon)<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>

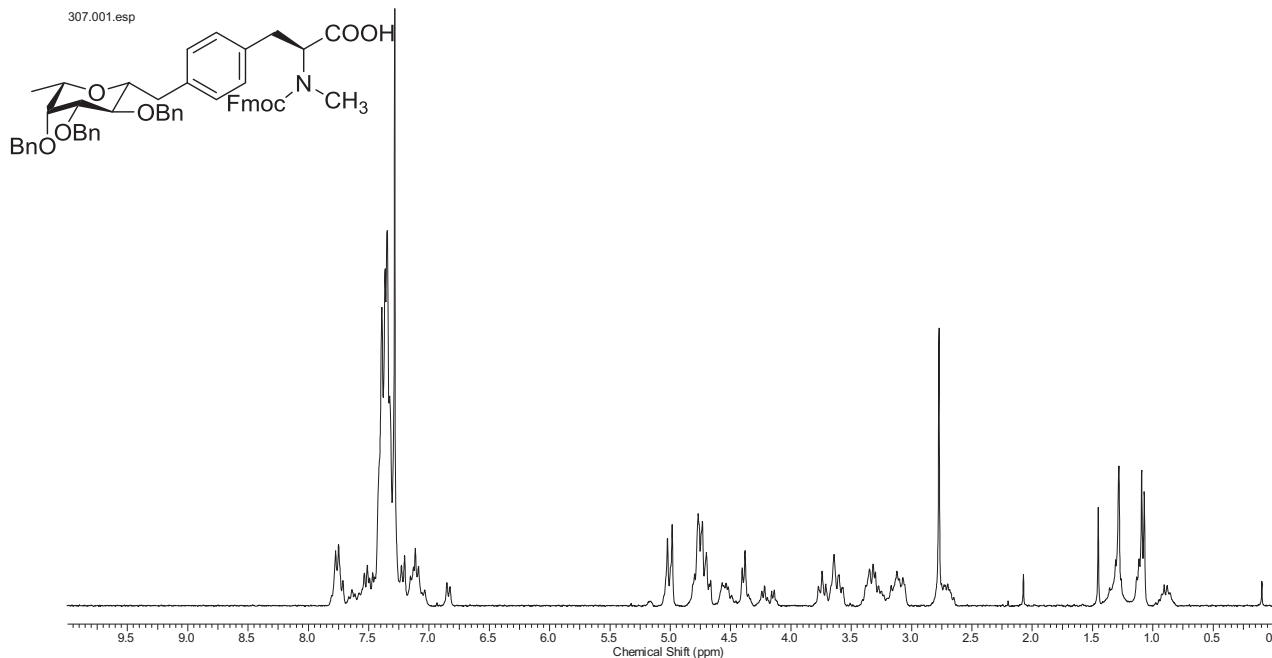
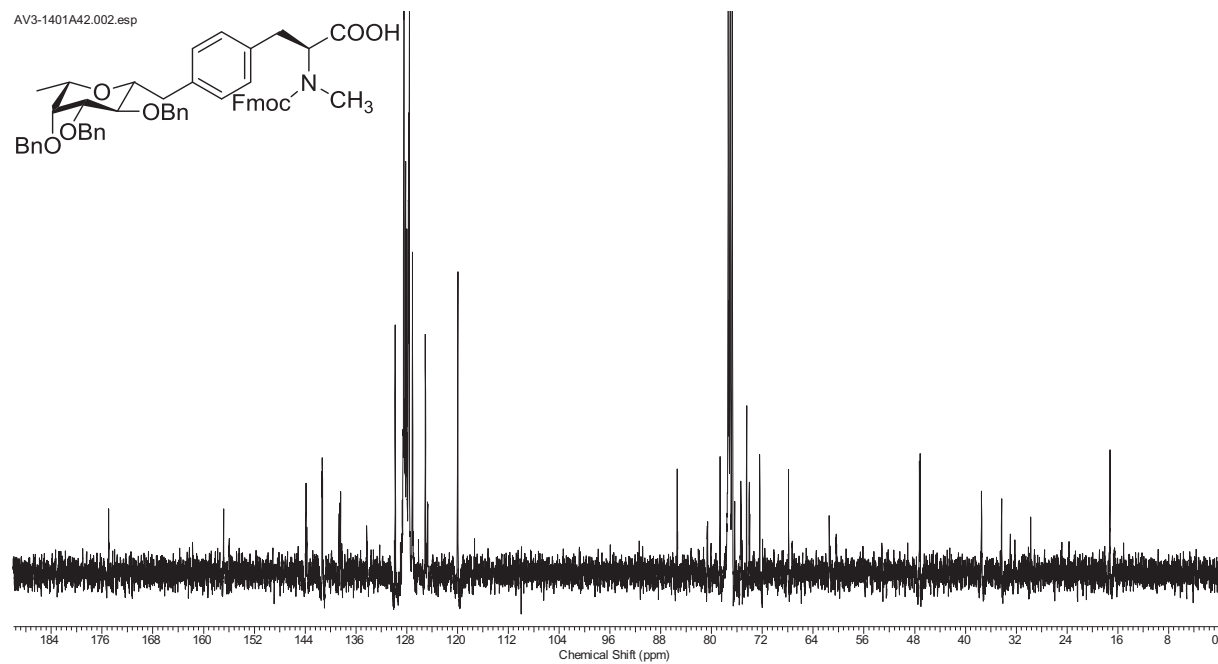
AV3-1310B54.001.esp

<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>

AV3-1310B54.002.esp





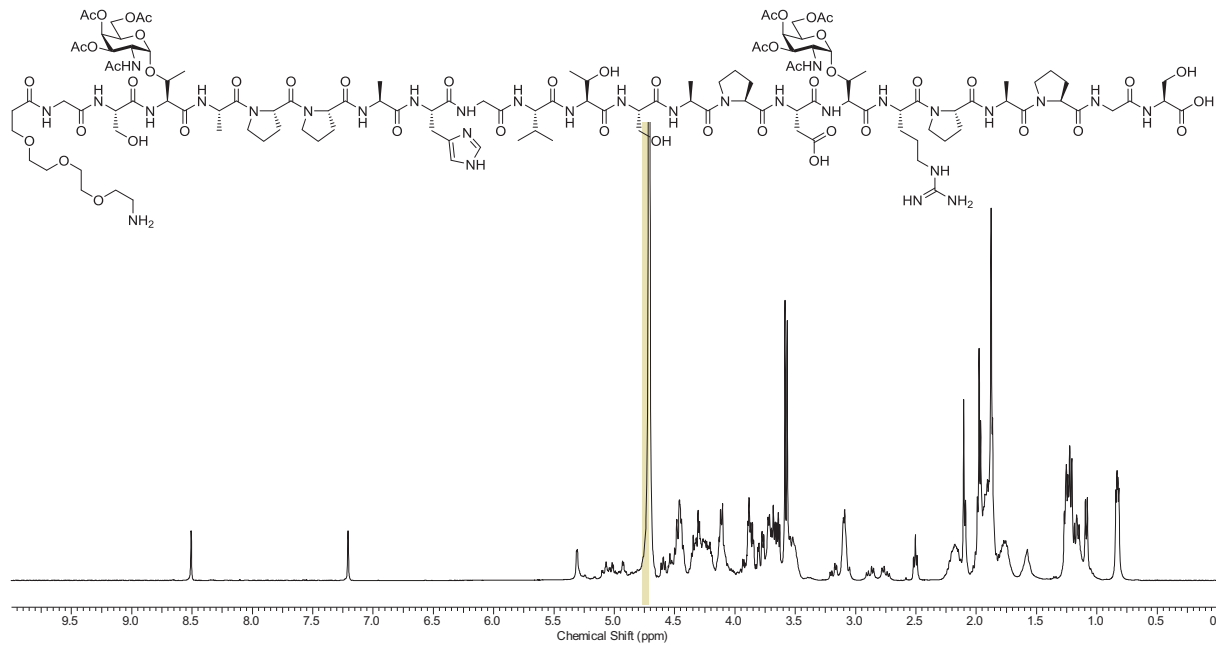
***N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*C*-[2,3,4-tri-*O*-benzyl- $\beta$ -L-fucopyranosyl]]-*N*-methyl-L-tyrosin (32)**(Fmoc-N-Me-C-Tyr-[ $\beta$ -Bn<sub>3</sub>Fuc]-OH)<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, CDCl<sub>3</sub><sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, CDCl<sub>3</sub>



**Amino-4,7,10-trioxa-dodecylamido-*N*-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (53)**

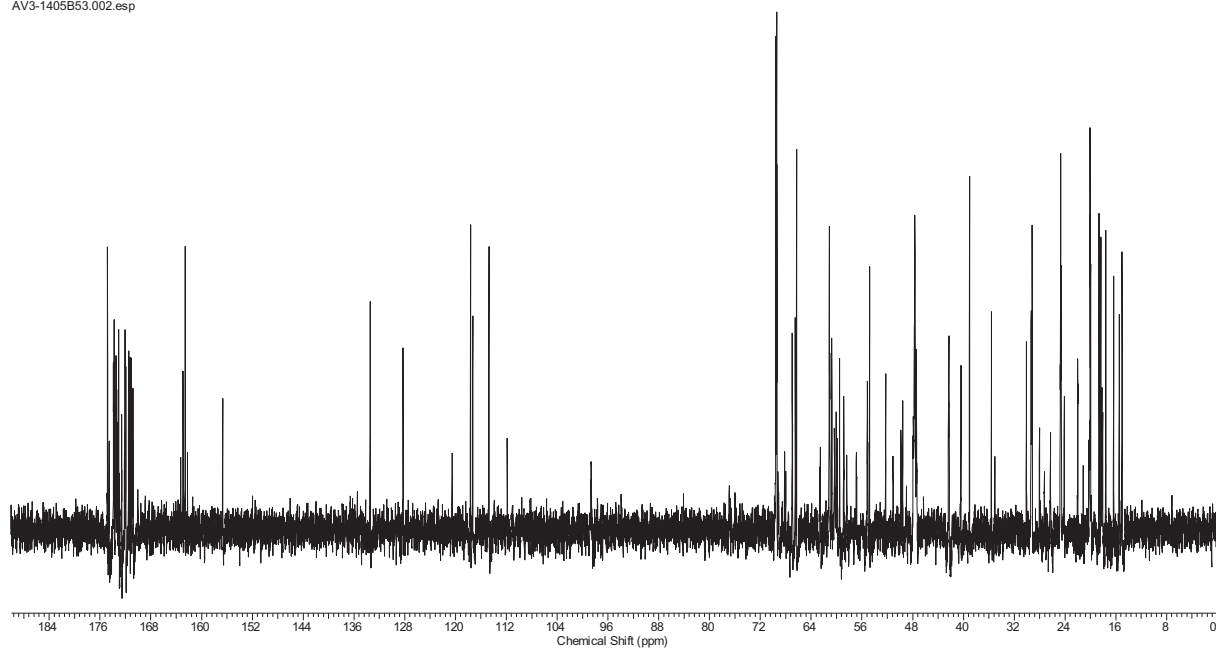
(H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)

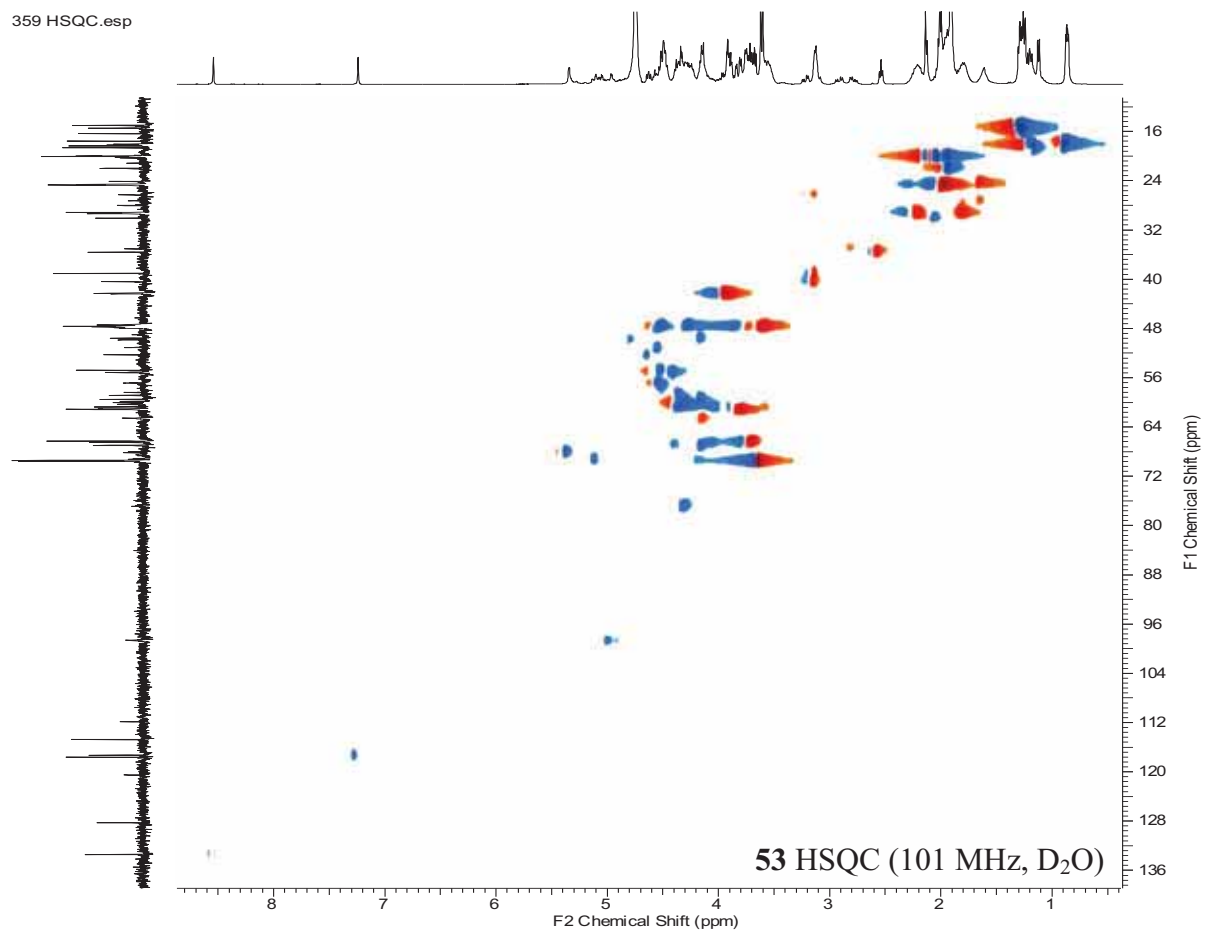
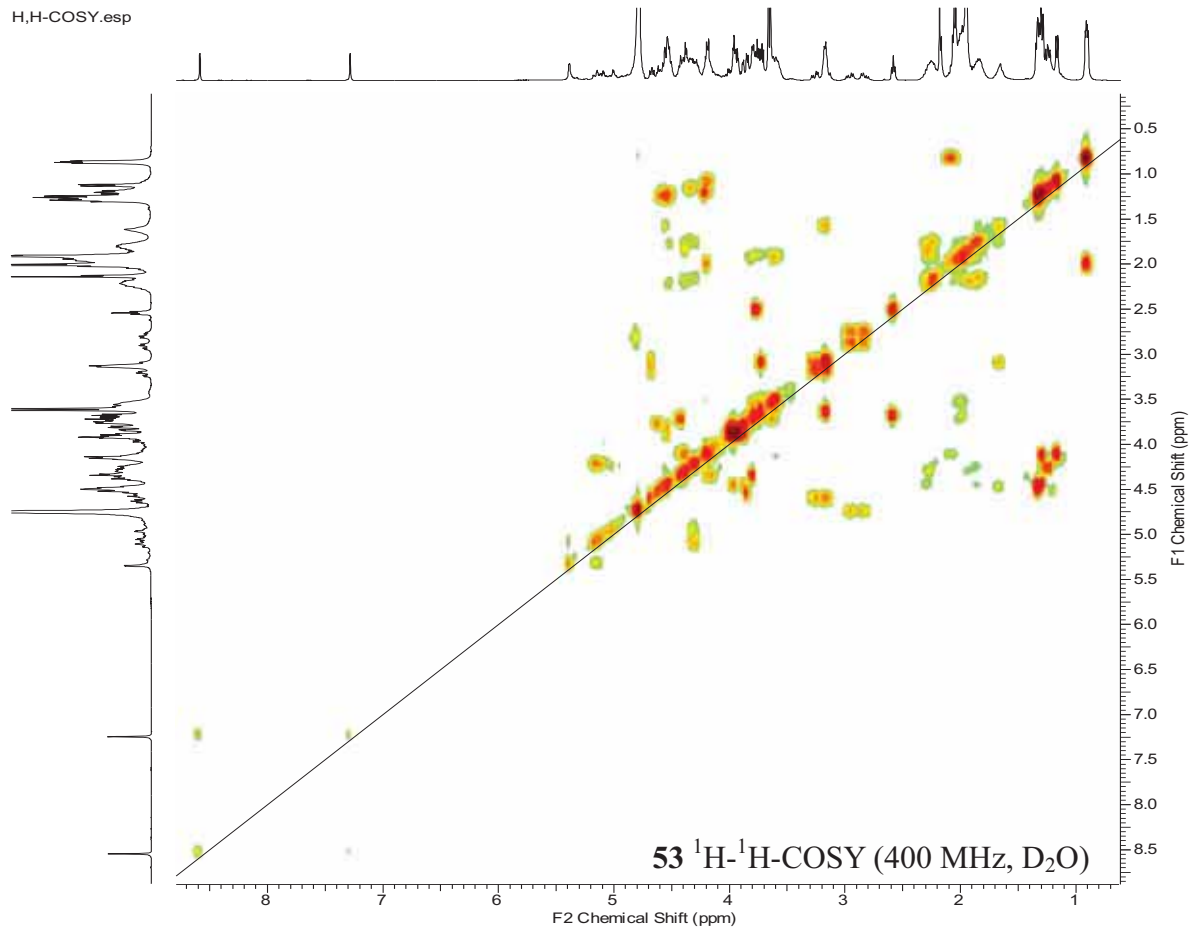
<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, D<sub>2</sub>O



<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, D<sub>2</sub>O

AV3-1405B53.002.esp

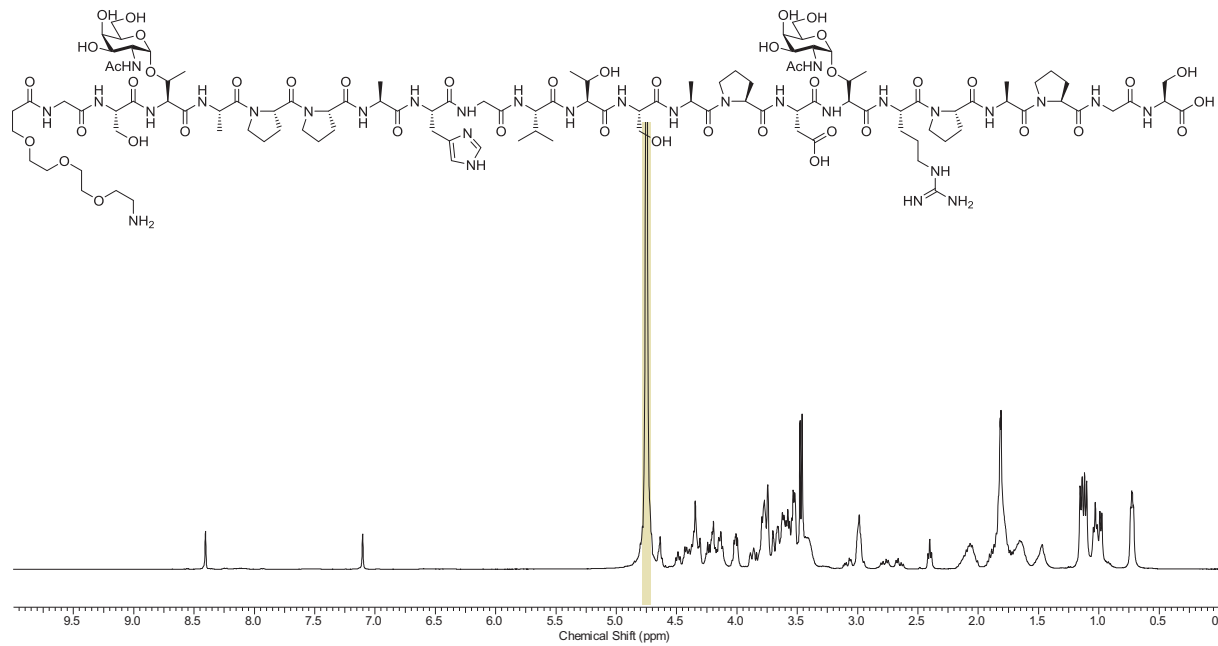




**Amino-4,7,10-trioxa-dodecylamido-*N*-L-glycyl-L-seryl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (54)**

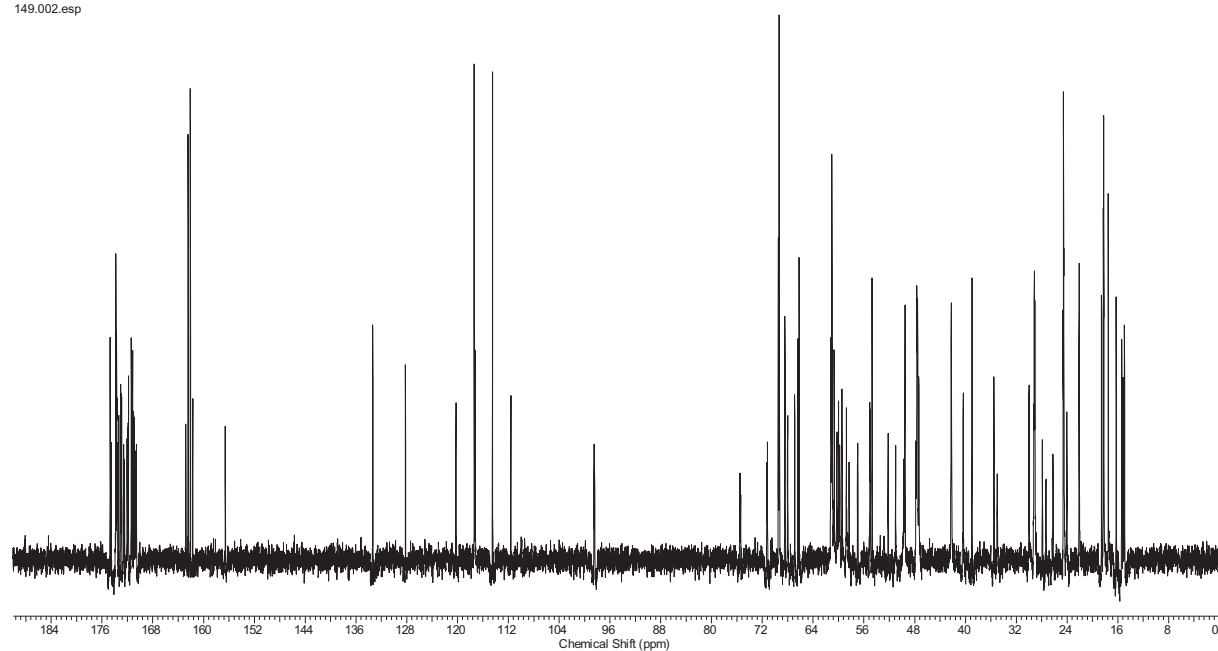
(H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)

<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, D<sub>2</sub>O

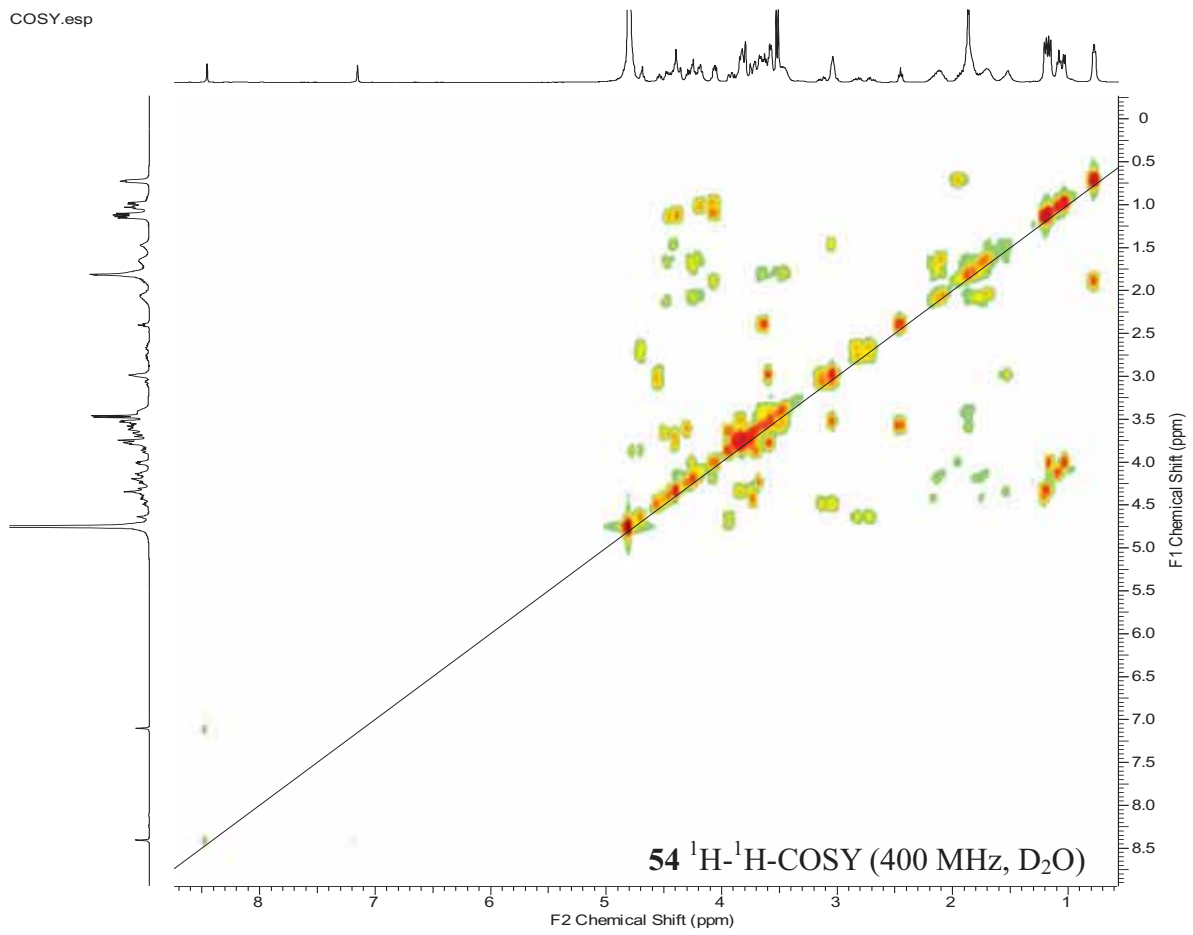


<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, D<sub>2</sub>O

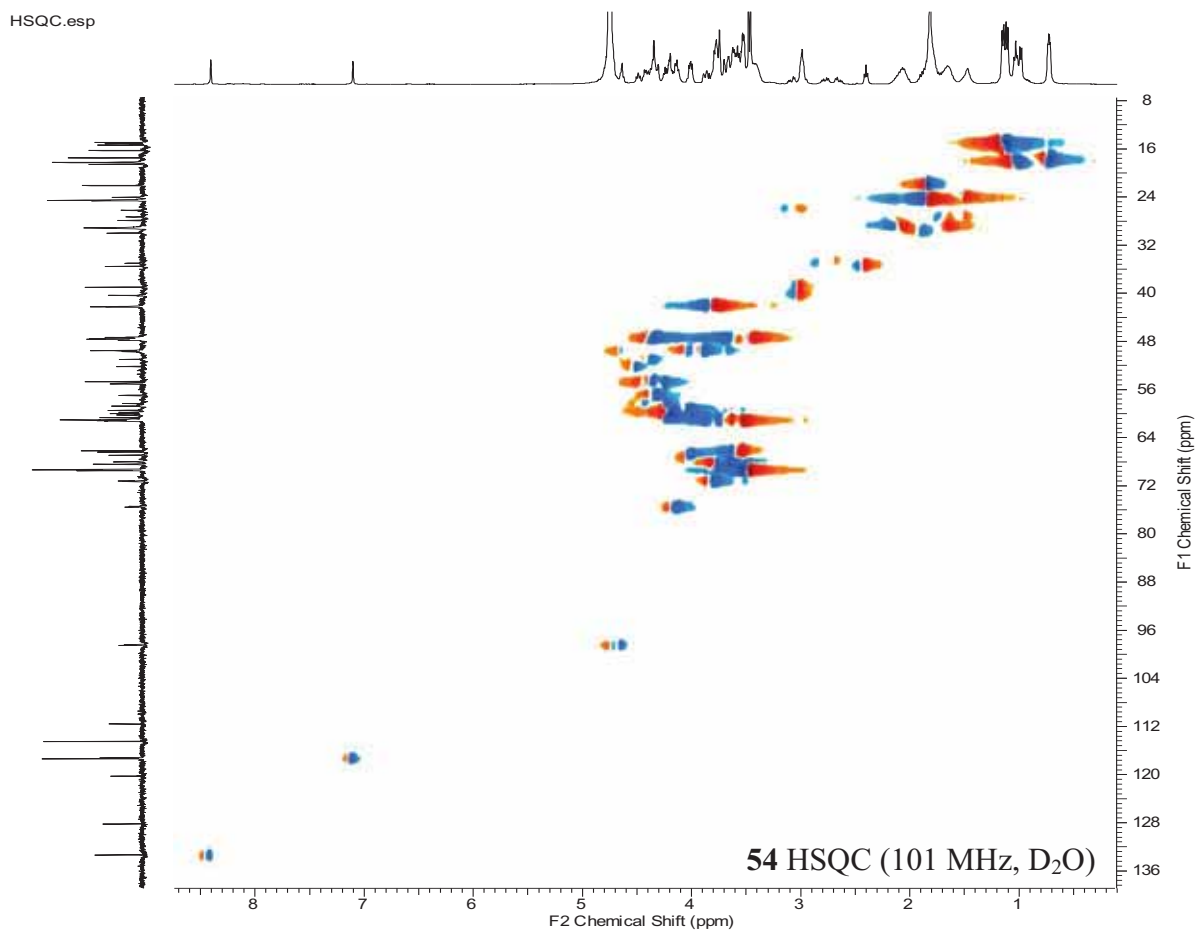
149.002.esp



COSY.esp



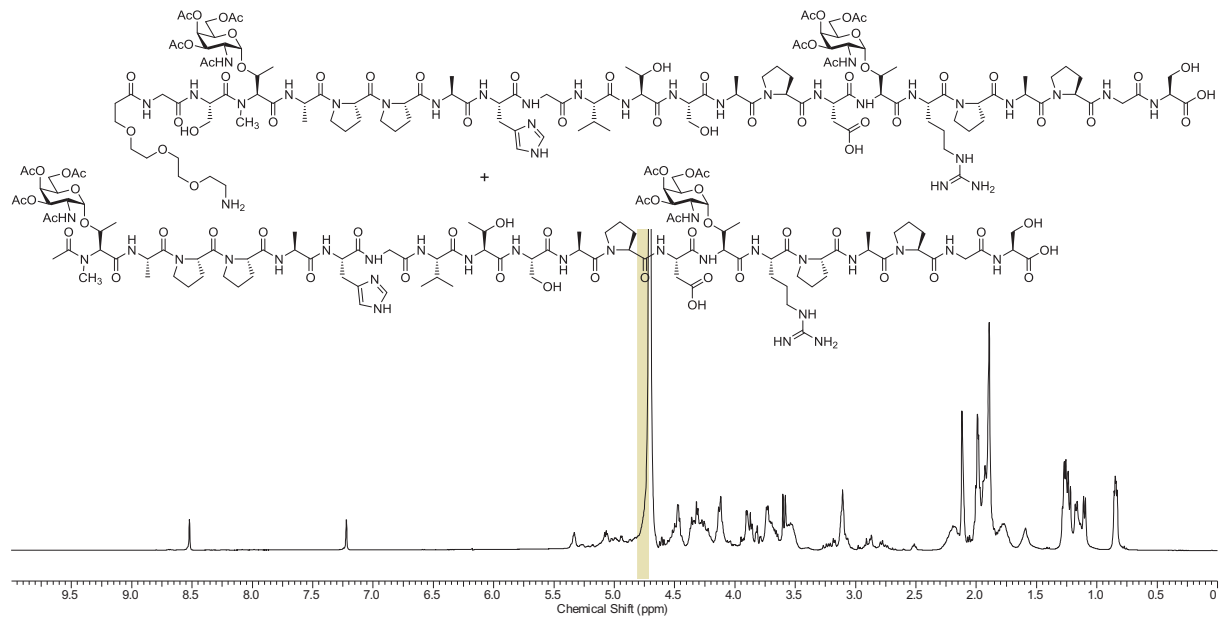
HSQC.esp



**Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-glycyl-L-seryl-[*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-*N*-methyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-serin (55) + *N*-Acetylierte Abbruchsequenz (56)**

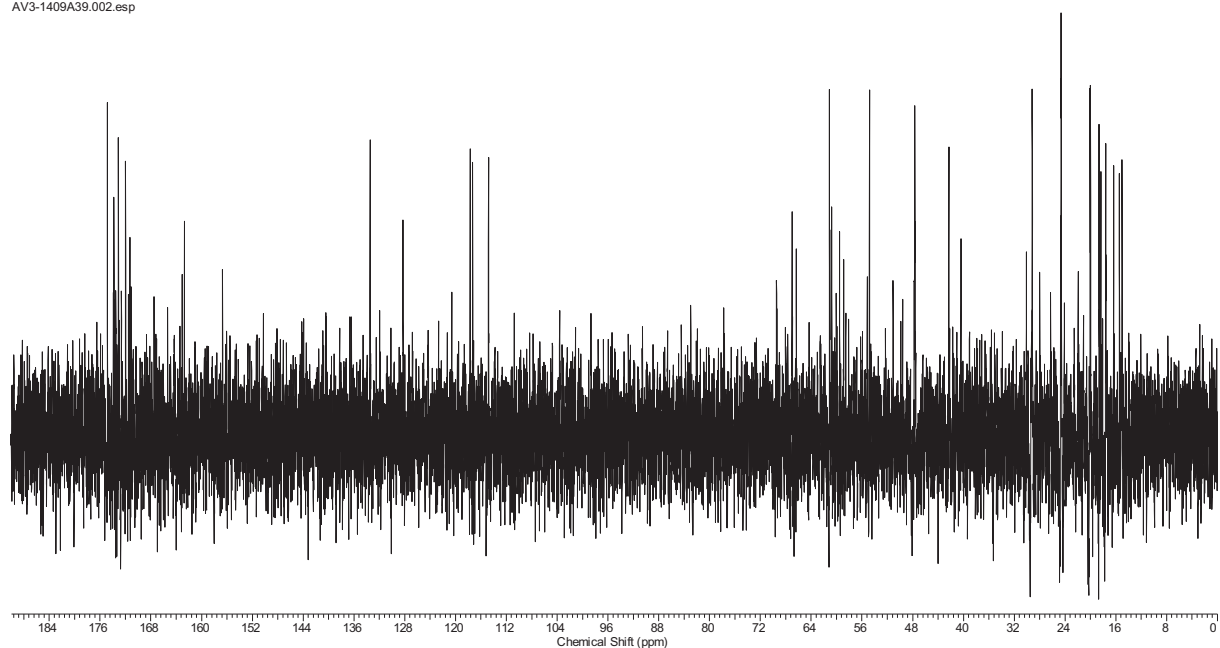
(H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-N-MeThr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)

<sup>1</sup>H-NMR, 400 MHz, D<sub>2</sub>O

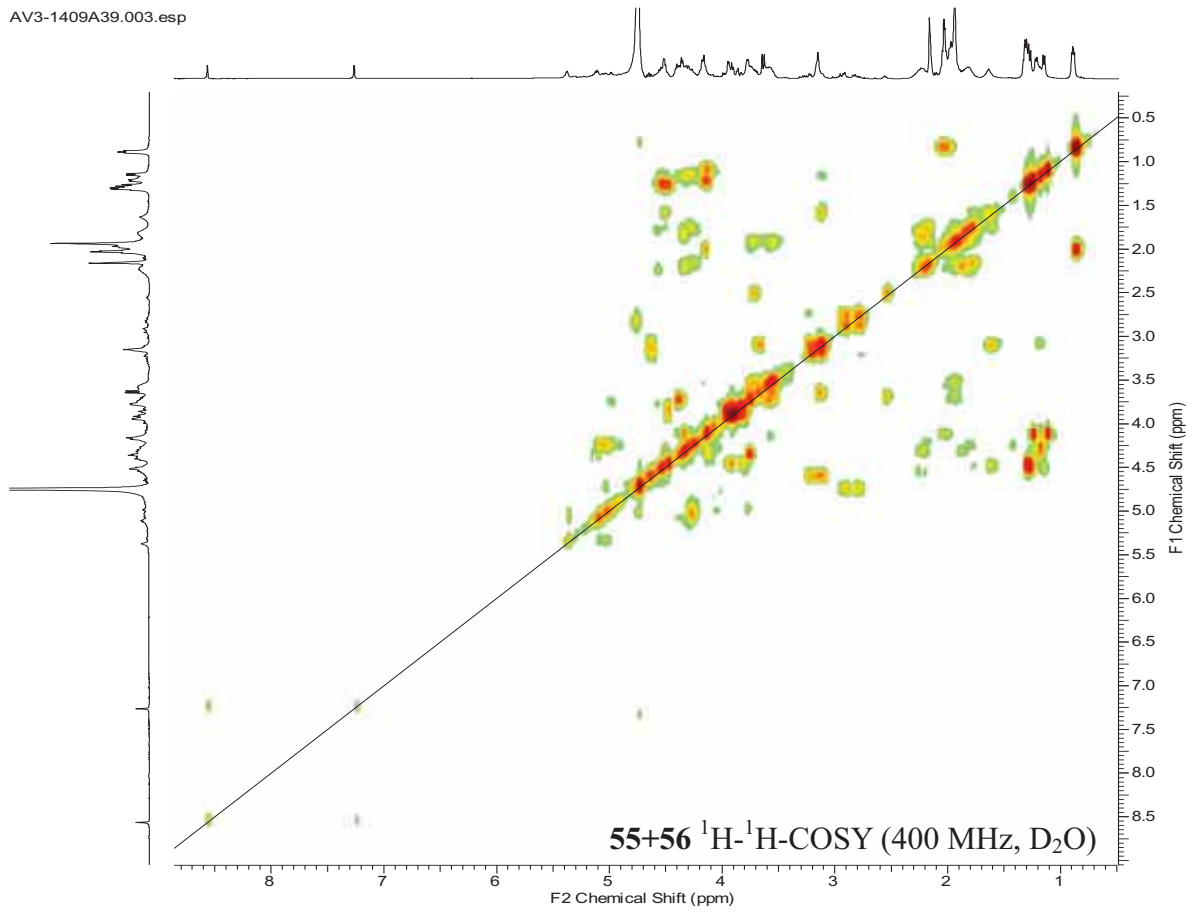


<sup>13</sup>C-NMR, 101 MHz, D<sub>2</sub>O

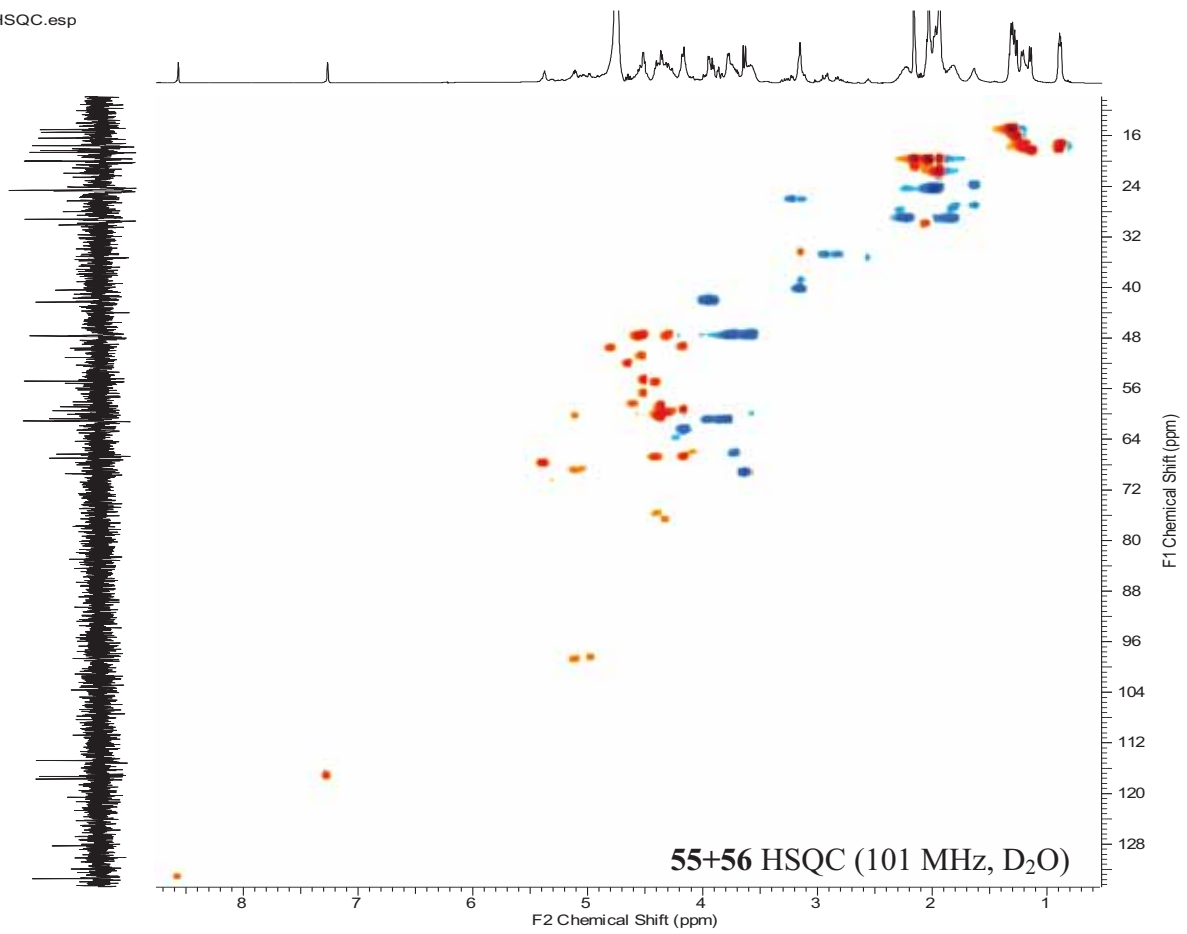
AV3-1409A39.002.esp



AV3-1409A39.003.esp

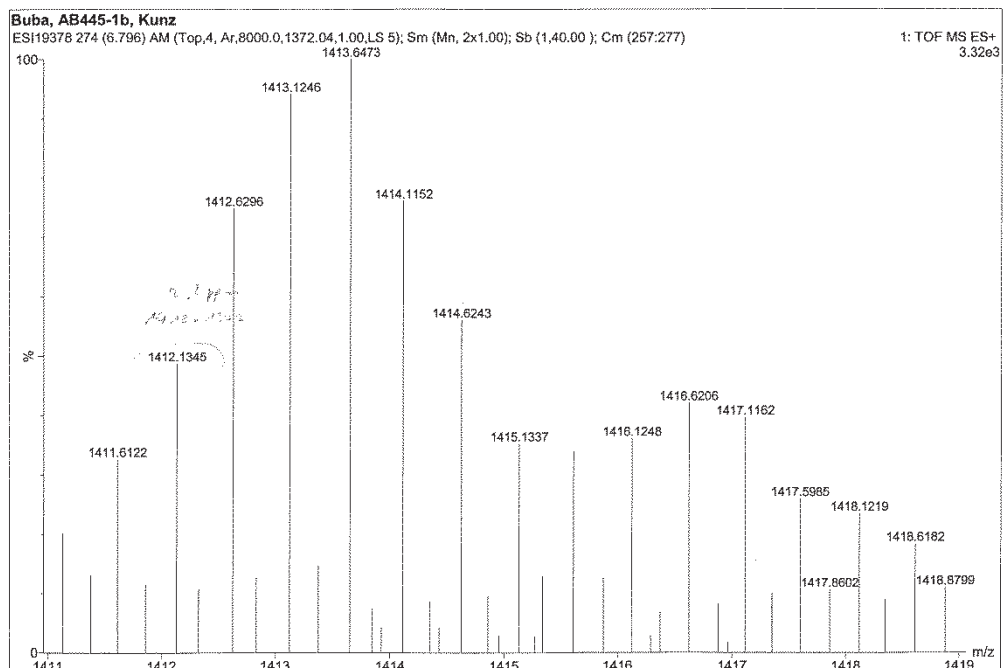
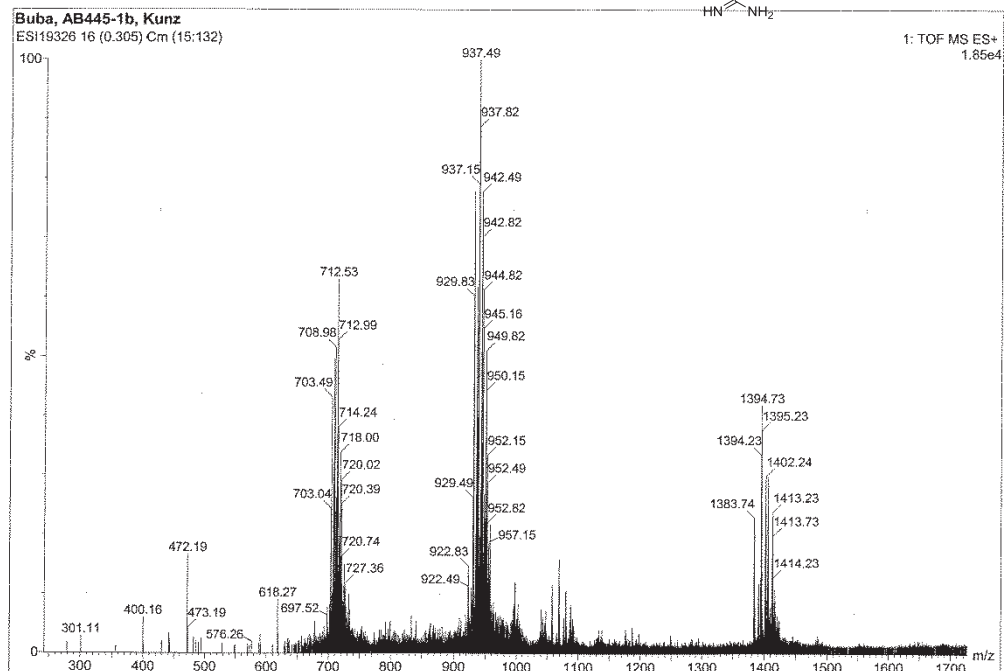
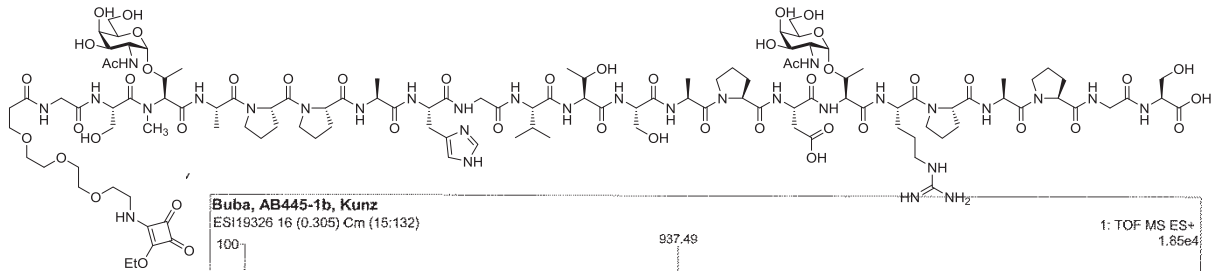


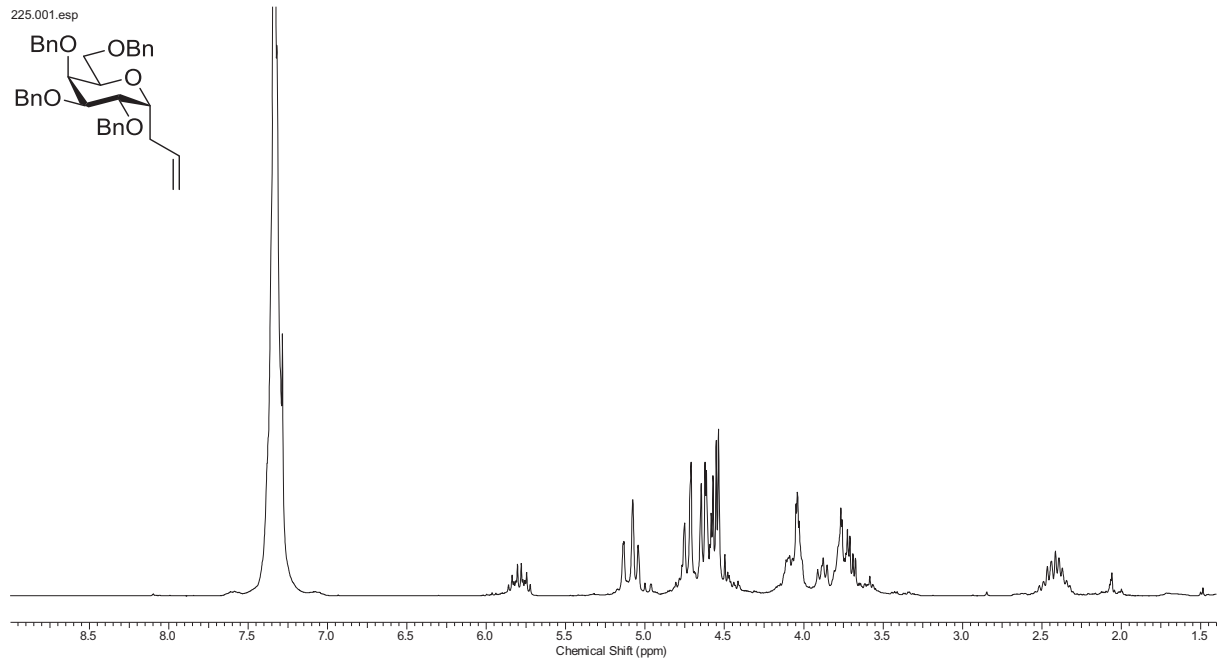
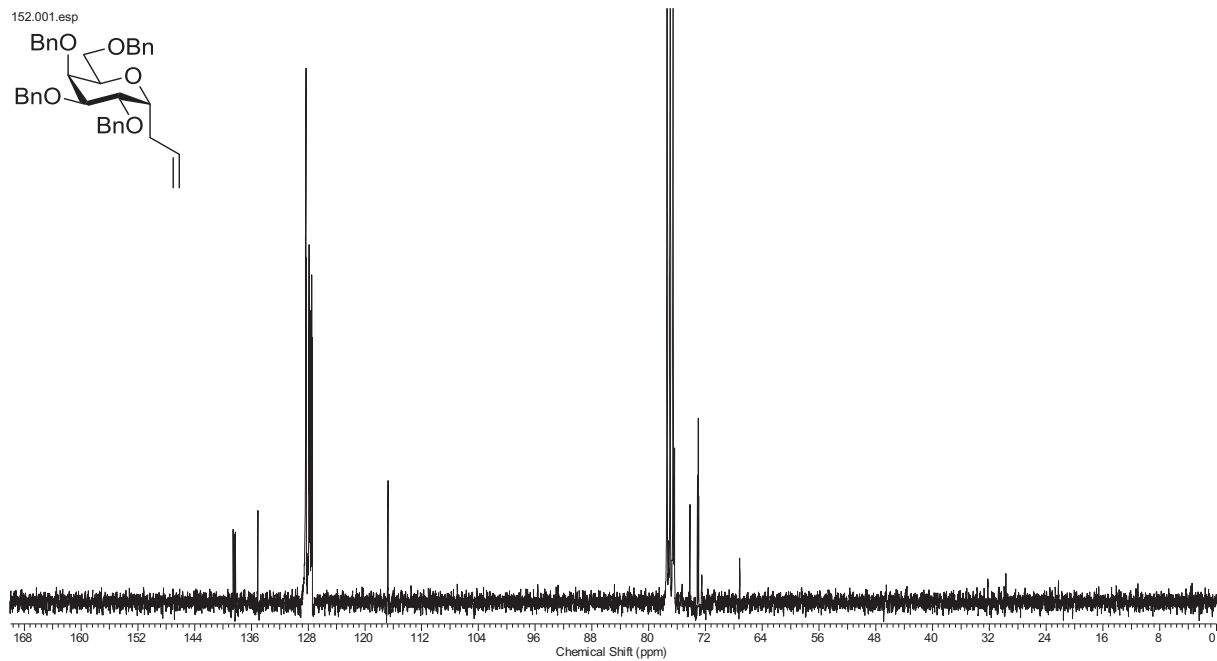
HSQC.esp

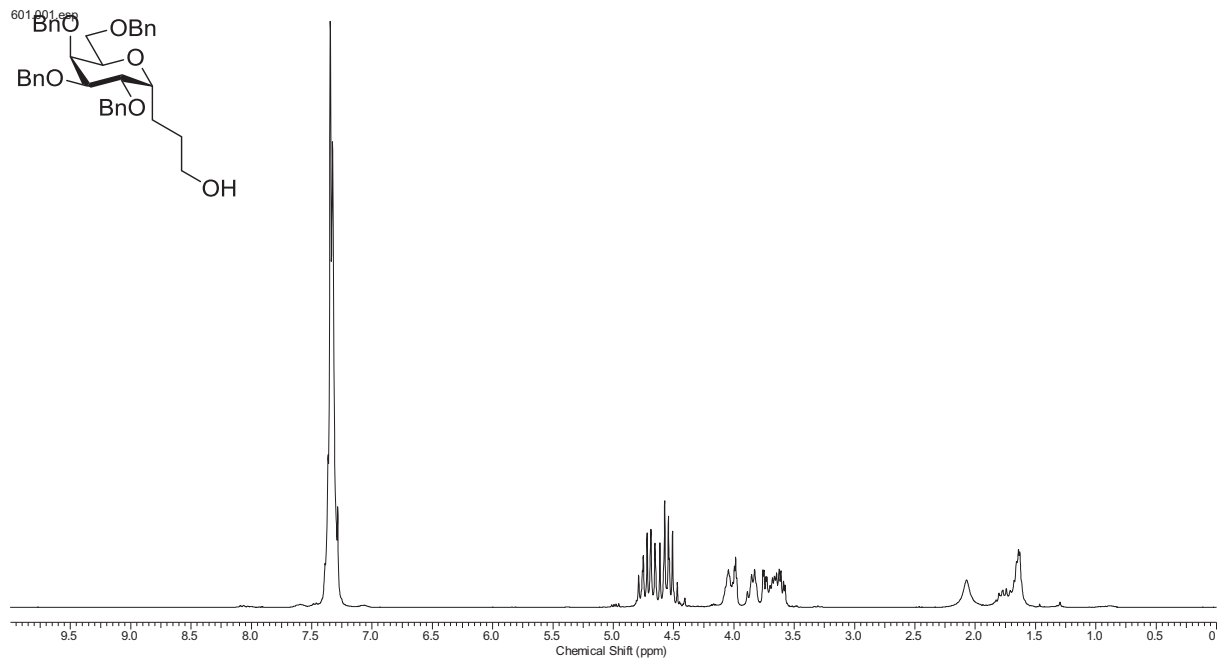
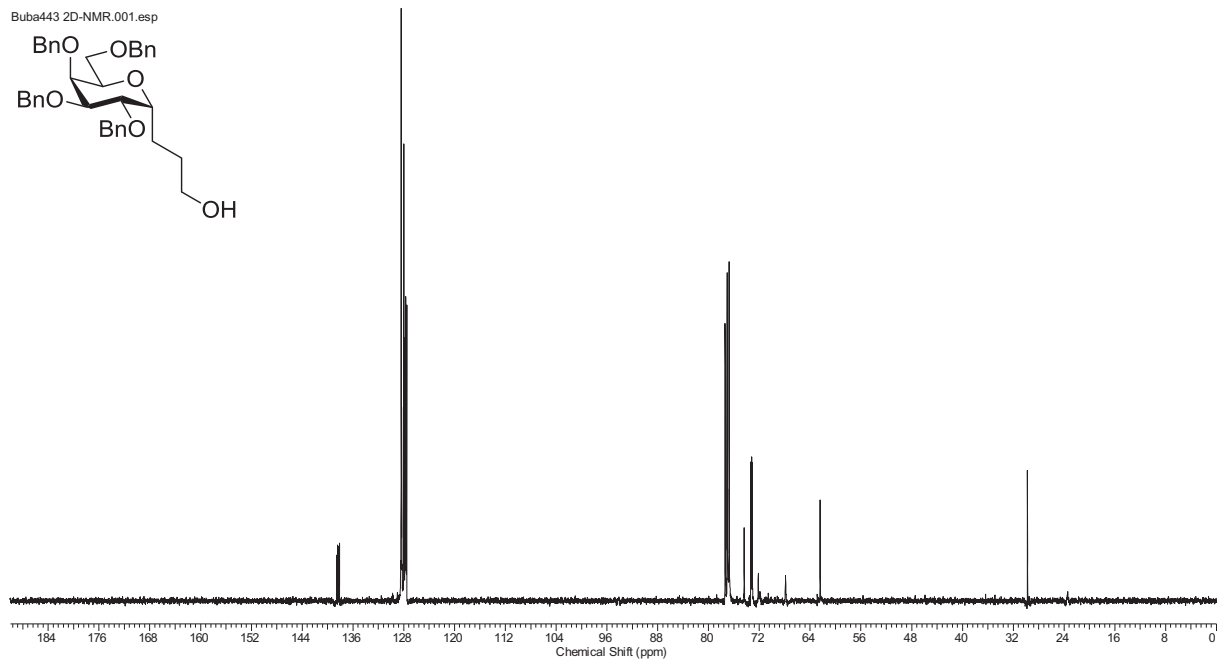


**1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecylamido-N-L-glycyl-L-seryl-[O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-N-methyl]-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-L-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-L-glycyl-L-seryl)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (65)**

(EtO-Squarat-HN-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH-Gly-Ser-N-MeThr( $\alpha$ GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr( $\alpha$ GalNAc)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-OH)

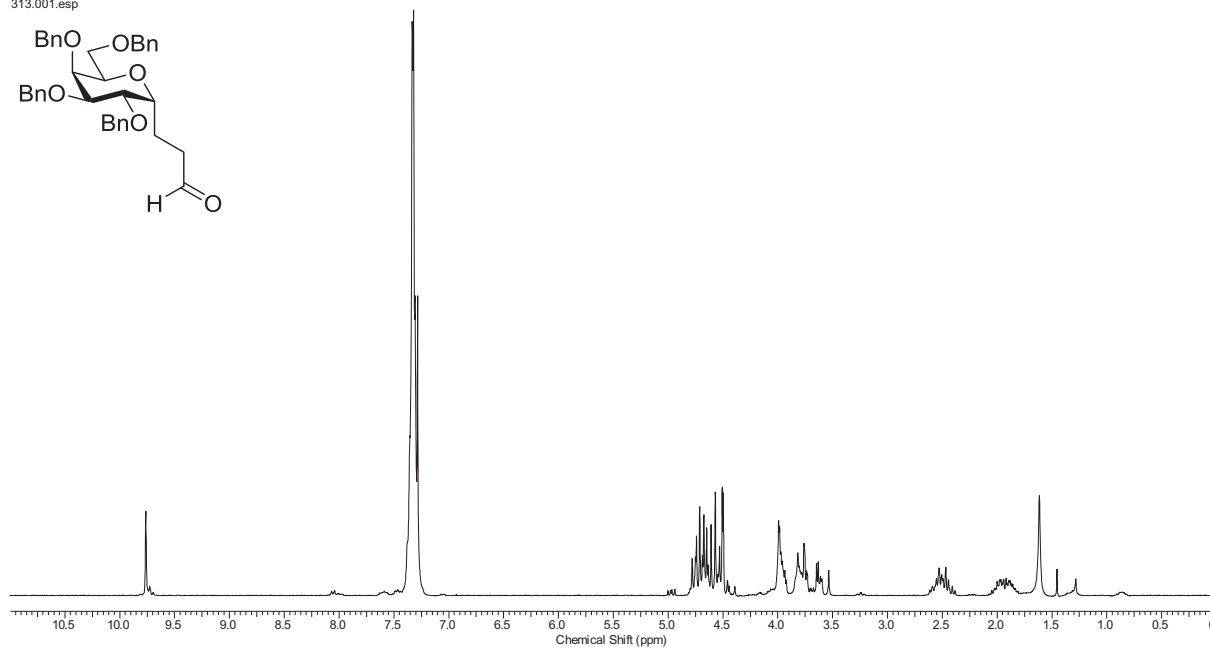
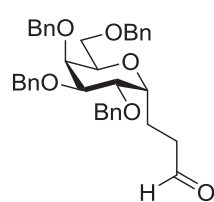


**1-Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid (87)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  $^{13}\text{C-NMR}$ , 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

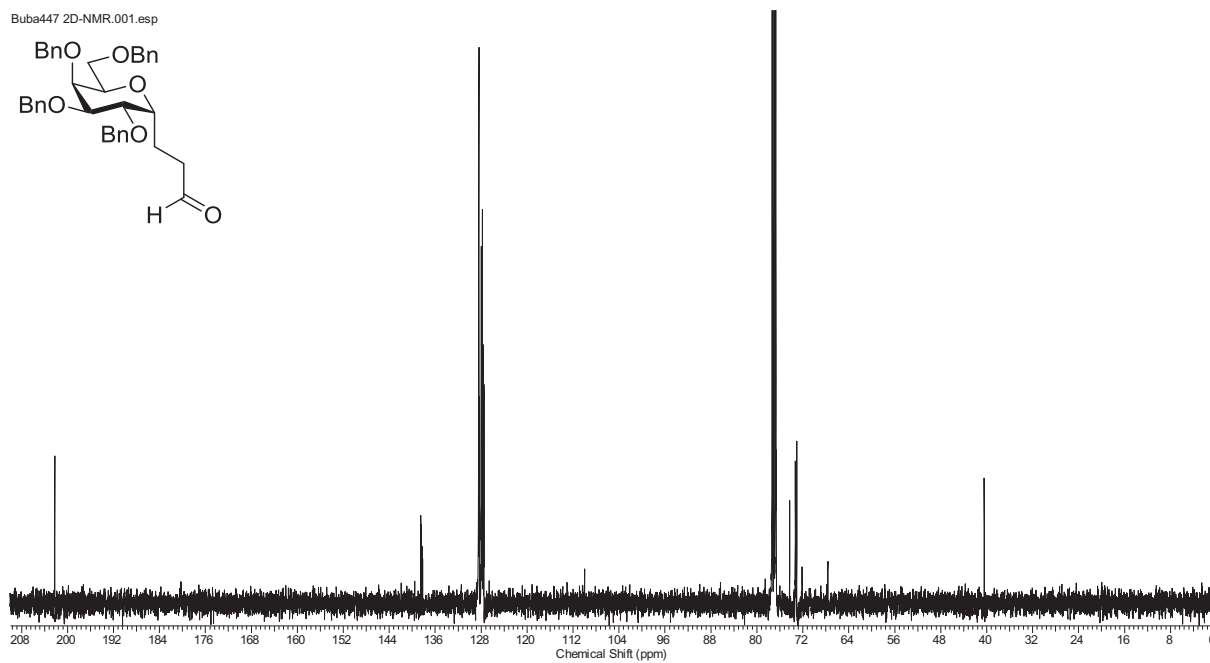
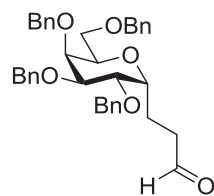
**1-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranos-1-yl)-propan-1-ol (93)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  $^{13}\text{C-NMR}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

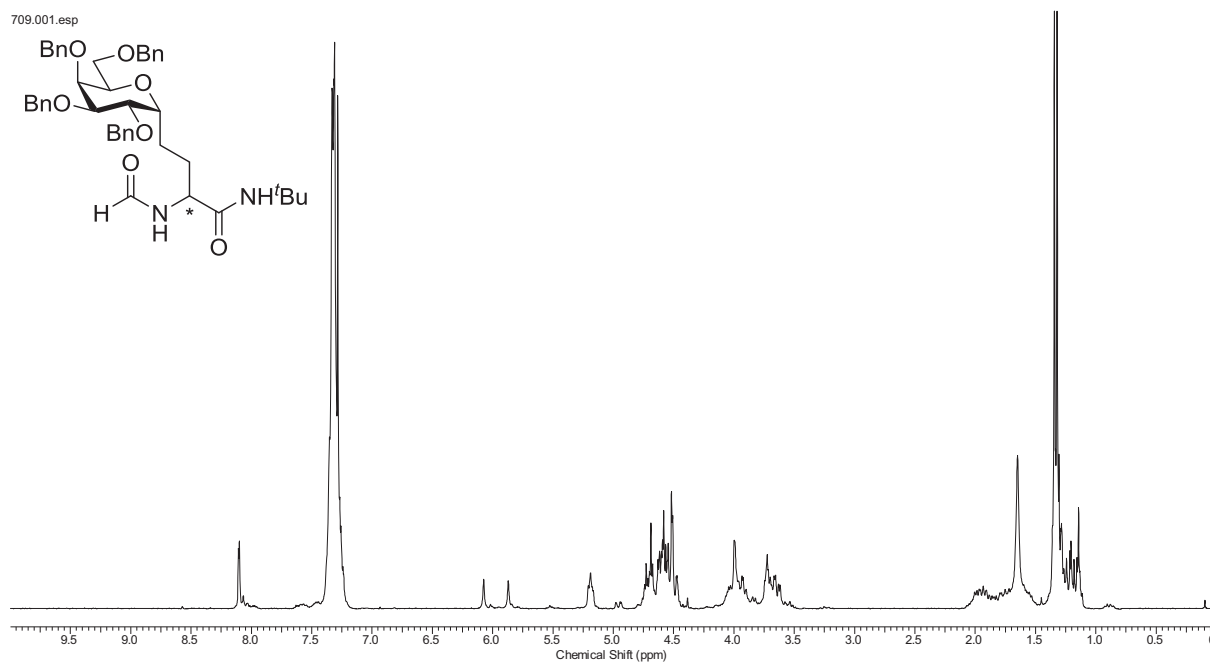
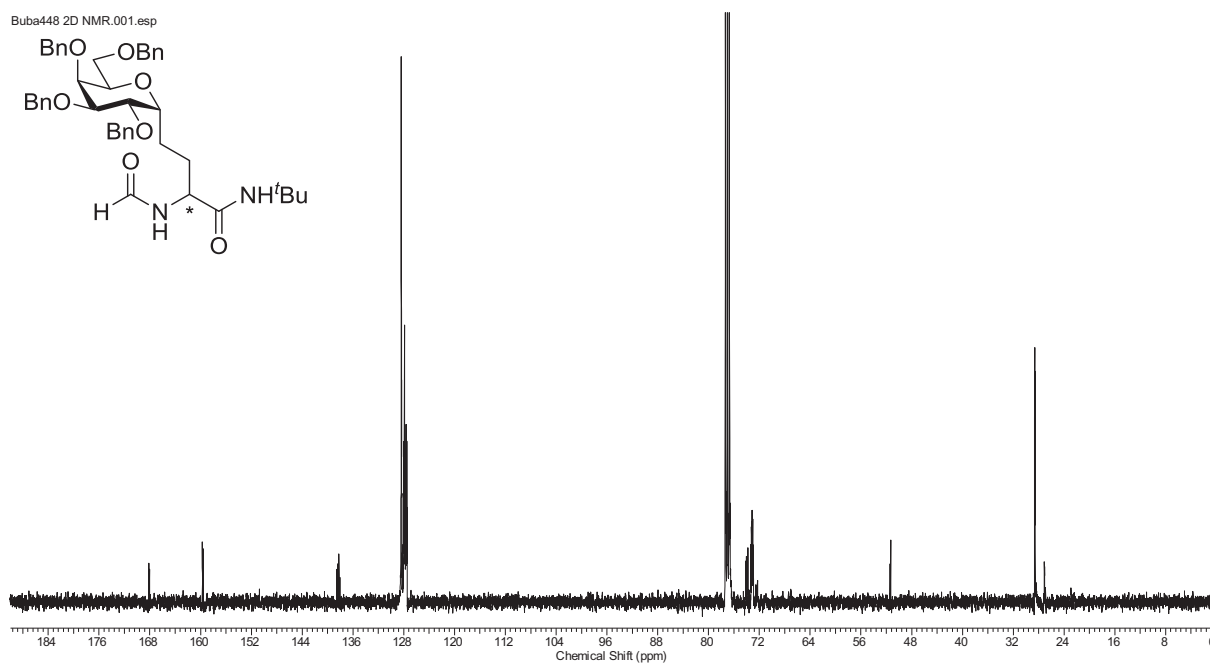
**1-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranos-1-yl)-propan-1-al (94)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

313.001.esp

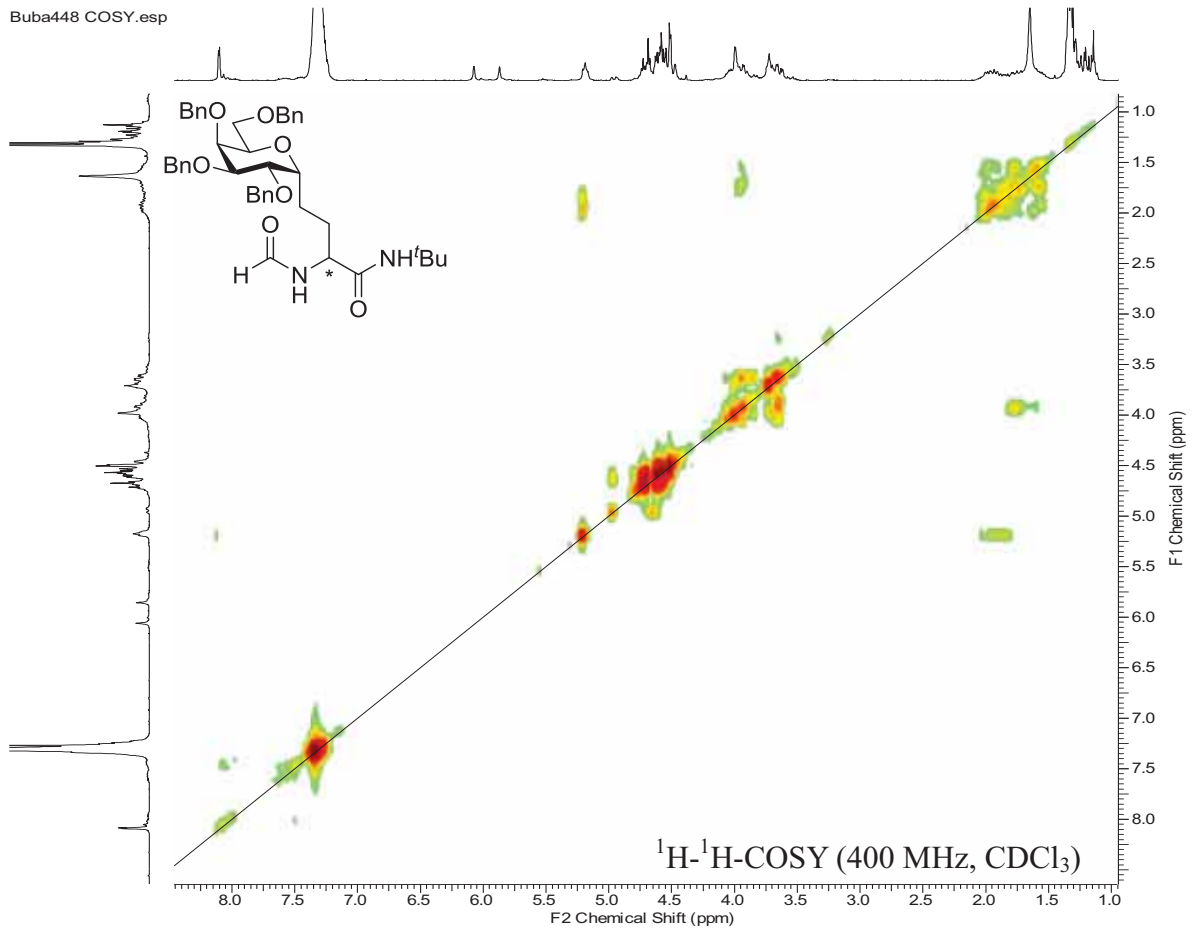
 $^{13}\text{C-NMR}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

Buba447 2D-NMR.001.esp

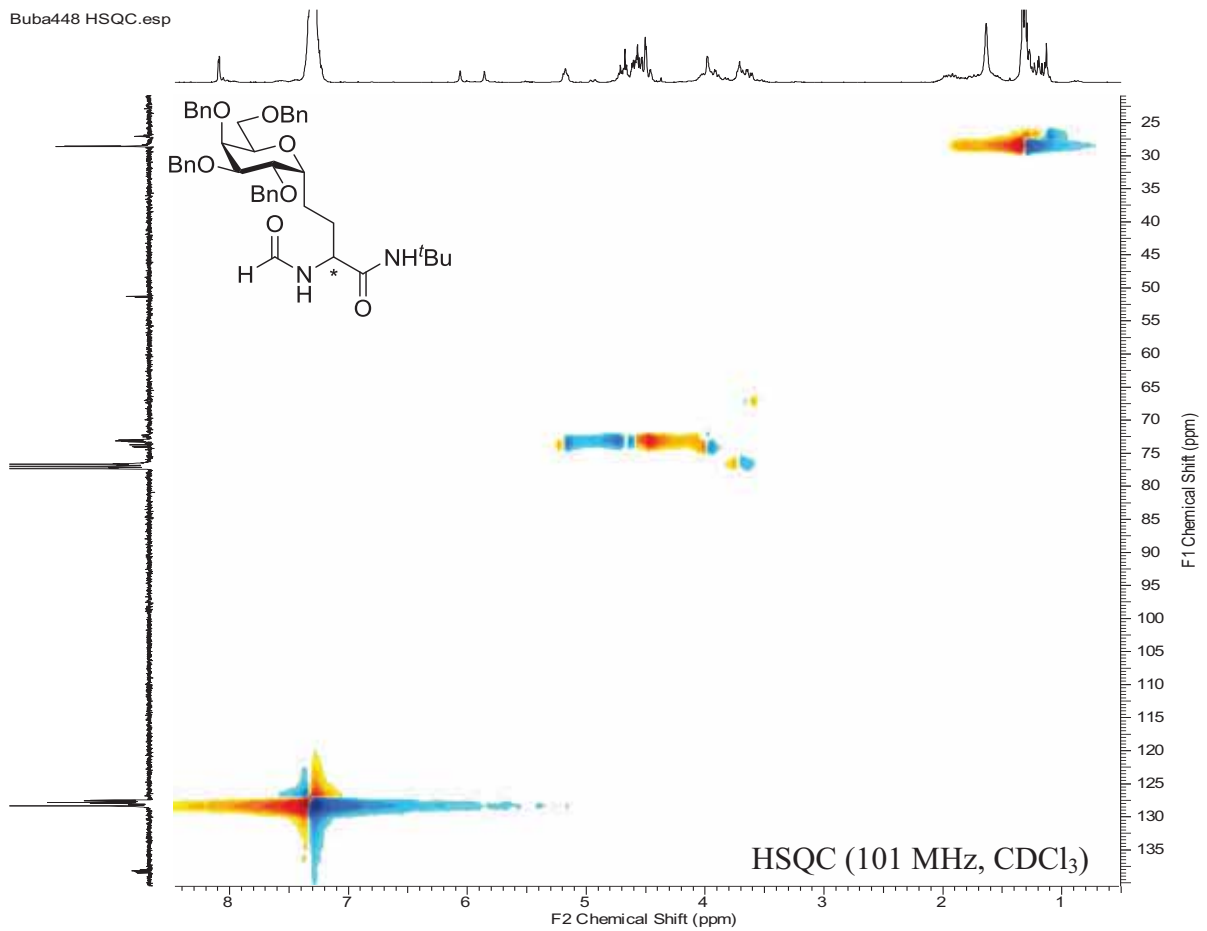


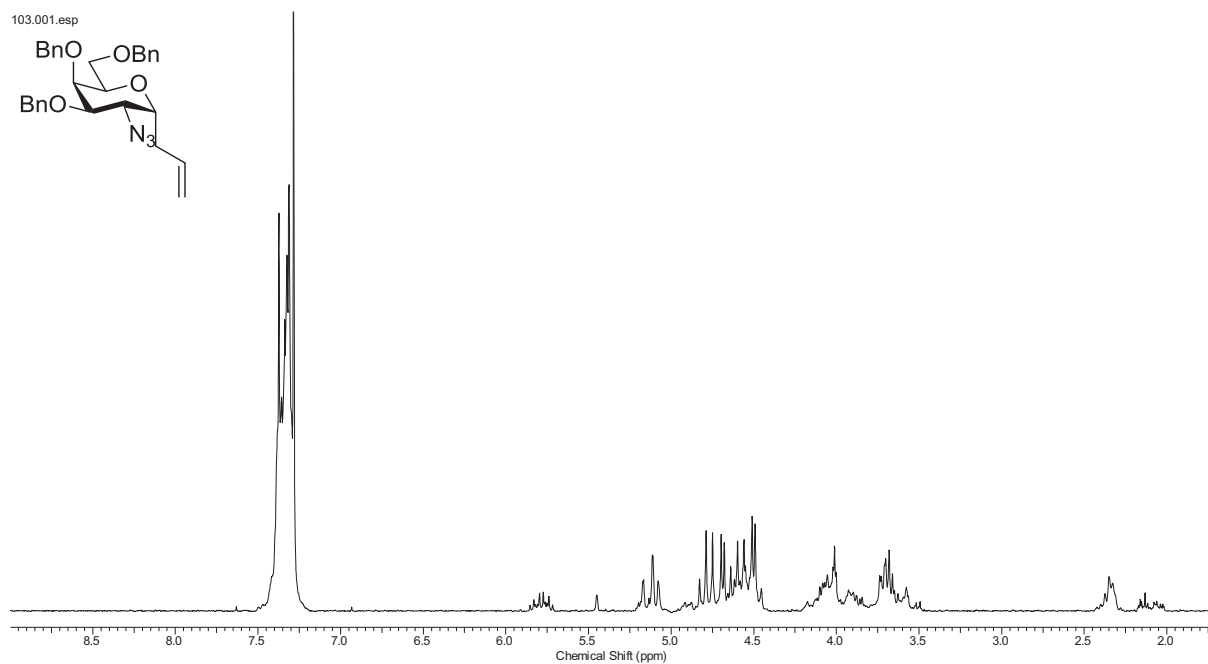
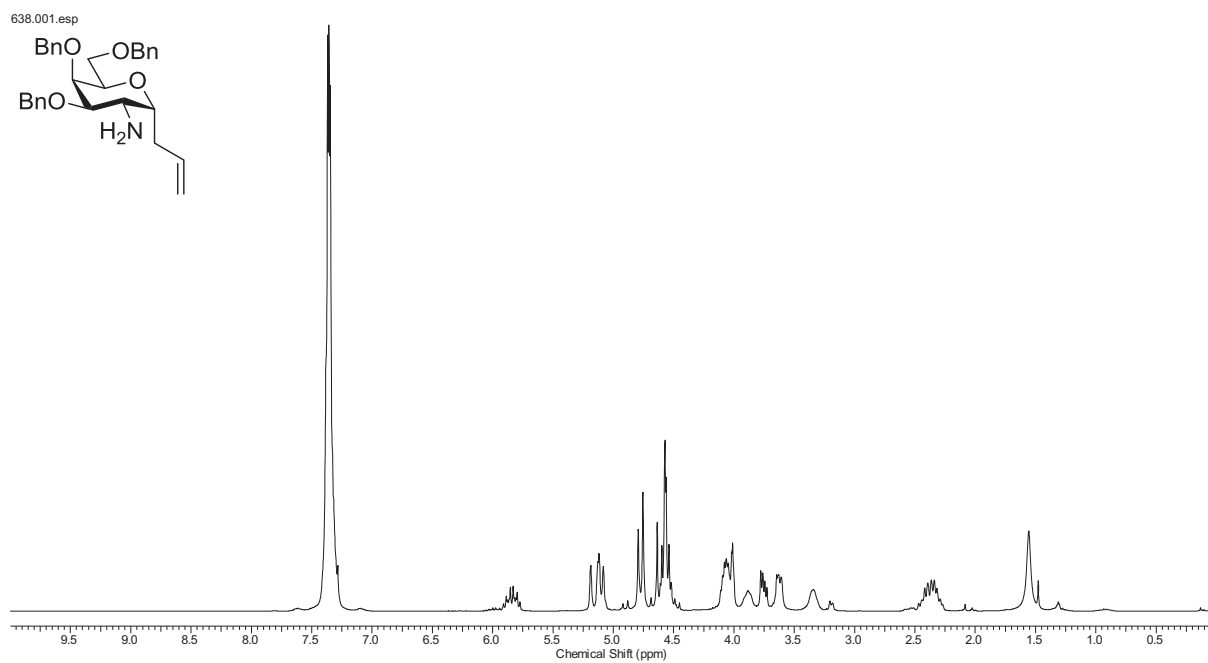
***N*-(*tert*-Butyl)-2-formamido-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranos-1-yl)-butanamid (110)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  $^{13}\text{C-NMR}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

Buba448 COSY.esp



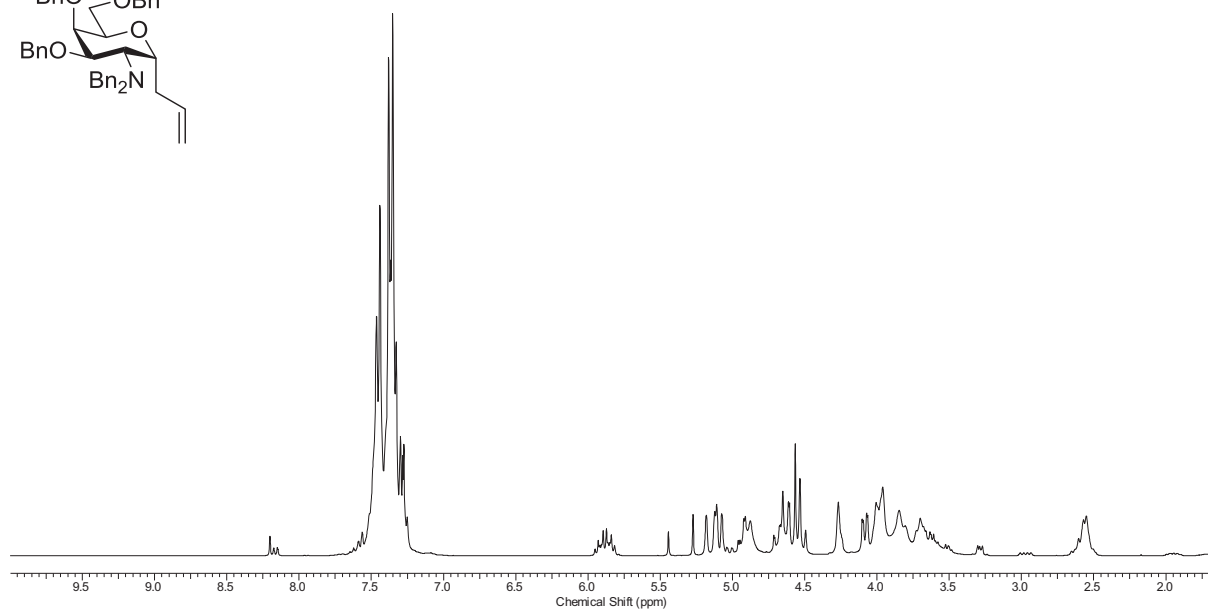
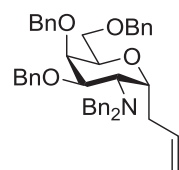
Buba448 HSQC.esp



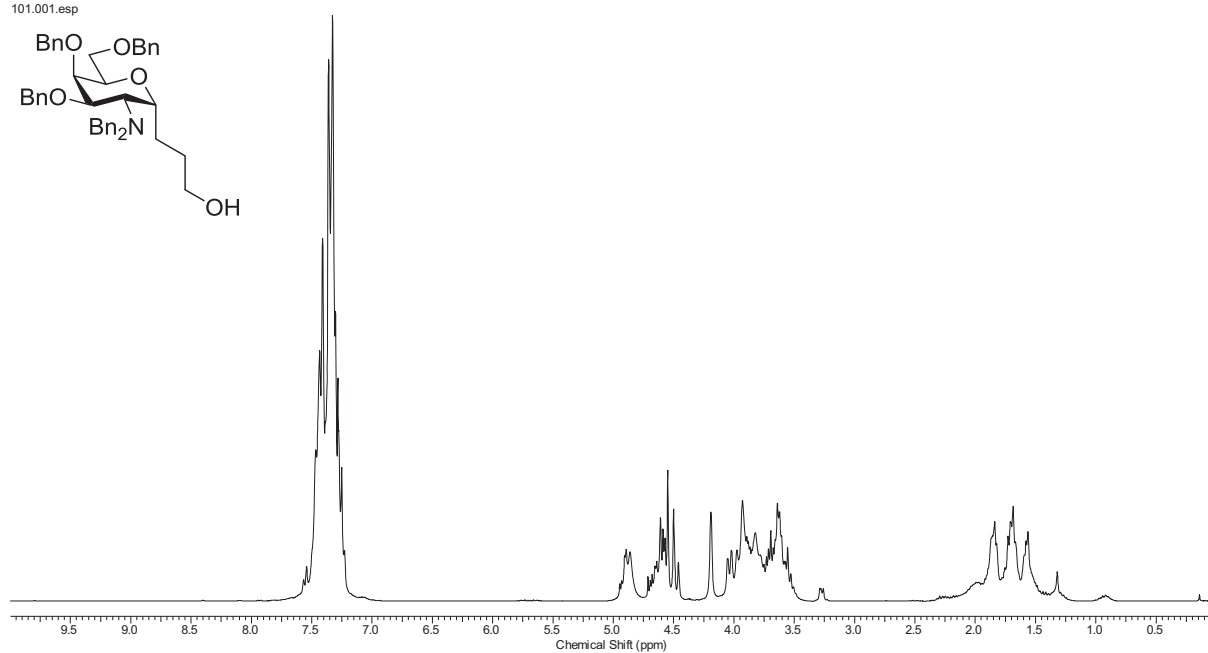
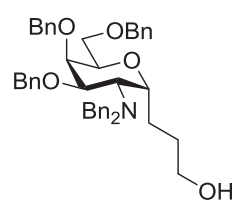
**1-Allyl-2-azido-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (89a)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ **1-Allyl-2-amino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (96)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

**1-Allyl-2-dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosid (98)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

432.001.esp

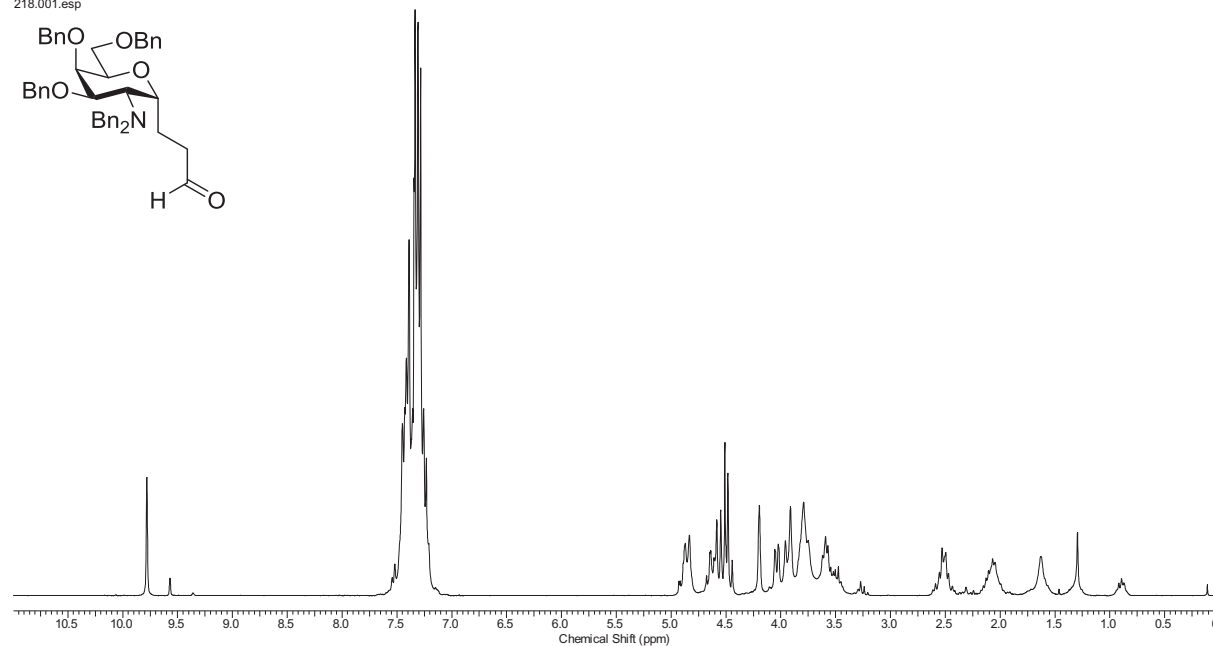
**1-(2-dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranose-1-yl)-propan-1-ol (99)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

101.001.esp

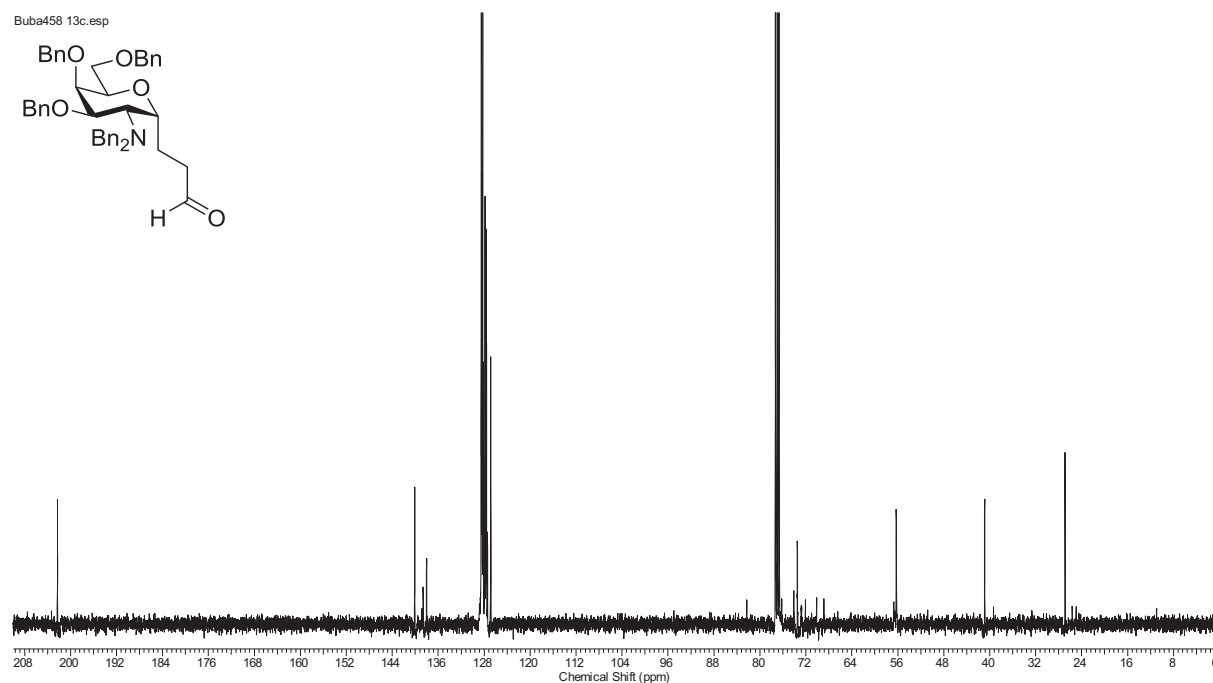


**1-(2-dibenzylamino-3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranose-1-yl)-propan-1-al (100)** $^1\text{H-NMR}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

218.001.esp

 $^{13}\text{C-NMR}$ , 101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ 

Buba458 13c.esp



---

## Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. ■■■■■, für die äußerst spontane und unkomplizierte Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie für die interessante Themenstellung. Vor allem danke ich ihm für den gewährten Freiraum zur Gestaltung meiner Arbeit. Dank seiner großen Hilfs- und Diskussionsbereitschaft zu jeder Zeit, hat er entscheidend zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen. Ebenfalls möchte ich mich für die herrlichen Abende im Hause ■■■■■ bedanken, hier vor allem bei seiner Frau ■■■■■, die für unser Wohlergehen keine Mühen gescheut hat.

Meinem weiteren Doktorvater, Herrn Prof. ■■■■■, möchte ich mich ebenfalls herzlich für die zahlreiche Unterstützung und Hilfestellung beim Arbeiten mit Mikroreaktoren sowie für die anregenden Gespräche und die netten Tage in Budapest bedanken.

Ich hatte großes Glück zwei solche kompetente Doktorväter gehabt zu haben, die mich vertrauensvoll bei allem unterstützten.

Außerdem danke ich dem gesamten Arbeitskreis ■■■■■, darunter selbstverständlich auch den ehemaligen Mitgliedern ■■■■■, die mich am ersten Arbeitstag so wunderbar in alles eingewiesen hatte, ■■■■■, ■■■■■ und ■■■■■, für die freundliche Aufnahme in den AK. Ein großes Dankeschön gebührt ■■■■■ und ■■■■■. Ohne sie hätte ich vermutlich nie das Glück gehabt den Arbeitskreis ■■■■■ kennen zu lernen.

Unter den Mitgliedern des Exillabors möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei meinen Kollegen ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■, ■■■■■ und ■■■■■ bedanken. Darunter danke ich vor allem ■■■■■, ■■■■■ und ■■■■■ für ihre Hilfe bei den Peptidsynthesen und die schöne gemeinsame Zeit.

Ebenfalls bedanke ich mich beim gesamten Arbeitskreis ■■■■■ für die zahlreichen Hilfestellungen beim Auf- und Umbau diverser Mikroreaktoren. Hier gilt mein besonderer Dank ■■■■■, ■■■■■ und ■■■■■ (Спасибо ■■■■■!). Es war eine tolle Zeit mit euch im Labor und ich danke euch dafür, dass ihr mich immer zum Lachen gebracht habt.

Ich danke auch dem gesamten Arbeitskreis ■■■■■ für die wunderbare Zusammenarbeit in den drei Jahren. Allen voran Danke ich ■■■■■ für die unzähligen HPLC-Messungen, die er immer mit einem Lächeln durchgeführt und mit netten Gesprächen ausgeschmückt hat. Danke! ■■■■■ danke ich ebenfalls für seine Unterstützung beim Vermessen einiger HPLC-Proben sowie für die vielen gemeinsamen Autofahrten nach Kaiserslautern und der netten Ablenkung, wenn wir mal wieder im Stau standen.

---

Zudem bedanke ich mich herzlich bei [REDACTED] und [REDACTED] für ihre Hilfe bei der Durchführung der nervenaufreibenden Peptidsynthesen und für die vielen, netten, polnischen Gespräche (Dziękuję bardzo!).

Meinen Forschungspraktikanten [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] danke ich sehr für Ihre Hilfestellung bei den teilweise sehr anspruchsvollen Synthesen und wünsche ihnen weiterhin alles Gute für die Zukunft.

Auch gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts, darunter der NMR-Abteilung um [REDACTED] und [REDACTED], der Massenspektrometrie-Abteilung um [REDACTED] und [REDACTED], des Chemikalienlagers mit [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED] sowie den Sekretärinnen [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]. Danke auch an [REDACTED] und [REDACTED] für die Praktikumsorganisation.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den vielen Korrekturlesern [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]. Vor allem danke ich [REDACTED] und [REDACTED] für die zahlreichen und sehr konstruktiven Verbesserungsvorschläge und für eure kostbare, geopferte Zeit.

Ich danke allen die mich in der gesamten Zeit unterstützt haben, insbesondere meinen Freunden, meiner Familie, den ehemaligen Kollegen der TU Kaiserslautern und von Boehringer Ingelheim. Darunter danke ich vor allem [REDACTED] für die vielen, vielen, schönen gemeinsamen Abende und ihre stetige Hilfsbereitschaft, [REDACTED] für seine grandiose Unterstützung vor Beginn dieser Arbeit und meinen Eltern sowie meiner Schwester und meinem Bruder für ihren Rückhalt.

Zuletzt bleibt mir noch einem ganz besonderen Menschen zu danken, meinem Freund [REDACTED]. Ohne dich wäre ich nicht da wo ich jetzt bin! Ich danke dir für deine unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit, in allen guten wie auch schwierigen Zeiten. Nur durch dich konnte ich diese Arbeit überhaupt realisieren und dafür danke ich dir sehr.

**Persönliches**

Annette Buba

\* [Redacted]

[Redacted]

---

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

---

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

---

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]

---

[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]

---

[REDACTED]  
[REDACTED]