

Glycosylierte β -Peptide als Oligosaccharidmimetika

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

Jan Ruben Hörzer geb. Maier

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2007

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Ziegler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. E. Maier

Für Helen und meine Familie in Liebe und Dankbarkeit

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Th. Ziegler für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung und Förderung in Rahmen dieser Arbeit durch zahlreiche Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. M. E. Maier für seine Tätigkeit als Mitberichter.

Herrn Dr. G. Lemanski, sowie allen Kollegen und Mitarbeitern in Tübingen für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Frau A. Just für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn P. Schuler für die zahlreichen NMR-Messungen.

Frau A. Frickenschmidt für die Durchführung der MALDI-TOF Messungen.

Den Herren G. Nicholson, H. Bartholomä und R. Müller für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren.

Herrn Thimo Birkenstock für die Einarbeitung in Lectinscreenings.

Allen Studenten, die als Praktikanten an meiner Arbeit mitgearbeitet haben.

Index:

1. Bezifferung der Verbindungen	- 1 -
2. Abkürzungen - 4 -	
3. Einleitung und Aufgabenstellung	- 8 -
4. Allgemeiner Teil:	- 11 -
4.1 Oligosaccharide auf Zellmembranen	- 11 -
4.1.1 Vorkommen und Funktion	- 11 -
4.1.2 Synthese von Oligosacchariden	- 13 -
4.1.3 Oligosaccharidmimetika.....	- 13 -
4.1.4 β -Aminosäuren und β -Peptide.....	- 17 -
4.1.5 Peptidkupplungsmethoden	- 19 -
4.2 Synthesestrategie der β – Glycopeptide	- 28 -
4.2.1 Konzept für ein rigides Oligosaccharidmimetikum	- 28 -
4.3 Synthese der β -Glycopeptide	- 36 -
4.3.1 Aufbau von Neo – Glycopeptidbausteinen	- 36 -
4.3.2 Darstellung des Spacermoleküls	- 36 -
4.3.3 Darstellung der Glucose, Galactose, Mannose und Rhamnose- Bausteine... -	37 -
4.3.4 Darstellung der N-Acetylglucosamin-Glycoside	- 39 -
4.3.5 Einführung der Asparaginsäure in die Glycosidbausteine	- 40 -
4.4 Aufbau von Neo- β -Glycotripeptidbausteinen	- 42 -
4.4.1 Synthese der β - <i>trans</i> -Aminocyclohexancarbonsäure [36]	- 42 -
4.4.2 Aufbau der Fmoc-(ACHC) ₂ - Dipeptide	- 44 -
4.4.3 Aufbau der Neo- β -Glycotripeptidbausteine	- 48 -
4.5 Aufbau von Neo- β -Glycopeptidoligomeren.....	- 50 -
4.6 Spektroskopische Untersuchung der Konformation der Neo – Glycopeptidoligomere mittels NMR.....	- 54 -
4.6.1 NMR-Auswertung des voll geschützten Glucose- Hexaglycopeptids 46	- 54 -
4.7 Aufbau einer Glycopeptidbibliothek.....	- 57 -
4.7.1 Derivatisierung von Cellulosemembranen	- 59 -
4.7.2 Aus Monomerbausteinen.....	- 62 -
4.7.3 Versuch einer Übertragung der Synthesestrategie auf Trimerbausteine	- 67 -
4.8 Lectintest	- 69 -
4.8.1 Lectintest der Bibliothek	- 72 -
4.8.2 Lectintest der Neo – Glycopeptidoligomere	- 76 -
5. Praktischer Teil	- 79 -

5.1 Verwendete Chemikalien	- 79 -
5.2 Allgemein:	- 79 -
5.3 Umsetzungen	- 82 -
Zu 4.3.1	- 82 -
Zu 4.3.2	- 84 -
Zu 4.3.3	- 92 -
Zu 4.3.4	- 94 -
Zu 4.4.1	- 99 -
Zu 4.4.2	- 100 -
Zu 4.4.3	- 105 -
Zu 4.5	- 109 -
Zu 4.7	- 118 -
Zu 4.8.1	- 123 -
Zu 4.8.2	- 125 -
6. Zusammenfassung	- 126 -
7. Literaturverzeichnis:	- 132 -

1. Bezifferung der Verbindungen

- 1 1,2,3,4,6-Penta-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranose
- 2 1,2,3,4,6-Penta-*O*- benzoyl- α -D-mannopyranose
- 3 1,2,3,4,6-Penta-*O*- benzoyl- β -D-galactopyranose
- 4 1,2,3,4-Tetra-*O*-benzoyl- β -L-rhamnopyranose
- 5 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-1-brom- β -D-glucopyranose
- 6 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-1-brom- α -D-mannpyranose
- 7 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-1-brom- β -D-galactopyranose
- 8 2,3,4,-Tri-*O*-benzoyl-1-brom- α -L-rhamnopyranose
- 9 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranose
- 10 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannpyranose
- 11 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranose
- 12 2,3,4,-Tri-*O*-benzoyl- β -L-rhamnopyranose
- 13 *p*-Aminomethylbenzylalkohol
- 14 *N*-Benzyloxycarbonyl-*p*-aminomethylbenzylalkohol
- 15 *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*p*-aminomethylbenzylalkohol
- 16 [*p*-(*N*-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosid
- 17 [*p*-(*N*-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosid
- 18 [*p*-(*N*-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosid
- 19 [*p*-(*N*-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4-tetra-*O*-benzoyl - β -L-rhamnopyranosid
- 20 [*p*-(*N*-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid
- 20a *p*-Amino-1-*O*-benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid
- 21 [*p*-(*N*-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid
- 21a *p*-Amino-1-*O*-benzyl- α -D-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-mannopyranosid

- 22 [p-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosid
- 22a p-Amino-1-O-benzyl-β-D-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-galactopyranosid
- 23 [p-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4-tetra-O-acetyl-β-L-rhamnopyranosid
- 24 N-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(p-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert-butylester
- 25 N-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(p-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert-butylester
- 26 N-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(p-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert-butylester
- 27 N-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(p-aminomethylbenzyl)-2,3,4-tri-O-acetyl-β-L-rhamnopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert-butylester
- 28 2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid
- 29 3,4,6-Tri-O-acetyl-glucopyrano-[2,1-d]-2-methyl-oxazolin
- 30 [p-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosid
- 31 N-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(p-aminomethylbenzyl)-2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosid]-L-asparaginsäure-β-tert-butylester
- 32 (rac)-trans-Cyclohexandicarbonsäure
- 33 (R,R)-trans-Cyclohexandicarbonsäure
- 34 (R,R)-trans-1,2-Cyclohexandicarbonsäureanhydrid
- 35 (R,R)-trans-1,2-Cyclohexandicarbonsäuremonoamid
- 36 (R,R)-trans-2-Aminocyclohexylcarbonsäurehydrochlorid
- 37 N-tert-Butyloxycarbonyl-(R,R)-trans-2-aminocyclohexylcarbonsäure
- 38 N-tert-Butyloxycarbonyl-(R,R)-trans-2-aminocyclohexylcarbonsäurebenzylester
- 39 (R,R)-trans-2-Aminocyclohexylcarbonsäurebenzylester
- 40 Boc-(ACHC-ACHC)-Bn
- 41a Boc-(ACHC-ACHC)
- 41b (ACHC-ACHC)
- 42 Fmoc(ACHC-ACHC)
- 43 Fmoc(ACHC-ACHC-(AcGIBB))OtBu
- 44 Fmoc(ACHC-ACHC-(AcManBB))OtBu

- 45 Fmoc(ACHC-ACHC-(AcGalBB))OtBu
- 46 Fmoc(ACHC-ACHC-(AcGIBB)-ACHC-ACHC-(AcGIBB))OtBu
- 47 Fmoc(ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB))OtBu
- 48 (ACHC-ACHC-(GIBB)-ACHC-ACHC-(GIBB))
- 49 Fmoc(ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB))OtBu
- 50 (ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB))
- 51 (ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB))
- 52 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl - β -D-glucofuranosyltrichloracetimidat
- 53 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl - α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat
- 54 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl - β -D-galactopyranosyltrichloracetimidat
- 55 2,3,4,-Tri-*O*-benzoyl - β -L-rhamnopyranosyltrichloracetimidat
- 56 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -pentafluorphenyl- β -*tert*-butyl-L-asparaginat
- 57 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucofuranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenylester
- 58 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β - pentafluorphenylester
- 59 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β - pentafluorphenylester
- 60 *N*-Benzyloxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäure
- 61 *N*-Benzyloxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäure-*tert*-butylester
- 62 (*R,R*)- *trans*-2-Aminocyclohexylcarbonsäure-*tert*-butylester
- 63 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäure
- 64 α -[(*p*-Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D- glucofuranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 65 α -[(*p*-Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D- mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 66 α -[(*p*-Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D- galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 67 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäure-pentafluorphenylester

2. Abkürzungen

AAV	allgemeine Arbeitsvorschrift
abs	absolut
Ac	Acetyl
AcGalBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure
AcGIBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure
ACHC	(<i>R,R</i>)- <i>trans</i> -2-Aminocyclohexylcarbonsäure
AcManBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrit
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Asp	L-Asparaginsäure
Ber	berechnet
Bn	Benzyl
BnBr	Benzylbromid
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di-tert-butyl-dicarbonat
BSA	Bovin Serum Albumin
BOP	Tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat
Bz	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
CDI	Carbonyl diimidazol
COSY	Correlated Spectroscopy
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
d	Tage
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEPT	distorsionless enhanced by polarization transfer

DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
EDC	Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid
EE	Essigsäureethylester
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electron Spray Ionisation
Et	ethyl
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardment
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FmocOSucc	9-Fluorenylmethyloxycarbonylsuccinimid
Gal	Galactose
GalBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure
gef	gefunden
gem	gemessen
ges	gesättigt
GlBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure
AcGalBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure
AcGlBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure
AcManBB	α -[(<i>p</i> -Aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure
Gluc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)oxybis-(pyrrolidino)-uronium hexafluorophosphat

HBTU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)oxybis-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HoDhbt	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
i	Bezifferung der Aminosäuren vom N-Terminus aus.
LG	Abgangsgruppe
Lsg	Lösung
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Dissorption – Time Of Flight
Me	methyl
MeOH	Methanol
min	Minuten
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
Pd/C	Palladium 10% auf Aktivkohle
PEG	Polyethylenglycol
PIFA	[Bis-(trifluoracetoxyl)iod]benzol
OAc	Acetyl
PFP	Pentafluorphenol
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)-phosphonium hexafluorophosphat
quant	quantitativ
RT	Raumtemperatur
SAAS	Sugar Amino Acids
Sdp	Siedepunkt
Smp	Schmelzpunkt
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TBS	Tris Buffer Saline
TBTU	O-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3- tetramethyluronium hexafluorophosphat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl

TFA	Trifluoressigsäure
TFFH	<i>N, N</i> -Tetramethylfluoroformamidinium hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time Of Flight
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat
Z	Benzyloxycarbonyl

3. Einleitung und Aufgabenstellung

Kohlenhydrate sind zusammen mit den Stoffklassen der Proteine, Lipide und der Nucleinsäuren für jedes lebende Wesen von fundamentaler Bedeutung. Das wird besonders deutlich, wenn man sich die drei größten Forschungsschwerpunkte der Biochemie in den letzten 30 Jahren betrachtet: Die „Genomics“, die „Proteomics“ und in den letzten Jahren vor allem die „Glycomics“.

Wenn man heute von Kohlenhydratchemie spricht, sind nur noch äußerst selten „klassische“ Inhalte der Kohlenhydratforschung wie etwa die Funktion der Kohlenhydrate als Strukturelement oder Energiespeicher von Interesse.

Vielmehr ist der so genannte „Zuckercode“ als „drittes Alphabet des Lebens“ nach Nucleinsäuren und Proteinen in immer stärkerem Maße Inhalt der Forschung.^[1]

Zucker stellen durch ihre enorme strukturelle Vielfalt ein ideales Medium zur Informationsübertragung dar. Dafür sind vor allem die vielen Stereozentren und potenziellen Anknüpfungspunkte, als auch die Derivatisierung der Hydroxylgruppen verantwortlich. Im Vergleich mit Nucleinsäuren oder Proteinen ist die Anzahl der möglichen Kombinationen weit weniger stark begrenzt. Die Anzahl der möglichen Kombinationen von Monosacchariden in einem Hexasaccharids erscheint mit $>10^{12}$ riesig.^{[2][7]} Diese große Variabilität ermöglicht sehr spezifische Wechselwirkungen zwischen Glykanen und Rezeptoren. Die Zelle integriert Oligosaccharide als Glykokonjugate in Form von Glycopeptiden oder Glycolipiden in ihre Zellmembran.^[3] Dort können sie von Rezeptorproteinen, so genannten Lectinen erkannt werden.^{[215] [216] [217]} Ausserdem kommen Oligosaccharide auch außerhalb der Zellen z.B. als Mucine vor.^[18]

Da extrem viele Vorgänge auf zellulärer Ebene, angefangen bei Entwicklungsvorgängen^[4], über Immunerkennungsvorgänge^[14] bis hin zu Infektionen beispielsweise mit HIV^[5] über die Erkennung von Glykokonjugaten ablaufen, ist die Erforschung der Informationscodierung durch Kohlenhydrate von großem wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Interesse.

Die Erkennungsmechanismen sind nicht vollständig aufgeklärt, obwohl von den Bindungstaschen vieler Lectine Kristallstrukturen vorliegen. Das liegt vor allem an fehlendem Probenmaterial, denn die Isolierung von Glykokonjugaten aus der Natur ist aufgrund der Mikroheterogenität, der kleinen verfügbaren Mengen und der Zersetzungsempfindlichkeit der Substanzen äußerst schwierig.

Aus den gleichen Gründen ist die Strukturaufklärung von Oligosaccharidstrukturen aus der Natur problematisch.

Eine gängige Methode zur Strukturaufklärung ist die NMR- Spektroskopie, die sich auch für Affinitätsuntersuchungen anbieten würde, wobei hier die Probenmenge ein limitierender Faktor ist.^[6]

Die großen Probleme bei der Isolierung von Glykanen aus der Natur stellen die Zuckerchemie vor die Aufgabe, passende Moleküle synthetisch darzustellen. Es hat sich gezeigt, dass synthetisch hergestellte Oligosaccharide und Glycokonjugate hervorragend als Liganden für Lectine und damit zur Erforschung der entsprechenden Wechselwirkungen geeignet sind. Allerdings steht man immer noch oft vor synthetisch kaum oder nur mit speziell angepassten Kupplungsreaktionen und Schutzgruppenstrategien lösbaren Problemen.

Durch die Vielzahl der möglichen Verknüpfungen ist eine automatisierte Synthese oder ein flexibles Synthesekonzept noch nicht möglich.

Deshalb wird immer öfter versucht, bei der Imitierung natürliche Liganden die synthetischen Probleme der Glycosylierungsreaktionen zu vermeiden, indem die Zuckerbausteine nicht mehr direkt miteinander verknüpft werden. Dazu werden Monosaccharide über eine Gerüststruktur miteinander verbunden und können sich so in Bindungstaschen einpassen ^[52] ^[53] ^[61].

Die bisher bekannten Oligosaccharidmimetika hatten eine meist relativ flexible multivalente Struktur, die sich variabel verschiedenen möglichen Liganden anpassen konnte. Dabei kommt es vor allem auf eine möglichst hohe Affinität zu einzelnen Liganden an. Die Affinität des Liganden zu speziellen Zuckersequenzen konnte so kaum untersucht werden.^[52]

Genau diese Spezifität wäre aber für die Untersuchung der charakteristischen spezifischen Erkennungsmechanismen der Lectine wichtig.

Die Herstellung von Molekülen, die durch ihre Affinität zu bestimmten Sequenzen als „molekularer Sonden“ eingesetzt werden können erfordert die eindeutige Positionierung der erkennenden Strukturelemente. Als Gerüststruktur besonders geeignet erscheinen dazu β -Peptide. ^[133] ^[132] Sie bilden schon bei Kettenlängen ab sechs Aminosäuren starre Helixstrukturen aus.

Die Verwendung eines Peptidrückgrates lässt außerdem eine sehr variable Blocksynthese zu. Ein weiterer Vorteil des β -Peptidgerüsts ist, dass sich die schon in unserer Arbeitsgruppe etablierten Neo- Glycopeptidbausteine für die Spotsynthese nahtlos in das neue Synthesekonzept einpassen, so dass sowohl Monomere aus dieser Arbeit für die Spotsynthese verwendet werden können, als auch für die Spotsynthese synthetisierte Bausteine in ein starres Gerüst integriert werden können.

Ziel dieser Arbeit sollte sein:

- Die Synthese neuer O- Glycopeptide mit rigidem, benzylischem Linkersystem, die als Monomere für die in unserer Gruppe etablierte Spotsynthese verwendbar sind.
- Verwendung dieser Bausteine für den variablen Aufbau rigider glycosylierter β -Peptide.
- NMR- spektroskopische Untersuchung der Sekundärstruktur der synthetisierten β -Glycopeptide
- Überprüfung der Affinität zu Lectinen

4. Allgemeiner Teil:

4.1 Oligosaccharide auf Zellmembranen

4.1.1 Vorkommen und Funktion

Oligosaccharide kommen in praktisch allen Organismen vor und übernehmen dort vielfältige Aufgaben. Seit einigen Jahren geht man davon aus, dass ihr Stellenwert dem der Nucleinsäuren oder Proteine gleichkommt. Der Grund dafür dürfte die riesige Zahl möglicher Kombinationen bei Oligosacchariden sein. So könnten rein rechnerisch ungefähr 1.05×10^{12} [7] verschiedene Strukturen eines reduzierenden Hexasaccharids entstehen.

Oligosacchariden kommen in Kombination mit einem Protein (Glycopeptide), einem Lipid (Glycolipide), oder einem Phospholipid (Glycophospholipid) in Organismen vor. [8]

Von besonderem Interesse sind zurzeit Glycopeptide, da sie in vielen extra – und intrazellulären Prozessen eine entscheidende Rolle spielen.

Schon als wenig modifizierte core-Strukturen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sind die Oligosaccharide an der Faltung, der Qualitätskontrolle und Auswahl der Proteine beteiligt. Im ER werden die Core-Strukturen der Oligosaccharide an Dolichylsulfat synthetisiert und danach auf simultan wachsenden Proteinen übertragen. Erst im Golgi- Apparat werden sie dann durch Glycosylierung, und anbringen verschiedener funktioneller Gruppen modifiziert, bevor sie an die Zelloberfläche gelangen. [9]

Die Glycopeptide kommen vor allen Dingen in drei Klassen vor:

-N-Glycoside, die in der Regel an Asparaginsäure gebunden sind. [10]

-O-Glycoside, die entweder an Serin oder an Threonin gebunden sind.

-über Ethanolaminphosphat an Proteine gebundenen Glykane, die in Glycosylphosphatidylinositolen, so genannten *GPI*- Ankern vorkommen. [11]

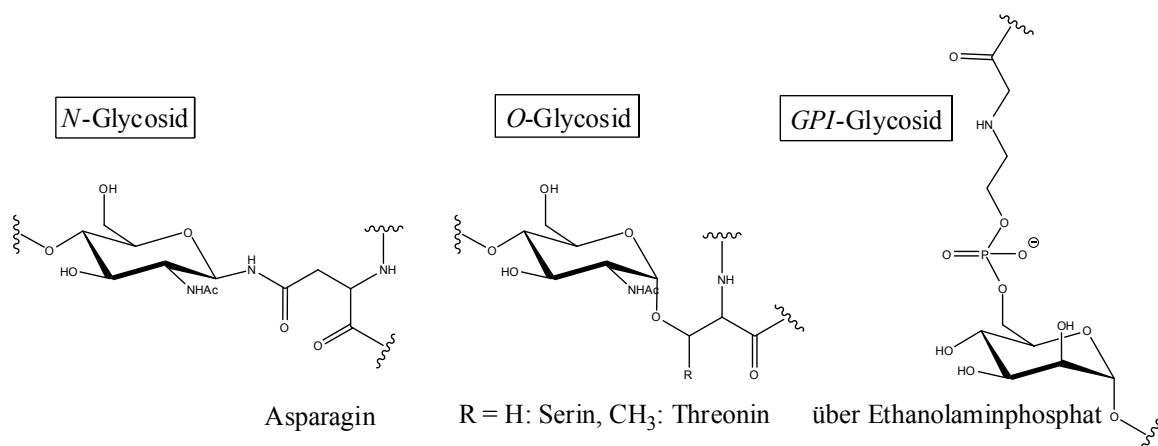


Abbildung 1: Verschiedene Glycopeptidklassen.

Die *N*-Glycoside werden in drei weitere Klassen unterteilt:

- den High Mannose Typ, der aus Mannose und Glucosamin – Bausteinen besteht
- den Complex Typ, der außerdem Galactose und Sialinsäure enthält
- den Hybridtyp

Alle drei Typen enthalten als Grundstruktur die so genannte Core-Struktur, ein verzweigtes Pentasaccharid. Die Core-Struktur von Complex- und Hybridtyp wird durch Verarbeitung von High Mannose Typ Glykanen hergestellt.^[12]

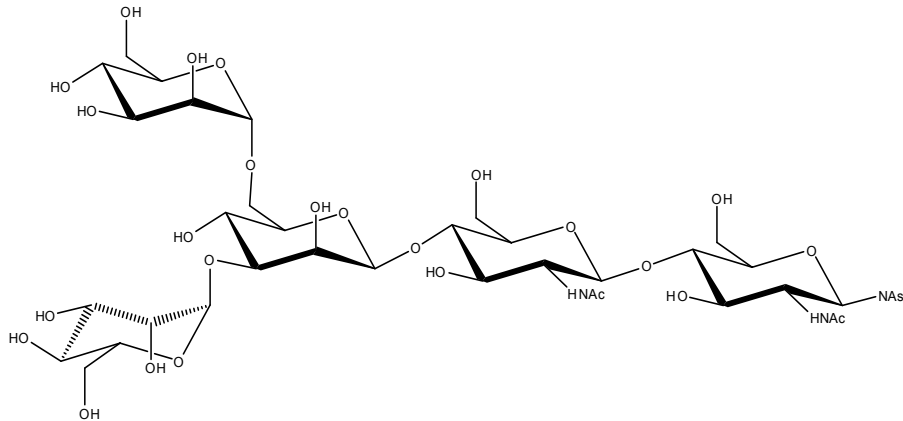


Abbildung 2:Core – Struktur

Auf der Zelloberfläche sind *N*-Glycoside dann für verschiedene Erkennungsprozesse zuständig:

Darunter fällt zum einen die Kommunikation mit und die Adhäsion von körpereigener Zellen, z.B. in der Embryonalentwicklung und Gewebedifferenzierung; wird z.B. die enzymatische Bildung der Core-Strukturen gestört, findet die embryonale Entwicklung nicht mehr vollständig statt.^[13]

Zum anderen spielen *N*-glycosylierte Proteine eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, wo sie für die Beladung und die korrekte Faltung der Proteine des major histocompatibility complex (MHC) und der T-Zell-Rezeptoren, sowie teilweise für Erkennungsprozesse in der humoralen Immunabwehr, z.B. bei rheumatischer Arthritis, verantwortlich sind.^{[14][15]}

Außerdem sind *N*-Glycoside für die Zelladhäsion und Zell-Zell-Interaktion z.B. beim Leukozytentransport wichtig.^{[13][16]}

Eine weitere Aufgabe, die *N*-Glycoside mit den O-glycosylierten Glycopeptiden gemeinsam haben, ist die Abschirmung von Proteinen gegen proteolytische Angriffe und ihre Stabilisierung.^[17]

Die O-Glycoside sind weitaus komplizierter aufgebaut und kommen in deutlich mehr Modifikationen als die *N*-Glycoside vor. Ihre Rolle ist erst in Ansätzen aufgeklärt.

Man kann speziell zwei Klassen O-glycosylierter Glycoproteine unterscheiden: Die Mucine und die Proteoglycane.

Die Mucine bilden Oberflächen, die nicht durch wasserabweisende Schichten geschützt sind und können große Mengen Wasser aufnehmen, z.B. im Verdauungs- und Genitaltrakt. Sie verhindern durch ihre hohe Wasseraffinität die Austrocknung der Epithel- und Endothelzellen. Des Weiteren verhindern sie das Eindringen von Keimen und sorgen für Schmierung.^[18]

Auch die extrazelluläre Matrix besteht zu großen Teilen aus Mucin-Glycopeptiden, wobei diese hier außer der Strukturbildung auch noch eine Rolle in der Zell-Zell-Erkennung und Adhäsion haben.^[19] Tumore können durch spezifische Glycanstrukturen der Mucine nachgewiesen werden.^[20]

Mucine bestehen meist aus relativ einfachen Core-Strukturen, in denen GlcNAc mit der Seitenkette von Threonin oder Serin verbunden ist. Typischerweise sind die Core-Strukturen disialyliert.

Die Glycane der Proteoglycane bestehen aus sehr langen, linearen Strukturen mit repetitiven Disaccharideinheiten aus Aminosucker und Hexose. Ihre Aufgabe besteht hauptsächlich in der Stabilisierung von Peptidstrukturen, aber auch verschiedene Funktionen in intrazellulären Organellen werden diskutiert.^[21]

Des Weiteren vermutet man, dass Störungen in der O-Glycosylierung von Proteinen mit GlcNAc sowohl eine Rolle bei Typ II – Diabetes als auch bei der Plaquebildung bei Alzheimer eine Rolle spielen.^[22]

4.1.2 Synthese von Oligosacchariden

Die Synthese natürlicher Oligosaccharidstrukturen ist aufgrund der oben genannten vielfältigen Funktionen heute von immensem Interesse. Sei es, um zu Forschungszwecken genügend Substrat zur Verfügung zu haben, das auf natürlichem Wege wegen der geringen zur Verfügung stehenden Mengen und der großen Diversität kaum zu beschaffen ist, oder um künstliche Impfstoffe herzustellen oder Arrays für serologische Tests zu bestücken.^{[23] [24] [25]}

Der Bedarf an entsprechenden Substanzen stellt den Chemiker oft vor kaum lösbare synthetische Probleme.^[26] Trotz der großen Anzahl an zur Verfügung stehenden Schutzgruppen und Aktivierungsmöglichkeiten sind entsprechende Synthesen immer noch mit großem synthetischen Aufwand verbunden.^{[27] [28] [29] [30] [31]}

4.1.3 Oligosaccharidmimetika

Da die Synthese natürlicher Verbindungen oft einen großen synthetischen Aufwand bedeuten, bemüht man sich im Moment vermehrt, Moleküle aufzubauen, die ähnliche Eigenschaften wie

ihre natürlichen Vorbilder haben, jedoch leichter synthetisch zugänglich sind. Dazu muss das Mimetikum eine Oberfläche besitzen, die dem zu imitierenden Glycan ähnelt. Oft sind nur wenige Reste am nicht reduzierenden Ende für eine Erkennung durch einen Rezeptor notwendig. Im Moment kann man zwei verschiedene Typen von Mimetika unterscheiden: Der erste Typ versucht, Liganden für Lectine bereitzustellen, was im Fall von Galectinen wegen deren Rolle bei Krebserkrankungen ^{[24] [32] [33] [34]} und im Immunsystem ^[35] von großem Interesse ist. In diesem Zusammenhang wird auch an der Entwicklung von Impfstoffen gegen HIV und Malaria sowie der direkten Adressierung von Wirkstoffen durch Oligosaccharide geforscht. ^{[36] [37] [38] [39]} Der zweite Typ versucht, durch kompetitive Hemmung Enzyme der Oligosaccharid-Biosynthese auszuschalten. ^{[40] [41] [42]}

Ein Grund für die Suche nach neuen Liganden ist der Bedarf an Modellverbindungen, um z.B. mehr über die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu erfahren. So konnten durch schrittweise Modifikation der Struktur Mimetika für Sialyl-Lewis X (SLe^x) und andere komplexe Oligosaccharide gefunden werden. ^{[43] [44] [45] [46]}

Teilweise hatten die Mimetika für SLe^x sogar höhere Bindungsaffinitäten als die Originalsubstanz, ein weiteres Argument für die Suche nach Mimetika.

Oligosaccharide unterliegen dem enzymatischen Abbau, was durch entsprechende Konzeption der Mimetika wie z.B. Verwendung von C-Glycosiden oder benzylicischen Glycosiden verhindert werden kann. ^{[47] [48]}

Immer mehr Mimetika vermeiden eine Verknüpfung ihrer Monomere über glycosidische Bindungen. Eine Möglichkeit dabei ist die Verwendung von Peptidbindungen, für die meistens gute Methoden etabliert sind. Dabei gibt es prinzipiell zwei Ansätze:

-Die direkte Funktionalisierung des Zuckermonomers, wobei die Hydroxylgruppe an C-1 durch eine Carboxylgruppe und eine der übrigen Hydroxylgruppen durch eine Aminofunktion ersetzt wird. Diese so genannten Sugar Amino Acids (SAAS) werden dann durch etablierte Peptidkupplungsmethoden zu Mimetika verbunden, die z.B. Zelladhäsion oder die Infektion mit HIV verhindern können. ^{[49] [50] [51]} Es existieren auch Abwandlungen dieses Systems, in dem Amidbindung teilweise in Kombination mit Spacermolekülen zum Aufbau multivalenter Dendrimere verwendet werden. ^[52]

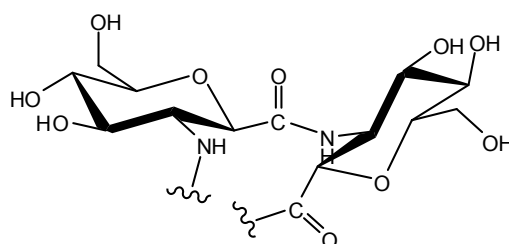
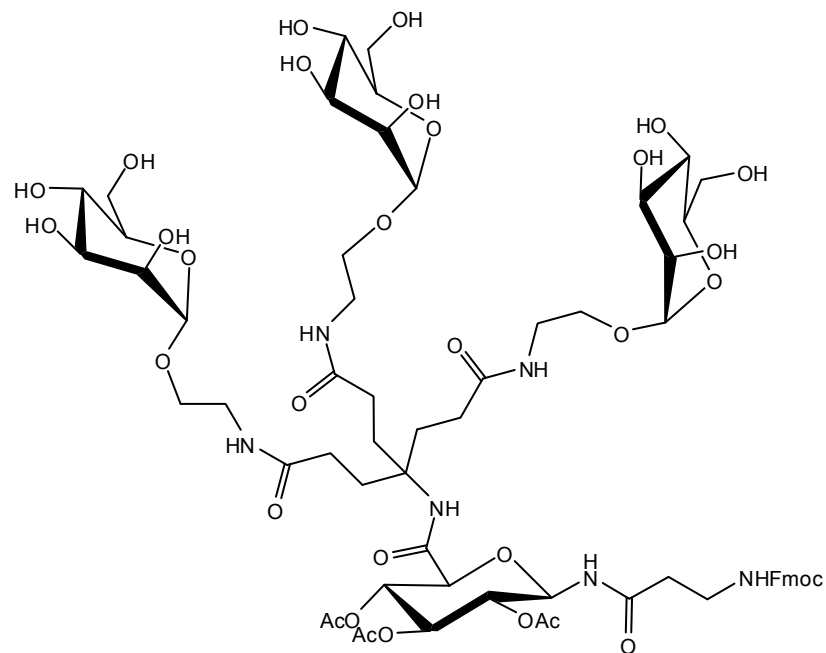
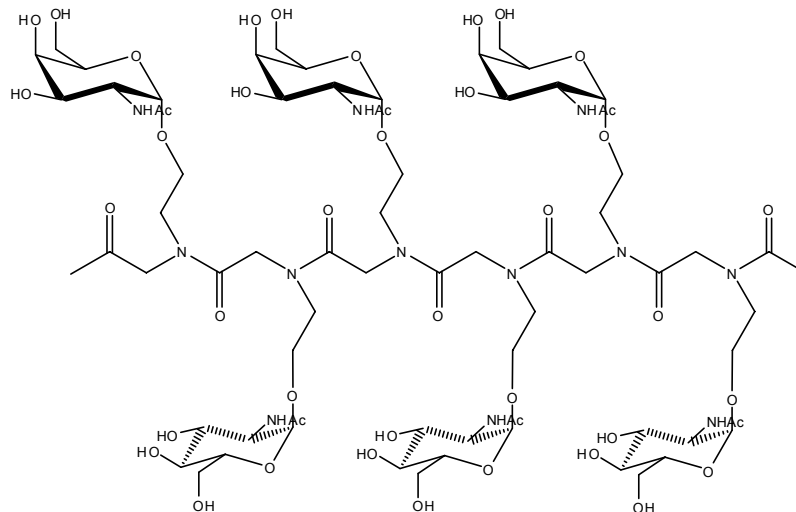


Abbildung 3: Ausschnitt eines SAAS – Mimetikums von Suhara et al.^[51]**Abbildung 4: Multivalentes Dendrimer aus der Arbeitsgruppe von T.K. Lindhorst.^[52]**

-Die Verknüpfung von Zuckermono- oder Oligomeren mit einer Aminosäure und der Aufbau eines Peptid- oder Peptidähnlichen Rückgrades^{[53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60]}

**Abbildung 5: Glycopeptidoid mit Tn Antigenen^[53]**

In unserer Arbeitsgruppe wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Neo- Glycopeptiden synthetisiert, deren Bausteine aus einer trifunktionellen Aminosäure, einem Spacermolekül und einem daran befestigten Mono- oder Disaccharid besteht. Dabei wurden verschiedene Aminosäuren, verschiedene Spacer, verschiedene Glycosidtypen und verschiedene Glycosylierungspositionen untersucht.^{[61] [62]}

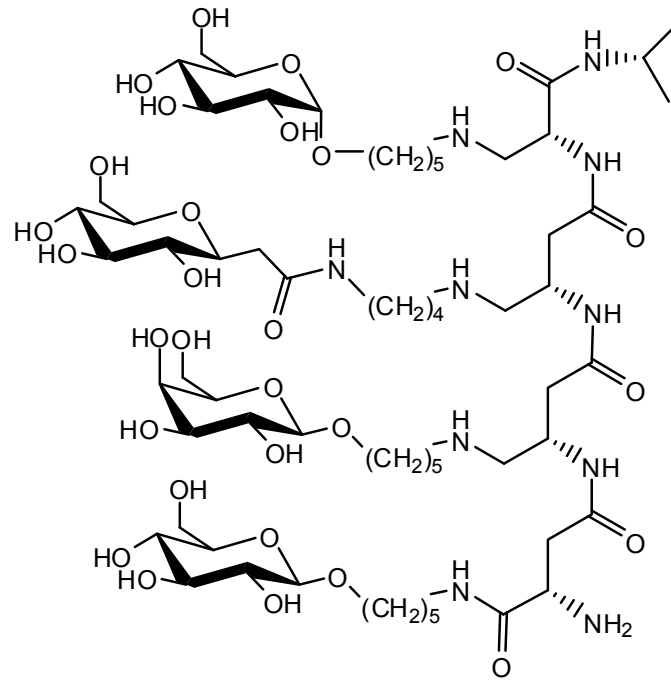


Abbildung 6: Beispiel eines in unserer Arbeitsgruppe synthetisierten Neo-Glycopeptids.^[61]

4.1.4 β -Aminosäuren und β -Peptide

Aus folgenden Gründen haben β -Peptide in den letzten Jahren als Mimetika für α -Peptide und als Gerüstsubstanzen an Bedeutung gewonnen.^[63]

- β -Peptide sind kaum von Peptidasen und Proteasen abbaubar.^[64]

- β -Peptide haben relativ gut voraussagbare Sekundärstrukturen in Lösungen.^{[65] [66]}

β -Peptide nehmen verschieden spezielle Konformationen an, je nachdem, welche Reste enthalten sind. Es sind Helices, Faltblattstrukturen und Turns bekannt.^{[67] [68] [69] [70] [71]}

Konformativ stark eingeschränkte β -Aminosäurereste wie jene, in denen C_α und C_β in einem kleinen Ring liegen, nehmen extrem rigide Konformationen an und schon so genannte β_3 -Aminosäuren, bei denen C_3 substituiert ist, unterstützen meistens schon die Helixbildung. Das liegt daran, dass C_α und NH in cyclischen $\beta_{2,3}$ -Aminosäuren immer synclinal vorliegen, wobei nicht cyclische $\beta_{2,3}$ -Aminosäuren sehr stark und β_3 -Aminosäuren immer noch stark die gauche-Konformation unterstützen.^{[72] [73]}

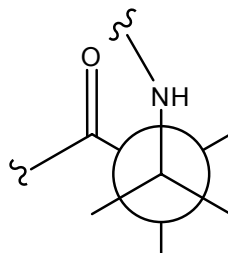


Abbildung 7: Synclinale Konformation um die C_2 – C_3 -Bindung

So werden schon β -Peptide die aus nur 6 Aminosäuren bestehen durch Verwendung entsprechender Reste in eine von zwei möglichen Helixstrukturen gezwungen.

Verwendet man beispielsweise *trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure (ACPC), so wird das Hexapeptid in eine „12-Helix“ gezwungen, definiert durch den Ring der sich aus der Wasserstoffbrückenbindung $C=O(i) \cdots H-N(i+3)$ (mit i wird die N-terminale Aminosäure beziffert) ergibt.^{[70] [74] [75] [76] [77] [78]}

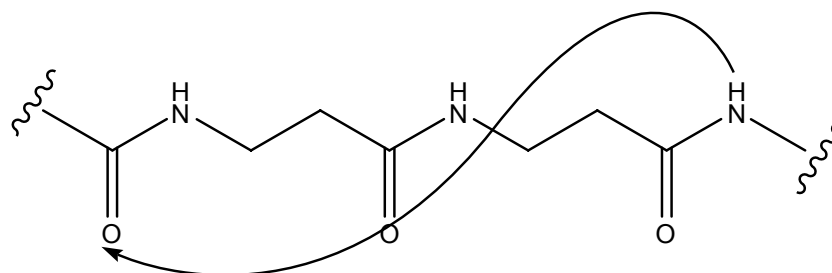


Abbildung 8: H-Brücke, die die 12-Helix stabilisiert

Verwendet man beispielsweise *trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC), so wird das Hexapeptid in eine „14-Helix“^[92] gezwungen, definiert durch den Ring der sich aus der Wasserstoffbrückenbindung $C=O(i) \cdots H-N(i-2)$ ergibt.^{[79][80][81][82][83]}

Die Ganghöhe der Helix beträgt dabei ungefähr 5Å.

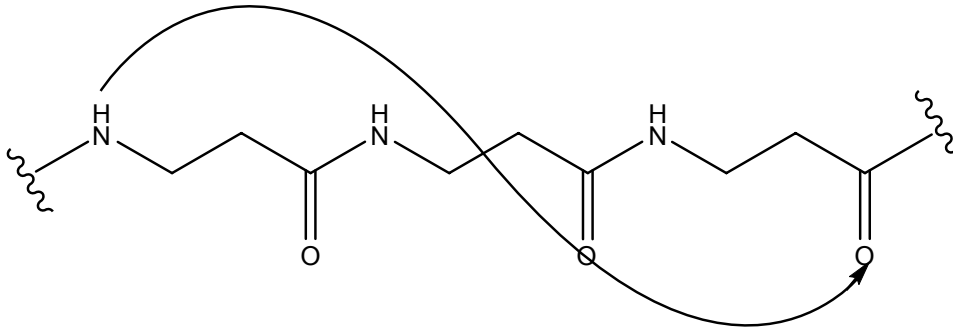


Abbildung 9: H-Brücke, die 14- Helix Stabilisiert.

α -Peptide oder β -Peptide ohne entsprechende Reste bilden bei entsprechender Länge kaum Helixstrukturen aus.^{[84][85][86][87][63]}

Das wird deutlich wenn man sich das so genannte N-Capping betrachtet, das man bei N-terminaler Asparaginsäure an einer Helix beobachten kann. Die einzig proteinogene β^3 -Aminosäure Asparaginsäure kann in dieser Position theoretisch zwei verschiedenen H-Brücken eingehen, wobei man aus entropischen Gründen glauben sollte, dass die H-Brücke über das α -Carbonyl erfolgen sollte, was zu einer Helixerweiterung führen sollte, da dabei nur zwei statt drei Bindungen fixiert werden. Tatsächlich ist aber das Gegenteil der Fall, was zum so genannten „N-capping“ führt. Dabei ist das N-capping mit 1.0 - 2.0 kcal/mol bevorzugt.^{[88][89]} Inzwischen ist bekannt, dass alternierende α - β - Peptide auch schon bei entsprechend kurzer Kettenlänge in Lösung stabile Helices ausbilden.^{[90][91]}

β -Peptide können durch Modifikation ihrer Seitenketten in ihrer Löslichkeit beeinflusst werden.^[79] Außerdem kann durch entsprechende Seitenketten ihre Sekundärstruktur stabilisiert werden.^{[92][93][168][94]}

- β -Aminosäuren neigen bei der Aktivierung nicht zum Racemisieren.

Aber:

- rigide cyclische β -Aminosäuren lassen sich, wohl aufgrund ihrer Struktur und ihres sterischen Anspruchs, oft sehr schlecht schützen, kuppeln und entschützen. Dazu sind oft starke Aktivierungsmethoden nötig.^{[95][96]} Aus diesem Grund eignen sie sich teilweise eher

schlecht für Festphasensynthesen bzw. ergeben keine mit α - Peptidparallelsynthesen vergleichbaren Ausbeuten.^[97]

β -Aminosäuren können durch verschiedene Methoden Dargestellt werden:

- Durch von Seebach et al. modifizierte Arndt Eistert- Synthese mit anschließender Wolf-Umlagerung aus α -Aminosäuren^{[67] [98] [99] [100] [63]}

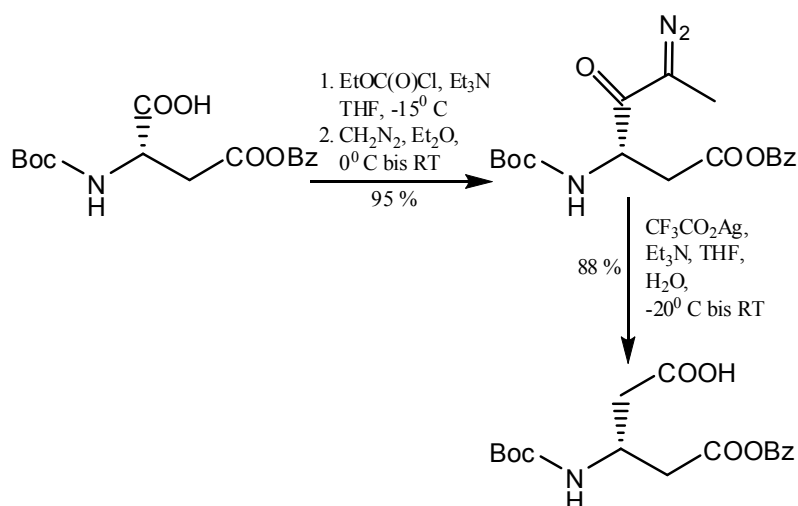


Abbildung 10: β - Aminosäuresynthese durch Arndt Eistert- Synthese mit anschließender Wolf-Umlagerung

- Durch Mitsunobu- Reaktion mit NH₃ und anschließende Reduktion.^[101]
- Durch Michael-Addition eines chiralen Amins an einen $\alpha\beta$ -ungesättigten Ester und Isomerentrennung.^[75]
- Durch Hofmann-Abbau eines enantiomerenreinen Dicarbonsäuremonoamids.
- Durch Reduktion eines chiralen Enamins.^[102]

4.1.5 Peptidkupplungsmethoden

In den letzten beiden Jahrzehnten sind eine große Anzahl möglicher Kupplungsreagenzien für die Bildung von Amidfunktionen entwickelt worden, oft in Zusammenhang mit entsprechenden Kupplungsproblemen.^{[103] [104]}

Hier sollen diejenigen Methoden nach den verwendeten Abgangsgruppen klassifiziert und vorgestellt werden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Auswahl kann wegen der großen Methodenvielfalt nur exemplarisch sein.

Alle Methoden haben gemeinsam, dass eine gute Abgangsgruppe (LG) an der Carboxylfunktion eingeführt wird, die ihrerseits in einem nucleophilen Angriff seitens der Aminogruppe substituiert wird.

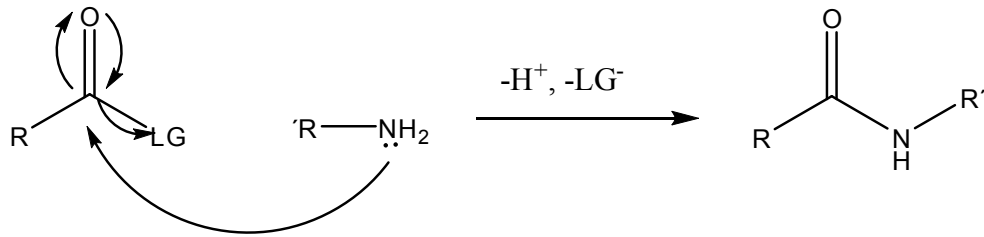
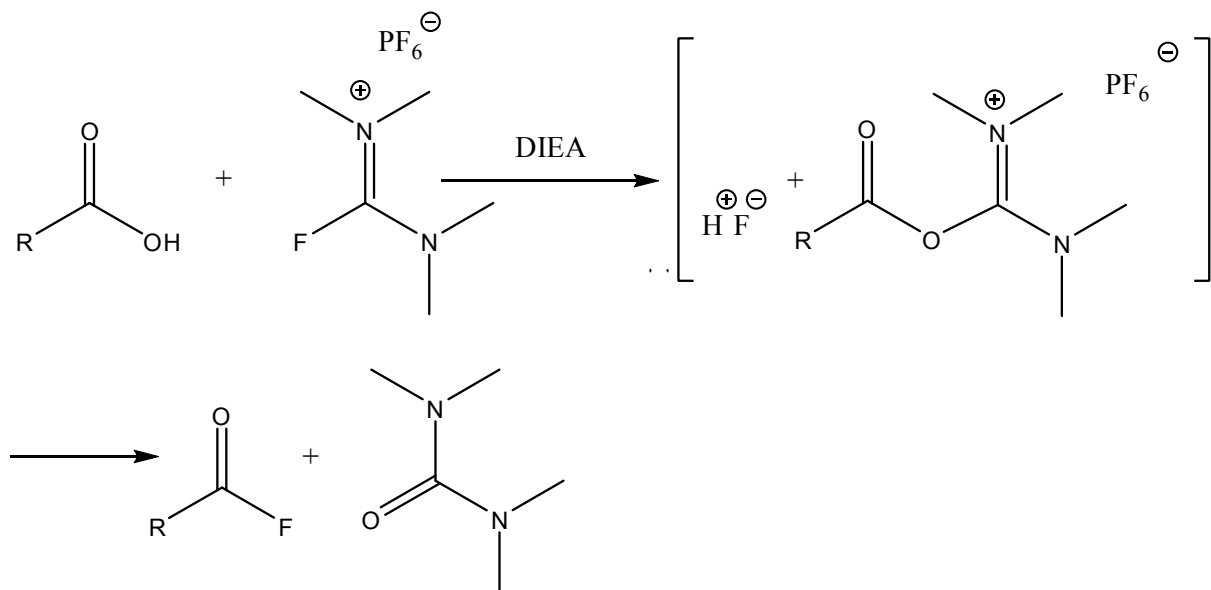


Abbildung 11: Schema einer Peptidkupplungsreaktion

-Säurehalogenide:

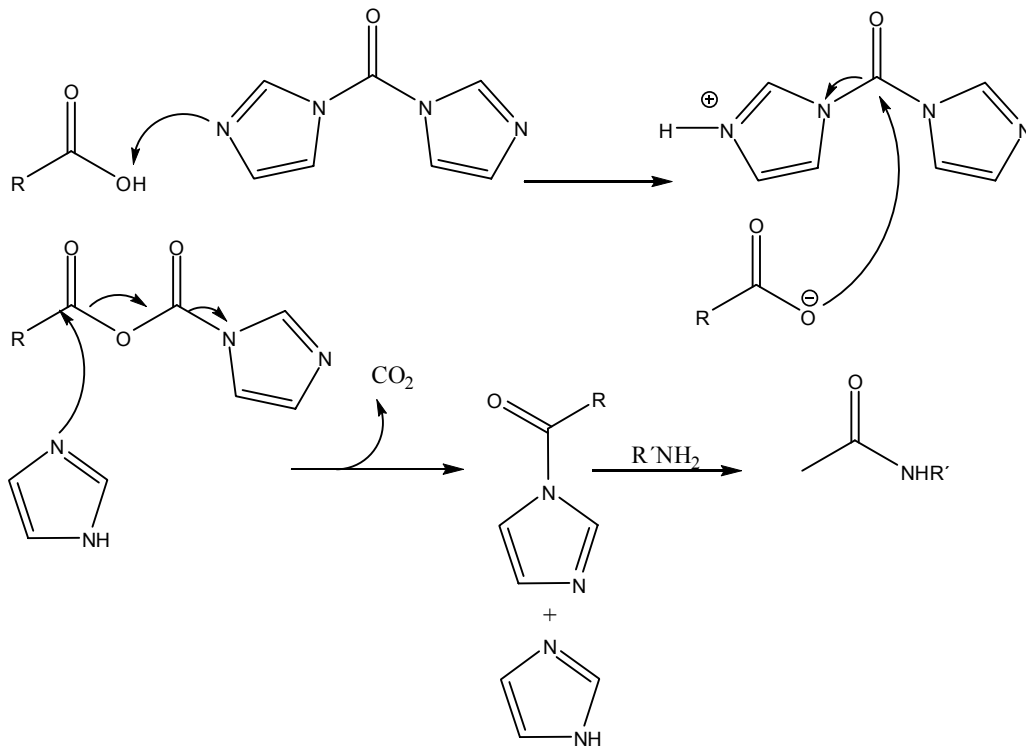
***N,N*-Tetramethylfluorformamidiniumhexafluorosphat (TFFH)**^{[105] [106]}

TFFH kann mit Hünigbase verwendet werden, wobei die Harnstoffbildung die treibende Kraft bei der Umsetzung zum Fluorid darstellt. Ein Vorteil gegenüber der Verwendung von Acylchloriden ist die geringe Feuchtigkeitsempfindlichkeit und die geringe Tendenz zur Racemisierung

Abbildung 12: Amidkupplung mit TFFH^[105]**-Acylimidazole**

Carbonyldiimidazol (CDI)^{[107] [108]}

Die Säure wird zum Acylimidazol umgesetzt. Dafür ist keine Base erforderlich. Daraufhin wird das Amin zugegeben und das Amid bildet sich. Die Methode ist sogar mit Hydrochloriden anwendbar.

Abbildung 13: Peptidkupplung unter Verwendung von CDI.^[107]**-Carbodiimide:**

**Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Diisopropylcarbodiimid (DIC),
Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid (EDC)**

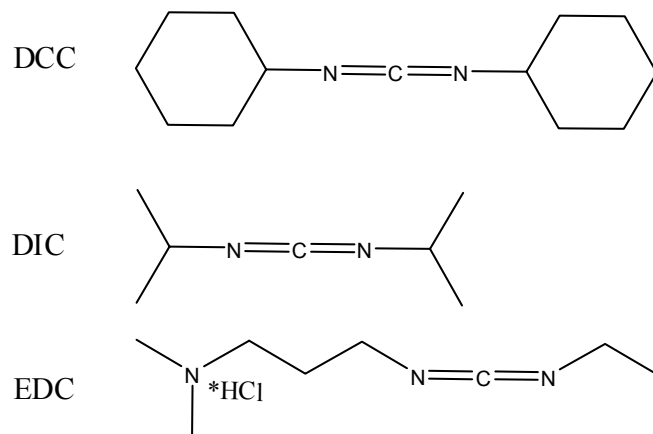


Abbildung 14: Carbodiimid- Kupplungsreagenzien

Carbodiimide reagieren auch ohne Basenzusatz, obwohl oft Hünigs Base verwendet wird. Dabei wird der O-Acylisoharnstoff als aktive Spezies gebildet. Die treibende Kraft hinter der Kupplungsreaktion ist auch hier die Bildung des Harnstoffs.^{[109] [110] [111]}

Bei der Reaktion kann es als unerwünschte Nebenreaktionen zur Bildung des unreaktiven N-Acylharnstoffs oder zu Racemisierungen kommen. Um das zu verhindern, wird die Reaktion

bei 0° C durchgeführt und es werden Nucleophile zugefügt, die schneller mit dem O-Acylharnstoff reagieren, als der Acyltransfer stattfinden kann. Man verwendet entweder DMAP^[112] oder z.B. Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Zusatz.^[113]

Ein großer Unterschied zwischen den Verfahren liegt in der Löslichkeit der entstehenden Harnstoffderivate:

DCC: Schwer lösliches Harnstoffderivat, das durch Filtration entfernt werden kann. Dadurch ist DCC für die Lösungssynthese, nicht aber für Festphasensynthesen geeignet, da der Harnstoff kaum vom Harz zu trennen ist.

DIC: In DCM lösliches Harnstoffderivat. Da der Harnstoff durch Waschschrte entfernt werden kann ist DIC gut zur Festphasensynthese geeignet.

EDC: In Wasser und verdünnten Säuren lösliches Harnstoffderivat, das bei der wässrigen Aufarbeitung entfernt werden kann. Anwendung ist deshalb die Lösungssynthese.

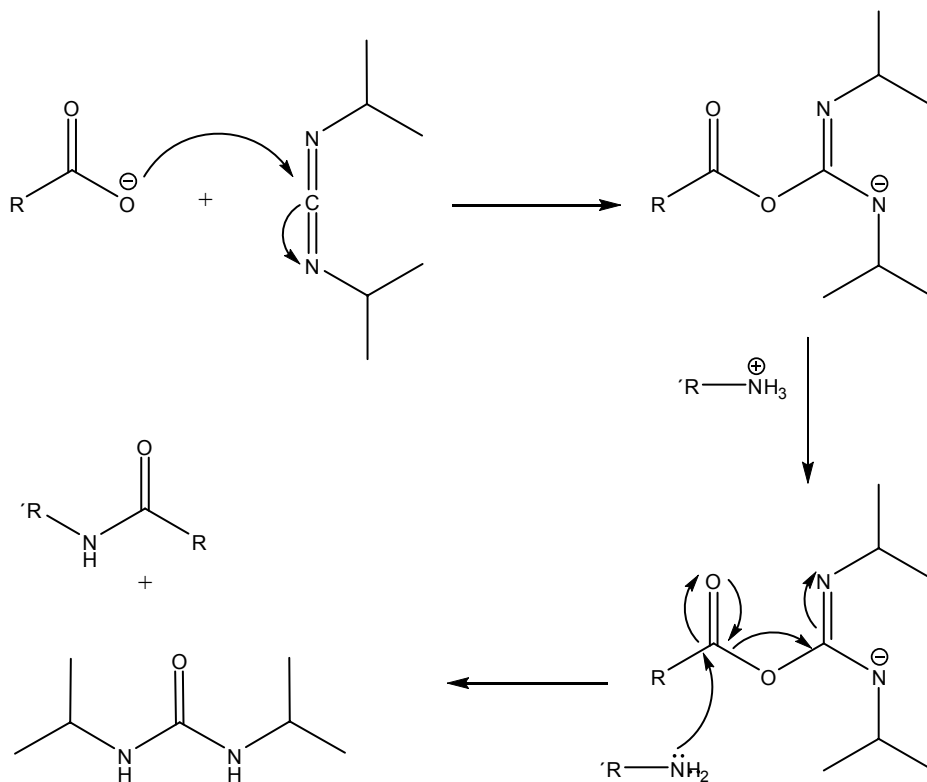


Abbildung 15: Peptidkupplung mit Carbodiimiden am Beispiel DIC

Aktivester:

Aktivester können in aller Regel leichter als Alkylester hydrolysiert werden, da sie den Carbonyl-Kohlenstoff deutlich elektrophiler machen. Dadurch können Amine relativ leicht und praktisch ohne Racemisierung zum Amid reagieren.

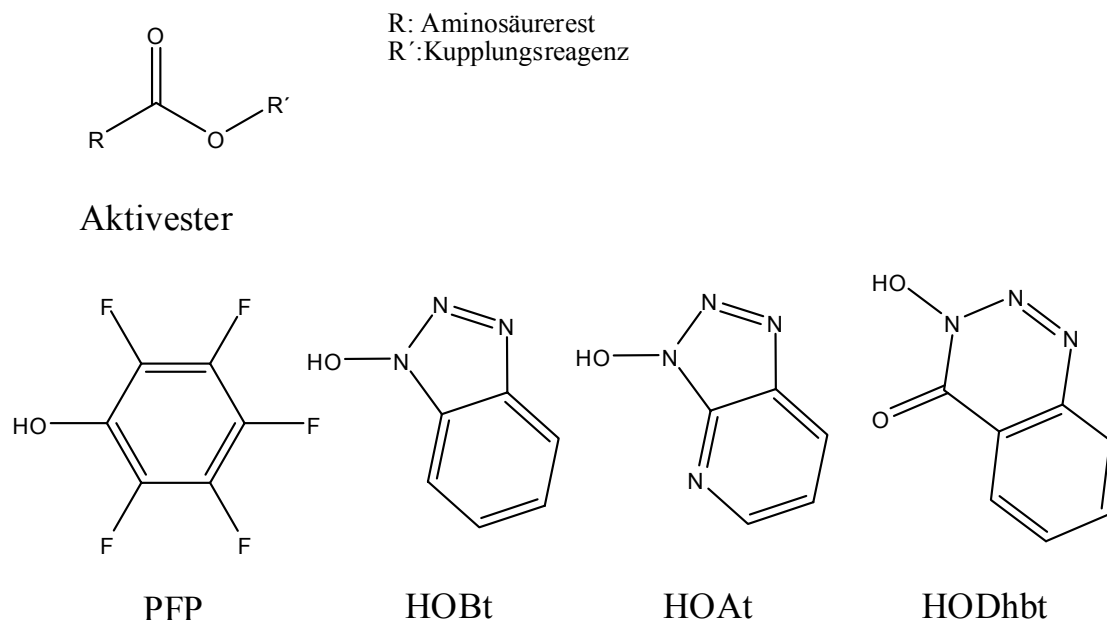


Abbildung 16: Gebräuchliche Alkohole zur Darstellung von Aktivestern.

Sehr gebräuchlich sind Hydroxybenzotriazol (HOBT) und Pentafluorphenol (PFP). Pentafluorphenol wird oft eingesetzt, wenn DCC^[114] oder DIC alleine keinen Erfolg bringen. PFP-Ester können in situ hergestellt werden, z.B. in Kombination mit DIC bei der Festphasensynthese, oder auch isoliert und gelagert werden. Sie reagieren schnell, speziell auch mit Fmoc- geschützten Aminosäuren und ohne Basenzusatz. Die Ausbeuten Mit PFP-Aktivestern können noch durch Zusatz von 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (HoDhbt) gesteigert werden, das analog HOBT reagiert.

Funktioniert eine Kupplung mit HOBT nicht oder nur schlecht, vor allem bei stark gehinderten Basen, so ist 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) oft noch eine Alternative, da möglicherweise durch den Stickstoff des Pyridins eine Fixierung und zusätzlich Aktivierung der Base erfolgen kann.

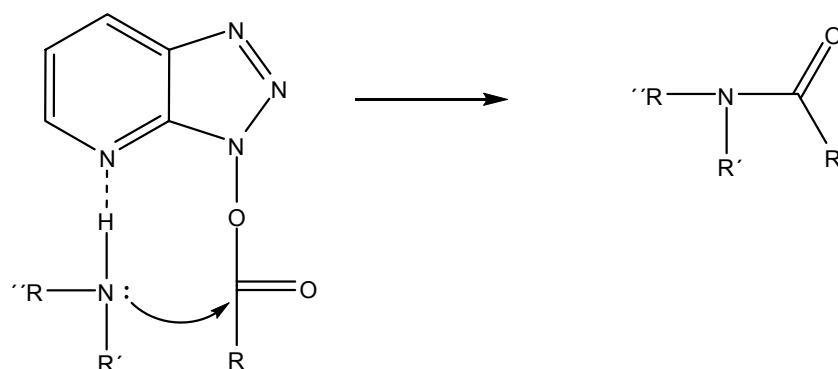


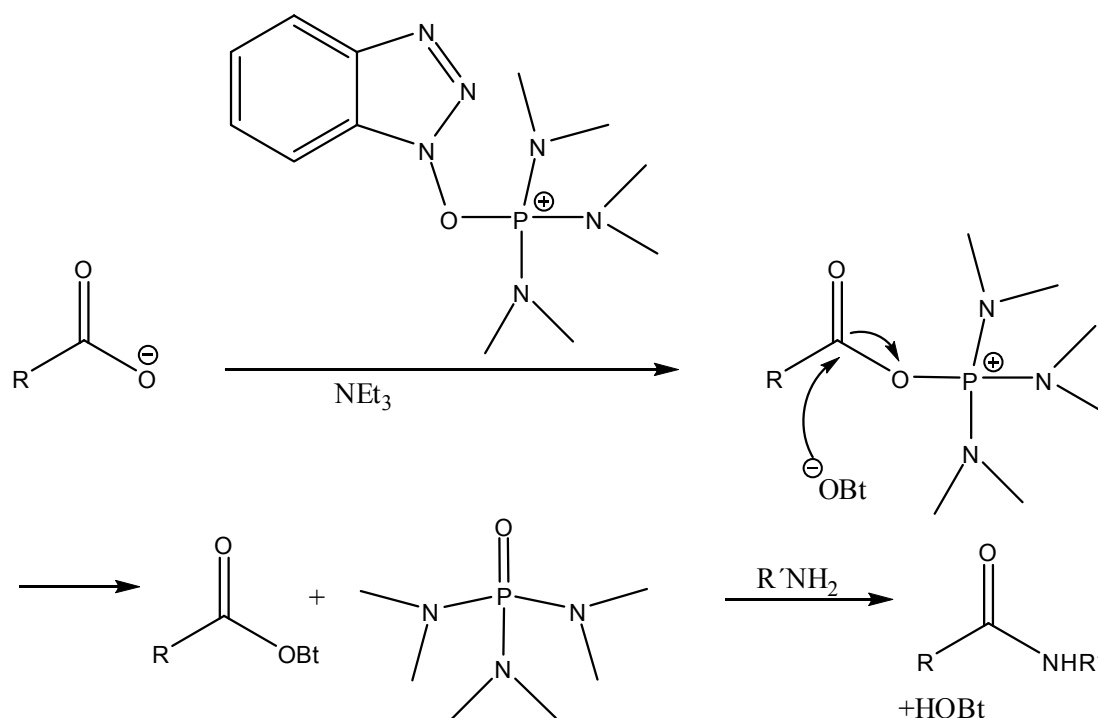
Abbildung 17: Kupplung einer sterisch anspruchsvollen Base mittels HOAt.

Reagenzien für Eintopfreaktionen:

Statt eine Kombination z.B. aus DCC und HOBt zu verwenden, kann man auch Phosphonium-, Uronium- oder Immoniumsalze, vor allem mit HOBt und HOAt- ähnlichen Resten einsetzen.

Im Fall von Tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP)^[115] werden Säure und Amin mit BOP und einer Hilfsbase gemischt. Dabei reagiert die deprotonierte Säure zunächst mit BOP zu einem Acylphosphonium-Aktivester, und HOBt seinerseits wieder mit dem Aktivester zum Benzotriazolester.

Die treibende Kraft ist die Bildung des korrespondierenden Phosphorsäureamids.^[116]

Abbildung 18: Eintopfreaktion mit BOP.^[116]

Da das bei der Reaktion entstehende Hexamethylphosphorsäuretriimid sehr giftig ist, hat man Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) entwickelt, das in ganz ähnlicher Weise reagiert.^{[117] [118]} Das dabei entstehende Phosphorsäureamid ist deutlich weniger giftig.

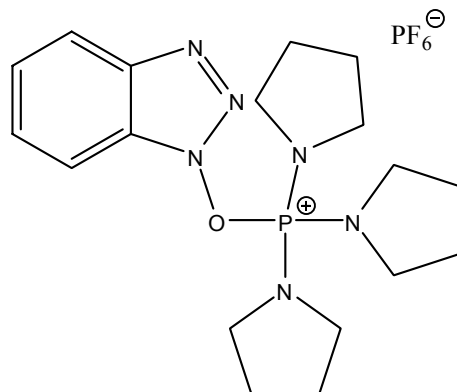


Abbildung 19: PyBOP

Ebenfalls bei den Uroniumsalzen werden Derivate des HOBt verwendet, die in ganz ähnlicher Weise wie die Phosphoniumderivate reagieren, nur dass hier die Bildung des Harnstoffderivats die treibende Kraft ist. Man unterscheidet TBTU- das Tetrafluorborat^{[119] [120]} und HBTU- das Hexafluorophosphat^{[121] [122] [123]}. Die nicht nucleophilen Gegenionen haben allerdings wohl keinen Einfluss auf die Reaktion, so dass man nach aktuellem Wissen wohl eigentlich auf Kupplungsversuche mit einer von beiden Spezies verzichten könnte falls es keine anderweitigen Vorteile von einer der beiden gibt.

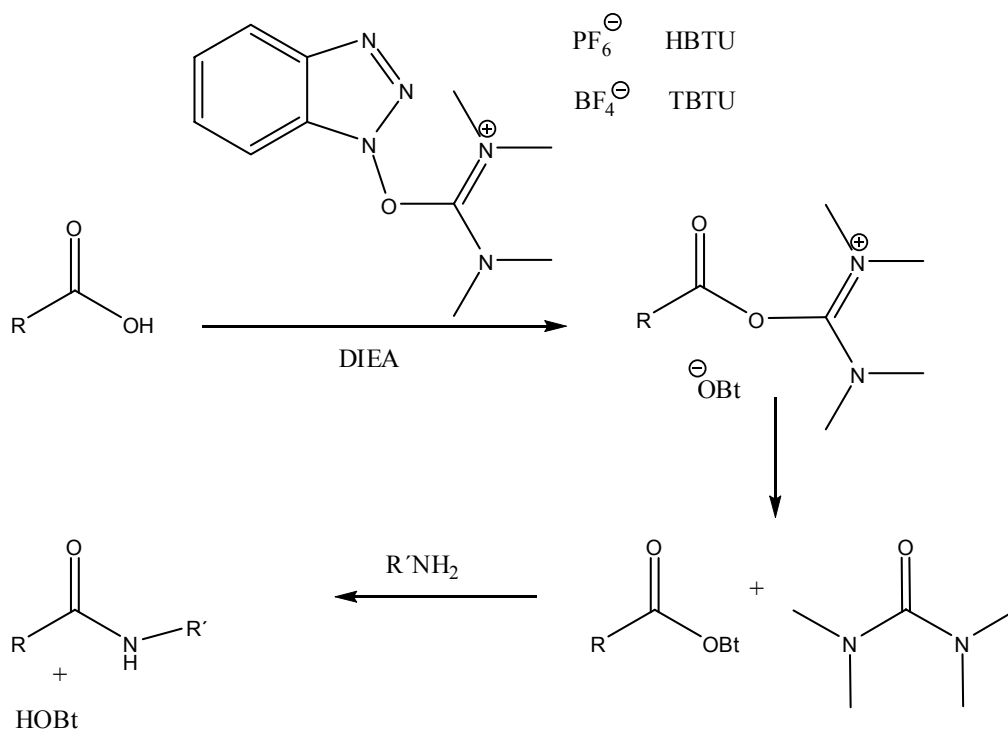


Abbildung 20: Kupplung mit HBTU bzw. TBTU.

In gleicher Weise reagiert der HOAT- Abkömmling HATU. HATU ist speziell bei stark sterisch gehinderten Basen eine gute Methode. Sowohl bei HATU als auch bei HBTU/TBTU gibt es ein Gleichgewicht zwischen O-Uronium und N-Guanidiniumform.^[124]

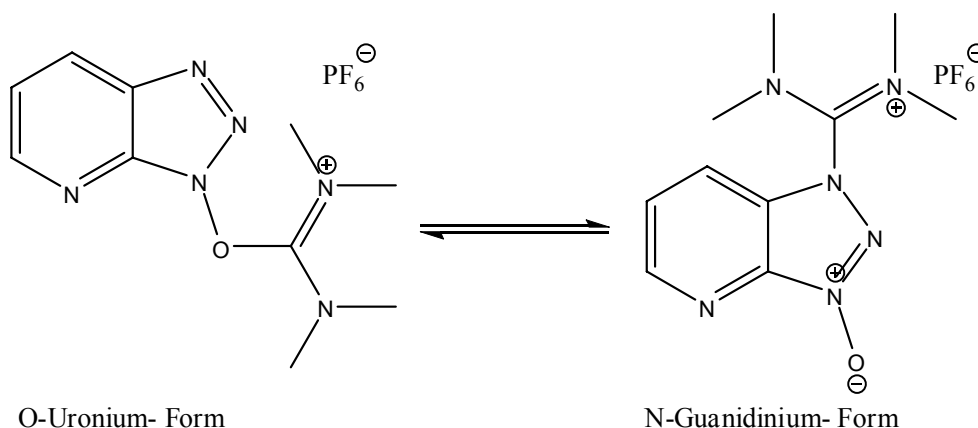


Abbildung 21: HATU in O-Uronium- und N-Guanidinium- Form

Die N-Guanidiniumform ist die meistens produzierte Spezies, die auch kristallin hauptsächlich vorliegt, während die O-Uronium-Form aktiver, aber auch aufwändiger darzustellen ist.^{[125] [126]}

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der verwendeten Peptidkupplungsreagenzien

Kupplungsreagenz	Vorteil	Nachteil
TFFH	geringe Feuchtigkeitsempfindlichkeit geringe Racemisierungstendenz	
CDI	keine Base erforderlich sogar bei Hydrochloriden anwendbar	
DCC		Bildung von N-Acylharnstoff, Racemisierung, Harnstoff nicht wasserlöslich, deshalb nur für Lösungssynthese geeignet
DIC	Harnstoffderivat in DCM löslich, deshalb für Festphasensynthese geeignet	Bildung von N-Acylharnstoff, Racemisierung,
EDC	In Wasser und verd. Säure lösliches Harnstoffderivat. Lösungssynthese	Bildung von N-Acylharnstoff, Racemisierung,
PFP	Aktivester können gelagert werden. können mit DIC in situ verwendet werden. Reagieren schnell, auch ohne Basenzusatz.	
HOBt		Keine Vorfixierung sterisch gehindert Basen
HOAT	Vorfixierung stark sterisch gehinderter Basen	

HODhbt	Kann die Ausbeute einer PFP-Kupplung steigern	
BOP	nur eine Komponente für zwei Aktivierungsschritte nötig.	hochgiftiges Zwischenprodukt
PyBOP	Wie BOP, jedoch ohne hochgiftiges Zwischenprodukt	
TBTU/HBTU	Ähnlich PyBOP einzusetzen, kaum praktische Unterschiede	
HATU	Gute Methode bei stark sterisch gehinderten Basen	

4.2 Synthesestrategie der β – Glycopeptide

In diesem Kapitel soll die Synthesestrategie zur Darstellung von β -Glycopeptiden dargestellt werden. Dabei soll der Syntheseweg und nicht die jeweilige Methode im Vordergrund stehen.

4.2.1 Konzept für ein rigides Oligosaccharidmimetikum

Ziel dieser Arbeit war es, ein Synthesekonzept für Oligosaccharidmimetika zu erarbeiten, die, im Gegensatz zu den bekannten Mimetika von Roy oder Lee, nicht als multivalente, unspezifische Oberfläche mit einer großen Anzahl flexibel angebrachter Zuckerreste für Lectine als Liganden zur Verfügung stehen,^{[127] [128] [129] [130]}, sondern es sollten Mimetika entstehen, die dem Lectin durch ihre relativ starre Struktur eine spezifische, nicht variable Oberfläche zur Anbindung bereitstellen und somit auch nur spezifische Anbindungen erlauben.

Mimetika mit geringer Steifigkeit des Rückgrates oder der Seitenketten haben oft das Problem einer mehr oder weniger willkürlichen oder zumindest schlecht vorhersagbaren Anordnung der Zuckerreste, wodurch eine spezifische Sequenz kaum imitiert werden kann. Auf der anderen Seite können sich solche Strukturen, wie die Dendrimere von Th. Lindhorst auch sehr gut in Bindungstaschen einpassen.^[131]

Um die Zuckerreste ähnlich wie im Oligosaccharid an ihrem jeweiligen Platz zu halten, sollten ausschließlich starre strukturbildende Elemente zum Einsatz kommen.

In unserer Gruppe wurden schon mehrfach Mimetika synthetisiert, die ein Rückgrat aus Asparaginsäure verwenden, wobei die β -Carboxylgruppe zum Aufbau des Rückgrates und die α -Carboxylgruppe zur Anknüpfung des Zuckerrestes über einen Spacer verwendet wurde.^[61]
[62]

Diese Mimetika besitzen bei relativ kurzen Kettenlängen aber keine starre Struktur.

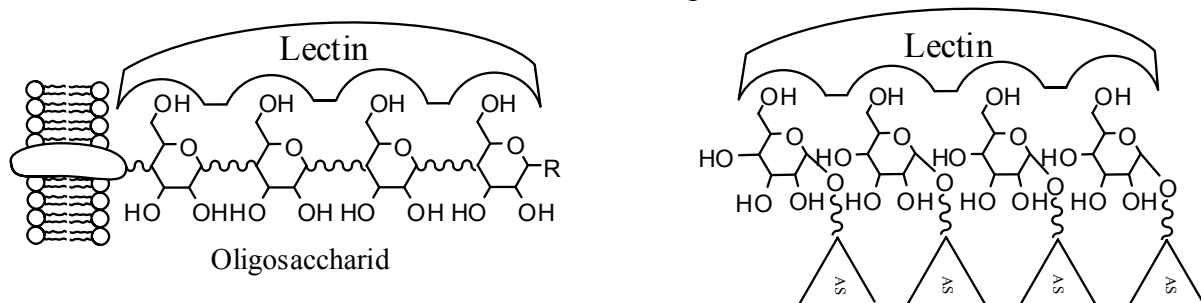


Abbildung 22: Schema einer Lectin-Oligosaccharid-Wechselwirkung auf einer Zellmembran und eines Oligosaccharidmimetikums, das die gleichen Wechselwirkungen eingehen kann.

Um das Rückgrat zu stabilisieren, soll das bestehende β -Peptidkonzept genutzt und ausgebaut werden.

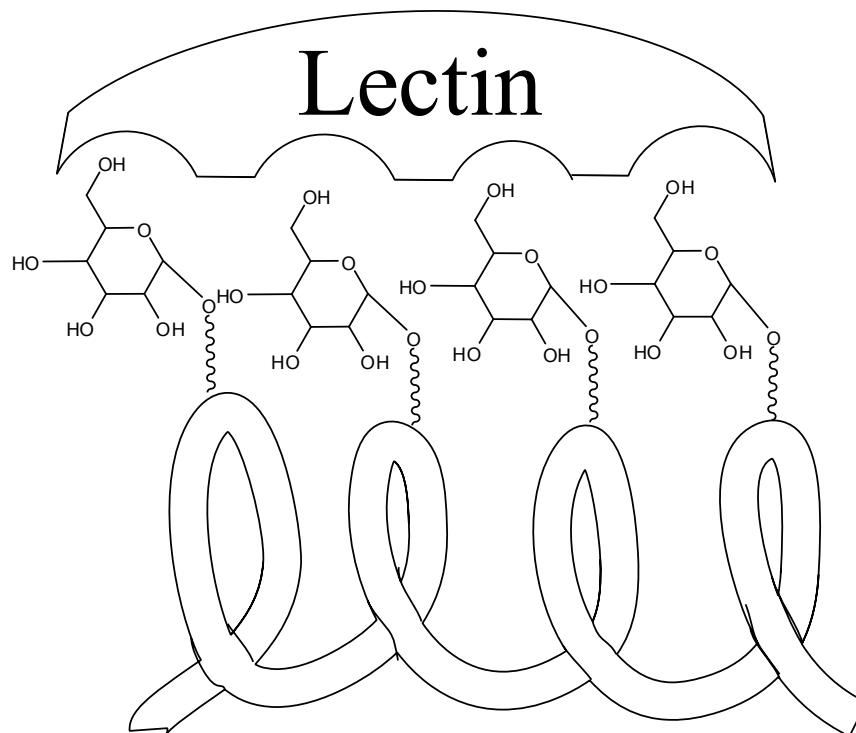


Abbildung 23: Oligosaccharidmimetikum, das eine β -Peptidhelix als Rückgrat nutzt

Dazu soll eine starre β -Peptidhelix verwendet werden. Besonders geeignet erscheint die in 4.4 beschriebene 14-Helix, da hier jede $i+3$. Aminosäure wieder über der i . Aminosäure liegt.

Schon beschrieben ist in diesem Zusammenhang die Verwendung einer in Wasser stabilen 12-Helix mit glycosylierten Seitenketten, die auch zur Bereitstellung nicht-multivalenter Liganden für Lectine synthetisiert wurde.^[132]

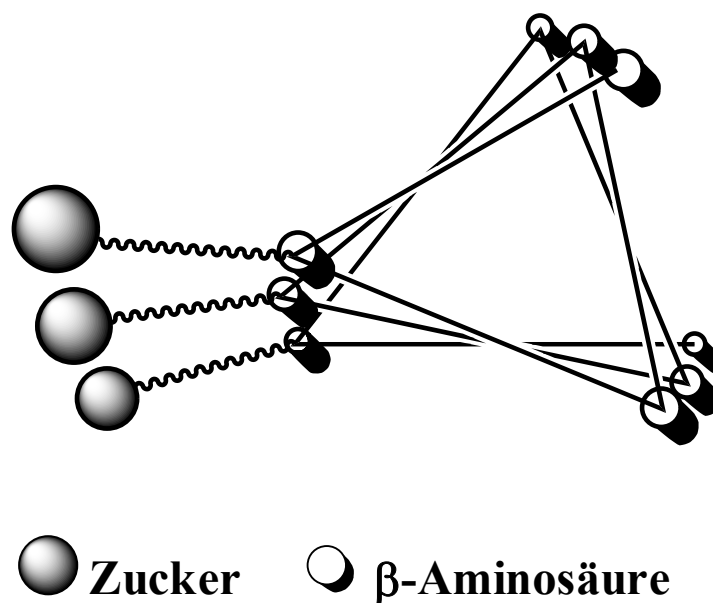


Abbildung 24: 14-Helix mit glycosylierter Seitenkette

Die Wahl des β -Peptidrückgrates erfolgte anhand bekannter NOE- und CD-Daten für β -Peptide mit Seitenkettensubstituenten. Dabei war wichtig, dass durch die Wahl entsprechender Aminosäuren eine 14-Helix zu erwarten war, da die Substituenten rigide in eine Richtung ausgerichtet werden sollten.^[83] Die Literaturergebnisse^[92] deuten darauf hin, dass der Einbau von zwei ACHC pro Turn eine deutliche Stabilisierung der Helixstruktur gegenüber dem Einbau nur einer ACHC bringt. Dabei muss auch daran gedacht werden, dass das synthetisierte Neo-Glycopeptid als Lectin-Ligand dienen soll und deshalb seine Helixstruktur auch in Wasser beibehalten soll.^[79] Da bekannt ist, dass stark in ihrer Konformation eingeschränkte cyclische Aminosäuren auch in Wasser stabile Helixstrukturen annehmen, erschien ein Rückgrat aus möglichst großen Anteilen an ACHC ideal.^{[75][79][133]} Ein weiterer Vorteil der Verwendung von β -Glycopeptiden liegt in der durch ihre geringere Affinität zu Glycosidasen herabgesetzte Hydrolyseempfindlichkeit im Vergleich zu α -Glycopeptiden.^[134]

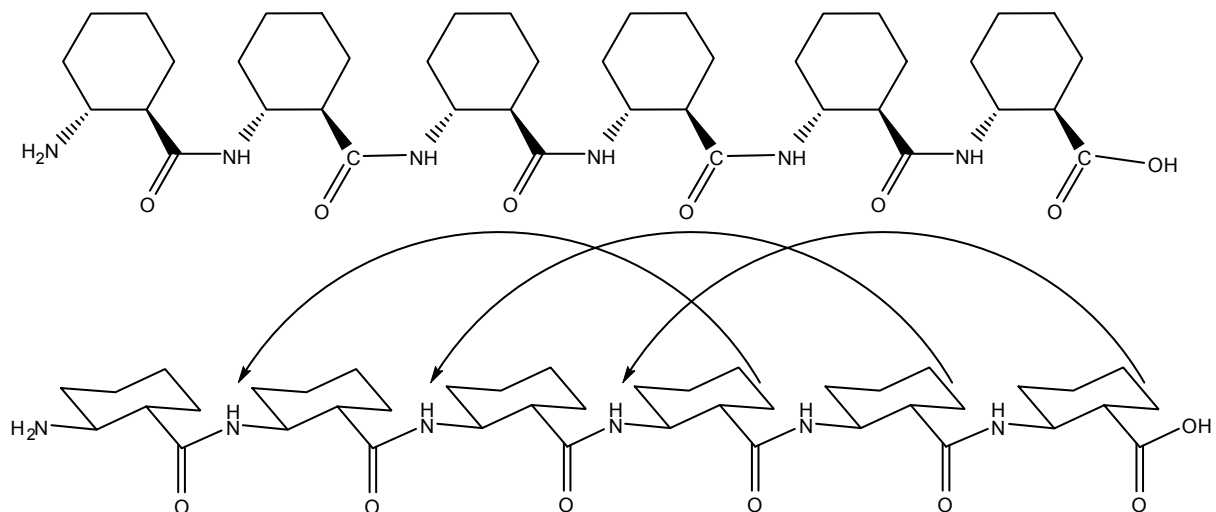


Abbildung 25: ACHC-Hexamer, mit stabilisierenden H-Brücken

Durch eine Sequenz, in der immer ein Asparaginsäure-Glycopeptidbaustein mit zwei ACHC-Bausteinen abwechselt, war zu erwarten, dass man eine durch die Hydroxylgruppen der Zuckerreste wasserlösliche, auch in Wasser stabile, 14-Helix-förmige Struktur erhalten würde. Zusätzlich war zu erwarten, dass sich die Helices immer zu dritt durch hydrophobe Wechselwirkungen zu Säulen aneinanderlagern würden.

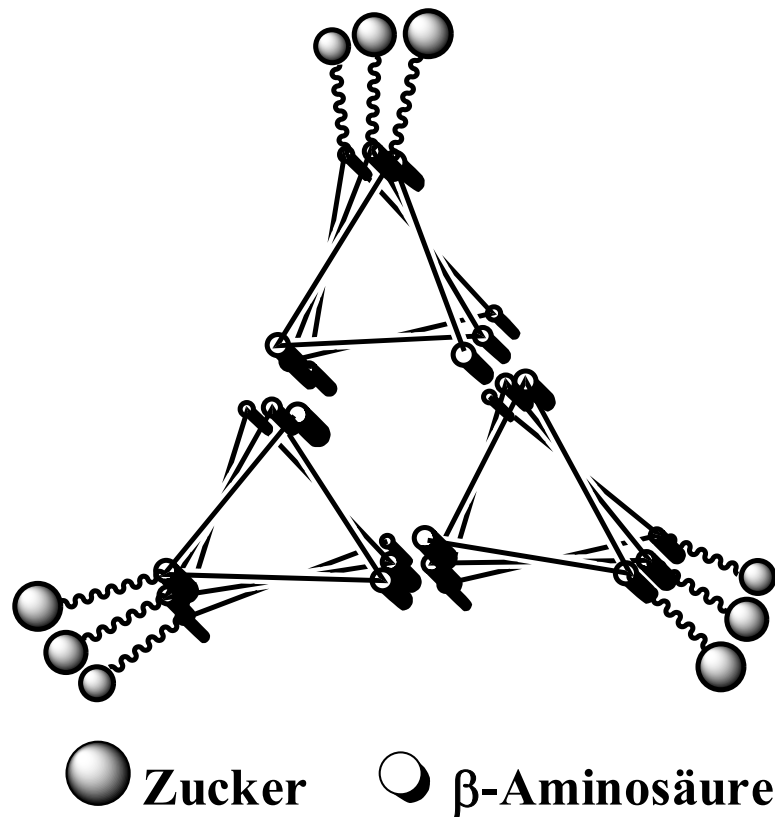


Abbildung 26: Drei amphiphile 14-Helices Lagern sich zu einer Säule zusammen.

Dieses Verhalten ist von β-Peptidhelices mit zwei hydrophoben und einer hydrophilen Seite bekannt ^{[82] [82] [135] [160]}

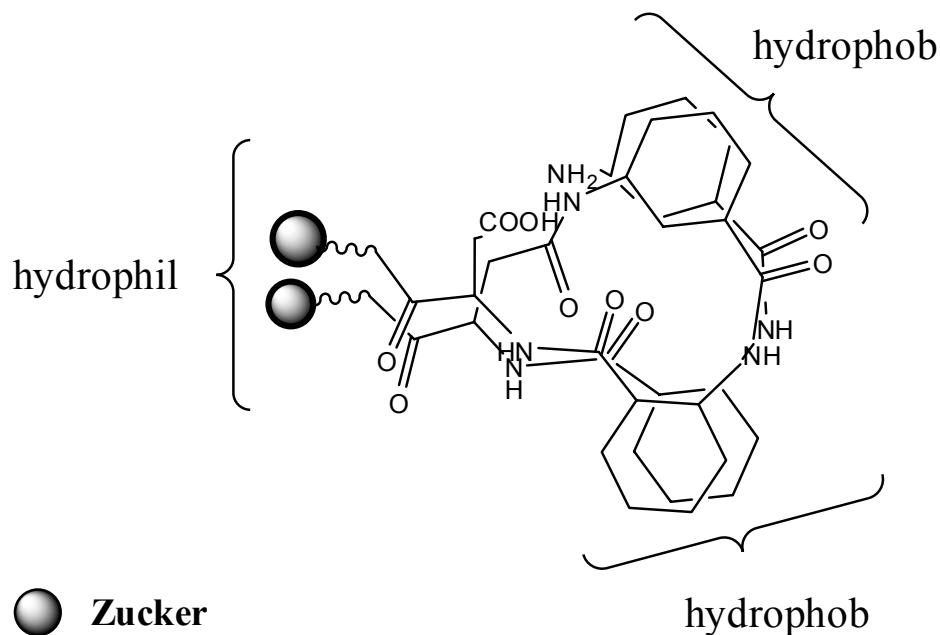


Abbildung 27: Amphiphile 14-Helix aus β-Glycohexapeptid mit 2 ACHC und einer Asp pro Turn.

Um die durch das helixförmige Rückgrat gewonnene Steifigkeit nicht in der Seitenkette völlig zu verlieren, sollte der Zucker auch über relativ steife Strukturkomponenten angebunden

werden. Dabei sollte ein Abstand von fünf bis sechs Kohlenstoffen zum Rückgrat hergestellt werden, was sich für Lectintests als vorteilhaft erwiesen hat, denn durch zu lange Ketten kann es zu einem abknicken des Spacers und dadurch zu unerwünschten Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat kommen, durch Spacer ab mit weniger als vier C- Atomen kann es zu sterischen Hinderungen des Zuckers und somit zu einer Verhinderung der Anbindung an ein Lectin kommen.

Die Verwendung eines aromatischen Spacers schien aus zwei Gründen interessant: Zum einen kann es durch π - π - Wechselwirkungen zu einem Stapel-effekt kommen, der wiederum zusätzlich die Helix stabilisiert^[136] und die Zuckerreste anordnet, zum anderen gibt es in den Lectin-Bindungstaschen Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäuren und Aromaten, was zu einer Vororientierung der Zuckerreste in der Bindungstasche und dadurch zu einer besseren Anbindung führen kann. Allerdings ist es bei rigiden Spacern oft nötig eine Vielzahl möglicher Liganden bereitzustellen, da sie auch das Einpassen in eine Bindungstasche verhindern können.^[193]

Die Entscheidung fiel zugunsten benzylicher Spacer, die gegenüber phenylischen Spacern den Vorteil deutlich höherer Nucleophilität sowohl am O- als auch am N-Terminus haben. Da die Zucker als O-Glycoside angebunden werden sollten und der Spacer als Amid mit der Asparaginsäure verbunden sein sollte, ergab sich 4-Aminomethylbenzylalkohol als Spacermolekül.

Damit ergab sich folgende Beispielstruktur für ein β -Glycohexapeptid mit glycosylierter aromatischer Seitenkette:

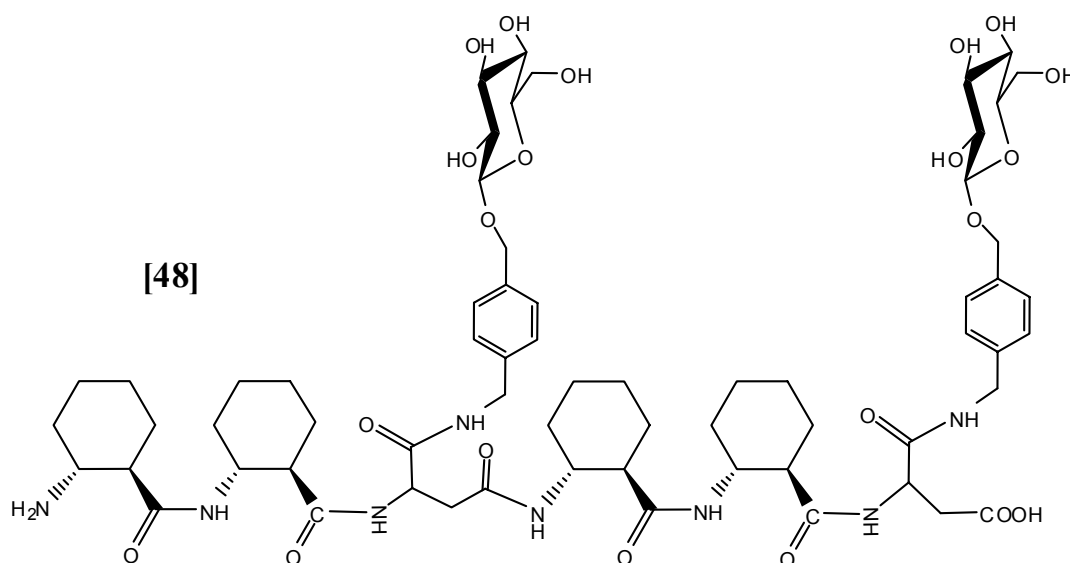


Abbildung 28: β -Hexapeptid mit glycosylierter aromatischer Seitenkette.

Bei der Synthese sollte eine möglichst große Konvergenz bei maximaler Flexibilität der Sequenz erreicht werden, d.h. es sollte aus variabel einsetzbaren Ausgangsverbindungen mit möglichst wenigen Arbeitsschritten jede gewünschte Zuckersequenz herstellbar sein.

In literaturbekannten β -Peptidsynthesen in Lösung ist es üblich, kurze Oligomere zu synthetisieren und durch aufeinander folgende Dimerisierungen diese dann zu größeren Strukturen zusammenzusetzen. ^{[160] [92]}

Da bei der angestrebten Substanzklasse jeder „Buchstabe“ bzw. Zuckerbaustein zunächst einmal drei Aminosäuren bzw. einen Turn lang ist, sollten diese Einheiten die Bausteine sein, aus denen durch entsprechende Oligomerisierungen jede gewünschte Zuckersequenz erhältlich sein sollte.

Als Schutzgruppenstrategie kam nur die Fmoc- tBu- Strategie in Frage, da eine Bn- Boc- Strategie Hydrierungen der synthetisierten Peptide erforderlich gemacht hätten, wodurch aber die benzylicchen Spacer mit abgespalten worden wären. Außerdem ist die Fmoc-Strategie die einzige wirklich etablierte Schutzgruppenstrategie für eine mögliche Festphasensynthese.

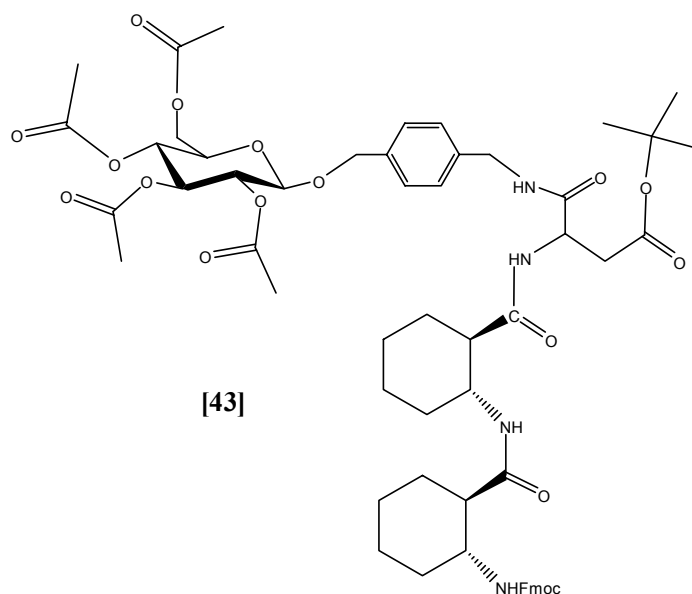


Abbildung 29: Beispiel für einen Tripeptidbaustein mit glycosylierter Seitenkette.

Dieser Baustein **43**, **44**, **45** wiederum sollte durch Peptidkupplung zwischen einem Fmoc-geschützten AHC-Dimer **42** und einem Asparaginsäure- Zuckerbaustein **24**, **25**, **26** aufzubauen sein.

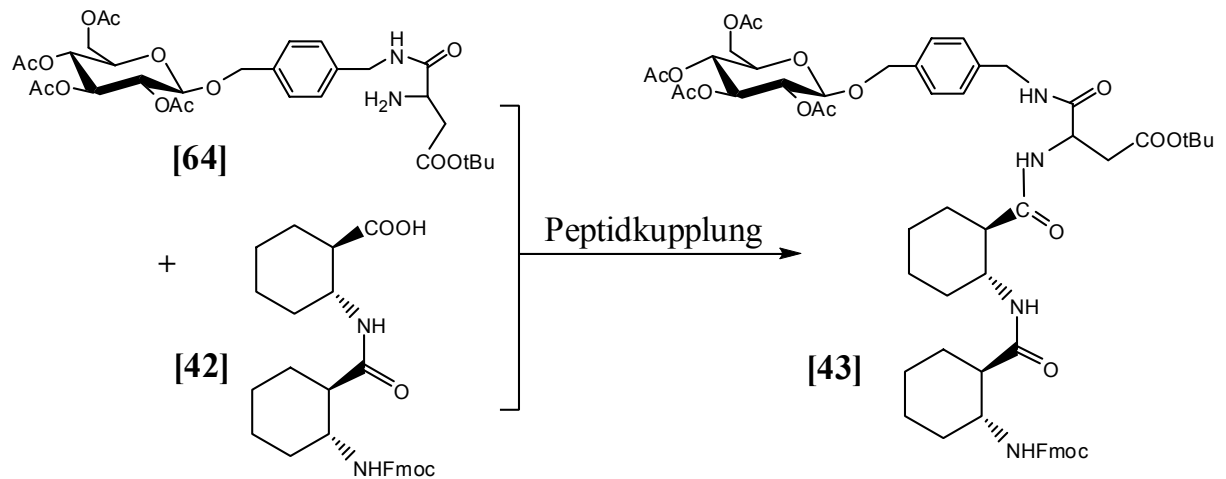


Abbildung 30: Aufbau eines Tripeptidbausteins aus ACHC- Dimer und Asparaginsäurebaustein.

Das benötigte Dipeptid **42** sollte durch Kopplung zweier ACHC-Monomere dargestellt werden.

Die Syntheseroute für den Asparaginsäurebaustein war mehr oder weniger klar, da die Vorversuche dazu schon in meiner Zulassungsarbeit gemacht wurden.^[137]

Es sollte zunächst der Spacer glycosyliert werden, um nach entsprechenden Ent- und, falls nötig, Umschutzschritten den Spacer durch eine Peptidbindung an die α - Carboxylgruppe der Asparaginsäure zu binden.

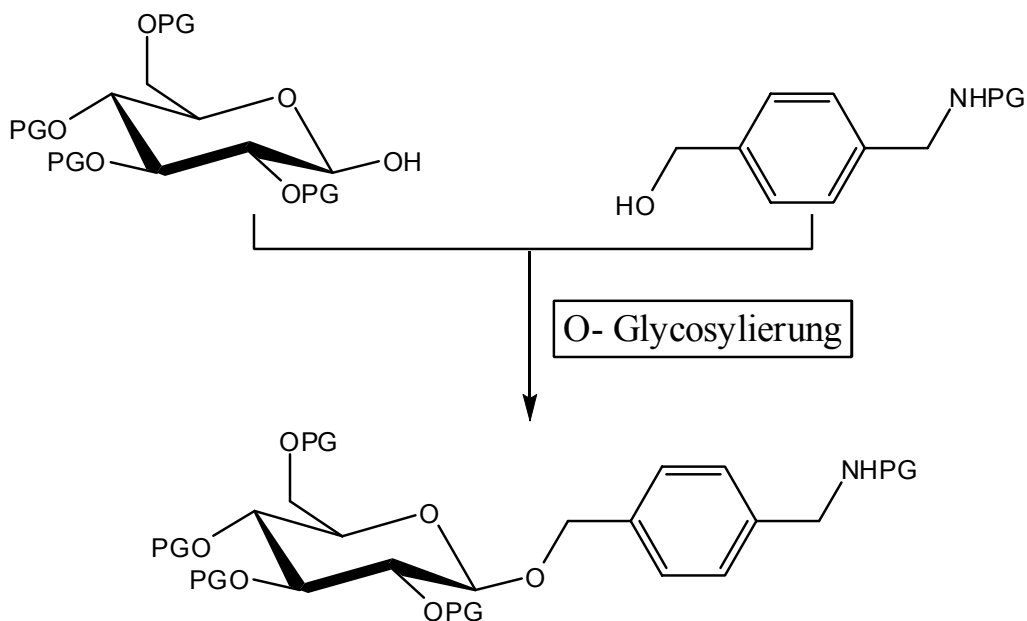


Abbildung 31: Glycosylierungsschritt der Asparaginsäurebaustein- Synthese.

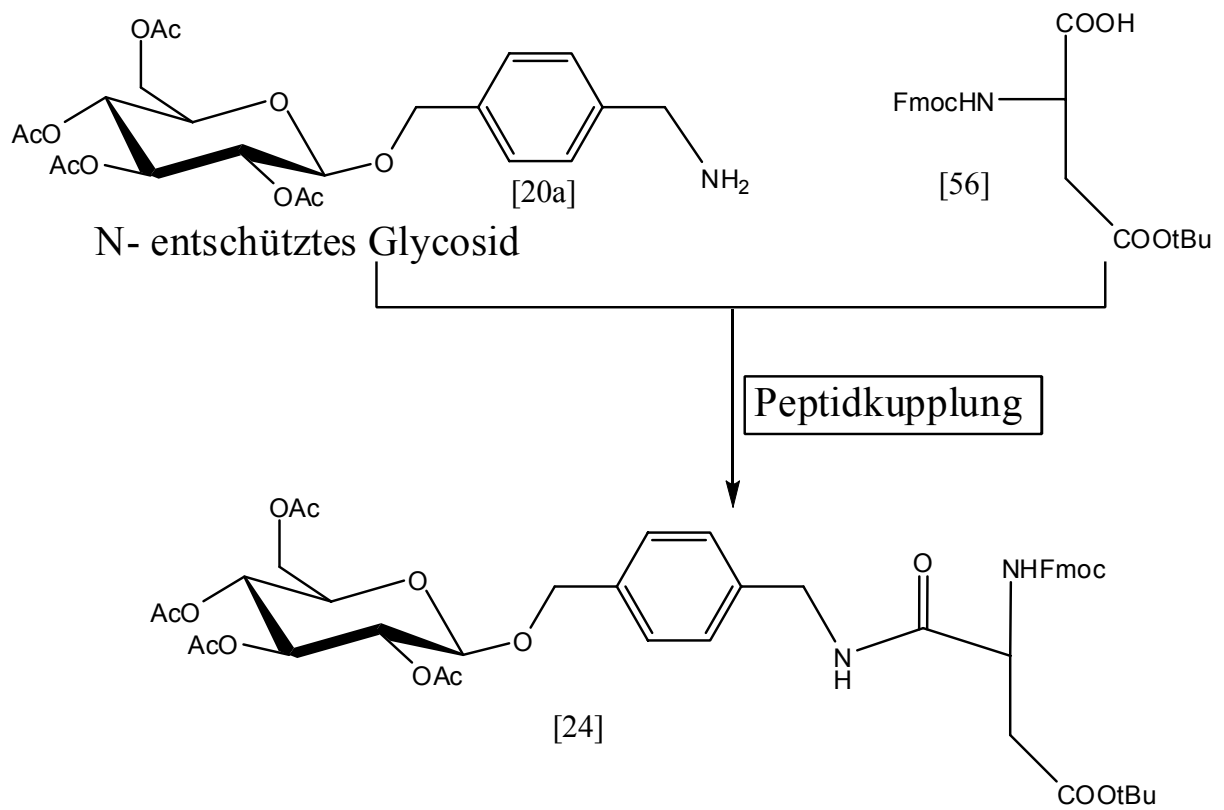


Abbildung 32: Kupplung zwischen Glycosid und Asparaginsäure.

4.3 Synthese der β -Glycopeptide

4.3.1 Aufbau von Neo – Glycopeptidbausteinen

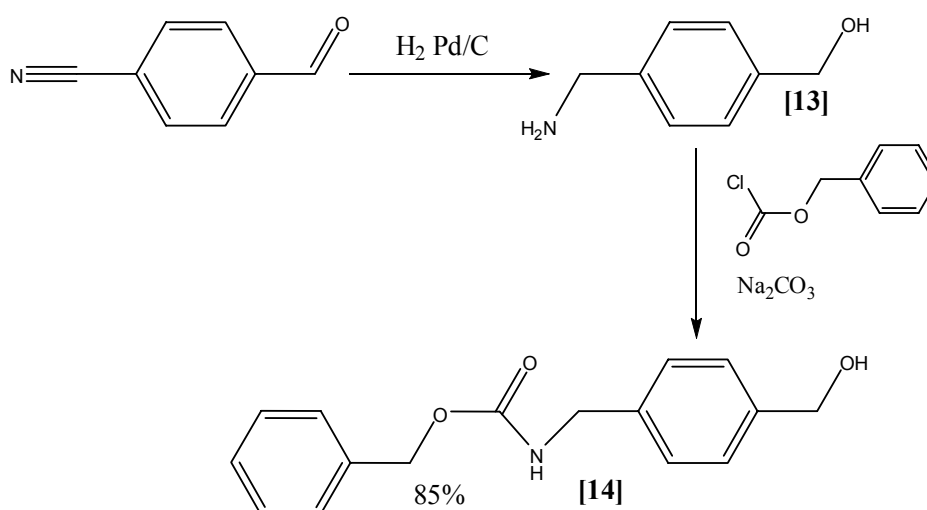
Es sollten Bausteine synthetisiert werden, in denen acetyl- bzw. benzoyl-geschützte Derivate von Glucose, Galactose, Mannose, Rhamnose und N-Acetylglucosamin als Glycosyldonoren verwendet werden und über die O-Benzylfunktion an den Spacer **14** als Glycosylakzeptor gebunden werden. In der Literatur findet man für Glucose, Galactose, Mannose und Rhamnose eine Vielzahl unterschiedlicher Aktivierungsmethoden. [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144] [145]

Bei N-Acetylglucosamin müssen wegen der Bildung des Oxazolins andere Glycosylierungsbedingungen, z.B. mit CuCl_2 gewählt werden. Deshalb wird in diesem Kapitel die Glycosylierung mit N-Acetylglucosamin extra behandelt. [157] [158] [159]

4.3.2 Darstellung des Spacermoleküls

Das Spacermolekül *p*-Hydroxymethylbenzylamin wird laut Literatur [146] durch Reduktion von *p*-Cyanobenzaldehyd mit LiAlH_4 und Isolierung durch Extraktion mittels eines Perforators dargestellt. Das Verfahren ist relativ aufwendig und liefert nur mittleren Ausbeuten (39%).

Besser und deutlich einfacher ist die Darstellung durch Hydrierung mit Pd/C als Katalysator in MeOH. Das Amin wird ohne Aufarbeitung direkt mit Benzoyloxycarbonylchlorid (Z-Chlorid) geschützt. [147] Die Ausbeuten über beide Stufen sind deutlich besser (85%).



Schema 1: Darstellung des Spacermoleküls durch Hydrierung mit anschließender Z-Schätzung.

4.3.3 Darstellung der Glucose, Galactose, Mannose und Rhamnose-Bausteine

Die Auswahl der Glycosylierungsmethode war schon durch die Vorversuche zur Glycosylierung mit benzyllischen Spacermolekülen während der Zulassungsarbeit abgeschlossen.^[137]

Dort war versucht worden, acetylgeschützte Glucose-, Mannose- und Galactosederivate mittels der BF_3 -Etherat-Methode, der Königs-Knorr-Methode mit Silbercarbonat und der Variante nach Helferich mit Quecksilbercyanid und Quecksilberbromid zu glycosylieren.^[148]^[149] ^[150] Außerdem war versucht worden, benzoylgeschützte Glucosederivate als Donoren nach der Trichloracetimidatmethode umzusetzen.

Die Helferich-Methode (42-76%) und die Trichloracetimidatmethode (84%) waren die einzigen erfolgreichen Methoden, die restlichen Methoden ergaben keinen Umsatz.

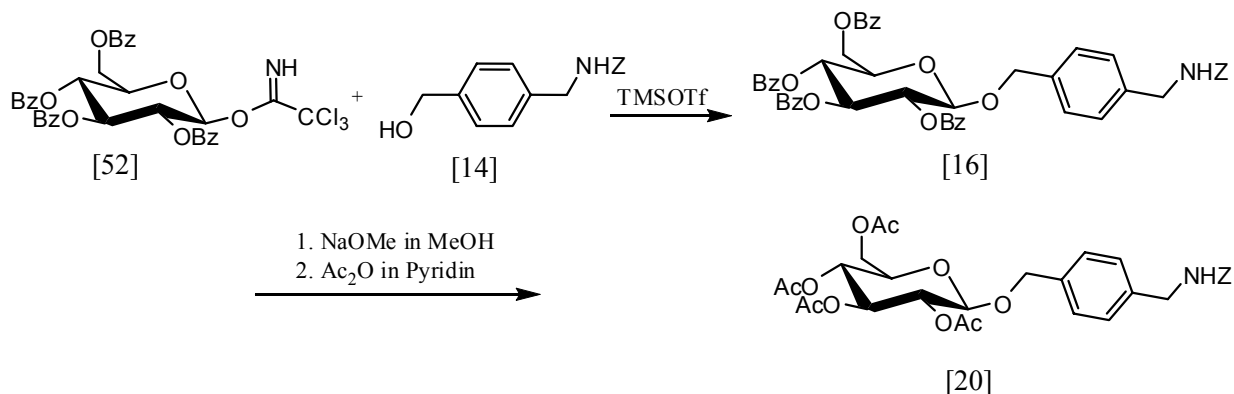
Die Helferichmethode war deutlich einfacher durchzuführen, da sie mit der sehr einfach zugänglichen 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-bromglucose bzw. den entsprechenden Mannose- und Galactosederivaten durchgeführt werden konnte, erbrachte aber nur mäßige bis gute Ausbeuten (42-76%), während die Trichloracetimidatmethode zwar mit der über drei Stufen mit anschließender chromatographischer Reinigung zugänglichen 2,3,4,6-Tetra-O-benzoylglucose und deren Mannose-, Galactose- und Rhamnosederivaten durchgeführt wurde, dafür aber exzellente Umsätze (68-76% über zwei Stufen) erzielt.

Da für die Trichloracetimidatmethode 1-OH-freie Benzoylderivate der verwendeten Zucker benötigt wurden, mussten diese durch Perbenzoylieren, Bromieren mit HBr in Eisessig und Hydrolyse zunächst einmal nach literaturbekannten Vorschriften dargestellt werden.^[151] Die Benzoylschutzgruppen sind dabei unbedingt notwendig, wie Vorversuche gezeigt haben, da bei direkter Verwendung von Acetylschutzgruppen während der Glycosylierungsreaktion nach kürzester Zeit Zersetzung stattfindet und kein Produkt mehr isolierbar ist.^[152]

Aus den 1-OH-freien Derivaten wurde mittels Umsetzung mit DBU und Trichloracetonitril die Trichloracetimide **52**, **53**, **54**, **55** dargestellt.^[153] ^[154] ^[155] Diese wurden mit dem Aglycon **14** bei -20°C unter saurer Katalyse mit TMSOTf umgesetzt, was mit ausgezeichneten Ausbeuten gelang (s.u.).

Die benzoylgeschützten Glycoside **16**, **17**, **18**, **19** wurden über Kieselgel filtriert und ohne weitere Aufreinigung direkt unter Zemplén-Bedingungen entschützt.^[156] Das Rohprodukt

wurde in Pyridin und AcOAc acetyliert und Säulenchromatographisch in hervorragenden Ausbeuten (68-76% inklusive Zemplén-Entschützung und Acetyl-Schutzung) isoliert **20**, **21**, **22**, **23**.



Schema 2: Glycosylierung nach der Trichloracetimidatmethode, Zemplén-Entschützung und Einführung der Acetylschutzgruppen.

Tabelle 2: Ausbeuten der Glycosylierungsschritte mittels der Trichloracetimidatmethode und der nachfolgenden Umschüttung.

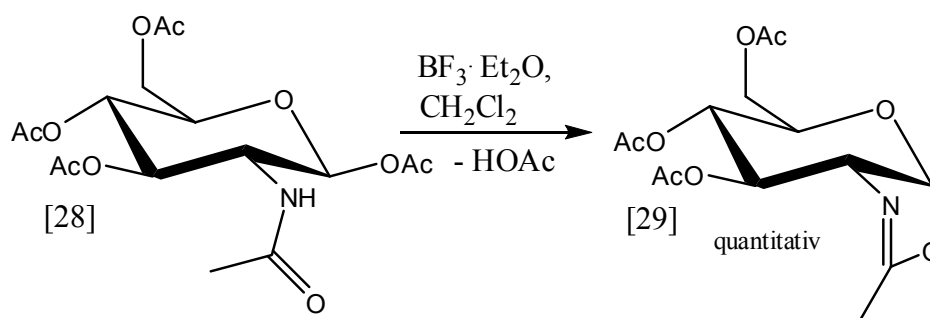
Edukt	Produkt	Ausbeute
 52	 20	68%
 54	 21	69%
 53	 22	76%

4.3.4 Darstellung der N-Acetylglucosamin-Glycoside

2-Acetamidoglycoside sind in der Natur sehr weit verbreitet. Deshalb war es interessant, auch einen entsprechenden Baustein zu synthetisieren.

Die Glycosylierungsmethoden unterscheiden sich signifikant von den Methoden zur Darstellung anderer Glycoside. Das liegt daran, dass die Acetamidogruppe bei der Verwendung von geschütztem N-Acetylglucosamin als Glycosyldonor eine starke Tendenz zur Bildung eines Oxazolins hat. Dieses kann allerdings wiederum als Glycosyldonor verwendet werden und von einem Nucleophil angegriffen werden. Dadurch entstehen ausschließlich 1,2-trans- Derivate.

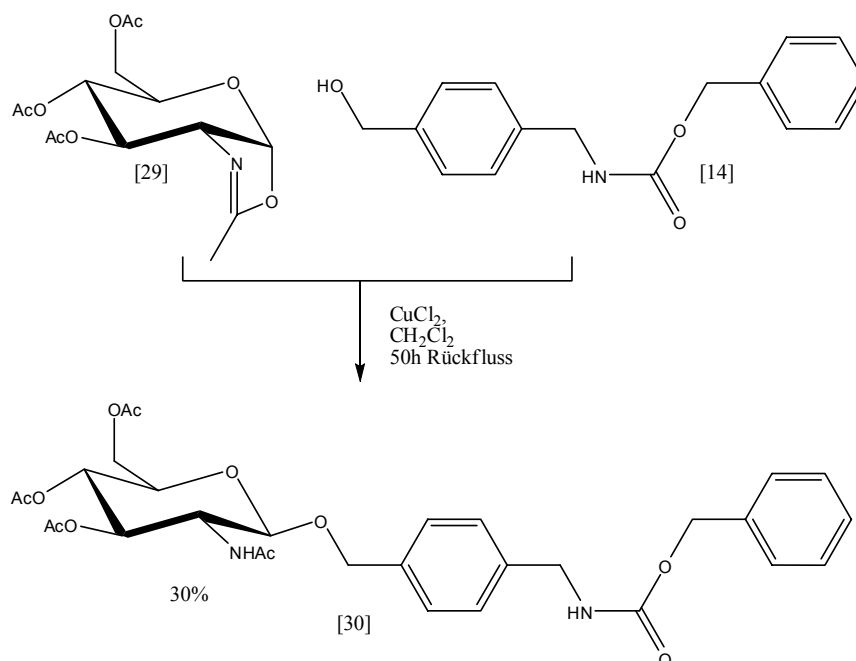
Die Darstellung des Oxazolins **29** kann entweder mit Lewissäuren wie TMSOTf oder BF_3 aus dem peracetylierten Derivat oder mit Schwermetallsalzen aus den Halogeniden erfolgen.^[157]
^[158] In unserem Fall wurde das deutlich billigere Verfahren mit BF_3 verwendet, das mit quantitativen Ausbeuten zum Oxazolin **28** führte.



Schema 3: Bildung des Oxazolins

Die Glycosylierungsreaktion mit N-Acetylglucosaminderivaten als Glycosyldonor erfordert drastische Reaktionsbedingungen wie die Aktivierung mit Lewis- oder Brønstedt- Säuren am Rückfluss.

In unserem Fall wurde CuCl_2 verwendet und 50 h lang in Toluol am Rückfluss erhitzt, wobei nur mäßige Ausbeuten (30%) des gewünschten Produkts **30** entstanden.^[159]



Schema 4: Glycosylierung von GlcNAc mit CuCl_2 .

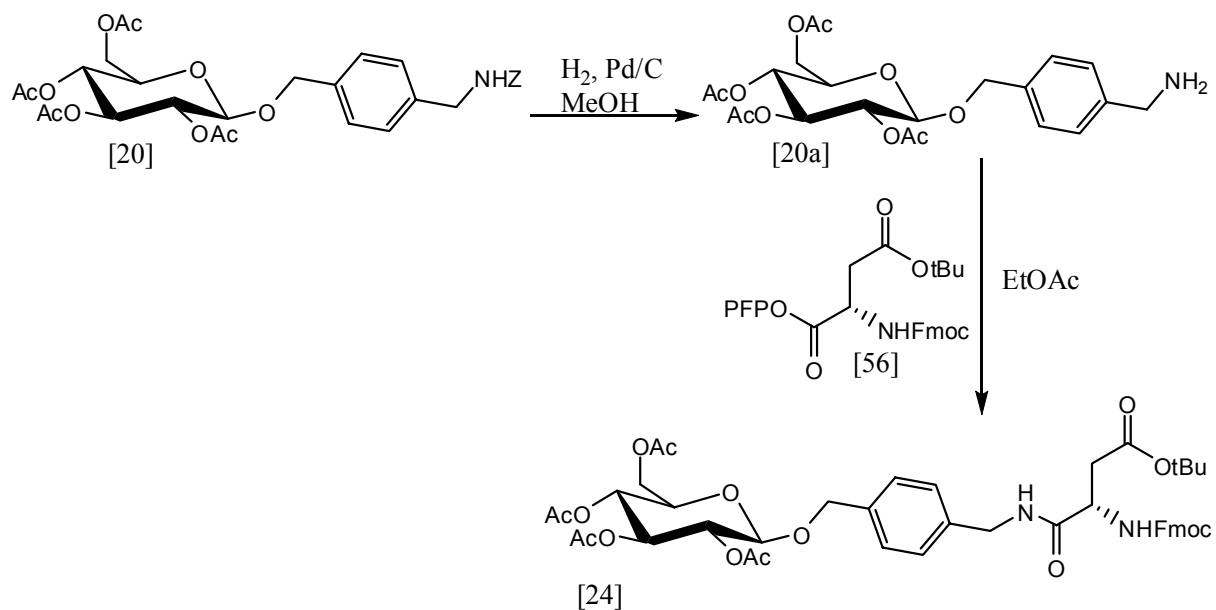
4.3.5 Einführung der Asparaginsäure in die Glycosidbausteine

Die Z- geschützten Glycoside **20**, **21**, **22**, **23**, **30** wurden durch Hydrierung mit Pd/C entschützt. Das Problem war, dass die Z-Schutzgruppe nicht vollständig orthogonal zu Benzyl-Glycosiden ist. Bei der Hydrierung wurden alle Benzylgruppen reduziert, wobei jedoch die Oxycarbonylfunktion der Z-Schutzgruppe zuerst reduziert wird. Die Reduktion unter Zusatz mehrerer Äquivalente Ammoniumformiat als Reduktionsmittel bringt keine größere Selektivität als die Hydrierung mit H_2 .

Nachdem klar war, dass die Selektivität nur durch rechtzeitigen Reaktionsabbruch zu erreichen war, wurde die Reaktion für das Glucose- Glycosid **20** optimiert, indem die Reaktionszeit der Hydrierung auf zwei Minuten begrenzt wurde. Die Reaktion wurde abgebrochen und der Reaktionsfortschritt durch DC überprüft. Dieses Vorgehen ist wichtig, da die Aktivität des Katalysators je nach Charge und Alter sehr unterschiedlich sein kann.

Die Darstellung der α -PFP- aktivierten, β -tBu und Fmoc geschützten Asparaginsäure **56** fand nach der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode ^[61] mit DCC und Pentafluorphenol statt.

Die Umsetzung mit PFP- aktivierter Asparaginsäure **56** läuft mit teilweise sehr guten Ausbeuten (42-85% inklusive der Z- Entschützung) ab.



Schema 5: Umsetzung des Glucosids **20** mit PFP- aktivierter Asparaginsäure **56**.

Tabelle 3: Ausbeuten der Z-Entschützung und der nachfolgenden Kupplung mit Asparaginsäure

Edukt	Produkt	Ausbeute
 20	 24	85%
 22	 26	42%
 21	 25	53%
 55	 27	12% über drei Stufen
 30	 31	55%

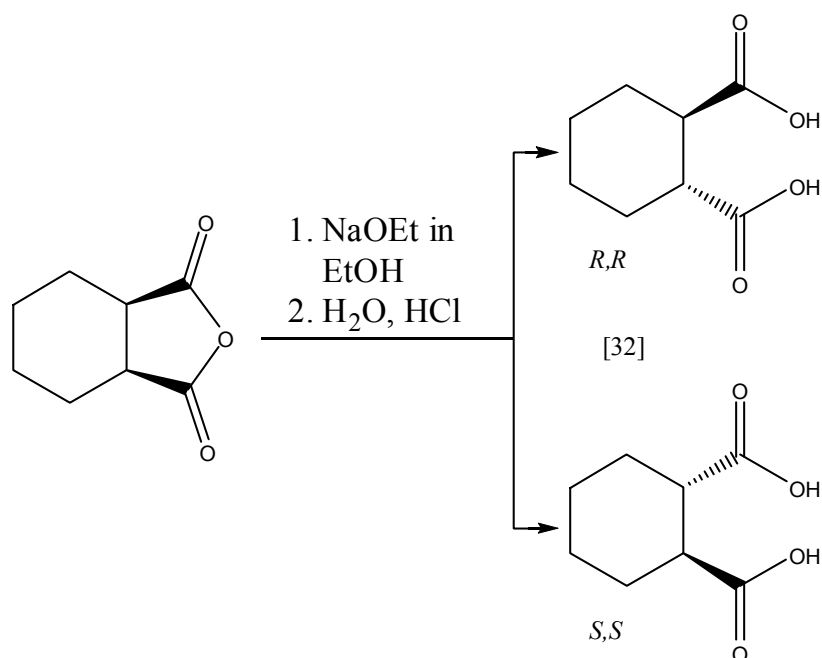
4.4 Aufbau von Neo- β -Glycotripeptidbausteinen

Für den Aufbau der Tripeptidbausteine **43**, **44**, **45** sollte zunächst ein Dimer aus ACHC **36** synthetisiert werden. Dazu musste zunächst einmal die Aminosäure synthetisiert werden.

Da die Tripeptidbausteine Fmoc-geschützt vorliegen mussten, wurde zunächst versucht, die ACHC-Dimere in Lösung mittels einer Fmoc- tBu- Strategie darzustellen. Da die Einführung der Schutzgruppen als auch die Kupplungsreaktion nicht zufrieden stellend abliefen und außerdem der synthetische Aufwand sehr hoch war, wurde nach einem Alternativweg gesucht. Als weitere Möglichkeit gab es die Synthese mit Boc- Benzyl- Strategie, durch die in sehr guter Ausbeute und mit mäßigem synthetischen Aufwand ein ACHC- Dimer **40** synthetisiert werden kann^[160], das dann auf Fmoc umgeschützt werden muss **42**. Diese Vorgehensweise erwies sich als praktikabel.

4.4.1 Synthese der β -*trans*-Aminocyclohexancarbonsäure [36]

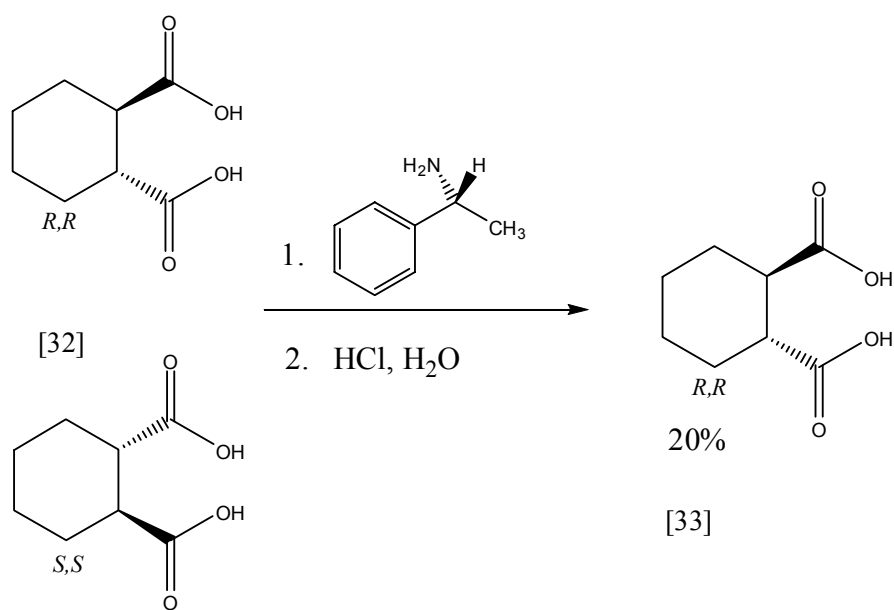
Zunächst wird durch basenkatalysierte *cis*- *trans*- Isomerisierung mit anschließender Hydrolyse *cis*-Hexahydrophthalsäureanhydrid in *trans*-Hexahydrophthalsäure **32** umgewandelt. Dabei entsteht ein Racemat aus *RR*- und *SS*- Enantiomeren.^[161]



Schema 6: *cis*- *trans*- Isomerisierung und Hydrolyse von *cis*-Hexahydrophthalsäureanhydrid.

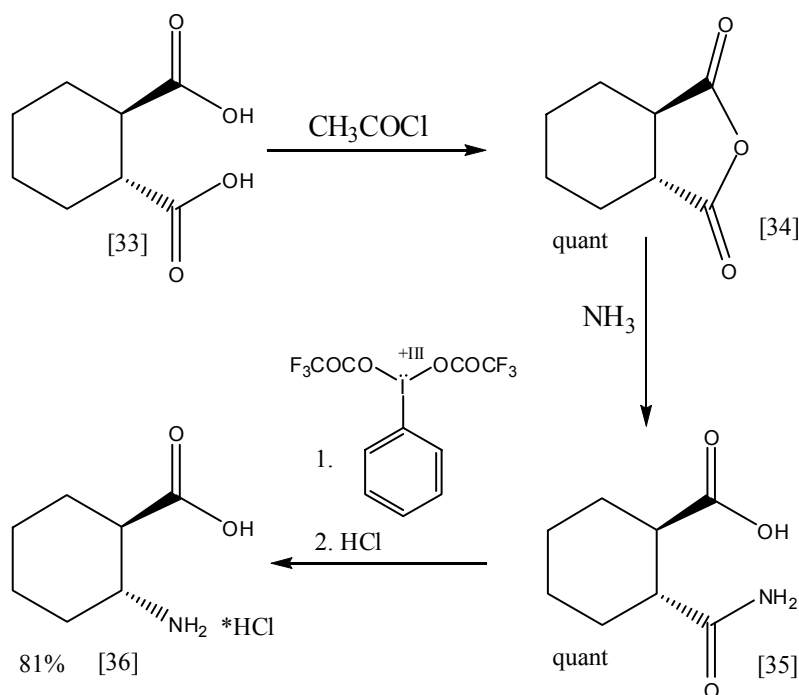
Dieses Racemat wird durch fraktionierte Kristallisation des Salzes aus (1*R*,2*R*)-Hexahydrophthalsäure und (*R*)-1-Phenylethylamin gespalten.^[164]

Die Abtrennung der Fraktionen muss in kleinen Schritten erfolgen, da nacheinander ausfallende Fraktionen nicht unbedingt zuerst das eine und dann das andere Produkt liefern müssen, sondern auch der Fall eintreten kann, dass zuerst die (*R,R*)-Form ausfällt **33**, dann mehr oder weniger racemisches Produkt, dann vermehrt (*S,S*)- Form und danach nochmals vermehrt (*R,R*)- Form, liegt die Vermutung nahe, dass hier außer thermodynamischen auch kinetische Gründe eine entscheidende Rolle für die Kristallisation spielen. ^[162]



Schema 7: Racematspaltung mit (*R*)-1-Phenylethylamin. ^[164]

Die enantiomerenreine (*R,R*)-Hexahydrophthalsäure **33** wird durch Erhitzen mit Acetylchlorid als Lösungsmittel am Rückfluß in ihr Anhydrid **34** überführt ^[161], das nach Einengen und Umkristallisation in CH₂Cl₂ gelöst wird und mit gasförmig eingeleitetem Ammoniak quantitativ zum Monoamid **35** reagiert, das als weißer Feststoff ausfällt und abgesaugt wird. ^[163] Das Monoamid wird in Acetonitril/Wasser 1:1 gelöst und mit Phenyliod(III)bis(trifluoacetat) (PIFA) einem Hofmann-Abbau unterzogen. Nachdem angesäuert wurde, wird überflüssigem PIFA und Iodbenzol ausgeethert und die wässrige Phase wird einrotiert, wobei das AHC **36** als Hydrochlorid in farblosen Kristallen ausfällt. ^[164] Das Hydrochlorid ist gut lagerbar.



Schema 8: Syntheseweg von der β -Dicarbonsäure zur β -Aminosäure.^[164]

4.4.2 Aufbau der Fmoc-(ACHC)₂- Dipeptide

Der Aufbau der Dipeptide sollte nach der Fmoc- *t*Bu- Strategie erfolgen, da diese auch für die Verwendung in Festphasensynthesen geeignet ist und außerdem zu den Zuckerbausteinen **24**, **25**, **26**, **27**, **31** orthogonal ist.

Zunächst einmal sollte daher versucht werden, die Fmoc-^[208] und *t*Bu- geschützten ACHC-Derivate **62**, **63** darzustellen.

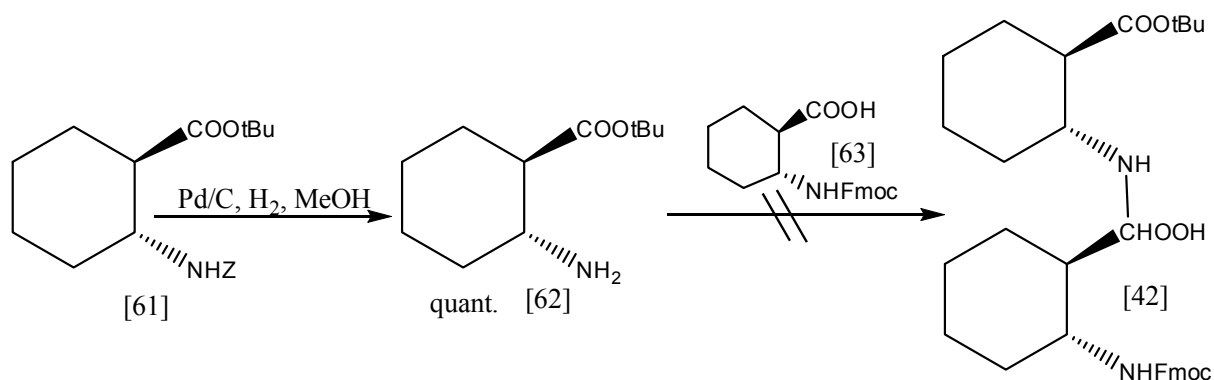
Deutlich größere Probleme machte das *t*Bu- geschützte Derivat **62**, das in der Literatur nicht beschrieben ist.

Zur Darstellung *tert*-Butyl geschützter ACHC wurde diese zunächst am Aminoterminus *Z*-geschützt **60** und mit diesem Derivat, dem Fmoc- Derivat sowie dem Hydrochlorid wurden verschiedene Möglichkeiten zur Darstellung von *tert*-Butylethern getestet, wobei ausschließlich das Verfahren mit *Z*-Schutzgruppe und POCl_3 das Produkt **61** lieferte.

Tabelle 4: Versuche zur Darstellung von *tert*-Butylethern

Edukt	Verfahren	Ausbeute
Z-ACHC [60], Fmoc-ACHC [63]	Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat, DMAP	-
Z-ACHC [60], Fmoc-ACHC [63]	<i>t</i> Bu-Trichloracetimidat, BF ₃ ·Et ₂ O Mikrowelle	-
Fmoc-ACHC [63]	<i>tert</i> -Butanol H ₂ SO ₄ , <i>iso</i> -Butylen Mikrowelle	-
ACHC·HCl [36]	<i>tert</i> -Butanol H ₂ SO ₄ , <i>iso</i> -Butylen Mikrowelle	-
Z-ACHC [60]	Pyridin, <i>tert</i> -Butanol, POCl ₃	67%

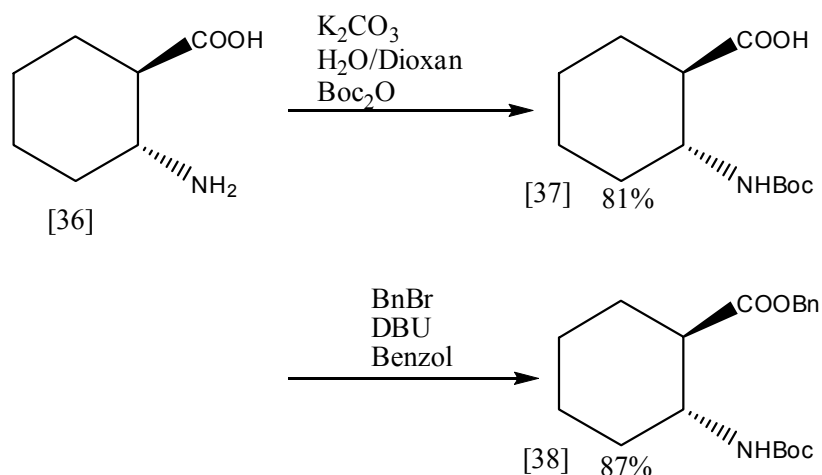
Fmoc- **63** / Z- **60** und *t*Bu- **62** geschützte Derivate konnten weder mit TBTU/HOBt/DIEA, noch mit EDC/DMAP oder TFFH/DIEA gekuppelt werden, so dass nach Alternativen gesucht werden musste.



Schema 9: Zunächst geplante Dipeptidsynthese.

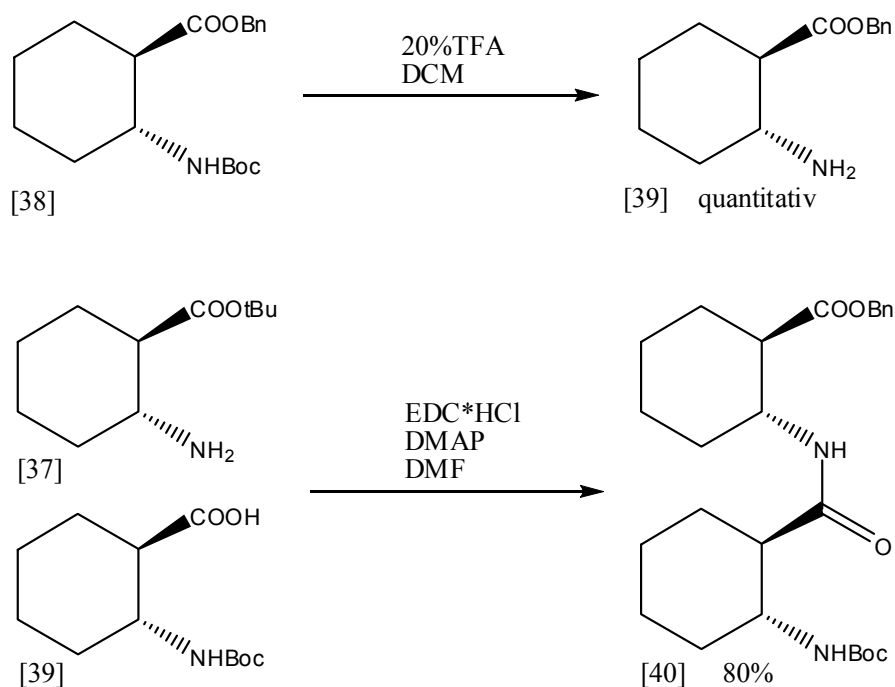
Dabei bot sich die bekannte Peptidsynthese mit Boc bzw. Bn- geschützter ACHC **37**, **39** in Lösung an^[160], gefolgt von einer Umschützung auf Fmoc **42**.

Dazu wurde zunächst ACHC mit Boc (81%) und anschließend mit Benzyl geschützt (87%) **38**. Dies gelingt mit hervorragenden Ausbeuten und ist durch die Einfache Aufreinigung durch Umkristallisation aus Hexan im Gramm-Maßstab sehr ökonomisch. Die Boc-geschützte Produkt **37**, **38** fallen sehr sauber als farblose Kristallnadeln an.



Schema 10: Schützung der ACHC mit Boc- und Benzyl-Schutzgruppen

Die nachfolgende Boc- Entschützung läuft quantitativ ab, überschüssige TFA und *tert*-Butanol werden vollständig mit Toluol coevaporiert und Boc- und Bn- geschützte ACHC werden in hervorragender Ausbeute (80%) mit EDC und DBU in DMF umgesetzt. Nach wässriger Aufarbeitung lässt sich das Produkt aus Hexan umkristallisieren und fällt wiederum in Kristallnadeln an.



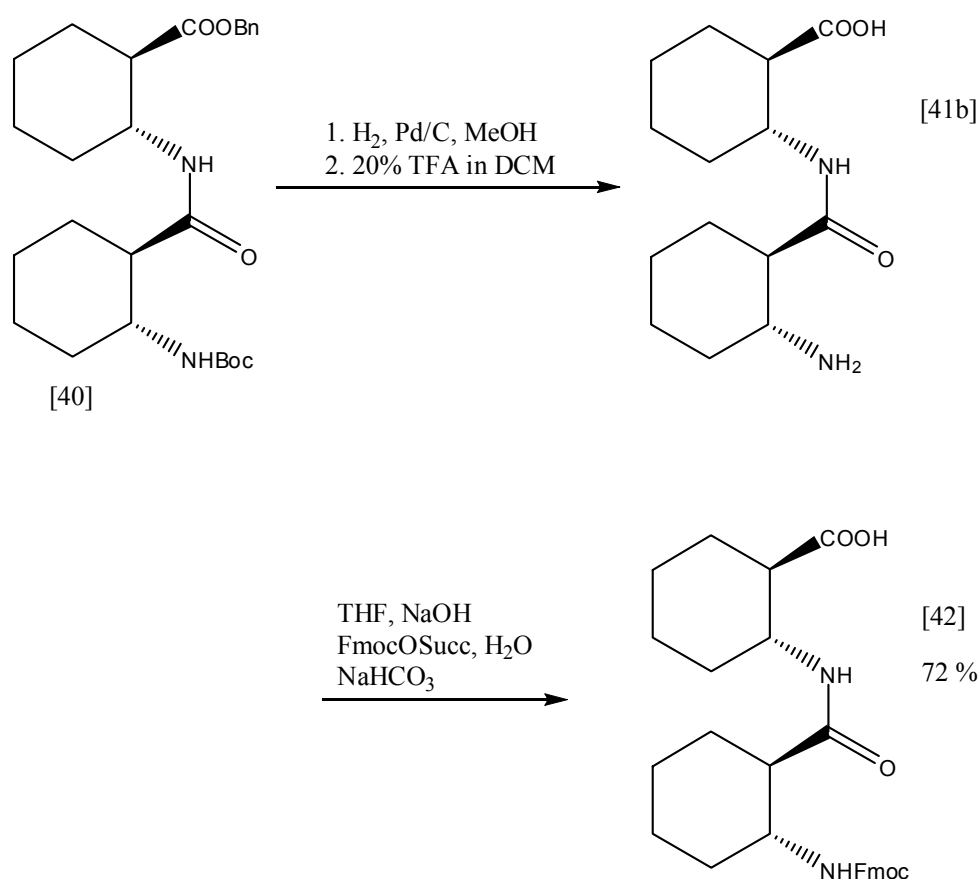
Schema 11: Darstellung des ACHC- Dimers.

Da das Dipeptid **40** so nicht für die Kupplung an den Asparaginsäure- Baustein **24**, **25**, **26**, **27**, **31** zu gebrauchen ist, da die Schutzgruppen nicht orthogonal zueinander und zum benzylichen Linkersystem sind, wird zunächst komplett entschützt, indem **40** über Nacht in Methanol Hydriert und so die benzyl- Schutzgruppe abgespalten wird. Nachdem das benzyl entschützte Dipeptid **41a** im Vakuum eingengt ist, wird es ohne weitere Aufarbeitung in 20%TFA in CH₂Cl₂ gelöst und für eine Stunde bei RT gerührt. Das Produkt **41** wird eingengt und mit Toluol coevaporiert.

Das freie Dipeptid **41** wird dann ohne weitere Aufarbeitung in Aceton/Wasser gelöst und im stark alkalischen mit FmocOSucc geschützt.

Dieser Schritt ist problematisch. Speziell die geringe Löslichkeit in für die Chromatographie geeigneten Lösungsmitteln und die schlechte Abtrennbarkeit durch Kristallisationsschritte von überschüssigem Fmoc- Edukt machen Probleme.

So muss im Normalfall im präparativen Maßstab mindestens zwei Mal chromatographiert werden.



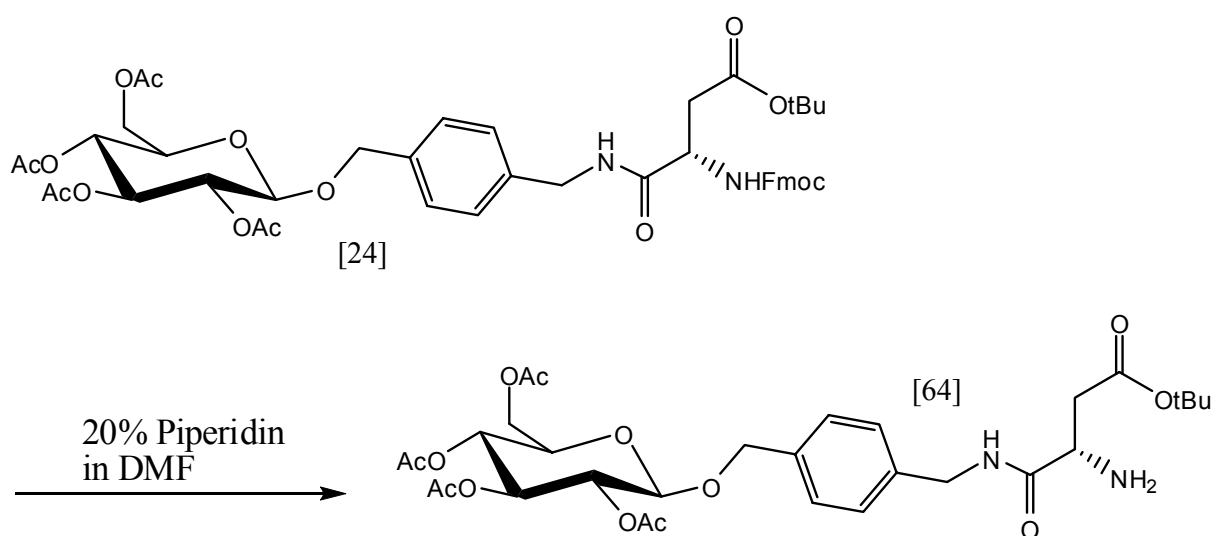
Schema 12: Umschützung des AHC- Dipeptids auf Fmoc.

4.4.3 Aufbau der Neo- β -Glycotripeptidbausteine

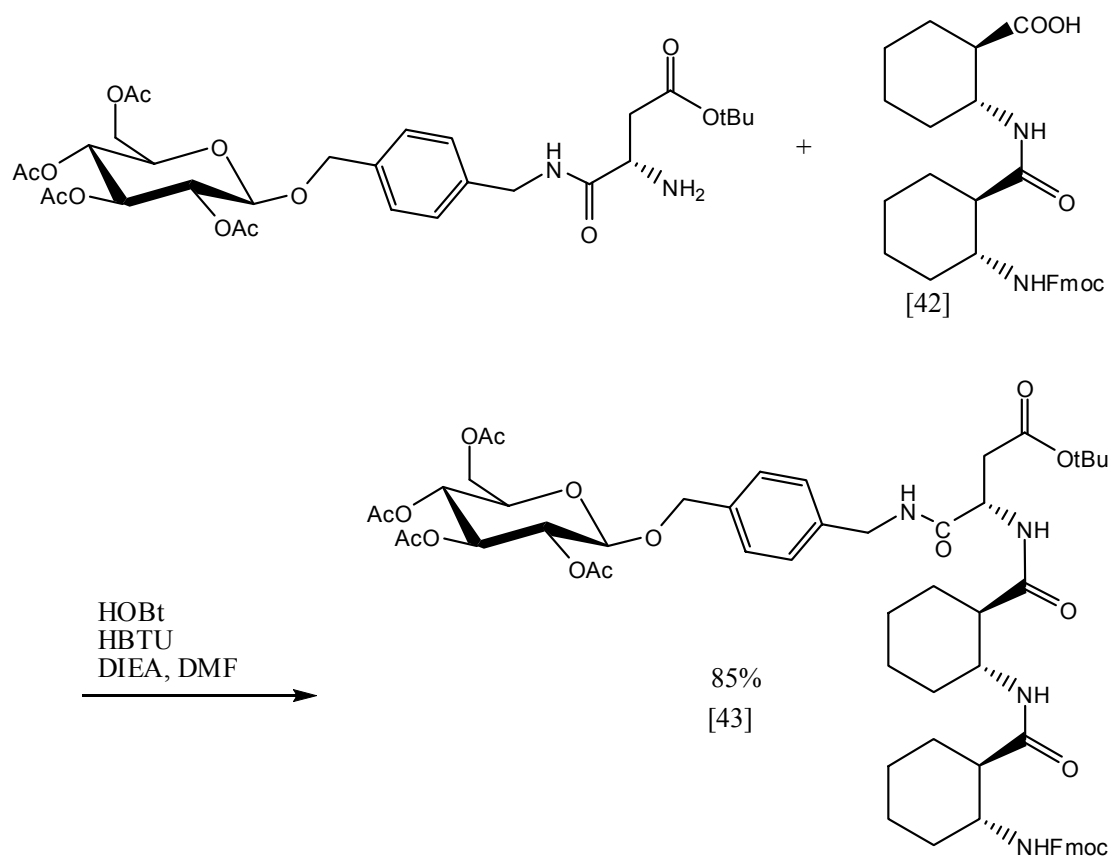
Das Fmoc- geschützte ACHC- Dipeptid **42** lässt sich dann mit HOBt HBTU und DIEA in sehr guten Ausbeuten (80-85%) mit den *t*Bu- entschützten Asparaginsäurebausteinen **64**, **65**, **66** kuppeln. Dazu wird zunächst das Fmoc- geschützte ACHC- Dipeptid [42] in trockenem DMF gelöst, die Kupplungssubstanzen und zuletzt nach etwa 5 min das freie Amin **64**, **65**, **66** zugegeben. Die Kupplung läuft innerhalb von ca. 20 min ab, der Umsatz wird mittels DC kontrolliert. Das Rohprodukt fällt als weißer Feststoff aus, wenn die Reaktionslösung in Wasser eingespritzt wird und kann abgesaugt werden. Die Glycotripeptidbausteine **43**, **44**, **45** lassen sich mit 2% MeOH in CHCl₃ chromatographieren. In allen anderen für die Chromatographie denkbaren Lösungsmitteln sind sie kaum löslich.

HPLC ist mit MeOH / CHCl₃ möglich und wurde mit einem Gradienten von 0 bis 20% MeOH über 20 min durchgeführt.

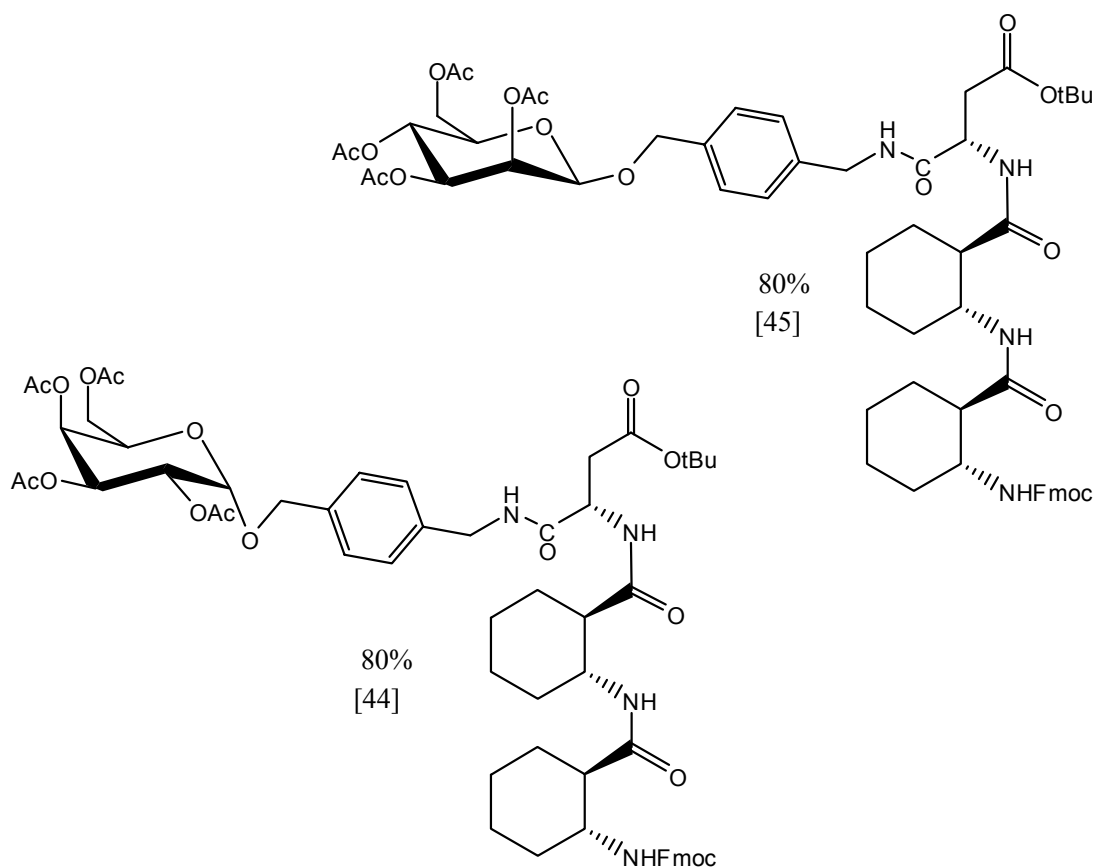
Eine Kupplung mit EDC/ HOBt/ DIEA in DMF erbrachte nur 40 % Ausbeute bei deutlich längerer Reaktionszeit, ist dem Verfahren mit HOBt/HBTU/DIEA also klar unterlegen.



Schema 13: Fmoc- Entschützung der Asparaginsäurebausteine.



Schema 14: Darstellung der Glycotripeptidbausteine.

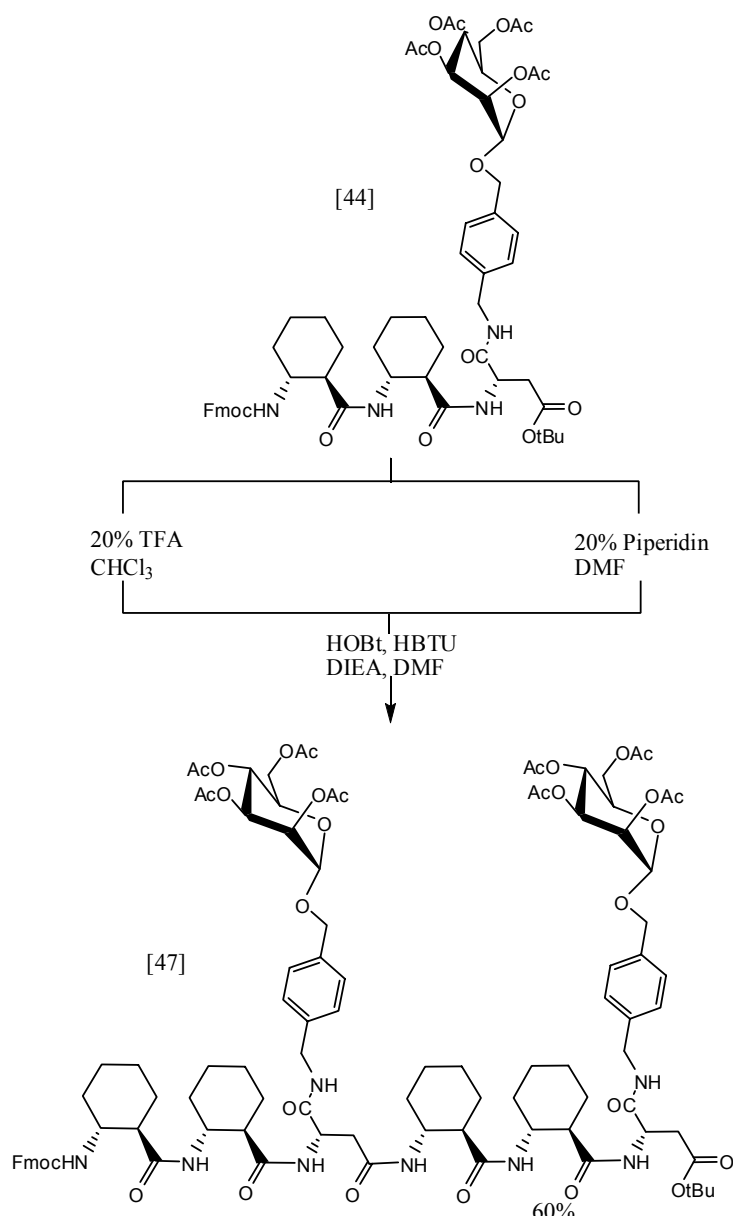


Schema 15: Weitere Glycotripeptidbausteine mit Mannose und Galactoseseitenkette.

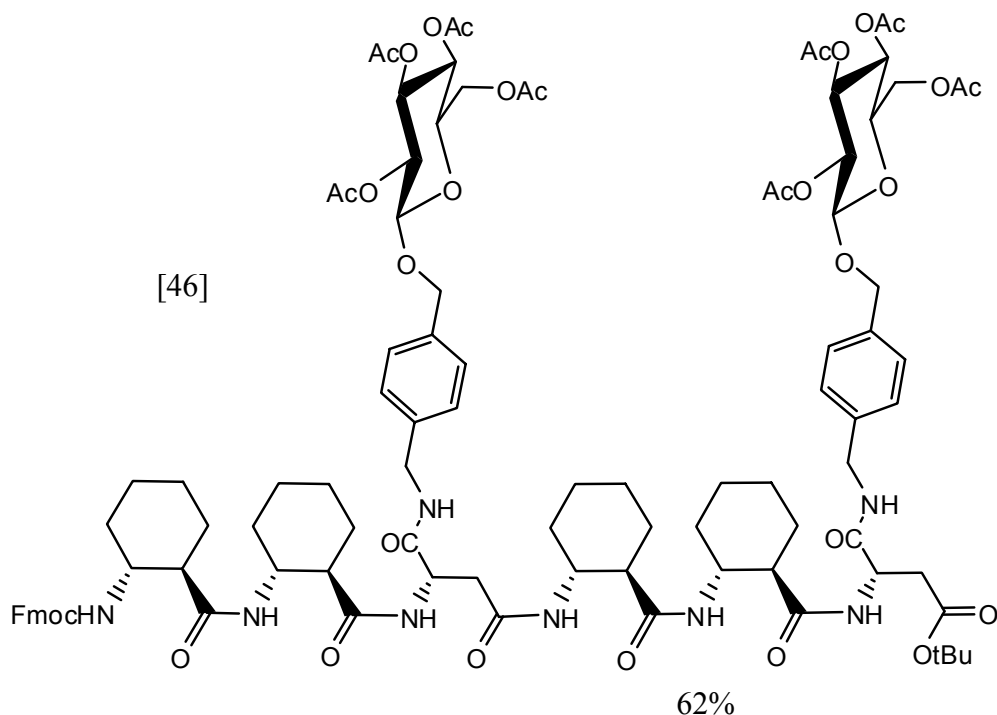
4.5 Aufbau von Neo- β -Glycopeptidoligomeren

Die Glycotripeptidbausteine **43**, **44** werden nach Standardverfahren mit 20% TFA in CHCl_3 über 18h bei RT *t*Bu- bzw. mit 20% Piperidin in DMF über 2h bei RT Fmoc-entschützt. Das so erhaltene freie Amin wird mit der freien Säure wieder mit dem schon etablierten Verfahren aus 4.4.3 mit HOBt/HBTU/DIEA in DMF umgesetzt. Die Reaktion läuft wieder erstaunlich schnell ab und ist nach ca. 40 min beendet.

Wie schon bei den Tripeptidbausteinen **43**, **44**, **45** fällt beim langsamen injizieren in Wasser ein weißer Feststoff aus, der sich nach Trockensaugen und erneutem Lösen in CHCl_3 und trocknen mit MgSO_4 hervorragend mit 4% MeOH in CHCl_3 chromatographieren lässt. Das Produkt **46**, **47** fällt dabei als extrem scharfe Bande ohne erkennbare Verunreinigungen an. Es geliert beim Eindampfen.



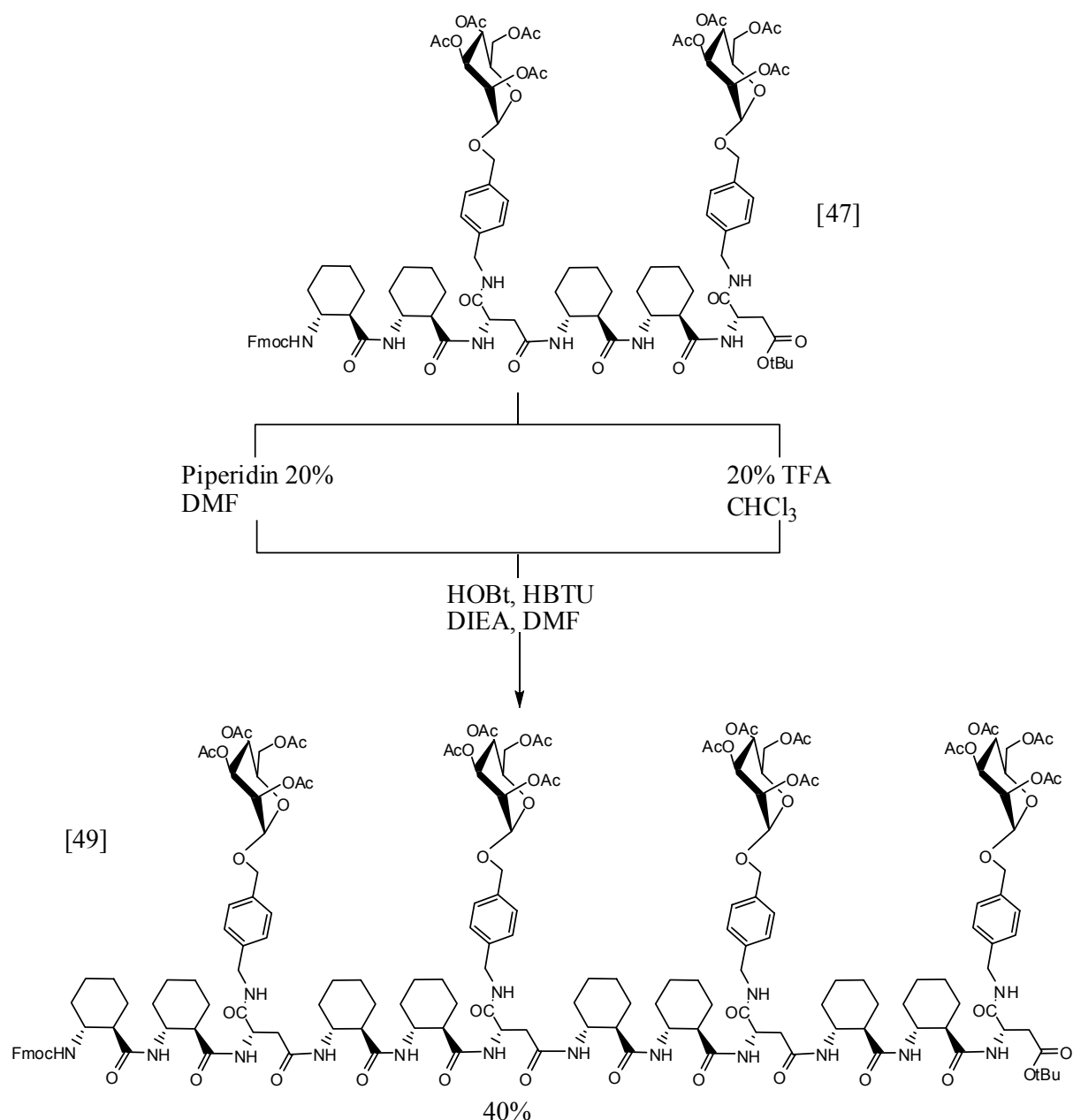
Schema 16: Darstellung der Hexaglycopeptidbausteine, hier mit Mannoseresten.



Schema 17: Hexapeptid mit Glucoseresten

Die Hexapeptide **47** ihrerseits können wieder, wie schon bei den kleineren Peptiden beschrieben, nach Standardverfahren mit 25% TFA in CHCl_3 über 12h bei RT *t*Bu- bzw. mit 20% Piperidin in DMF über 12h bei RT Fmoc-entschützt werden. Dabei ist eine Reaktionskontrolle mittels DC unbedingt nötig, da die zur Entschützung nötigen Zeiten mit steigender Kettenlänge stark zunehmen. Auf ein vollständiges Entfernen der Reagenzien mittels Coevaporation mit Toluol ist größte Sorgfalt zu legen.

Die Hexapeptide werden mit den Standardmethoden aus 4.4.3 mit HOBt/HBTU/DIEA gekuppelt und wässrig aufgearbeitet wie schon beschrieben. Die Abtrennung des Produktes **49** mittels Säulenchromatographie erbringt keine zufrieden stellenden Ergebnisse, aber das Produkt lässt sich gut mittels HPLC mit MeOH / CHCl_3 mit einem Gradienten von 0 bis 20% MeOH über 20 min abtrennen.



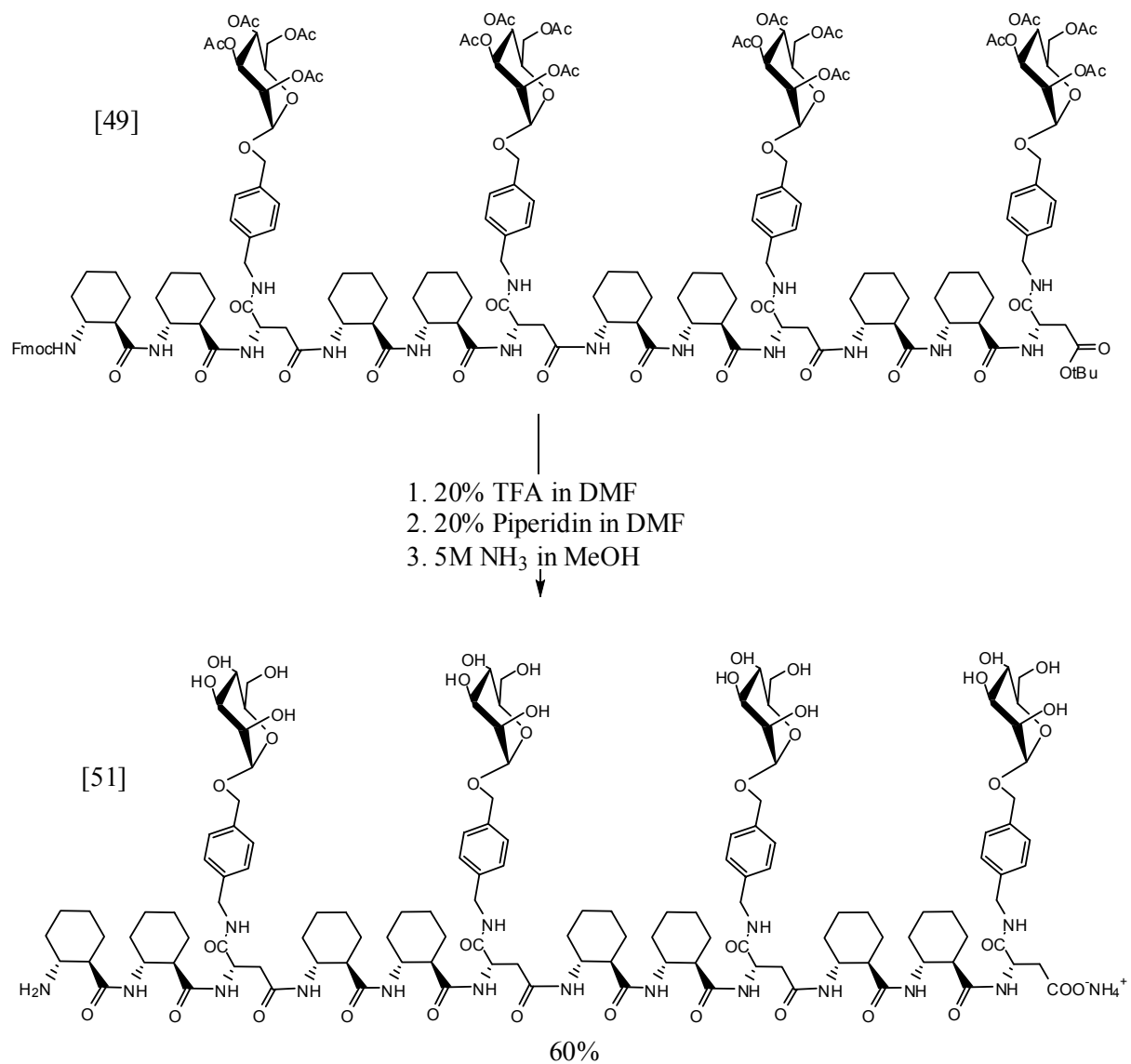
Schema18: Synthese des Dodecaglycopeptids mit Mannoseresten

Die synthetisierten Glycopeptide **46**, **47**, **49** mussten für die Durchführung von Affinitätstests vollständig geschützt werden. Dazu wurden nach Standardverfahren mit 25% TFA in CHCl₃ über 12h bei RT die *t*Bu-, mit 20% Piperidin in DMF über 12h bei RT die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Anschließend wurden die Acetylschutzgruppen abgespalten.

Für die Abspaltung der Acetylschutzgruppen wurde eine 5 M ammoniakalische Methanollösung verwendet und die Lösung über Nacht bei RT gerührt.

Die Massenbestimmung ergab keinen Hinweis auf verbliebene Schutzgruppen.

Die entschützten Produkte konnten nicht chromatographisch aufgereinigt werden, was durch den amphiphilen Charakter der Helix zu erklären ist. Eine wässrige Aufarbeitung durch Ausschütteln der wässrigen Lösung gegen Diethylether war aber erfolgreich (62 – 70%).

**Schema 19: Komplett Entschützung der Glycopeptide**

4.6 Spektroskopische Untersuchung der Konformation der Neo – Glycopeptidoligomere mittels NMR

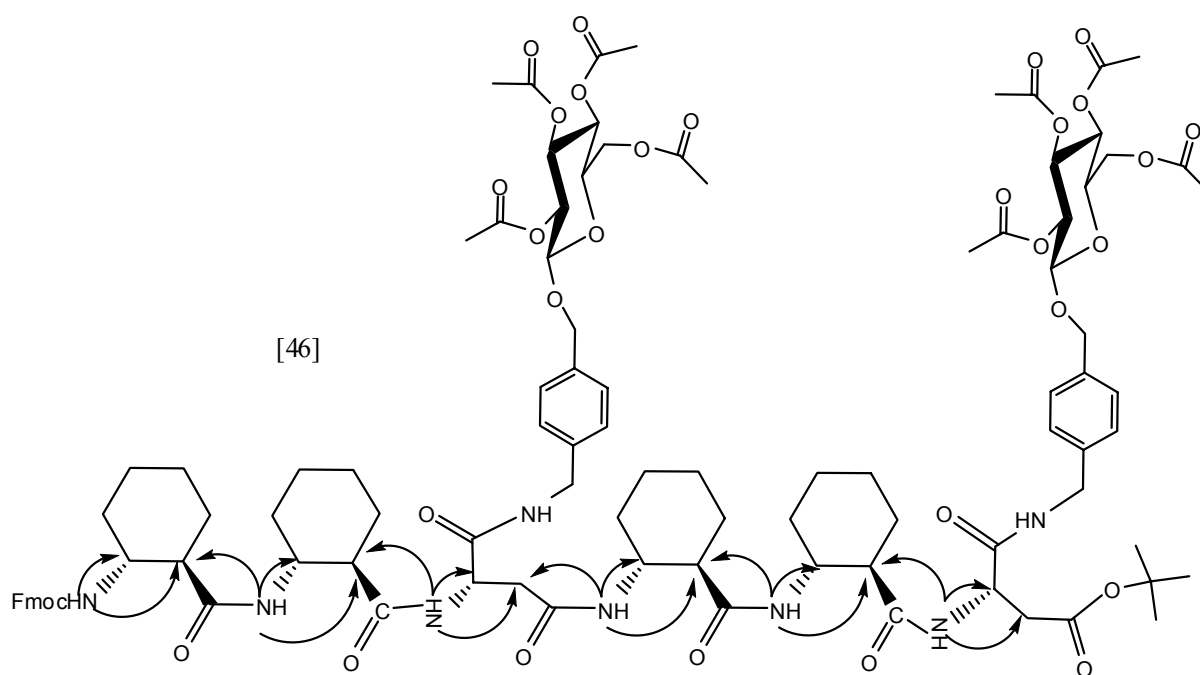
4.6.1 NMR-Auswertung des voll geschützten Glucose- Hexaglycopeptids 46

Von der zu untersuchenden Substanz **46** wurden H-H-COSY, TOCSY, NOE mit 500ms und 700ms mixing time, sowie HSQC und HMBC- Spektren aufgenommen.

Die Sequenzzuweisung musste mittels NOE erfolgen, da die Carbonylsignale wegen der Acetylschutzgruppen nicht aufzulösen und so eine Sequenzanalyse mittels HMBC nicht möglich war.

Die Zuweisung der Signale nach der Sequenz erfolgte mittels eines „Gangs“ entlang des Rückgrates, wobei die NOE- Signale der NH-Protonen mit $C\alpha$ (i) und $C\alpha$ (i-1) verwendet und mit den TOCSY- Daten abgeglichen wurden. Die NOE- Signale, die auf diese Weise nicht zugewiesen wurden, passten perfekt mit den für eine 14-Helix zu erwartenden Daten einer Kopplung über den Raum überein.^[132]

Folgende short range NOE- Daten wurden zur Sequenzzuweisung verwendet:

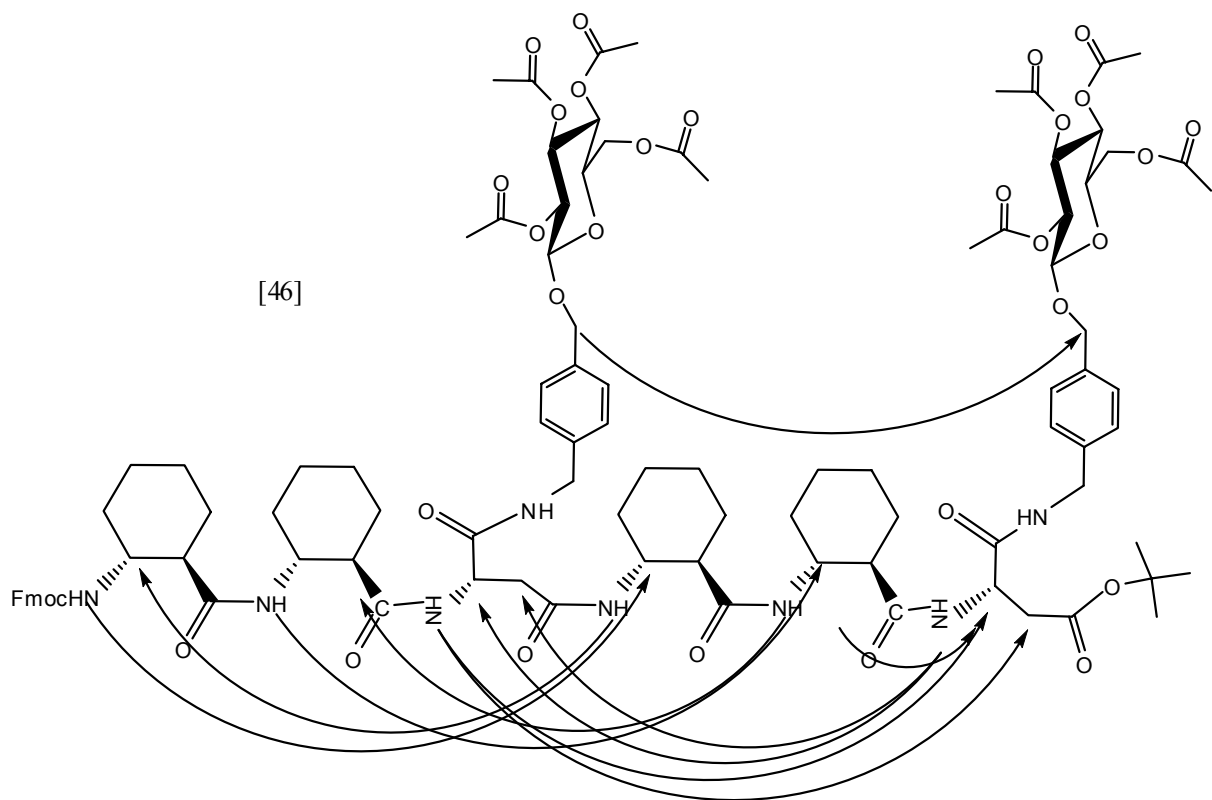


Schema 20: Short-Range-NOE-Signale am Rückgrat benachbarter Protonen.

Die Abbildung 34 zeigt, dass die Amid- Protonen der Peptidkette immer mit $H\alpha$ und $H\beta$ (i) und mit $H\alpha$ (i+1) koppeln. So kann ein lückenloser „Gang“ entlang des Rückgrates unternommen werden kann.

Die nach dieser Zuweisung im verwendeten Bereich übrigen Signale können also nicht durch aufgrund ihrer Primärstruktur in räumlicher Nähe zueinander liegende Protonen zustande kommen, sondern müssen durch aufgrund ihrer Sekundärstruktur angenäherte Protonen entstehen.

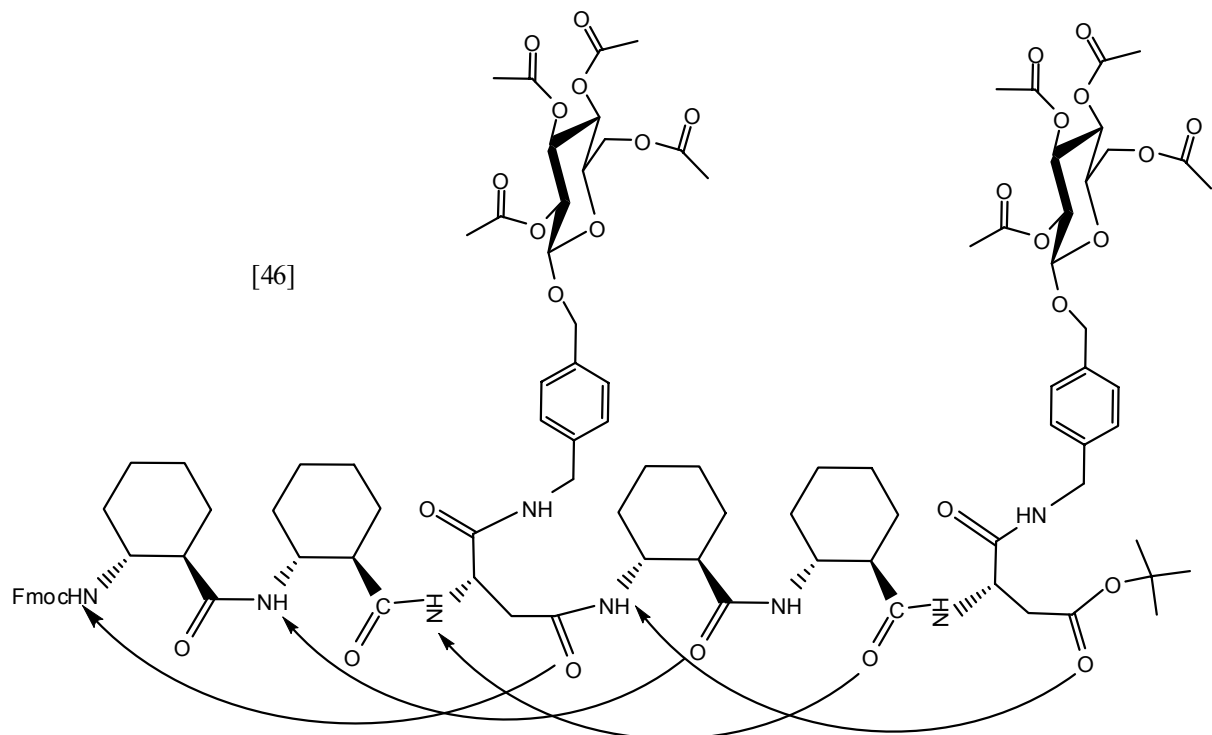
Folgende long range NOE- Signale über den Raum konnten beobachtet werden:



Schema 21: Long-Range –NOE-Signale

Die vorrangige Kopplung zwischen NH (i) und $NH(i+3)$ deutet darauf hin, dass es sich bei der Sekundärstruktur um die gewünschte 14-Helix handelt.

Ein weiteres Indiz ist die Kopplung zwischen den beiden O-benzylischen Gruppen der Spacer. Die beobachtete Struktur lässt auf folgende Wasserstoffbrücken schließen, durch die die 14-Helix stabilisiert wird.



Schema 22: Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der beobachteten 14-Helix.

Bei der Vermessung der entschützten Derivate **48**, **50** ergaben sich spektroskopisch kaum lösbare Probleme, da ein Großteil der Signale zusammenfällt und nicht mehr auflösbar ist. Die wenigen verwendbaren NOE- Signale würden mit einer Helixstruktur übereinstimmen, jedoch sind die Indizien so gering, dass eine gesicherte Aussage auf dieser Basis nicht getroffen werden kann.

Allerdings finden sich in der Literatur einige Anhaltspunkte, die für die Hypothese einer wasserlöslichen und in Wasser stabilen Helixstruktur sprechen.

Methanol ist ein Lösungsmittel, das die Helixbildung stark unterstützt, wobei, wie bei α -Helices und Turns auch, die Stabilität in Wasser stark herabgesetzt ist.^{[83] [165] [98] [71] [166]}

Jedoch ist bekannt, dass β -Peptide, die ACHC enthalten auch in Wasser 14- Helices ausbilden, die, je mehr ACHC sie enthalten, umso stabiler werden.^{[79] [79]}

Da die Zunahme der Seitenketten-Polarität eine erhöhte Stabilität der Helix bewirkt^{[167] [168] [169] [86] [170] [171] [172] [173]}, wenn sich dabei die hydrophoben Seiten aneinanderlagern können^{[82] [82] [174] [160]} kann davon ausgegangen werden, dass das Peptid trotz der schwachen Indizien seitens des NOE-Spektrums als Helix vorliegt.

4.7 Aufbau einer Glycopeptidbibliothek

Bei der Synthese größerer Peptide tritt das Problem der Aufreinigung nach jeder Synthesestufe in den Vordergrund, da chromatographische Schritte immer mit einem hohen Zeitaufwand und einem Ausbeutenverlust einhergehen. Mit der Erfindung der Merrifield-Festphasensynthese an funktionalisierten Polystyrolkugeln 1963 ^[175] ^[176] hat die Festphasensynthese in weiten Bereichen die Lösungssynthese von Peptiden verdrängt.

Dabei wird meistens der C-Terminus der ersten Aminosäure der Sequenz direkt an den festen Träger gebunden und daran durch eine orthogonale Schutzgruppentechnik eine definierte Sequenz aufgebaut.^[177] Der große Vorteil dieser Methode ist, dass man durch große Eduktüberschüsse das Reaktionsgleichgewicht zum Produkt hin verschieben kann und das Produkt hinterher durch einfache Waschschrte von den Reaktanden getrennt werden kann. Oft kann das Edukt so wieder verwendet werden.

Die Festphasensynthese wurde seit den achtziger Jahren stark weiter entwickelt und durch die Synthese neuer Harze, Membranen, Linker und Kupplungsreagenzien immer effektiver gemacht, so dass heute viele Festphasensynthesen nach standardisierten Verfahren automatisch ablaufen.^[178]^[179]

Nach und nach wurden außer Peptiden auch Oligonucleotide^[180] und Oligosaccharide^[181]^[182] dargestellt.

Viele der so dargestellten Substanzen zeigen biologische Aktivität und viele haben auch schon klinische Tests durchlaufen.^[183]

Die Möglichkeit, auf einer Harzkugel eine einzelne Substanz aufzubauen hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren vermehrt durch die so genannte „Split and combine“- Technik große Substanzbibliotheken herzustellen.^[184]

Mit dieser Methode lassen sich biologische Tests einer Vielzahl von Verbindungen durchführen, jedoch ist man bei einem positiven Testergebnis gezwungen über aufwendige Methoden die jeweilige Sequenz auf dem entsprechenden Harzkügelchen zu ermitteln.

Um diese Problematik zu umgehen, macht es Sinn, die entsprechenden Sequenzen in räumlich getrennten Reaktoren in einer „Parallelsynthese“ darzustellen, wobei die Sequenz immer bekannt bleibt.

Eine weitere Vereinfachung brachte die 1988 von R. Frank ^[185] und J. Eichler ^[186] praktisch gleichzeitig entwickelte Synthese auf derivatisierten Cellulosemembranen. Dabei werden die Reaktanden als Tropfen aufgebracht, so dass Punkte entstehen, daher der Name „Spot-Synthese“, die so weit voneinander entfernt sind, dass es sich bei jedem Punkt um einen

eigenen Reaktor mit einer eigenen Sequenz handelt. Dieses Verfahren ist also auch eine Parallelsynthese.^[187] Sie hat den Vorteil, dass bei sehr geringem Verbrauch an Edukt eine Vielzahl von Substanzen auf einer Oberfläche synthetisiert werden, und dass bei Pipettierolumina zwischen 0,5 und 3 μl genug Produkt entsteht, um eine Analytik mittels MALDI-TOF oder HPLC-MS durchführen zu können.^[188]

In den Letzten Jahren sind immer neue planare funktionalisierte Polymere Membranen auf den Markt gekommen und es wurden viele Bibliotheken auf funktionalisierten Glasplatten aufgebaut.^{[189][190]}

Dabei ist eine Miniaturisierung möglich, so dass so genannte „Biochips“ heute Substanzbibliotheken von bis zu 200000 Spots aufweisen.^[191] Dabei werden lediglich pMol an Eduktsubstanz benötigt.^[192]

Durch Festphasensynthese hergestellte Oligosaccharid- und Glycopeptidbibliotheken stehen wegen der oft großen synthetischen Probleme noch ganz am Anfang der Entwicklung, wobei auch hier Fortschritte erzielt worden sind.^{[193][56][194][195]}

Deshalb werden Oligosaccharide oft in Lösung aufgebaut und erst anschließend auf einem Glaträger immobilisiert.^{[196][197][198]}

Ein großer Fortschritt in der Glycopeptidsynthese war die Idee von Meldal, die gut etablierte Fmoc- Strategie aus der Peptidsynthese auf vorher glycosylierte, PFP- aktivierte Aminosäuren anzuwenden und so die sehr schwierige nachträgliche Glycosylierung der Peptide zu vermeiden.^[199] Diese Synthese ist gut automatisierbar und es war durch „split and combine“- Technik möglich, eine Heptaglycopeptidbibliothek mit 300000 Substanzen zu synthetisieren.^{[200][201]}

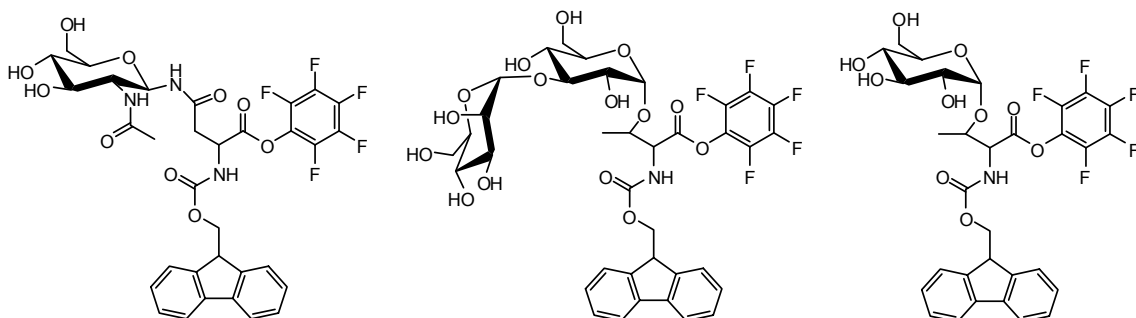


Abbildung 33: Meldals glycosylierte PFP- aktivierte und Fmoc- geschützte Aminosäuren.^[199]

Hummel^[56] gelang die Spotsynthese von Glycopeptiden mit kohlenhydratderivatisierter Asparaginsäure, die mittels PFP- Aktivierung^{[202][199]} an eine Zellulosemembrane nach Frank/ Eichler angebunden wurde. Dabei wurde allerdings im Gegensatz zu unserem System die α - Carboxylfunktion aktiviert und der Zuckerrest über die β -Carboxylgruppe angebunden.^[56]

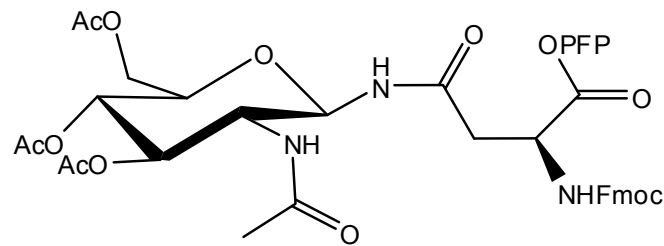


Abbildung 34: Baustein für eine Glycopeptid- Spotsynthese nach Hummel. ^[56]

In unserer Arbeitsgruppe waren schon ähnliche Substanzbibliotheken mit S- Glycopeptiden aufgebaut worden. ^[203] Dabei wurden Kettenlängen bis zu fünf Bausteinen dargestellt.

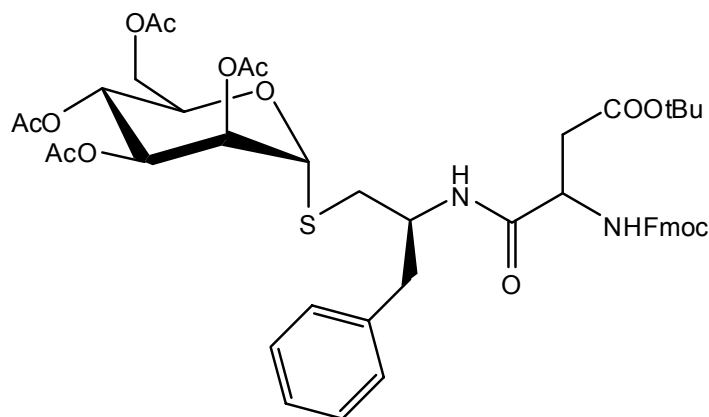


Abbildung 35: Beispiel eines in unserer Arbeitsgruppe zum Aufbau von Spot- Bibliotheken synthetisierten Bausteins. ^[203]

4.7.1 Derivatisierung von Cellulosemembranen

Die Cellulosemembran wurde mit Epibromhydrin funktionalisiert und das entstehende Bromid mit einem aus 4,7,10-Trioxa-1,13-Tridecandiamin bestehenden „Safety Catch Linker“ ^[204], der die Aufgabe hat, für den nötigen Abstand zur Membranoberfläche zu sorgen, umgesetzt. Die freie Aminogruppe kann an dieser Stelle schon mit einem Aktivester umgesetzt werden. Um sich aber die Möglichkeit eines Ablösens von der Membrane vorzubehalten, wurde zusätzlich ein orthogonal zur Fmoc- Strategie spaltbarer Linker eingeführt. Dabei wurde der Rink-Amidlinker verwendet, der sich in TFA- Dampf problemlos spalten lässt und sich in Vorversuchen als praktikabler als ein Photolinker erwiesen hatte. ^[205]

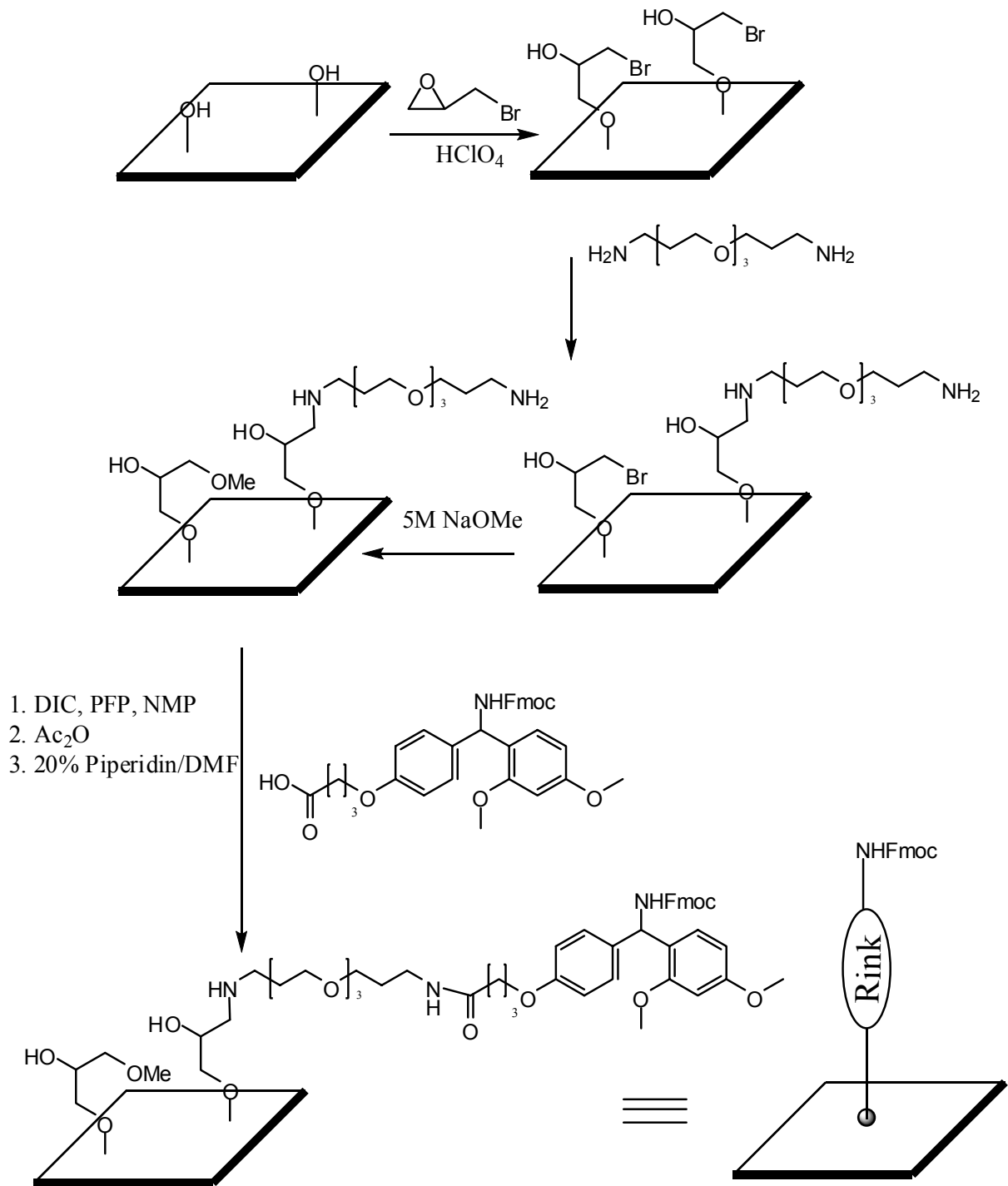


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Derivatisierung der Cellulosemembran mit Safety Catch- und Rink-Amid-Linker.

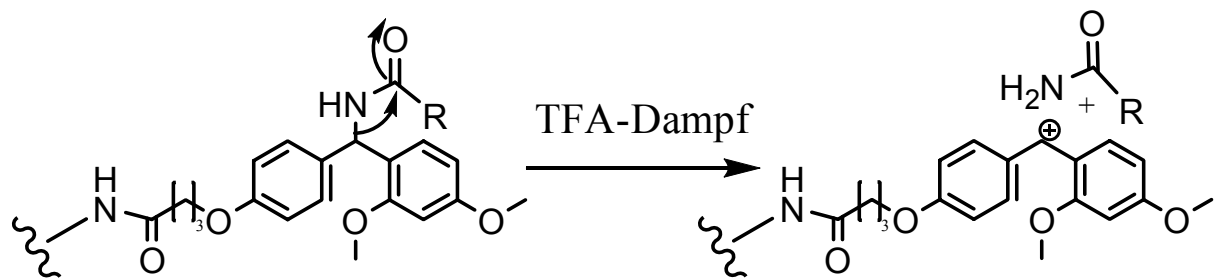


Abbildung 37: Abspalten des Rink-Linkers mit TFA.

Um sterische Hinderungen in der Nähe des Linkers zu vermeiden, wurde als erste Aminosäure Fmoc-Gly-OPFP an den Linker gebunden. Die Membranen wurden Fmoc-geschützt im Dunkeln gelagert und erst kurz vor ihrer Verwendung entschützt.

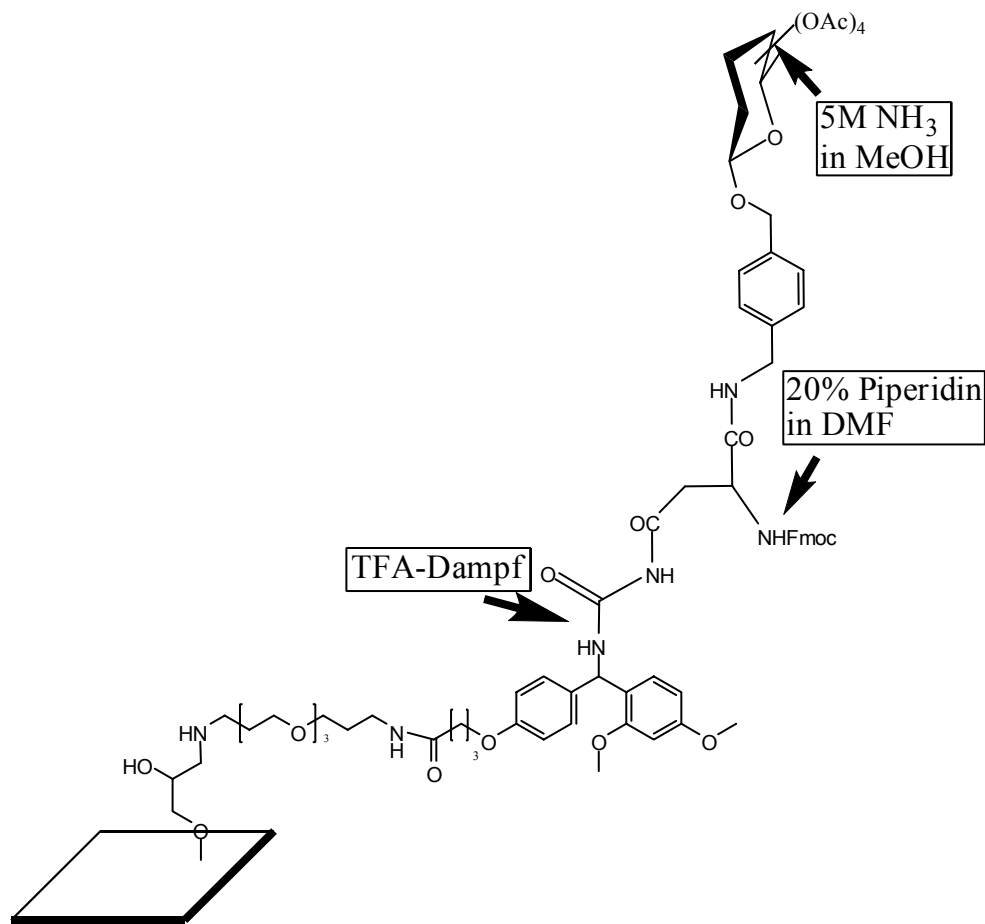
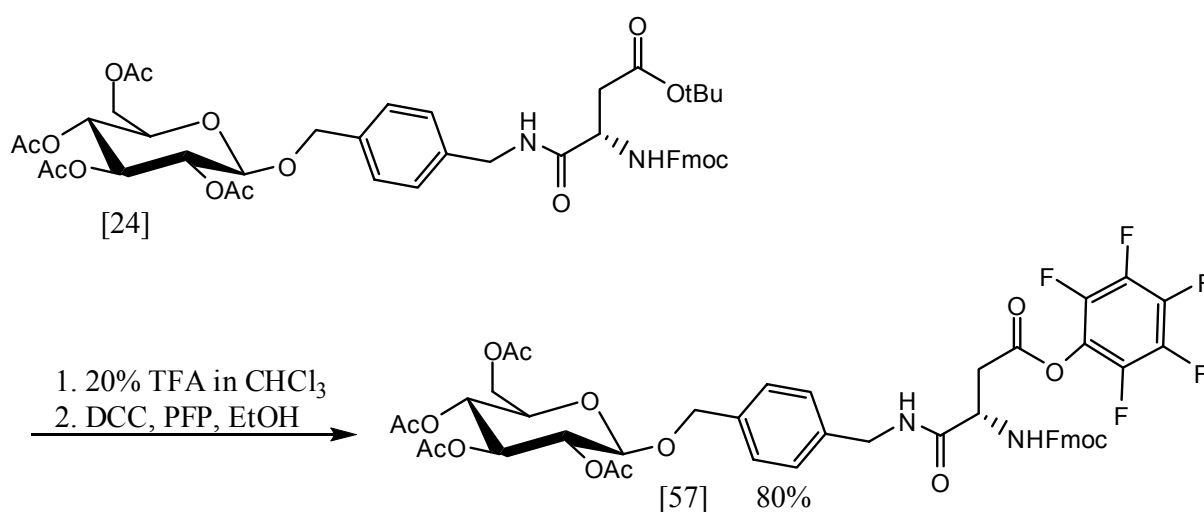


Abbildung 38: Orthogonale Schutzgruppen- und Linkerstrategie für die Spotsynthese.

4.7.2 Aus Monomerbausteinen

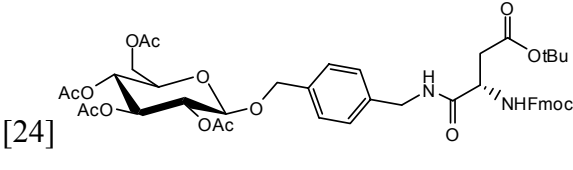
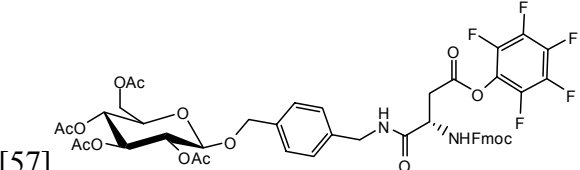
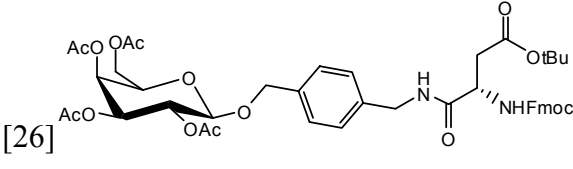
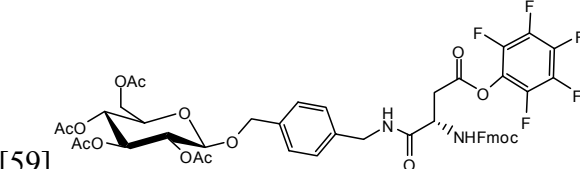
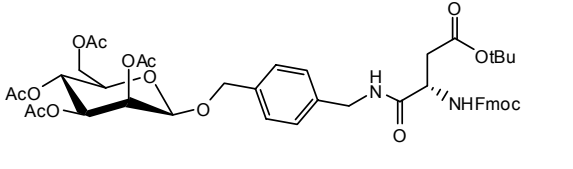
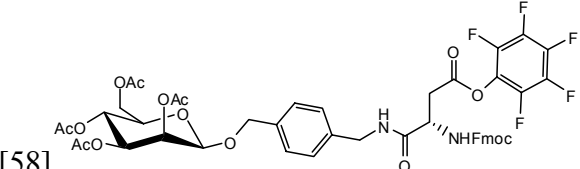
Da durch die Aktivierung mit Pentafluorphenol in Vorversuchen ^{[203] [205] [137]} gute Ergebnisse bei ähnlichen Spotsynthesen erzielt wurden, und da die entsprechenden Aktivester isolierbar, lagerbar, und ohne Hilfsbase umsetzbar sind, sollte der Aufbau einer Glycopeptidbibliothek aus monomeren Asparaginsäurebausteinen **24**, **25**, **26** auch mit dieser gut etablierten Methode versucht werden.^[59]

Dazu muss die Carboxylgruppe der Bausteine **24**, **25**, **26** zuerst einmal mit TFA entschützt werden und mit DCC und Pentafluorphenol zum Pentafluorphenylester **57**, **58**, **59** umgesetzt werden.



Schema 23: Aktivierung der Asparaginsäurebausteine mit Pentafluorphenol.

Tabelle 5: Ausbeuten der Pentafluorphenolaktivierung der Bausteine

Edukt	Produkt	Ausbeute
 <p>[24]</p>	 <p>[57]</p>	80 %
 <p>[26]</p>	 <p>[59]</p>	75 %
 <p>[25]</p>	 <p>[58]</p>	70 %

Die Pentafluorphenylester werden dann als 0.1 molare Lösungen mit HOtHbt auf die Membrane aufgetragen. Die Bausteine reagieren dann mit den freien Aminogruppen der Membrane zu Amiden.

Da trotzdem keine Reaktion zu 100% abläuft, schließt sich an jeden Kopplungsschritt ein Abbruchsritt an, der übrig gebliebene Funktionen auf der Oberfläche durch quantitative Reaktionen so derivatisiert, dass beim nächsten Schritt keine falsche Sequenz entstehen kann.

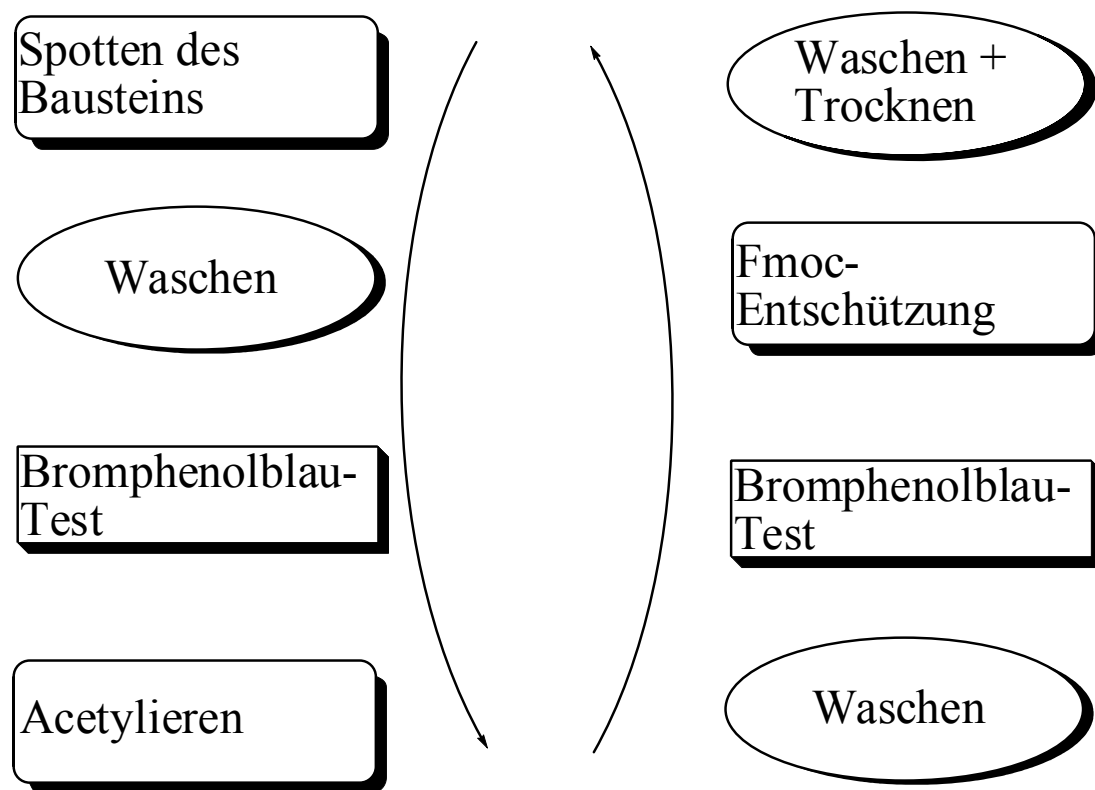
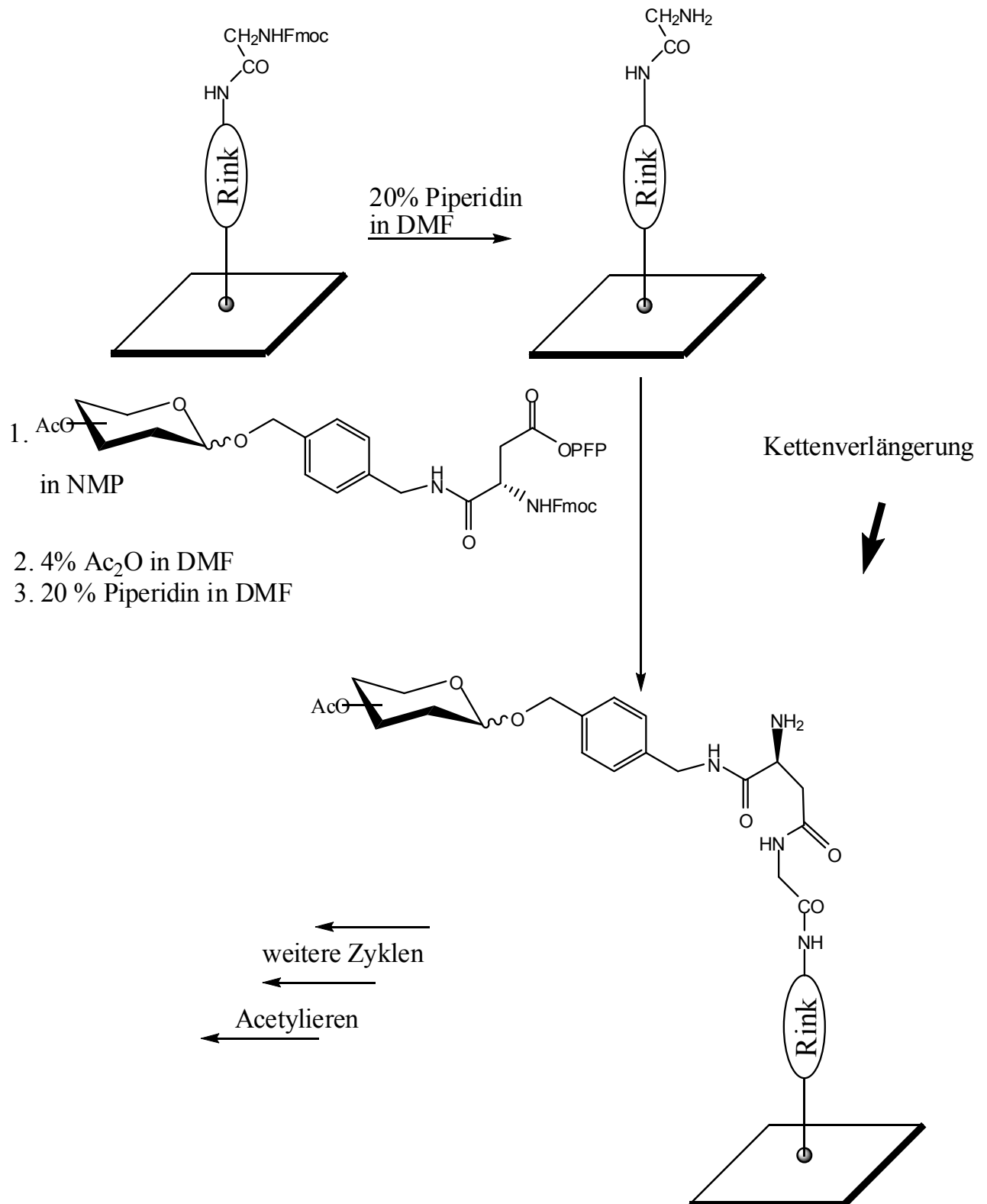


Abbildung 39: Schema eines Spotsynthese- Zyklusses

Von besonderer Wichtigkeit sind bei der Spotsynthese die Waschschrte. Dabei hat sich bewährt, nach dem Spotten zweimal 5 min mit DMF zu waschen und, um bei nicht vollständig abgelaufener Synthese noch eine Wiederholung des Kupplungsschrittes vornehmen zu können, die zweite Waschlösung kurz mit Bromphenolblau anzufärben. Bei nicht vollständiger Reaktion erfolgt dabei eine blaue Anfärbung der Spots. Bei nur ganz leichter Anfärbung kann dann ohne zu trocknen direkt acetyliert werden. Danach muss ein mal 1 min und drei mal 5 min mit DMF gewaschen werden. Möchte man sicher gehen, dass alle übrigen Aminogruppen acetyliert sind, kann man genau wie im letzten Schritt mit Bromphenolblau testen.

Nach der Fmoc-Abspaltung mit Piperidin kommt der wichtigste Waschschrte, da schon kleinste auf der Membrane verbleibende Spuren von Piperidin zu einer Fmoc-Abspaltung während des Spot-Schrittes und damit zur Bildung einer Fehlsequenz führen können. Dabei haben sich fünf Waschschrte mit DMF und drei anschließende Waschschrte mit Methanol als praktikabel erwiesen. Ethanol ist deutlich schlechter geeignet aber unter Umständen wegen der geringeren Toxizität doch eine Alternative.

Für alle Wasch- und Reaktionsschrte mit Lösungsmittelbädern wurde auf einem Orbitalschüttler in Kristallisationsschalen gearbeitet.



Schema 24: Ablauf der Spot-Synthese mit PFP-aktivierten Asparaginsäurebausteinen.

Nach dem letzten geplanten Kupplungsschritt wird die Aminogruppe entschützt und anschließend mit AcOAc in DMF acetyliert. Damit ist die Aminogruppe dauerhaft geschützt.

Anschließend wird die Membran für 14 h in 5M methanolischer Ammoniaklösung acetylentschützt.

Nach diesem Schritt kann die Membran für Lectintests verwendet werden.

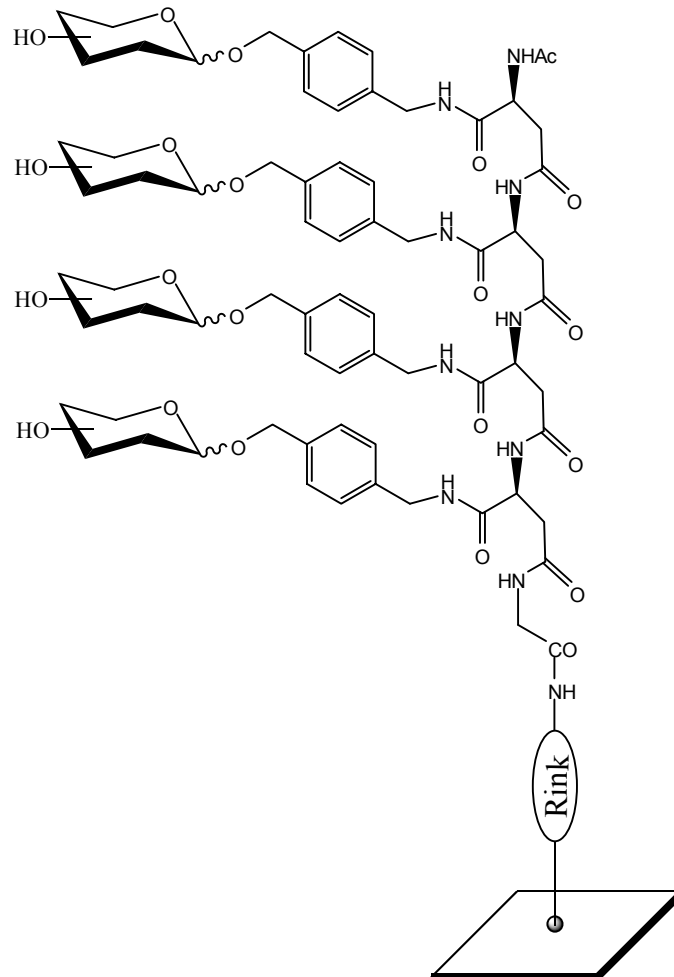


Abbildung 40: Fertig aufgebautes und entschütztes Glycopeptid.

Soll eine weitere Analytik erfolgen, wird der Rink-Amid-Linker durch inkubieren der Membran in TFA- Dampf abgespalten.

Im abgebildeten MALDI-TOF – Spektrum sieht man deutlich das gewünschte Tetramer, jedoch sind auch Kettenabbruchprodukte nach zwei und drei Zyklen zu erkennen. Außerdem ist noch ein Peak des Pentamers zu sehen. Dieser Peak ist nur dadurch zu erklären, dass die Fmoc- Schutzgruppe bei einigen Ketten während eines Kupplungsschrittes entschützt worden sein muss, was zu einer Doppelkupplung geführt haben muss.

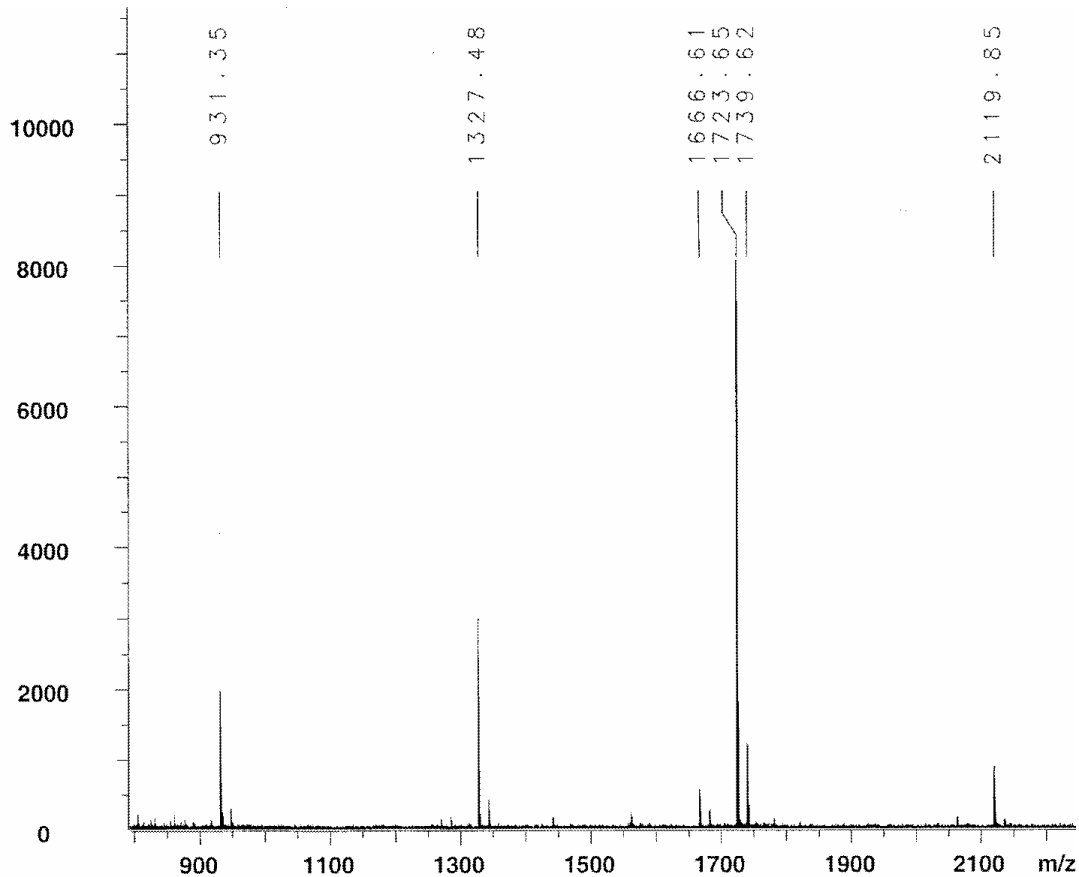


Abbildung 41: Maldi-ToF Massenspektrum des Tetramers aus Abb. 45 mit vier Mannoseeinheiten.

4.7.3 Versuch einer Übertragung der Synthesestrategie auf Trimerbausteine

Die Übertragung dieses Synthesekonzepts auf helixförmige Glycopeptide, wie sie vorher in Lösung synthetisiert worden waren, erschien von Anfang an fraglich. ACHC ist als extrem sterisch anspruchsvolle Aminosäure bekannt, speziell, wenn eine Fmoc- geschützte ACHC an den C- Terminus einer weiteren ACHC gekuppelt werden soll. Dabei sind die Ausbeuten speziell für eine Spotsynthese, deren Produkte direkt auf dem Träger und nicht erst nach aufwendigen Reinigungsschritten über HPLC getestet werden sollen mit Ausbeuten zwischen 40 und 80% pro Kupplungsschritt zu niedrig. Die einzig bekannte Möglichkeit, an festen Phasen, hier Wang- Harzen, passable, wenn auch immer noch zu niedrige bis 80% Ausbeuten pro Kupplungsschritt zu erreichen, ist die Verwendung einer mikrowellengestützten Synthese.^{[95] [96]}

Auch auf Cellulosemembranen sind mikrowellengestützte Spot- Synthesen bekannt.^[206]

Da auch die Trimerbausteine aufgrund ihrer Schutzgruppenstrategie potentiell für Umsetzungen in einer Festphasensynthese geeignet sind und durch vorziehen von zwei von drei Kupplungsschritten in die Lösungssynthese zumindest die Anzahl der Kupplungsschritte an der festen Phase relativ gering wäre, war die Spotsynthese zumindest einen Versuch wert. Allerdings ließen sich die Trimerbausteine **43, 44, 45** mit keiner der getesteten Methoden an die feste Phase anbinden und auch Versuche, sie direkt an den Safety Catch Linker oder direkt an den Rink-Linker zu binden schlugen komplett fehl.^[207]

Es konnten also mit Hilfe der Spotsynthese keine Substanzbibliotheken aufgebaut werden, die den in Lösung aufgebauten Glycopeptiden entsprachen.

Mit folgenden Kupplungsreagenzien wurden Kupplungsversuche unternommen:

Tabelle 6: Kupplungsmethoden, die zur Kupplung der Tripeptide erprobt wurden.

1.	HOBt, HBTU, DIEA ^{[94][208]}	Diese Kupplungsmethode wurde auch unter Zusatz von 10 Äquivalenten LiCl mit verschiedenen Zeiten und Leistungen in der Mikrowelle durchgeführt.
2.	HOBt, DIEA	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt.
3.	TBTU, DIEA	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt
4.	EDC, HOBt, DIEA ^{[209][210][213]}	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt
5.	DIC, PFP, HODhbt, DIEA	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt.
6.	BOP, DIEA	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt
7.	PyBOP, DIEA ^{[75][211][212]}	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt
8.	HATU, HOBt, DIEA ^{[73][166][213][214]}	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt
9.	TFFH, DIEA ^[105]	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt
10.	BOP, EDC, DIEA	Diese Kupplungsmethode wurde bei verschiedenen Temperaturen von 20-100° C im Trockenschrank durchgeführt

4.8 Lectintest

1936 wurde ein Protein aus *Canavalia ensiformis* isoliert, das zur Agglutination von Blutzellen führte. Diese Agglutination erfolgte selektiv und analog zu den von Landsteiner 1908 entdeckten Blutgruppen.

In diesem Zusammenhang wurde wegen der Spezifität das erste Mal von Lectinen gesprochen. Heutzutage werden unter Lectinen Proteine verstanden, die spezifisch, nicht kovalent und reversibel an Glycane anbinden können, ohne enzymatisch aktiv zu sein und ohne durch eine Immunreaktion induziert worden zu sein.

Sie können eine oder mehrere CRDs (Carbohydrate Recognition Domain) besitzen, man spricht dabei von Mono- oder von Multivalenz. Dadurch lässt sich auch die Agglutination von Blutzellen erklären, wobei multivalente Lectine als „Brücken“ zwischen den Oberflächenglycanen mehrerer Zellen binden. Diese Agglutination kann durch Zugabe der jeweils spezifischen Zucker verhindert werden.

Lectine sind in fast allen Lebewesen und in Viren zu finden. Sie erfüllen dort die unterschiedlichsten Aufgaben.

Diese reichen von Erkennungsprozessen zwischen Zellen, Zellen und Antikörpern, Erkennung von Zellen durch Viren bis hin zur Erkennung einzelner Moleküle innerhalb und außerhalb der Zelle wie etwa Glycopeptide oder Hormone.^{[215] [216] [217]}

Sie sind wissenschaftlich von großem Interesse, um aufgrund ihrer Spezifität Untersuchungen an komplexen Oligosacchariden und Glycopeptiden vorzunehmen, sowie um Veränderungen an Zelloberflächen aufgrund physiologischer Prozesse und Krankheiten wie z.B. Krebs zu detektieren.

Lectine sind heutzutage in großer Auswahl im Handel erhältlich, sie werden entweder durch Affinitätschromatographie aus Organismen isoliert, oder sie werden durch rekombinante DNA- Techniken gewonnen.

Die Anbindung kommt durch verschiedene Effekte zustande^{[218] [219]}:

- Wasserstoffbrückenbindungen
- durch Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrücken
- koordinative Wechselwirkungen mit divalenten Ionen wie Ca^{2+} oder Mn^{2+} und Carbonylgruppen, wobei die benachbarte NH_2 - Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer Zucker- OH-Gruppe ausbildet.

- ionische Wechselwirkungen zwischen geladenen Zuckergruppen und Aminofunktionen der Aminosäuren des Lectins, wobei Wasser als Brücke dient.
- Nichtpolare Wechselwirkungen zwischen unpolaren Bereichen des Zuckers (B-Face) und aromatischen Resten von Tryptophan oder Phenylalanin in der Bindungstasche.

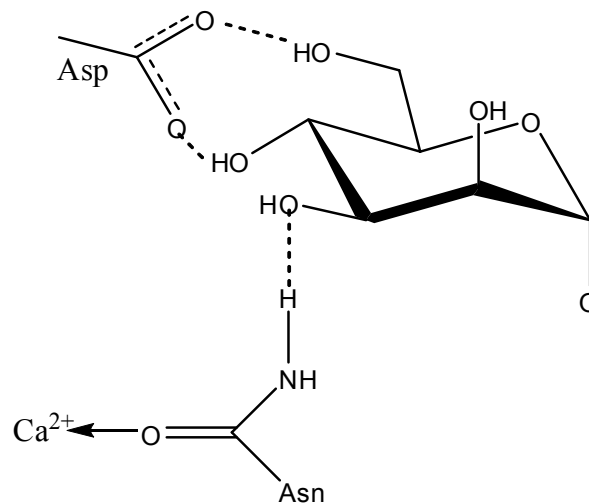


Abbildung 42: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Mannose und Aminosäureseitenketten des Mannose bindenden Lectins Concanavalin A.^[220]

Trotzdem sind sie im Vergleich mit anderen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen als schwach einzustufen. Die Bindungsenergie liegt z.B. für Concanavalin A bei 5.3 kcal/mol.^[221]

Die Affinität eines Lectins zu einem Monosaccharid wird durch die Affinität zu einem multivalenten Liganden um bis zu drei Zehnerpotenzen übertroffen. Das ist durch eine einfache Addition der Bindungskonstanten nicht zu erklären. Hier spielen zusätzlich verschiedene Effekte eine Rolle:

- Durch die Verdrängung von Lösungsmittelmolekülen entsteht eine Entropievergrößerung.
- Die Mehrfachbindung (Chelateffekt) verhindert beim statistischen Bruch einer einzelnen Bindung den kompletten Bindungsverlust zum Liganden.
- Hohe Ligandenkonzentrationen begünstigen die statistische Möglichkeit einer Rückbindung.
- Durch Annäherung der Liganden werden die Rezeptoren ausgerichtet.

Lectine sind von der Struktur her sehr unterschiedlich, wobei sich pflanzliche Lectine deutlich stärker voneinander unterscheiden, als tierische Lectine. Trotzdem gibt es auch bei Pflanzen

teilweise große Strukturübereinstimmungen, die oft zur Identifizierung neuer Lectine beitragen.

Die Einteilung der Lectine erfolgt zunächst einmal in pflanzliche und tierische Lectine.

Pflanzliche Lectine werden ihrerseits wieder nach ihrer Affinität zu verschiedenen Zuckern eingeteilt (Mannose, Galactose/N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin, L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure).

Pflanzliche Lectine sind nicht membranständig, sondern löslich und bestehen aus mindestens zwei, oft aber drei oder vier Untereinheiten mit oft jeweils mehreren CRDs, was ihre Fähigkeit z.B. zur Hämagglutination erklärt.

Ihre Aufgaben liegen vor allem in der Abwehr von Fressfeinden und Krankheiten.^{[222] [223]}

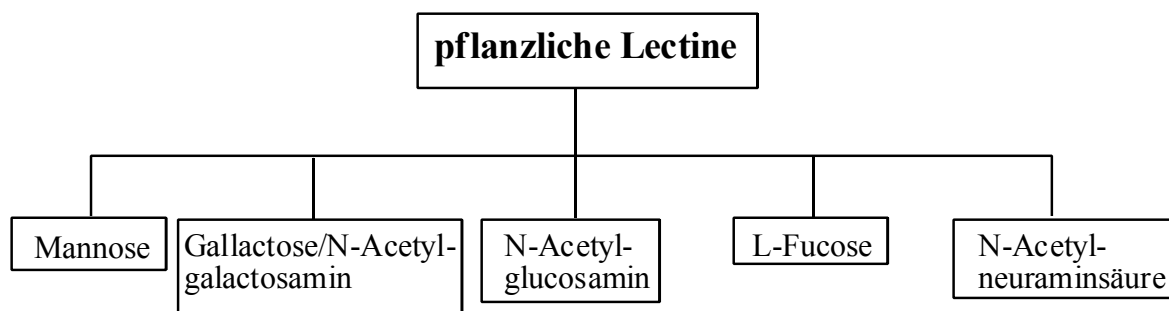


Abbildung 43: Einteilung pflanzlicher Lectine

Tierische Lectine werden in drei Grundgruppen unterteilt: S- Typ, C- Typ und P-Typ-Lectine.

Die S- Typ-Lectine oder auch Galectine binden Galactose und sind für die Zelladhäsion nötig.^[24]

Die C-Typ-Lectine benötigen für eine Anbindung Ca^{2+} - Ionen (siehe Abb.42)

Sie sind durch eine Bindungsdomäne mit konservierter Aminosäuresequenz charakterisiert, wobei ein Teil ausschließlich und ein anderer in Verbindung mit Ca^{2+} an den Zucker bindet.

Sie werden ihrerseits noch einmal in Untergruppen aufgeteilt:

-Endotheline Lectine sind membranständige Rezeptoren, die z.B. für die Phagocytose bei Makrophagen notwendig sind.

-Collectine besitzen C- Lectin-CRDs die an kollagene Strukturen gebunden und löslich sind.

Beispiele sind die MBPs (Mannose binding Proteins) im Serum und die SP-A und SP-D (surfactant Protein A and D) in der Lunge.

- Selectine sind eine Gruppe von drei membrangebundenen Lectinen, die die Adhäsion von Leukozyten an Endothelien vermitteln.^[224]

L-Selektin: Ein Zelladhäsionsmolekül, das auf Lymphozyten vorkommt.

P-Selektin: kommen auf Endothelzellen und Blutplättchen vor. Sie vermitteln die Adhäsion von Leukozyten und Blutplättchen an Entzündungsstellen. P-Selektine Binden an Transmembranmoleküle woran N-Glycane mit terminaler Sialinsäure gebunden sind.

E-Selektin: kommen auf Endothelzellen vor. Sie vermitteln die Adhäsion von Leukozyten an Entzündungsstellen. E-Selektine binden an Transmembranglycoproteine mit einer Mucin-ähnlichen Struktur woran O-Glycane mit terminaler Sialinsäure sowie Tyrosinphosphat gebunden sind.^{[225] [226] [227]}

Die P-Typ Lectine besitzen einen als Mannose-6-phosphat bezeichneten Rezeptor. Sie sind für den Vesikeltransport aus dem trans- Golgi in die Endosomen und für die Detektion und Aufnahme lysosomaler Enzyme aus dem extrazellulären Medium verantwortlich.^[228]

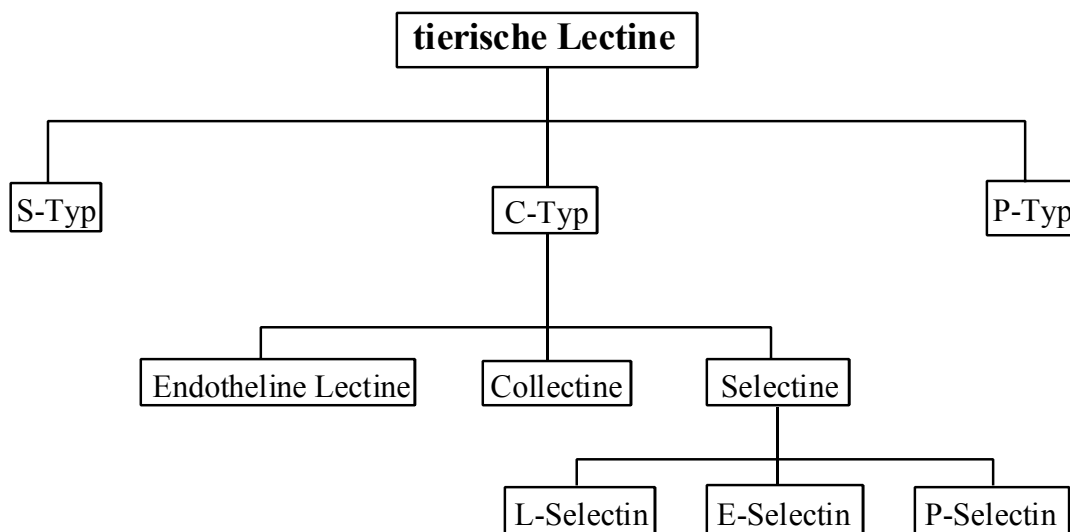


Abbildung 44: Einteilung tierischer Lectine.

4.8.1 Lectintest der Bibliothek

Zum Testen der Glycopeptide wurden zwei Mannose bindende Lectine ausgewählt.^[229]

- Das Concanavalin A, das Mannose besser als Glucose, jedoch nicht nur spezifisch Oligomere, sondern auch Monomere erkennt.
- Das GNA aus *Galantus nivalis*, das Man- α -1,3-Man Oligomere erkennt und kaum Affinität zu Monomeren aufweist.^{[230] [231] [232]}

Die Lectine wurden Peroxidase labeled verwendet. Zur Sichtbarmachung wurde die Farbreaktion mit AEC und H_2O_2 verwendet, bei der durch Oxidation ein roter, in Wasser unlöslicher, durch Methanol aber auswaschbarer Farbstoff entsteht.

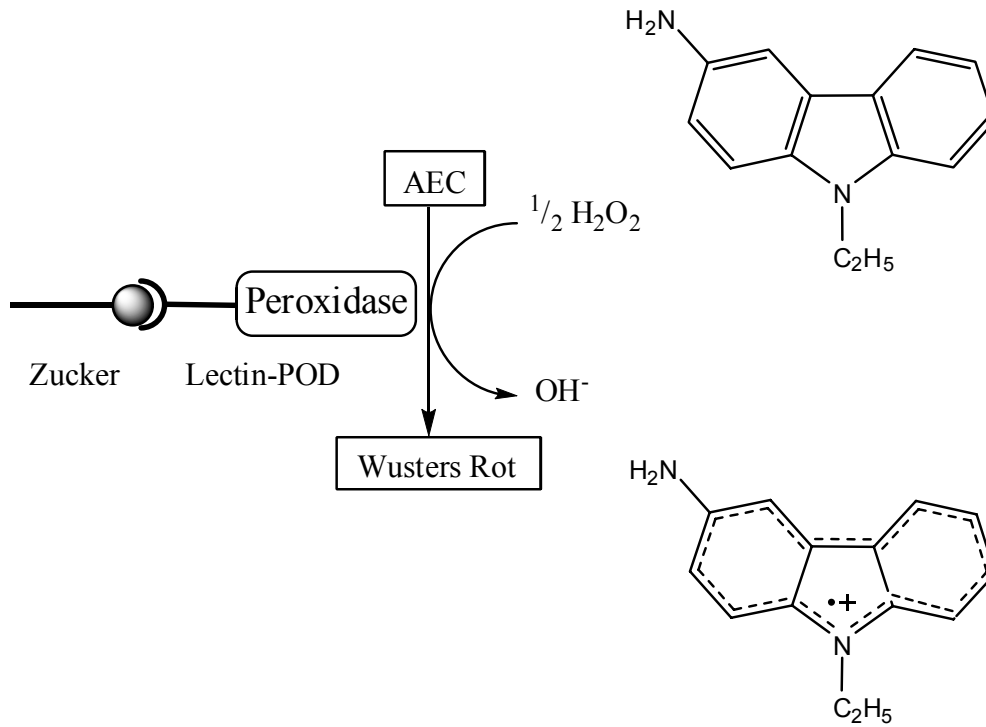


Abbildung 45: Farbtest mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) und Wasserstoffperoxid.

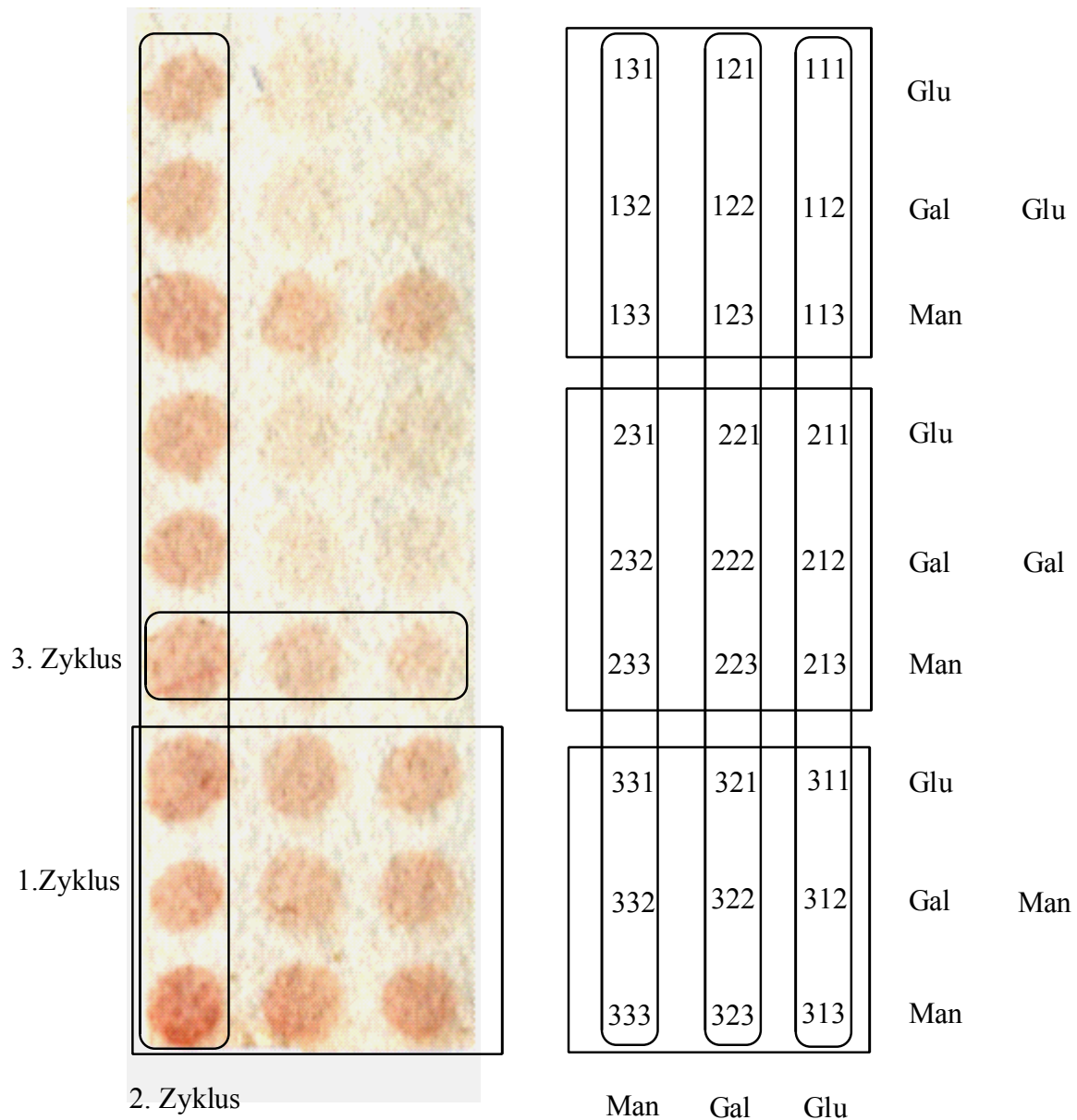


Abbildung 46: Test Mit POD-markiertem ConA und AEC.

Der Test der Bibliothek aus Abb. 51 mit ConA zeigte eine erhöhte Affinität zu den Mannosereichen Regionen, wobei die Affinität stärker war, je mehr Mannosebausteine in die Sequenz eingebaut waren. Reine Glucose- und Galactosesequenzen zeigten ähnlich geringe Affinitäten zu ConA.

In einem Vergleichstest der Bibliothek aus Abb. 51 mit GNA konnte keine Spezifische Affinität zu einer bestimmten Sequenz festgestellt werden.

Deshalb wurde für der Test mit GNA für eine Bibliothek wiederholt, deren Peptidlänge auf vier Bausteine erhöht wurde, wobei jeder Spot zuerst mit einem Mannosebaustein belegt wurde. Darauf wurden in gleicher Reihenfolge wie oben beschrieben eine 27er- Bibliothek aus D-Glucose-, D-Galactose-, und D-Mannosebausteinen aufgebaut. Die Bibliothek wurde nach dem gleichen Protokoll, jedoch mit POD- labeled GNA inkubiert und mit AEC getestet. Dabei zeigte sich eine spezifische Anbindung in den mannosereichen Regionen, die sich speziell von den galactosereichen Regionen unterscheidet. Das ist bemerkenswert, da GNA dafür bekannt ist, kaum Affinität zu Monosacchariden zu haben. Auch die glucosereichen Regionen hatten eine im Vergleich zu den galactosereichen Regionen etwas erhöhte Affinität. Diese Ergebnisse sind homolog zu den bisher in unserer Arbeitsgruppe mit GNA getesteten Bibliotheken, bei denen erhöhte Affinitäten erst bei Glycopeptiden mit vier oder fünf Zuckereinheiten festgestellt werden konnten.^[205]

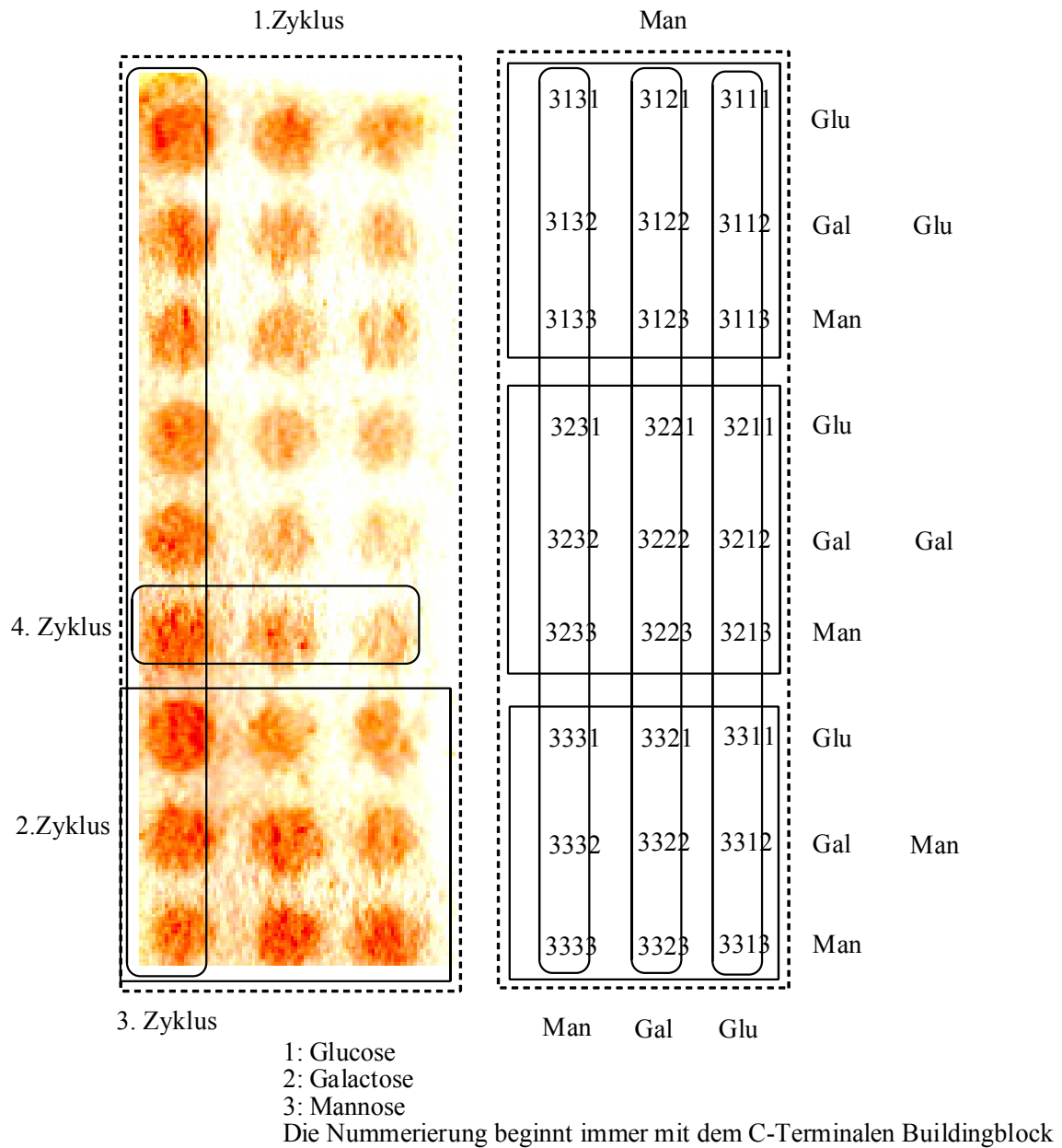


Abbildung 47: Test mit POD- Markiertem GNA und AEC

4.8.2 Lectintest der Neo – Glycopeptidoligomere

Da die synthetisierten β -Glycopeptide auch auf ihre Affinität zu Lectinen getestet werden sollten, es aber nicht möglich war, sie per Spotsynthese herzustellen, musste Nitrocellulose als Trägermaterial verwendet werden, das eine sehr hohe Affinität zu Peptiden aufweist und daher zur Immobilisierung der in Lösungssynthese dargestellten Glycopeptide sehr gut geeignet ist. Lectintests mit aus der Natur isolierten Oligosacchariden und Glycopeptiden sind gut etabliert.^{[233] [234] [235] [236]}

Die Substanzen **51**, **50**, **48** wurden in Verdünnungen von 0.001 mmol/l bis 1mmol/l in Portionen von jeweils einem μ l aufgetragen und trocknen gelassen. Danach wird mit TBS-Puffer gespült und mit BSA blockiert und nochmals mit TBS gespült.

Danach wird die Membran in der Lectinlösung inkubiert und nach weiteren Waschschritten die Lectinmenge durch die Farbreaktion der Peroxidase mit AEC qualitativ ermittelt.

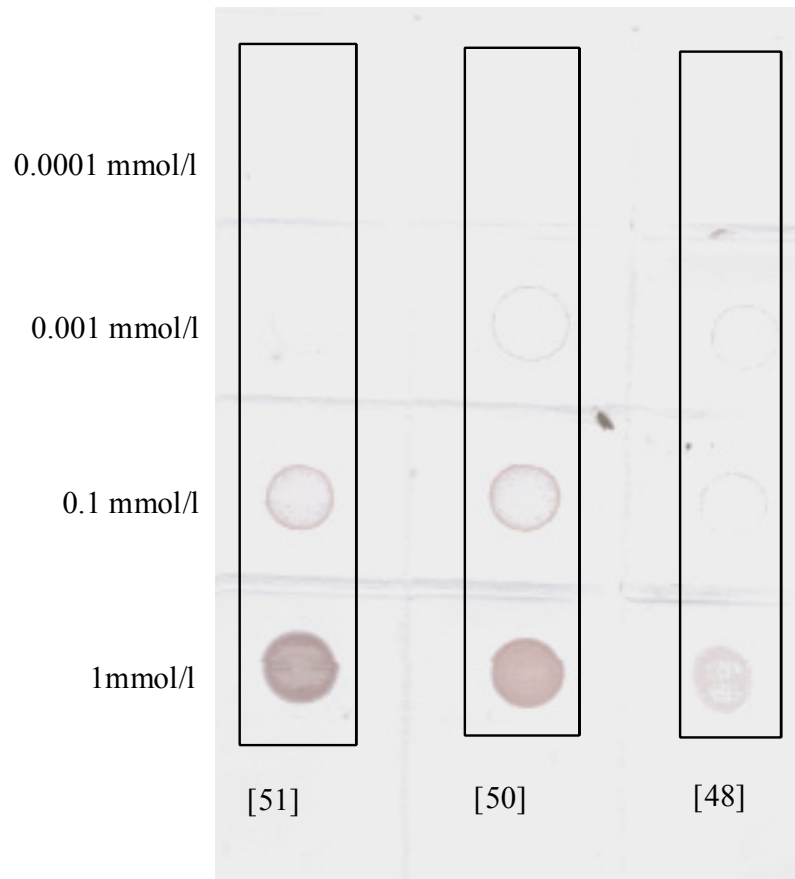


Abbildung 48: Lectintest der Glycopeptide [51], [50], [48] mit Con A

Der Affinitätstest mit ConA zeigt eine erhöhte Affinität zu den mannosehaltigen Glycopeptiden **51** und **50**, wogegen es zum glucosehaltigen Glycopeptid [48] kaum Affinität aufweist. Die Affinität zu **51** und **50** ist sehr ähnlich, die längere Zuckersequenz mit vier Mannoseeinheiten in **51** bringt also keine signifikant höhere Affinität im Vergleich zu **50** mit nur zwei Mannoseeinheiten.

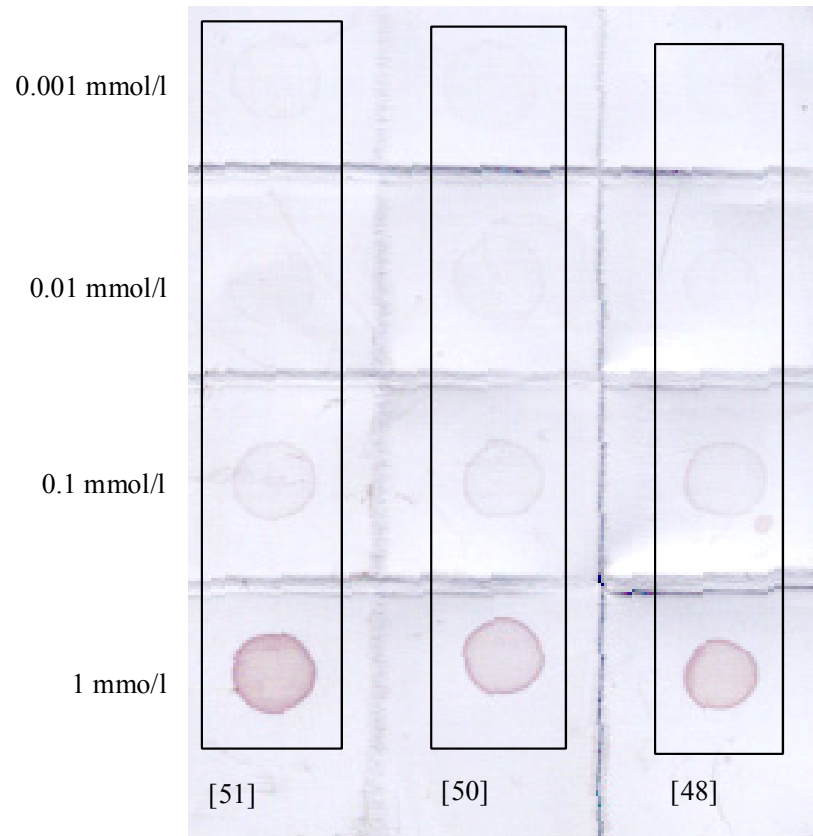


Abbildung 49: Lectintest der Glycopeptide 51, 50, 48 mit GNA.

Der Affinitätstest mit GNA zeigt eine hohe Affinität zum Glycopeptid [51] mit vier Mannoseeinheiten, jedoch auch eine nur wenig schwächere Affinität zu **50** und **48**. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Vororientierung der Zuckereinheiten in der 14-Helix schon deutlich kürzere Zuckersequenzen von nur zwei Zuckereinheiten von GNA wie ein Oligosaccharid erkannt werden. Außerdem scheinen nicht unbedingt Mannoseeinheiten nötig zu sein, um Man- α -1,3-Man Oligomere zu imitieren, denn **48** hat mit seinen beiden Glucoseeinheiten eine ähnlich hohe Affinität zu GNA wie **50** mit zwei Mannoseeinheiten.

5. Praktischer Teil

5.1 Verwendete Chemikalien

AEC (Aldrich), Asparaginsäurederivate (Novabiochem), Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorosphat (Fluka), Benzoylchlorid (Fluka), Benzyloxycarbonylchlorid (Aldrich), Bromwasserstoff in Essigsäure 33% (Fluka), Carbonyldiimidazol (Fluka), *tert*-Butyl-dicarbonat (Acros), DBU (Aldrich), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (Fluka), Diisopropylcarbodiimid (Fluka), 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin (Fluka), Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (Fluka), Diisopropylethylamin (Fluka), 4-Dimethylaminopyridin (Merck), D-Galactose (Glycon Biochem), D-Glucose (Glycon Biochem), D-Mannose (Glycon Biochem), *N*-Acetylglucosamin (Glycon Biochem), 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (Aldrich), 1-Hydroxybenzotriazol (Aldrich), Lectine (Sigma-Aldrich / EY Laboratories INC.), Molekularsieb 3Å und 4Å (Roth), Natriummethanolat 5M in Methanol (Fluka), Pd auf Aktivkohle 10% (Fluka), Pentafluorphenol (Fluka), Piperidin (Riedel de Hæn), Rink-Amid-Linker (Novabiochem), TBTU (Novabiochem), *N,N*-Tetramethylfluorformamidinium hexafluorosphat (Fluka), Trichloracetonitril (Fluka), Triethylamin (Fluka), Trifluoressigsäure (Fluka), Tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorosphat BOP (Fluka),

5.2 Allgemein:

Zur Durchführung der Versuche sowie Isolierung und Charakterisierung wurden folgende Geräte verwendet:

NMR- Spektroskopie:

¹H- Spektren wurden auf Bruker AC 250 (250 MHz), Bruker Avance 400 (400 MHz), und Bruker AMX 600 (600 MHz) aufgenommen.

¹³C- Spektren wurden auf Bruker AC 250 (62.9 MHz), Bruker Avance 400 (100 MHz), und Bruker AMX 600 (151 MHz) aufgenommen.

Das deuterierte Lösungsmittel wurde als interner Standard verwendet.

Chemische Verschiebungen δ werden in parts per million (ppm) relativ zum internen Standard angegeben. Die Zuordnungen der Signale wurde durch Abgleich mit Vergleichssubstanzen, Inkrementberechnungen sowie ¹H-¹H- COSY sowie ¹³C-¹H-COSY- Experimente durchgeführt.

Bei Bedarf wurden weitere zweidimensionale Experimente durchgeführt (HMBC, HSQC, TOCSY, NOESY).

Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Die Multipletts werden mit folgenden Abkürzungen angegeben:

- s: Singulett
- d: Duplett
- t: Triplett
- q: Quartett
- m: Multiplett
- dd: Duplett eines Dupletts
- ddd: Duplett eines Dupletts eines Dupletts
- dt: Duplett eines Triplets
- b: breites Signal

Massenspektrometrie:

Massenspektrometer Finnigan TSQ 70 (EI) und Massenspektrometer Bruker Apex II FT-ICR-MS (FAB), Massenfeinbestimmungen erfolgten nach der Peak-Matching-Methode und der Ionisierungsmethode FAB.

Maldi-TOF: Bruker Autoflex. Die Spektren wurden mit α -Cyano-*m*-hydroxymzimtsäure als Matrix gemessen.

Elementaranalyse:

Die Elementaranalysen wurden mit einem Euro EA 300 der HEKAtech GmbH aufgenommen.

Drehwerte:

Polarimeter Modell 341 der Firma Perkin Elmer. Die Messungen wurden bei 20° C in einer Quarzglasküvette mit 10 cm Länge bei einer Wellenlänge von 589 nm (Na-Lampe) durchgeführt.

Schmelzpunkte:

Schmelzpunktbestimmungsapparatur Büchi SMP -20 in Siliconöl.

Schmelzpunktbestimmungsapparatur Büchi B-540.

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

HPLC:

Präparative HPLC S1122 der Firma Sykam mit einer Normalphasensäule (Saphir 65 Si, 5µm 250 × 20 mm) der Firma Grom.

Analytische Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel Polygram SIL G/UV254 Fertigfolien der Firma Macherey & Nagel. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung oder Verkohlung mit 3% ethanolischer Schwefelsäurelösung. Zur Detektion freier Amine wurde eine 5% ethanolische Ninhydrinlösung verwendet.

Präparative Säulenchromatographie:

Glassäulen verschiedener Größe gefüllt mit Kieselgel der Größe 0.032-0.063 mm der Firma Macherey & Nagel. Die Laufmittel sind in den Arbeitsvorschriften angegeben.

Arbeitsweise:

Alle Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Methoden gereinigt und /oder getrocknet. Alle feuchtigkeits- und luftempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten und mit Argon gespülten Apparaturen unter Argon durchgeführt.

Lösung mit organischen Lösungsmitteln wurden vor dem Aufkonzentrieren mit wasserfreiem MgSO₄ getrocknet.

5.3 Umsetzungen

Zu 4.3.1

***p*-Aminomethylbenzylalkohol (13)**

20 g *p*-Cyanobenzaldehyd (0.1527 mol) werden in 200 ml abs. Diethylether gelöst. 10.5 g (0.276 mol) LiAlH₄ werden in 100 ml abs. Diethylether suspendiert und langsam zugetropft, so dass die Reaktionslösung leicht siedet. Die entstehende Kruste wird durch gelegentliches Schwenken von der Wand des Kolbens gelöst. Nach Beendigung der Reaktion wird überschüssiges LiAlH₄ unter Eiskühlung langsam mit Wasser hydrolysiert. Die Reaktionsmischung wird in einen Perforator überführt und drei Tage lang mit Diethylether perforiert.

Das Rohprodukt wird einrotiert und direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 8.1 g (59 mmol, 39%) (Lit ^[146]: 68%)

5 g *p*-Cyanobenzaldehyd (0.0382 mol) werden in 50 ml Methanol gelöst und es werden im Argongegenstrom 50 mg Pd / C zugegeben.

Die Reaktionsmischung wird bei RT und Umgebungsdruck 24 h lang unter H₂-Atmosphäre hydriert (DC – Kontrolle, da die Reaktionszeiten je nach Aktivität des Katalysators stark variieren können. Das Pd / C wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wird direkt weiter umgesetzt.

***N*-benzyloxycarbonyl-*p*-aminomethylbenzylalkohol (14)**

5.07 g *p*-Methylaminobenzylalkohol (13) (37 mmol) werden in 50 ml DCM gelöst. Dazu werden 70 ml 1M wässrige Natriumcarbonat-Lösung gegeben. Die Reaktionslösung wird auf 0° C gekühlt und 5.2 ml Benzyloxycarbonylchlorid (6.29 g, 37 mmol) in 50 ml Dichlormethan werden langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt, die organische Phase wird abgetrennt, mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt wird säulenchromatographisch abgetrennt (100 % Toluol, dann Toluol : Aceton = 10 : 1).

Ausbeute: 8.8 g (32 mmol, 85 %)über zwei Stufen (Hydrierung und Z-Schützung)

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.37 – 7.27 (m, 9H, Aryl), 5.14 (s, 2H, CH₂-NHCOO), 4.68 (s, 2H, O-CH₂), 4.38 (d, 2H, J = 5.56 Hz, NH-CH₂).

^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 156.6$ (NCOO), 140.4, 17.98, 136.6, 128.7, 128.4, 128.3, 127.9, 127.5 (Aryl), 67.1 (NHCOO- CH_2), 65.1 (O- CH_2), 45.0 (NH- CH_2).

Smp. 120°C

m / z für $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (FAB) = 294.0 (m + Na^+)

EA:

Ber: C: 70.83 H: 6.32 N: 5.16

Gef: C: 71.12 H: 6.24 N: 4.96

***N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-*p*-aminomethylbenzylalkohol^[237] (15)**

2.301 g *p*-Methylaminobenzylalkohol (**14**) (16.8 mmol) und 4.35 g Fmoc – Chlorid (16.8 mmol) werden in 20 ml Dichlormethan gelöst. Dazu werden 30 ml 1M wässrige NaHCO_3 -Lösung gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt, die organische Phase wird abgetrennt, mit MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Das Produkt wird aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute: 5.25 g (14.6 mmol, 87%)

Smp. 178°C

m/z für $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ (FAB): 360.2 (M + H)⁺, 382.1 (M + Na)⁺

Zu 4.3.2

AAV 1 Perbenzoylierung von Hexosen

0.17 mol Hexose (30.6 g) werden in 300 ml trockenem Pyridin gelöst und 193 ml (1.67 mol) Benzoylchlorid werden bei 0 ° C zugetropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und anschließend für 1 h auf 70 ° C erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Mischung auf Eiswasser gegossen und dreimal mit je 200 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen werden dreimal mit je 300 ml 1 N Salzsäure, einmal mit Wasser, zweimal mit je 200 ml ges. NaHCO₃-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen.

Die organische Phase wird mit MgSO₄ getrocknet und am Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird mit Toluol coevaporiert, bis kein Geruch nach Pyridin mehr festzustellen ist. Das Produkt wird Säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Toluol: Aceton 30 : 1).

1,2,3,4,6-Penta-O-benzoyl-β-D-glucopyranose (1)

Smp. = 185 °C (187 °C^[238])(Ethanol)

Ausbeute: 80 %

NMR- Spektren entsprechen der Literatur^[238]

1,2,3,4,6-Penta-O- benzoyl-β-D-galactopyranose (3)

Smp. = 150 °C (151 °C^[226]) (Ethanol)

Ausbeute: 80 %

NMR- Spektren entsprechen der Literatur^[238]

1,2,3,4,6-Penta-O- benzoyl-α-D-mannopyranose (2)

m.p. = 159 °C (161 °C^[226]) (Ethanol)

Ausbeute: 60 %

NMR- Spektren entsprechen der Literatur^[238]

1,2,3,4-Tetra-O-benzoyl-α-LRhamnopyranose (4)

Smp.: 200 °C (199 °C^[239])(Ethanol)

AAV 2 Bromierung perbenzoylierter Hexosen

15 g der perbenzoylierten Hexose aus AAV 1 werden in 50 ml DCM gelöst. Die Lösung wird auf 0 ° C abgekühlt und es werden 12 ml (68 mmol) 33 % Bromwasserstoff in Eisessig zugetropft. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur weitere 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wird auf Eiswasser gegossen und die organische Phase mit ges. NaHCO₃-Lösung und nochmals mit Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. ^[240]

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-1-brom-β-D-glucopyranose (5)

Ausbeute: 12 g (87 %, 18.2 mmol)

NMR- Spektren entsprechen der Literatur ^[241]

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-1-brom-β-D-galactopyranose (7)

Ausbeute: 11.6 g (84 %, 17.6 mmol)

NMR- Spektren entsprechen der Literatur ^[242]

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl-1-brom-α-D-mannopyranose (6)

Ausbeute: 11.0 g (80 %, 16.8 mmol)

NMR- Spektren entsprechen der Literatur ^[243]

2,3,4,-Tri-*O*-benzoyl-1-brom-β-L-rhamnopyranose (8)

Ausbeute: 9,8g (92% der Theorie)

Smp.: 159°C (164°C ^[239]) (CH₂Cl₂)

AAV3 1-OH-Benzoylhexose

16 mmol der bromierten Benzoylhexose aus AAV 2 werden in einer Mischung aus 50ml H₂O und 50ml Aceton gelöst und mit 10 g NaI für 24 h bei 40 °C gerührt.

Der im Vakuum konzentrierte Rückstand wird in 100ml CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 50 ml H₂O, 50 ml ges. NaHCO₃-Lsg., 50 ml ges. Na₂S₂O₃-Lsg. und 50 ml H₂O gewaschen.

Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und am Hochvakuum eingedampft. Es entsteht ein farbloser Schaum.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-β-D-glucopyranose (9)

NMR- Spektren entsprechen der Literatur^{[244] [245]}

Ausbeute: 7,8g (11.7 mmol) 73%

m/z (FAB) = 619.0 (m +Na⁺)

$[\alpha]_D^{20} = 72^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

Smp. = 118°C (CH₂Cl₂)

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-α-D-mannopyranose (10)

NMR- Spektren entsprechen der Literatur^[244]

Ausbeute: 6.7 g (10.8 mmol) 63%

m/z (FAB) = 619.0 (m +Na⁺)

$[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-β-D-galactopyranose (11)

NMR- Spektren entsprechen der Literatur^[246]

Ausbeute: 7.7 g (11.5 mmol) 72 %

m/z (FAB) = 619.0 (m +Na⁺)

$[\alpha]_D^{20} = +100^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

2,3,4,-Tri-O-benzoyl-β-L-rhamnopyranose (12)

NMR- Spektren entsprechen der Literatur^[239]

Smp.: 205°C (Toluol)

$[\alpha]_D^{20} = 158^\circ$ (c = 0.42, CHCl₃)

Ausbeute: 6.5 g (13.6 mmol) 85 %

AAV 4 Trichloracetimide

Unter Inertbedingungen werden 125 μ l (0.85 mmol) DBU bei 0° C zu einer Lösung von 1.7 ml (17 mmol) Trichloracetonitril und 5 g (8.4 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-benzoylhexopyranose in 40 ml Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt, im Vakuum eingeeengt und das Produkt wird durch Flashchromatographie (Tol : Aceton 10 : 1) abgetrennt.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl - β -D-glucopyranosyltrichloracetimidat (52)

Ausbeute: 4.47g (6.05 mmol, 72%)

$$[\alpha]_D^{20} = 82^\circ (c=1, \text{CHCl}_3)$$

NMR – Daten entsprechen der Literatur^[247]

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl - β -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (54)

Ausbeute: 5.5g (6.7 mmol, 80%)

$$[\alpha]_D^{20} = 141^\circ (c=1, \text{CHCl}_3)$$

Smp 140° C

NMR – Daten entsprechen der Literatur^[248]

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl - α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat (53)

Ausbeute: 5.0g (6.1 mmol, 73%)

$$[\alpha]_D^{20} = -37^\circ (c=1, \text{CHCl}_3)$$

NMR – Daten entsprechen der Literatur^[247]

2,3,4,-Tri-O-benzoyl - β -L-rhamnopyranosyltrichloracetimidat (55)

Aus 5g (10,5mmol) Edukt

Ausbeute: 4.55g (7.03 mmol, 70%)

$$[\alpha]_D^{20} = +148.3^\circ (c=1, \text{CHCl}_3)$$

Smp = 146° C (CH₂Cl₂)

NMR – Daten entsprechen der Literatur^[249]

AAV 5 Glycosylierung nach der Trichloracetimidat Methode

Unter Inertbedingungen werden zu einer Lösung von 6 g (8.1 mmol) des Trichloracetimidats (AAV 4) und 2g (7.4 mmol) **14** in 200 ml trockenem DCM bei -20° C 8 µl (0.04 mmol) TMSOTf zugegeben.

Nach 30 min (DC –Kontrolle) gibt man 0.2 ml Pyridin zur Reaktionsmischung. Das Produkt wird am Vakuum eingeeengt, das Pyridin mit Toluol coevaporiert. Das Produkt wird mittels Flash – Säulenchromatographie filtriert, eingeeengt und am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird roh in AAV 6 eingesetzt.

[*p*-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-β-D-glucopyranosid (16)

Ansatz: 3.0g (4,1 mmol)

Ausbeute: 3.0g (3.5 mmol, 85%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.97–7.74 (m, 8H, Aryl), 7.50-7.18 (m, 17H, Aryl), 7.04 (m, 4H, Aryl), 5.78 (t, 1H, H-3, *J*_{H3-H4}=9.6 Hz), 5.62 (t, 1H, H-4, *J*_{H4-H5}= 9.6 Hz), 5.53 (m, 1H, H-2, *J*_{H2-H3}= 9.5 Hz), 5.08 (s, 2H, Spacer-O-CH₂-Ph), 5.00 (bs, 1H, NH), 4.81(d, 1H, Z-CH₂-Ph *J*=12,6 Hz), 4.61 (d, 1H, Z-CH₂-Ph, *J* = 12,6 Hz), 4.75 (d, 1H, 1-H, *J*_{H1-H2}= 7.8 Hz), 4.56 (d, 1H, H-6a, *J*_{H5-H6a}=3.0 Hz), 4.44 (dd, 1H, H-6b, *J*_{H5-H6b}=5.3Hz), 4.25 (d, 2H, NH-CH₂-Ph), 4.03 (m, 1H, C-5).

¹³C NMR (CDCl₃): δ=166.3, 165.9, 165.3, 165.2 (CO-Bz), 156.5 (Z-CO Spacer) 138.3,135.2, 133.6, 133.4, 133.4, 133.3, 130.0, 129.9, 129.9, 129.4, 128.9, 128.9, 128.7, 128.5, 128.5. 128.4, 128.3, 128.2, 127.7 (Aryl), 99.4 (C-1), 73.0 (C-3), 72.4 (C-2), 71.9 (C-4), 70.4 (C-5), 69.9 (Z-CH₂Ph), 67.0 (O-CH₂Ph), 63.2 (C-6), 44.9 (NH-CH₂Ph).

m/z (Fab) (*m* + H)⁺ = 850.2, (ber.: 850.28)

EA: C H N

Ber.: 71.78 5.04 1.71

Gef.: 70.66 5.10 1.65

[*p*-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl-α-D-mannopyranosid (17)

Ansatz: 5.2g (7 mmol)

Wird direkt weiter umgesetzt.

[*p*-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-galactopyranosid (18)

Ansatz: 6g (8.1 mmol)

Wird direkt weiter umgesetzt.

[*p*-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4-tetra-*O*-benzoyl - β -L-rhamnopyranosid (19)

Ansatz: 4g (6.5 mmol)

Wird direkt weiter umgesetzt.

AAV 6 Zemplén – Entschützung und Acetylierung

Zu einer Lösung von 4.9 mmol (oder entsprechend der Ansatzgröße umgerechneten Mengen) des Benzoyl- geschützten Glycosids aus AAV 5 in 35 ml trockenem Methanol unter Argon werden unter Rühren 870 μ l einer 1 M NaOMe- Lösung zugespritzt. Die Reaktionslösung wird 3h bei Raumtemperatur gerührt und der vollständige Umsatz mittels DC überprüft (DCM : Methanol = 20 : 1). Die Reaktionslösung wird mit Dowex – Ionentauscher (H^+ -Form) unter Schütteln neutralisiert, der Ionentauscher abfiltriert , die Lösung am Vakuum eingengt und am Hochvakuum getrocknet.

Das entschützte Glycosid wird in 60 ml trockenem Pyridin gelöst und 9 ml (9.72 g, 95 mmol) Essigsäureanhydrid werden bei 0° C zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 3h lang gerührt, auf 200ml Eiswasser gegossen und dreimal mit je 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 100 ml 1 N Salzsäure, einmal mit Wasser, zweimal mit je 200 ml ges. wässriger $NaHCO_3$ -Lösung und noch einmal mit Wasser gewaschen.

Die organische Phase wird abgetrennt, mit $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert und am Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird mehrmals mit Toluol coevaporiert.

Das Produkt wird durch Säulenchromatographie abgetrennt (Kieselgel, Toluol:Aceton = 20:1) und fällt als farbloser, amorpher Schaum an.

[p-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosid (20)

¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7.18-7.29 (m, 9H, Aryl), 5.10 (t, 1H, H-3, J_{H3-H4}=9.6 Hz), 5.07 (s, 2H, Spacer-Z-CH₂-Ph), 5.03 (t, 1H, H-4, J_{H4-H5}= 9.6 Hz), 4.99 (t, 1H, H-2, J_{H2-H3}= 9.09 Hz), 4.80 (d, 1H, O-CH₂-Ph, J=12.38 Hz), 4.53 (d, 1H, O-CH₂-Ph, J=12.38 Hz), 4.46 (d, 1H, 1-H, J_{H1-H2}= 7.89 Hz), 4.31 (d, 2H, NH O-CH₂-Ph), 4.20 (d, 1H, H-6a, J_{H5-H6a}=4.55 Hz), 4.09 (dd, 1H, H-6b, J_{H5-H6b}=2.27Hz, J_{H6a-H6b}= 12.38 Hz), 3.58-3.61 (m, 1H, C-5), 2.03 (s, 3H, Acetyl- CH₃), 1.95 (s, 3H, Acetyl- CH₃), 1.94 (s, 3H, Acetyl- CH₃), 1.93 (s, 3H, Acetyl- CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ=170.8, 170.4, 169.5, 169.4 (COO Acetyl), 156.5 (NCO-O Spacer), 138.4, 136.5, 136.1, 128.7, 128.3, 127.8 (Aryl), 99.4 (C1), 72.9 (C-3), 72.0 (C-2), 71.4 (C-4), 70.5 (C-5), 68.5 (Z-CH₂-Ph), 67.0 (O-CH₂-Ph), 62.1 (C-6), 45.0 (NH-CH₂-Ph), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (Acetyl-CH₃).

Ansatz: 3g (3.5 mmol)

Ausbeute: 1.7 g (2.8 mmol) 80%

m/z (Fab) [m + H]⁺ = 602.2, (ber. 602.22)

[α]_D²⁰ = -36.7° (c = 1, CHCl₃)

EA:	C	H	N
Ber.:	59.89	5.86	2.33
Gef.:	59.83	5.90	2.10

[p-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosid (22)

¹H-NMR (CDCl₃):δ= 7.30-7.20 (m, 9H, Aryl), 5.33 (d, 1H, H-4, J_{H3-H4}=2.78 Hz), 5.22 (dd, 1H, H-2, J_{H2-H3}= 10.36 Hz), 5.08 (s, 2H, Z-CH₂-Ph), 5.04 (bs, NH), 4.93 (dd, 1H, H-3), 4.83 (d, 1H, O-CH₂-Ph J=12.12 Hz), 4.55 (d, 1H, O-CH₂-Ph J=12.12 Hz), 4.45 (d, 1H, 1-H, J_{H1-H2}= 8.08Hz), 4.33 (bs, 2H, NH-CH₂-Ph), 4.17-5.05 (m, 2H, H-6a, J_{H5-H6a}=6.56 Hz, H-6b, J_{H5-H6b}=6.57Hz), 3.82 (t, 1H, C-5), 2.10 (s, 3H,CH₃ Acetyl), 2.01 (s, 3H,CH₃ Acetyl), 1.96 (s, 3H,CH₃ Acetyl), 1.92 (s, 3H,CH₃ Acetyl).

¹³C-NMR(CDCl₃):δ=170.4, 170.3, 169.5, 169.4 (COO Acetat), 156.5 (NCO-O Spacer) 138.4, 136.5, 136.1, 128.7, 128.3, 128.3, 128.2, 127.8, (m, Aryl), 99.9 (C1), 71.0(C-3), 70.8 (C-5), 70.5 (Bz-Z), 68.9 (C-2), 67.2 (O-CH₂-Ph),67.0 (C-4), 61.4 (C-6), 44.9 (NH-CH₂-Ph), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (Acetyl- CH₃)

m/z (Fab) $[m + H]^+ = 602.2$ (ber.: 602.22)

Ansatz: 6g (8.1 mmol) in AAV 5

Ausbeute: 3.36 g (5.59 mmol) 69%

$[\alpha]_D^{20} = -33.5^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

EA: C H N

Ber.: 59.89 5.86 2.33

Gef.: 59.60 5.83 2.04

[*p*-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (21)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 7.22-7.29$ (m, 9H, Aryl), 5.30 (dd, 1H, H-3, $J_{H3-H4} = 9.86$ Hz), 5.23 (d, 1H, H-4), 5.19-5.20 (m, 1H, H-2, $J_{H2-H3} = 3.28$ Hz), 5.06 (s, 3H, Z-CH₂-Ph, NH), 4.79 (bs, 1H, 1-H, $J_{H1-H2} = 1.27$ Hz), 4.62 (d, 1H, O-CH₂-Ph $J = 11.87$ Hz), 4.46 (d, 1H, O-CH₂-Ph $J = 11.87$ Hz), 4.31 (d, 2H, NH-CH₂-Ph), 4.19 (dd, 1H, H-6a, $J_{H5-H6a} = 5.05$ Hz), 3.98 (dd, 1H, H-6b, $J_{H5-H6b} = 2.27$ Hz, $J_{H6a-H6b} = 12.38$ Hz), 3.90-3.94 (m, 1H, C-5), 2.06 (s, 3H, CH₃ Acetyl), 2.04 (s, 3H, CH₃ Acetyl), 1.96 (s, 3H, CH₃ Acetyl), 1.91 (s, 3H, CH₃ Acetyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 170.8, 170.1, 170.0, 169.8$ (COO Acetat), 156.5 (NCOO Spacer) 138.7, 136.6, 135.6, 128.7, 128.7, 128.3, 127.9, (m, Aryl), 96.8 (C1), 69.7 (C-2), 69.5 (O-CH₂-Ph), 69.2 (C-3), 68.8 (C-5), 67.0 (Z-CH₂-Ph), 66.3 (C-4), 62.5 (C-6), 44.9 (NH-CH₂-Ph), 21.0, 20.9, 20.8, 20.8, (Acetyl-CH₃)

Ansatz: 5.54g (7,6 mmol) in AAV 5)

Ausbeute: 3.42 g, (5,7 mmol) 76%

m/z (Fab) $[m + H]^+ = 602.1$, (ber.: 602.22)

$[\alpha]_D^{20} = +42^\circ$ (c = 1, CHCl₃)

EA: C H N

Ber.: 59.89 5.86 2.33

Gef.: 59.74 5.87 2.07

[*p*-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2,3,4-tetra-*O*-acetyl- β -L-rhamnopyranosid (23)

Ansatz: 4g (6.5 mmol) in AAV 5

Das Produkt aus AAV 6 wird direkt in AAV 7 eingesetzt.

Zu 4.3.3

2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucoopyranosid (28)

Zu einer Lösung von 24.7g (0.11 mol) N-Acetylglucosamin in 250 ml trockenem Pyridin werden bei 0° C 84 ml (85.09 g, 0.83 mol) AcOAc zugegeben. Nach fünf Minuten wird das Eis entfernt und die Reaktionslösung noch 1,5 h weitergerührt (DC- Kontrolle). Die Reaktionslösung wird auf 1,5 l Eiswasser gegossen und die wässrige Phase dreimal mit je 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden fünf mal mit je 300 ml 1 N HCl, mit 300 ml Wasser, mit 300 ml ges. NaHCO₃- Lsg. und nochmals mit Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und im Vakuum eingengt. Das Produkt wird mehrmals mit Toluol coevaporiert.

Das Produkt wird aus Petrolether (60°-95°) umkristallisiert und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 38.4 g (0.096 mol) = 86%

NMR- Daten entsprechen der Literatur^[157]

2-Phenyl-4,5-dihydro-(3,4,6-tri-O-acetyl-1,2-dideoxy- α -D-glucoopyranoso)[2.1-d]-1.3-oxazol (29)

Zu einer Lösung von 6 g (15.42 mmol) **28** in 100 ml Dichlormethan werden 24 ml (0.92 mmol) BF₃ · Et₂O gegeben und die Reaktionslösung 48 h bei RT gerührt.

Die Reaktionslösung wird mit 100 ml Wasser, 100 ml ges. NaHCO₃- Lsg. und nochmals mit 100 ml Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet, im Vakuum eingengt und am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: Quantitativ

NMR- Daten entsprechen der Literatur^{[158] [159]}

m/z (FAB) = 330.1 [m+H]⁺ (ber.: 330.11)

[*p*-(N-Benzyloxycarbonylaminomethyl)]benzyl-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid (30)

Zu einer Lösung von 454 mg (1.38 mmol) durch mehrfaches Coevaporieren mit abs. Toluol getrocknetem **29** in 20 ml abs. DCM werden 204 mg (1.52 mmol) frisch getrocknetes CuCl₂ gegeben und die grünliche Reaktionslösung unter Argon 50 h unter Rückfluss erhitzt.

Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und das Produkt mittels Flash-Chromatographie (Silicagel, Toluol : Aceton = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 0.245 g (0.415 mmol) = 30 %

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.34-7.23 (m, 9H, Aryl), 5.41 (d, 1H, J = 8.85 Hz, HNAc), 5.25 (t, 1H, H-3, J_{H3-H4} = 9.60 Hz), 5.12 (s, 2H, CH₂-Z), 5.06 (t, 1H, H-4, J_{H4-H5} = 9.60 Hz), 4.84 (dd, 2H, O-CH₂-Ph, J = 12.12 Hz), 4.60 (d, 1H, J_{H1-H2} = 8.59 Hz, 1-H), 4.56 (dd, 2H, O-CH₂-Ph, J = 12.12 Hz), 4.36 (d, 2H, J = 6.07 Hz, NH-CH₂-Ph), 4.25 (dd, 1H, H-6a, J_{H5-H6a} = 4.80 Hz, J_{H6a-H6b} = 12.38 Hz), 4.14 (dd, 1H, H-6b, J_{H5-H6b} = 2.02 Hz, J_{H6a-H6b} = 12.38 Hz), 3.93 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 18.95 Hz, H-2), 3.64 (m, 1H, C-5), 2.08 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 2.00 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.89 (s, 3H, Acetyl-CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 171.2, 171.0, 170.4, 169.6 (COO-Acetat), 150.9 (NCOO-Z), 138.6, 136.6, 136.4, 128.8, 128.6, 128.4, 128.2, 127.8, (Aryl), 99.6 (C1), 72.6 (C-3), 72.1 (C-5), 70.5 (O-CH₂-Ph), 68.7 (C-4), 62.3 (C-6), 54.8 (C-2), 45.0 (NH-CH₂-Ph), 23.5, 21.0, 20.9, 20.8 (Acetyl-CH₃).

$[\alpha]_D^{20} = -29.1^\circ$ (CHCl₃)

Smp.: 125 °C

m/z (m+Na)⁺ = 623.1, ber.: 623.23

EA:	C	H	N
ber.:	59.99	6.04	4.66
gef.:	60.09	6.19	4.47

Zu 4.3.4***N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- α -pentafluorphenyl- β -*tert*-butyl-L-asparaginat** ^[250] ^[62]**(56)**

Eine Lösung von 2,24g (12.16mmol) Pentafluorphenol und 5g (12.16mmol) *N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl- β -*tert*-butyl-L-asparaginsäure in 50ml EtOAc wird auf 0° C gekühlt und 5g (12.66mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben.

Das Reaktionsgemisch wird 4h bei RT gerührt.

Der ausgefallene *N*-Cyclohexylharnstoff wird über Cellite abfiltriert, das Lösungsmittel am Vakuum abgezogen.

Das Produktgemisch wird an Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, EtOAc:Petrolether =1:2).

Ausbeute: 5,4 g (9,3mmol) = 86%.

NMR – Daten entsprechen der Literatur^[251]

AAV 7 : Hydrieren der Benzyloxycarbonyl – geschützten Aminofunktion und Kupplung mit *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- α -pentafluorphenyl- β -*tert*-butyl-L-asparaginat (56)

Zu einer Lösung von 5 mmol (oder dem entsprechend berechneten Ansatz) des *Z* – geschützten Glycosids aus AAV 6 **20, 21, 22, 23, 30** in 70 ml Methanol werden im Argongegenstrom 50 mg Pd auf Kohlenstoff gegeben und die Reaktionsmischung wird unter H₂-Atmosphäre hydriert. Nach 3 min Rühren wird die Reaktion abgebrochen und eine Reaktionskontrolle durchgeführt. Je nach Fortschritt wird weiter hydriert und regelmäßig in kurzen Abständen eine Reaktionskontrolle durchgeführt. Ist das Edukt auf der DC verschwunden und noch kein verkohlbarer, nicht UV – aktiver Spot auf der DC zu erkennen, wird die Reaktion abgebrochen, die Reaktionsmischung über Celite abfiltriert und im Vakuum eingengt.

Das entstandene Amin wird in 70 ml Ethylacetat gelöst und es werden 5 mmol *N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl- α -pentafluorphenyl- β -*tert*-butyl-L-asparaginat (56) zugegeben und die Reaktionsmischung wird 4h bei RT gerührt.

Das Produkt wird im Vakuum eingengt und säulenchromatographisch abgetrennt (Kieselgel, Toluol : Aceton = 20 : 1).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (24)**

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.67- 7.70 (q, 2H, Fmoc-Aryl), 7.49 (d, 2H, Fmoc-Aryl) 7.19-7.35 (m, 4H, Aryl Spacer), 7.15 (s, 4H, Fmoc-Aryl) 6,73 (s, 1H, NH Spacer), 5.89 (d, 1H, CH-NH-CO), 5.10 (t, 1H, H-3, $J_{\text{H}_3\text{-H}_4}$ =9.4 Hz), 5.03 (t, 1H, H-4, $J_{\text{H}_4\text{-H}_5}$ = 9.6 Hz), 4.99 (t, 1H, H-2, $J_{\text{H}_2\text{-H}_3}$ = 9.09 Hz), 4.81 (d, 1H, O- CH_2 -Ph, J =12.38 Hz), 4.51 (d, 1H, O- CH_2 -Ph, J =12.38 Hz), 4.46 (m, 2H, 1-H, $J_{\text{H}_1\text{-H}_2}$ = 7.83 Hz, CH Asp), 4.37 (m, 3H, NH- CH_2 -Ph, CH_2 -Fmoc), 4.19 (dd, 1H, H-6a, $J_{\text{H}_5\text{-H}_6\text{a}}$ =4.55 Hz, $J_{\text{H}_6\text{a-H}_6\text{b}}$ = 12.38 Hz), 4.09 (d, 1H, CH Asp), 4.13 (dd, 1H, H-6b, $J_{\text{H}_5\text{-H}_6\text{b}}$ =2.27Hz, $J_{\text{H}_6\text{a-H}_6\text{b}}$ = 12.38 Hz), 3.57-3.60 (m, 1H, C-5), 2.90, 2.55 (2dd, 2H, CH_2 Asp), 2.03 (s, 3H, CH_3 -Acetyl), 1.94 (s, 3H, CH_3 -Acetyl), 1.93 (s, 3H, CH_3 -Acetyl), 1.926 (s, 3H, CH_3 -Acetyl), 1,37 (s, 9H, *t*Bu).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 171.4, 170.8, 170.5, 170.4, 169.5 (COO Acetat), 169,4 (COO Asp, NCOO Fmoc), 143.8, 141.5, 137.9, 136.1, 128.7, 128.2, 127.9, 127.8, 127.2, 125.1, 120.2 (m, Aryl), 99.4 (C-1), 82.1 (C-(CH_3)₃), 73.0 (C-3), 71.4 (C-2), 72.0(C-5), 71.4 (O- CH_2 -Ph), 68.5 (C-4), 67.3 (Fmoc- CH_2), 62.0 (C-6), 51.3 (CH-Asp), 47.3 (CH Fmoc), 43.4 (NH- CH_2 -Ph), 37.5 (CH_2 Asp), 28.2 (CH_3 *t*Bu), 20.9, 20.8, 20.8 (Acetyl- CH_3)

Ansatz: 4.3g (5mmol) **20**

Ausbeute: 3.65g (4.25 mmol) 85 %

m/z (Fab) $[m + \text{Na}]^+ = 883.1$, (ber.: 883.34)

$[\alpha]_D^{20}$ - 14.4° (c = 1, CHCl_3)

EA: C H N

Ber.: 62.78 6.09 3.25

Gef.: 62.06 6.12 2.93

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (26)**

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.69- 7.67 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.49 (m, 2H, Fmoc-Aryl) 7.19-7.34 (m, 4H, Aryl Spacer), 7.15 (s, 4H, Fmoc-Aryl) 6,73 (s, 1H, NH Spacer), 5.90, (d, 1H, CH-NH-CO), 5.31(d, 1H, H-4, $J_{\text{H}_3\text{-H}_4}$ =3.03 Hz), 5.20 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{H}_2\text{-H}_3}$ = 10.35 Hz), 4.91 (dd, 1H, H-3), 4.80 (d, 1H, O- CH_2 -Ph J =12.38 Hz), 4.52 (d, 1H, O- CH_2 -Ph J =12.38 Hz), 4.48 (b, 1H, CH-Asp), 4.42 (d, 1H, 1-H, $J_{\text{H}_1\text{-H}_2}$ = 8.09 Hz), 4.35-4.38 (m, 4H, NH- CH_2 -Ph, CH_2 -Fmoc), 4.04-4.16 (m, 3H ,H-6a,b $J_{\text{H}_5\text{-H}_6\text{b}}$ $J_{\text{H}_5\text{-H}_6\text{a}}$ =6.56 Hz, Fmoc-CH), 3.80 (t, 1H, C-5), 2.89, 2.55

(2dd, 2H, CH₂ Asp), 2.08 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.98 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.94 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.90 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.36 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C NMR(CDCl₃): δ= 171.9, 170.4, 170.2, 170.2, (COO Acetat), 169,5 (COO Asp), 156.2 (NCOO Fmoc), 143.8, 141.4, 137.9, 127.9, 127.8, 127.2, 125.1, 120.2, (Aryl), 99.9 (C-1), 82.1 C-(CH₃)₃, 71.0 (C-3), 70.8 (CH-Fmoc), 70.4(O-CH₂-Ph), 68.9 (C-5, C-2) 67.2 (Fmoc CH₂, C-4), 61.4(C-6), 51.3 (CH-Asp), 47.3 (CH Fmoc), 43.4 (NH-CH₂-Ph), 37.5 (CH₂ Asp), 28.2 (CH₃ *t* Bu), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (Acetyl- CH₃)

Ansatz: 1.86 g (3.1 mmol) [22]

Ausbeute 1.12 g (1.3 mmol) 42 %

m/z (Fab) [m + Na]⁺ = 883.2, (ber.: 883.34)

[α]_D²⁰ = + 10.3° (c = 1.0, CHCl₃)

EA	C	H	N
----	---	---	---

Ber.:	62.78	6.09	3.25
-------	-------	------	------

Gef.:	62.61	5.99	2.91
-------	-------	------	------

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[*p*-aminomethylbenzyl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (25)**

¹H NMR (CDCl₃): δ= 7.68 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.49 (d, 2H, Fmoc-Aryl) 7.16-7.35 (m, 8H, Aryl Spacer, Fmoc), 6,77 (s, 1H, NH Spacer), 5.91 (d, 1H, CH-NH-CO), 5.30(dd, 1H, H-3, J_{H3-H4}=10.11 Hz), 5.23 (d, 1H, H-4), 5.20 (m, 1H, H-2, J_{H2-H3}= 3.03 Hz), 4.80 (bs, 1H, 1-H, J_{H1-H2}= 2.18 Hz), 4.59 (d, 1H, O-CH₂-Ph, J=4.87 Hz), 4.48 (bs, 1H, CH-Asp), 4.45 (d, 1H, O-CH₂-Ph J=11.87 Hz), 4.35-4.42 (m, 4H, NH- CH₂-Ph, CH₂-Fmoc), 4.19 (q, 1H ,H-6a J_{H6a-H6b}=12.13Hz, J_{H5-H6a}=5.05Hz), 4.12 (t, 1H, Fmoc-CH), 3.97 (dd, 1H, H-6b J_{H5-H6b}=12.39Hz), 3.91-3.93 (m, 1H, C-5), 2.89-2.56 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.06 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 2.03 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.96 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 1.91 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1,37 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C NMR(CDCl₃): δ= 171.4, 170.8, 170.5, 170.1, 170.0 (COO) 169.9 (CONH Asp), 156.2 (NCOO Fmoc), 143.8, 141.4, 138.2, 135.6, 128.7, 127.9, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Aryl), 96.8 (C-1), 82.1 C-(CH₃)₃, 69.7 (C-2), 69.5 (O-CH₂-Ph), 69.3 (C-3), 68.7 (C-5), 67.3 (Fmoc-CH₂), 66.3 (C-4), 62.5 (C-6), 51.3 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc), 43.4 (NH-CH₂-Ph), 37.6 (CH₂ Asp), 28.2 (CH₃ *t*Bu), 21.0, 20.9, 20.8 , 20.8 (Acetyl- CH₃).

Ansatz: 2.15g (3.58 mmol) [21]

Ausbeute 1.62 g (1.88 mmol) 53 %

$$[\alpha]_D^{20} = +39.7^\circ \text{ (c = 1, CHCl}_3\text{)}$$

$$m/z \text{ (Fab) } [m + Na]^+ = 883.1, \text{ (ber.: 883.34)}$$

EA: C H N

Ber.: 62.78 6.09 3.25

Gef.: 62.81 6.31 2.97

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -L-rhamnopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (27)**

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.72 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.54 (m, 2H, Fmoc-Aryl) 7.20-7.39 (m, 8H, Aryl Spacer, Fmoc), 6,75 (s, 1H, NH Spacer), 5.91 (bd, 1H, CH-NH-CO), 5.28(dd, 1H, H-3, J_{H3-H4} =12.88 Hz), 5.20 (d, 1H, H-2 J_{H2-H3} = 6.57 Hz), 5.00 (t, 1H, H-4, J_{H4-H5} = 10.10Hz), 4.71 (bs, 1H, 1-H, J_{H1-H2} = 1.52 Hz), 4.60 (d, 1H, O-CH₂-Ph J = 11.87 Hz), 4.47 (b, 1H, CH-Asp), 4.41 (d, 1H, O-CH₂-Ph J = 11.87 Hz), 4.35-4.39 (m, 4H, N- CH₂-Ph, CH₂-Fmoc), 4.12 (m,1H, Fmoc-CH), 3.79-3.85 (m, 1H, C-5), 2.57 – 2.96 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.06 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.97 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.91 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.36 (s, 9H, *t*Bu), 1.14 (d, 1H ,H-6 J_{H5-H6} = 6.06Hz).

¹³C-NMR(CDCl₃): δ = 171.5, 170.6, 170.3 (COO Acetat), 170.2, 170.1 (COO Asp), 156.4 (NCOO Fmoc) 143.8, 141.5, 138.0, 136.0, 128.6, 128.4, 128.0, 127.9, 127.3, 125.2, 120.2, (Aryl), 96.7 (C1) 82.2 (C-(CH₃)₃), 71.3 (C-4), 70.0 (C-2), 69.4 (C-3), 69.2 (O-CH₂-Ph), 67.3 (Fmoc-CH₂), 66.7 (C-5), 51.3 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc), 43.5 (NH-CH₂-Ph), 37.6 (CH₂ Asp), 28.2 (CH₃ *t*Bu), 21.1, 21.0, 20.9 (Acetyl- CH₃), 17.6 (C-6).

Ansatz: 4g (6.5 mmol) in AAV 5

Ausbeute: 0.61 g (0.76mmol) = 12%

$$m/z \text{ (Fab) } (m + Na)^+ = 825.2, \text{ (ber.: 825.33)}$$

$$[\alpha]_D^{20} = -27.8^\circ \text{ (c = 1, CHCl}_3\text{)}$$

EA: C H N

ber.: 65.47 6.64 3.55

gef.: 65.33 6.48 3.21

***N*- α -Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid]-L-asparaginsäure- β -tert-butylester (31)**

^1H NMR (CDCl_3): δ = 7.8 (dd, 2H, $J_1 = 2.78$ Hz, $J_2 = 7.33$ Hz, Fmoc-Aryl), 7.60 (bd, 2H, Spacer-Aryl) 7.44 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.35-7.21 (m, 4H, Fmoc-Aryl, Spacer-Aryl), 6.93 (s, 1H, Ph-CH₂-NH), 6.06 (bd, 1H, CH-NH-CO), 5.63 (bd, 1H, HNAc), 5.25 (t, 1H, H-3, $J_{\text{H}3-\text{H}4}=9.60$ Hz), 5.12 (t, 1H, H-4, $J_{\text{H}4-\text{H}5}= 9.60$ Hz), 4.87 (d, 1H, O-CH₂-Ph, $J=12.13$ Hz), 4.66 (d, 1H, $J_{\text{H}1-\text{H}2}= 8.34$ Hz, 1-H), 4.57 (d, 1H, O-CH₂-Ph, $J=12.13$ Hz), 4.58 (d, 1H, $J = 12.12$ Hz, CH Asp), 4.46 (m, 3H, Ph-CH₂-NH, Fmoc-CH), 4.45 (d, 2H, $J = 7.07$ Hz, Fmoc-CH₂), 4.31 (dd, 1H, H-6a, $J_{\text{H}5-\text{H}6a}=3.80$ Hz, $J_{\text{H}6a-\text{H}6b}= 12.38$ Hz), 4.25 (d, 2H, $J = 7.07$ Hz, Fmoc-CH₂), 4.19 (dd, 1H, H-6b, $J_{\text{H}5-\text{H}6b}=2.29$ Hz, $J_{\text{H}6a-\text{H}6b}= 12.38$ Hz), 4.00 (dd, 1H, $J_{\text{H}2-\text{H}3}= 10.11$ Hz, H-2), 3.68 (m, 1H, C-5), 2.98, 2.68 (2bdd, 2H, CH₂ Asp), 2,21(s, 3H, Acetyl- CH₃), 2.05 (s, 3H, Acetyl- CH₃), 1.93(s, 3H, Acetyl- CH₃), 1,49 (s, 9H, tBu)

^{13}C NMR(CDCl_3): δ = 171.4 171.1, 171.0, 170.7, 170.4, 169.6 (COO-Acetat, COO- Asp), 156.3 (NCOO-Fmoc), 143.8, 141.5, 138.0, 136.3, 128.6, 128.0, 127.8, 127.3, 125.5, 120.3 (Aryl), 99.6 (C1), 82.2(C-(CH₃)₃), 72.6 (C-3), 72.0 (C-5), 70.5 (O-CH₂-Ph), 68.8 (C-6), 62.3 (NH-CH₂-Ph), 54.7 (C-2), 51.4 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc), 43.5 (Fmoc CH₂), 37.6 (CH₂ Asp), 28.2 (CH₃ t Bu), 23.5, 21.0, 20.9, 20.8 (Acetyl- CH₃)

Ansatz: 0.25g (0.41 mmol) [30]

Ausbeute: = 0.28 g (0.33 mmol) 80 %

m/z (FAB) = $(m + \text{Na})^+ = 881.2$, (ber.: 881.35)

$[\alpha]_D^{20} = -29.2^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

EA:	C	H	N
ber.:	62.85	6.21	4.89
gef.:	63.02	6.41	4.61

Zu 4.4.1

Racematspaltung der Enantiomere (*R,R*) (33)-und (*S,S*)-*trans*-Cyclohexandicarbonsäure

19.36 g (20.4 ml, 0.16 mol) (*R*)- Phenylethylamin werden in 220 ml Ethanol gelöst und auf -78°C abgekühlt. Dazu werden langsam 27 g **32** (0.175 mol) gegeben.

Nach 10 min wird der Kryostat ausgeschaltet und die Reaktionsmischung erwärmt sich langsam, wobei sich das Edukt langsam vollständig löst.

Etwa 3min nach dem vollständigen Lösen fängt das Rohprodukt an, auszukristallisieren. Zu diesem Zeitpunkt wird das Rohprodukt nacheinander in mehreren Fraktionen mit einer Saugfritte abgetrennt.

Von den einzelnen Fraktionen werden jeweils Proben von etwa 20 mg in 1N HCl gelöst, die dabei entstehende freie Säure wird mit Diethylether extrahiert, die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Von den Proben werden Drehwerte mit $c=1$ gemessen und die Fraktionen mit negativem Wert unter -7° werden weiter verwendet.

Das Rohprodukt wird mehrmals aus Ethanol umkristallisiert. beim Kristallisieren wird nur auf Raumtemperatur abgekühlt, um die andere Fraktion in Lösung zu halten.

Nach dreimaligem Umkristallisieren wird wie oben beschrieben eine Probe genommen und der Drehwert bestimmt. Gegebenenfalls muss nochmals umkristallisiert werden.

Das so erhaltene Produkt wird in 1N HCl aufgelöst dreimal mit Diethylether extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert.

Ausbeute der (*R,R*)- *trans*-Cyclohexandicarbonsäure (**33**): 5.4 g (0.03 mol), 18%

$[\alpha]_D^{20} = -18.2^{\circ}$ ($c = 1.00$, Aceton) Lit.: -18.4° ($c=1.00$, Aceton)

Smp. = 178°C ^[164]

(*R,R*)- *trans*- 1,2-Cyclohexandicarbonsäureanhydrit 34

5.4 g [**33**] (0.031 mol) werden mit 20 ml Acetylchlorid zum Sieden erhitzt und so lange Acetylchlorid zugegeben (etwa 10 ml), bis sich das gesamte Edukt gelöst hat.

Das Acetylchlorid wird abgedampft und das Produkt am Hochvakuum getrocknet. [**34**] entsteht als farblose, kristalline Substanz.

Ausbeute: 4.8g (0.031 mol) **34**, quant.

Smp. = 162°C (Lit.: 163°C ^[252])

(*R,R*)- *trans*- 1,2-Cyclohexandicarbonsäuremonoamid 35

4.8 g (0.031mol) **34** werden in Dichlormethan gelöst und durch Einleiten von gasförmigem Ammoniak umgesetzt. Die Reaktion ist beendet, wenn ein weißer Feststoff ausgefallen ist und

das Reaktionsgefäß wieder abgekühlt ist. Nach Reaktionsende wird noch 15 min Druckluft durch die Reaktionsmischung geleitet um überschüssigen Ammoniak zu entfernen. Der entstandene weiße Feststoff wird in einer Saugfritte trockengesaugt und am Hochvakuum getrocknet

Ausbeute: 4.8 g (0.031 mol) **35**, quant.

(R,R)- trans- 2-Aminocyclohexylcarbonsäurehydrochlorid 36

12 g (27,8mmol) [Bis-(trifluoroacetoxy)iod]benzol (PIFA) werden in 100 ml Acetonitril/Wasser 1:1 gelöst. Dazu werden 4.8 g (28 mmol) **34** gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 600ml Wasser verdünnt und mit 60 ml konz. Salzsäure angesäuert. Iodbenzol und nicht umgesetztes PIFA werden dreimal ausgeethert. Die Etherphase wird dreimal mit 1M HCl gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen werden einrotiert, wobei das Hydrochlorid als farblose kristalline Substanz entsteht.

Das Produkt wird Aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert, wobei nach dem Abkühlen durch mehrfaches Einengen und Zugeben von Diethylether weiteres Produkt auskristallisiert wird.

Ausbeute: 4.05 g **36** (22.5 mmol) 81%

$[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ (c = 1.00, Wasser) ^[155]

NMR-Daten entsprechen der Literatur^[164]

Zu 4.4.2

N-Benzyloxycarbonyl-(R,R)- trans-2-aminocyclohexylcarbonsäure (60)

Eine Mischung von 11 ml 2M NaOH mit 3.2 ml (22.8 mmol) Benzyloxycarbonylchlorid wird auf 0 ° C gekühlt. Dazu werden 2g (11.7 mmol) AHC·HCl **36** in 11 ml 2M NaOH werden langsam zuge tropft. Die Reaktionsmischung wird langsam auf RT erwärmt und 48h bei RT gerührt. Das Produkt wird dreimal mit jeweils 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert, die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Das Produkt wird durch Flash- Säulenchromatographie (Tol:Aceton = 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.98 g (10.5 mmol) 90%

m/z (FAB-MS) = [m+H]⁺ = 278.0, (ber.: 278.13)

¹H-NMR: δ = 7.33-7.26 (m, 5H, Z-Aryl), 6.01 (1H, NH), 5.03 (m, 2H, CH₂-Ph), 3.73 bs, 1H, (CH-NH), 2.31 (m, 1H, CH-COO), 2.06- 1.22 (m, 8H, CH₂).

^{13}C -NMR: $\delta = 179.11$ (CO-ACHC), 155.78 (OCONH), 136.56, 128.63, 128.17, (Aryl), 66.82 (-CH₂-Ph), 51.59 (CHNH), 49.38 (CHCO), 32.80, 28.76 (CH₂ ACHC), 24.61, 24.46 (CH₂ ACHC).

***N*-Benzyloxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäure-*tert*-butylester (61)**

Zu einer Lösung von 1g (3.6 mmol) [60] in 8 ml Pyridin und 13 ml *tert*-Butanol werden bei -10° C unter Argon 0.6 ml (0.66 mmol) POCl₃ langsam zugespritzt. Nach 15 min wird die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und 16h bei RT gerührt.

Danach werden zur Reaktionsmischung langsam 10 ml Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wird mit DCM extrahiert, am Vakuum eingengt und mit Toluol coevaporiert.

Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (Tol:Aceton = 10:1).

Ausbeute: 0.8g (2.4 mmol), 67 %

$m/z = (m+H)^+ = 334.0$, (ber.: 334.19)

EA	C	H	N
ber.	68.44	8.16	4.20
gef.	68.24	8.12	4.04

^1H NMR: $\delta = 7.70$ -7.26 (m, 5H, Z-Aryl), 5.07 (m, 2H, Ph-CH₂), 4.77 (bs, 1H, CH-NH), 3.70 (m, 1H, CH-COO), 2.12- 1.12 (m, 19H, CH₂, 1.38 (tBu)).

^{13}C NMR: $\delta = 173.01$ (CO-ACHC), 155.12 (OCONH), 136.45, 128.25, 127.88, 127.80 (Aryl), 80.40 (C(CH₃)₃), 66.26 (CH₂-Ph), 52.28 (CHNH), 50.85 (CHCO), 32.97, 28.50 (CH₂ ACHC), 27.71 (CH₃ *t*Bu), 24.46, 24.24 (CH₂ ACHC).

***(R,R)*- *trans*-2-Aminocyclohexylcarbonsäure-*tert*-butylester (62)**

Zu einer Lösung von 0.67g (2 mmol) 61 in 30 ml Methanol werden im Argongegenstrom 20 mg Pd auf Kohlenstoff gegeben und die Reaktionsmischung wird 12h lang hydriert. Die Reaktionsmischung wird über Celite abfiltriert und im Vakuum eingengt. Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

***N*-Fluorenylmethyloxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäure (63)**

1.07 g (6 mmol) **36** werden in 60 ml THF gelöst und 0.3 g (7.5 mmol) NaOH zugegeben. Danach werden 2.04 g Fmoc-OSucc (6 mmol) und 20 ml Wasser zugegeben. Nach 10 min werden 500 mg (6 mmol) NaHCO₃ zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 1N Salzsäure auf pH 1 angesäuert, wobei ein weißer Feststoff ausfällt. Die Reaktionsmischung wird mit Ethylacetat (200 ml) verdünnt, wobei der weiße Feststoff nur teilweise in Lösung geht, und die wässrige Phase wird abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wird mit 100 ml 1N Salzsäure gewaschen. Die organische Phase wird einrotiert und aus Ethylacetat / Hexan umkristallisiert.

$$[\alpha]_D^{20} = -37.3^\circ (\text{CHCl}_3), (\text{Lit.: } -42^\circ)^{[164]}$$

Ausbeute: 1.7g (4.6 mmol) = 78%

NMR-Daten entsprechen der Literatur^[155]

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäure (37)**

In 330 ml Dioxan/Wasser 2:1-Mischung wird **36** (4.03g, 22.5 mmol) gelöst. Dazu werden K₂CO₃ (31 g, 224 mmol) und Boc₂O (4.9 g, 22.4mmol) gegeben und 5h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit konz. Salzsäure auf pH 2 eingestellt und dann dreimal mit jeweils 200 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird aus Hexan umkristallisiert und es entstehen farblose Kristalle.

Ausbeute: 4.42 g (18.2mmol) 81%

Smp: 156 °C (n-Hexan) (Lit.: 154-155 °C^[155])

***N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-(*R,R*)- *trans*-2-aminocyclohexylcarbonsäurebenzylester (38)**

1.78 g (6.37 mmol) **37** werden in 180 ml trockenem Benzol gelöst. Dazu werden 0.87 ml (7.32 mmol) Benzylbromid und 1.1 ml (7.4 mmol) DBU gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 6h unter Argon am Rückfluss erhitzt. Dabei setzt sich ein weißer Niederschlag ab. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Nach Einengen im Vakuum bleibt ein farbloser Feststoff zurück, der aus n-Hexan umkristallisiert wird. Es entstehen farblose Kristalle

Ausbeute: 2.12 g (6.4 mmol) 87%

Smp.: 110 °C (n-Hexan) (Lit.: 103 °C^[160])

(R,R)- trans- 2-Aminocyclohexancarbonsäurebenzylester (39)

3.32g (9.95 mmol) **38** werden in 30 ml 20% TFA in Dichlormethan gelöst und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 30 ml Toluol verdünnt und die TFA mehrfach mit Toluol coevaporiert. Das Produkt wird direkt weiter umgesetzt.

Boc-(ACHC-ACHC)-OBn (40)

Zum Produkt **39** (3.32g, 9.95mmol) werden 2.42 g (9.95 mmol) **38**, 1.36 g (13.53mmol) DMAP, 70 ml DMF und 4.23 g (22.1 mmol) EDC * HCl gegeben und die Reaktionsmischung wird 48 h unter Argon gerührt. Das Lösungsmittel wird mit Toluol coevaporiert und der Rückstand wird mit 210 ml 1N HCl versetzt. Der Rückstand, der sich nicht auflöst wird abfiltriert und nochmals mit 1N HCl gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wird aus n-Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 3.61 g (7.9 mmol) 80%

$[\alpha]_D^{20} = -12.4^\circ$ (c= 1.00, Aceton)

m/z (FAB) = 459.3 (M + H)⁺ (ber.: 459.28)

Smp.: 202 °C (n-Hexan) (Lit.: 195 °C, 1,2-Dichlorethan^[160])

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.30 -7.40 (m, 5H, Aryl), 6.22 (bd, J = 7.83 Hz, NH), 5.08 (d, 2H, J = 12.38 Hz, Ph-CH₂), 4.67 (bd, 1H, J = 9.11Hz, NH), 4.05 (m, 1H, BocHNCH), 3.47 (m, 1H, CONHCH), 2.38 (m, 1H, HNCOCH), 2.14 – 1.81 (m, 5H), 1.78-1.55 (m, 5H,), 1.84 – 1.32 (m, 10H, ACHC-CH₂, tBu), 1.10 – 1.30 (m, 6H, ACHC-CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 175.9, 175.5 (ACHC-Carbonyl), 158.0 (Boc-Carbonyl), 138.3, 130.8, 130.5, 130.4 (Aryl), 81.8 (C(CH₃)₃), 68.6 (Ph-CH₂), 55.1, 53.1, 52.0, 51.9 (CH-ACHC), 36.0, 34.6, 33.0, 30.8 (CH₂-ACHC), 30.7 (C(CH₃)₃), 26.8, 26.7 (CH₂-ACHC).

Boc-(ACHC-ACHC) (41a)

5g (10.9 mmol) **40** werden in 60 ml Methanol gelöst, im Argongegenstrom wird eine Spatelspitze Pd / C zugegeben und die Reaktionsmischung wird bei Umgebungsdruck unter H₂-Atmosphäre über Nacht hydriert. Das farblose, kristalline Produkt wird ohne weitere Reinigung direkt weiter umgesetzt.

(ACHC-ACHC) (41b)

4 g (10.9 mmol) **41** werden in 60 ml 20 % TFA in DCM gelöst und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 60 ml Toluol verdünnt und mehrfach mit Toluol coevaporiert. Es entsteht eine farblose, amorphe Substanz.

Ausbeute: 2.9 g (10.9 mmol) quantitativ

Fmoc-(ACHC-ACHC) (42)

0.525 g (1.96 mmol) **41b** werden ohne weitere Aufarbeitung in 60 ml THF gelöst und 0.1 g (2.5 mmol) Natriumhydroxid zugegeben. Danach werden 0.67 g Fmoc-OSucc (1.96 mmol) und 20 ml Wasser zugegeben. Nach 10 min werden 168 mg (2 mmol) Natriumhydrogencarbonat zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird mit 1N Salzsäure auf pH 1 angesäuert, wobei ein weißer Feststoff ausfällt. Die Reaktionsmischung wird mit Ethylacetat (200 ml) verdünnt, wobei der weiße Feststoff nur teilweise in Lösung geht, und die wässrige Phase wird abgetrennt. Die organische Phase wird mit 100 ml 1N Salzsäure gewaschen. Die organische Phase wird einrotiert und aus Ethylacetat / Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 0.69 g (1.41 mmol) 72%

$$[\alpha]_D^{20} = -30.7^\circ \text{ (DMF)}$$

$$m/z \text{ (HRMS)} = 491.25397 [m+H]^+ \text{ (ber.: 491,2468)}$$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.25\text{-}7.71$ (m, 8H, Fmoc), 5.62 (bd, $J = 8.37$ Hz, NH), 4.80 (bs, 1H, NH), 4.34 (m, 2H, Fmoc- CH_2), 4.15 (m, 1H, Fmoc CH), 1.78-1.55 (m, 4H, CH-ACHC), 1.84 – 1.32 (m, 10H, CH_2 -ACHC), 1.10 – 1.30 (m, 6H, CH_2 -ACHC).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 175.9, 175.5$ (ACHC-Carbonyl), 158.0 (Boc-Carbonyl), 138.3, 130.8, 130.5, 130.4 (Aryl), 81.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 68.6 (Ph- CH_2 -), 55.1, 53.1, 52.0, 51.9 (CH-ACHC), 36.0, 34.6, 33.0, 30.8, 26.8, 26.7 (CH_2 -ACHC).

Zu 4.4.3

AAV 9 Darstellung der Glycotripeptidbausteine

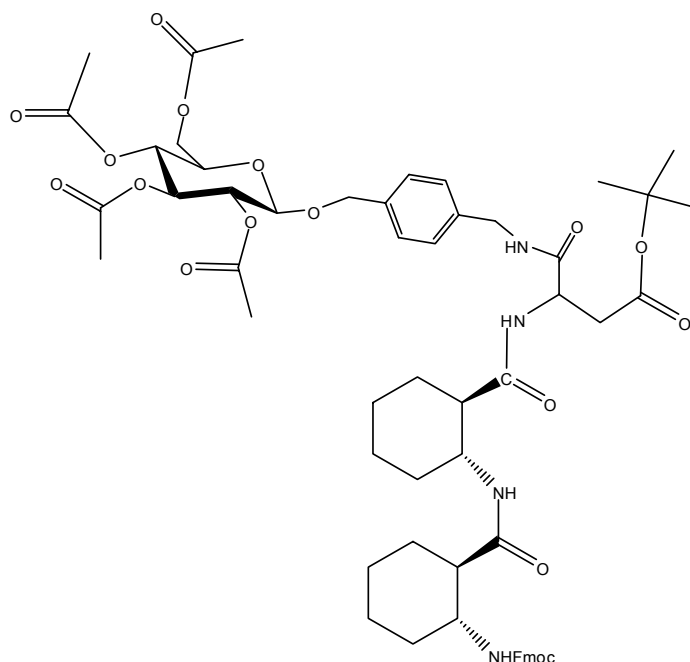
0,3 g (0,35 mmol) des geschützten Asparaginsäurebausteins [56, 57, 58] werden in 3ml 20% Piperidin in DMF gelöst und 1h bei RT gerührt. Vollständige Umsetzung wird mittels DC kontrolliert. DMF und Piperidin werden mit Toluol coevaporiert.

0,17 g (0,35 mmol) [42] werden in 5ml trockenem DMF gelöst. Dazu werden 0,17 g HBTU (0,45 mmol), 0,06 g HOBT (0,44 mmol) und 0,1 ml DIEA (13,8 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 40 min unter Argon bei RT gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird in einer Pipette aufgenommen und langsam in 50 ml Wasser eingespritzt, wobei ein weißer Feststoff ausfällt. Dieser wird mit einer Fritte (Por.4) abgenutscht und trocken gezogen. Das Rohprodukt wird in Chloroform gelöst, die Lösung mit $MgSO_4$ getrocknet und am Vakuum eingengt. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Chloroform /Methanol = 40:1) abgetrennt.

Fmoc(ACHC-ACHC-(AcGIBB))OtBu (43)

Nach AAV 9



1H NMR ($CDCl_3$): δ = 7.82 (bs, 1H, Fmoc-Aryl), 7.73 (d, 2H, Spacer-Aryl), 7.61 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.26-7.38 (m, 6H, Fmoc-Aryl), 7.17 (d, 2H, Spacer-Aryl), 7.03 (bs, 1H, NH Spacer), 6.12 (bs, 1H, ACHC-NH), 5.40 (bs, 1H, Asp-NH), 5.15 (t, 1H, H-3, $J_{H3-H4}=9.4$ Hz), 5.08 (t, 1H, H-4, $J_{H4-H5}=9.6$ Hz), 5.03 (t, 1H, H-2, $J_{H2-H3}=9.10$ Hz), 4.86 (m, 1H, CH-Asp),

4.83 (d, 1H, O-CH₂-Ph, J = 12.33 Hz), 4.55 (d, 1H, Ph-CH₂-O, J = 12.33 Hz), 4.52 (d, 1H, 1-H, J_{H1-H2} = 8.08 Hz), 4.43 (m, 2H, Ph-CH₂-NH), 4.27 (bm, 1H, ACHC HNC₂H₅), 4.20 (m, 4H, H-6a, H-6b, Fmoc-CH₂, J_{H5-H6a} = 4.55 Hz, J_{H6a-H6b} = 12.38 Hz), 4.09 (m, 2H, CH Asp, H-6b), 3.96 (bs, 1H, ACHC CONHCH), 3.65 (m, 1H, C-5), 3.45 (m, 1H, CONHCH ACHC), 2.93 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.40 (m, 1H, ACHC HNC₂H₅), 2.08 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 2.00 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.99 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.97 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 2.18-1.88 (m, 2H, ACHC CH₂), 1.52- 1.78 (m, 5H, ACHC CH₂), 1.378 (s, 9H, tBu) 1.05-1.35 (m, 8H, ACHC CH₂).

¹³C-NMR(CDCl₃): δ = 174.5, 173.8, 172.2, 171.1 (COO ACHC, Asp), 170.8, 170.6, 169.8, 169.8 (COO Acetat), 156.5 (OCOO Fmoc), 144.4, 141.6, 139.5, 135.5, 128.4, 128.2, 128.0, 128.0, 127.4, 125.6, 120.4 (Aryl), 99.7 (C1), 81.9 C-(CH₃)₃, 77.7 (ACHC-NH-CH), 73.3 (C-3), 72.2 (C-2), 71.7 (C-5), 71.0 (Ph-CH₂-O), 68.8 (C-4), 67.2 (Fmoc CH₂), 62.3 (C-6), 53.8 (ACHC NH-CH), 51.9 (Asp CH), 50.3, 49.3 (ACHC CH-CO) 47.5 (CH Fmoc), 43.7 (Ph-CH₂-NH), 37.0 (CH₂ Asp), 33.4, 30.8, 29.6 (ACHC CH₂), 28.4 (CH₃ tBu), 25.3, 25.2, 25.1 (ACHC CH₂), 21.2, 21.1, 21.0 (Acetyl- CH₃)

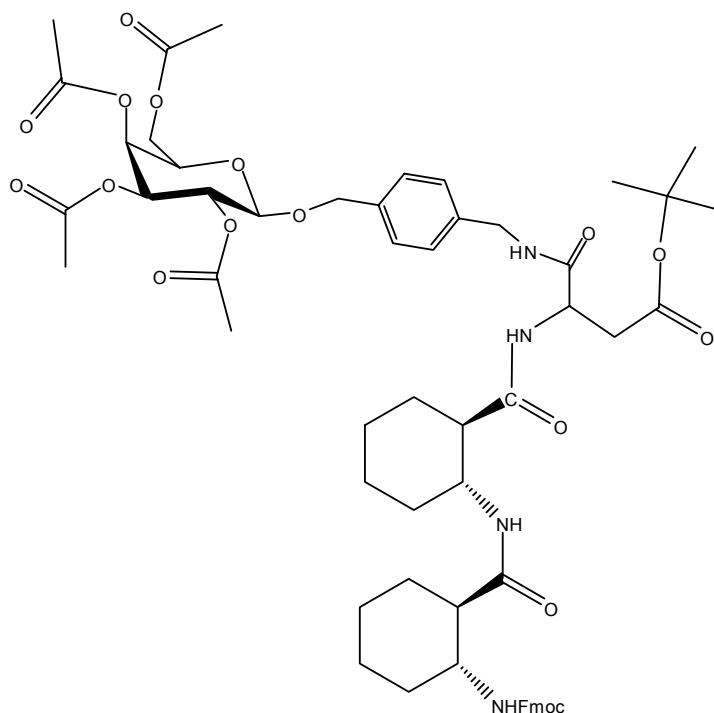
$[\alpha]_D^{20} = -34.5^\circ$ (c=1.00, DMF)

m/z (HRMS) = [m+Na]⁺ = 1133.49448 (ber.: 1133.4947)

Ausbeute: 0,33g (0,29 mmol) 85 %

Fmoc(ACHC-ACHC-(AcGalBB))OtBu (45)

nach AAV 9



^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 7.80$ (bs, 1H, Fmoc-Aryl), 7.73 (d, 2H, $J = 17.33\text{Hz}$, Spacer-Aryl), 7.59 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.26-7.38 (m, 6H, Fmoc-Aryl), 7.16 (d, 2H, Spacer-Aryl), 7.01 (bs, 1H, NH Spacer), 6.08 (bs, 1H, ACHC-NH), 5.40 (bs, 1H, Asp-NH), 5.36 (d, 1H, H-4, $J_{\text{H}_3-\text{H}_4}=3.3$ Hz), 5.23 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{H}_2-\text{H}_3}=8.06$ Hz), 4.96 (dd, 1H, H-3, $J_{\text{H}_3-\text{H}_4}=3.30$ Hz), 4.84 (m, 1H, CH-Asp), 4.82 (d, 1H, Ph- CH_2 -O, $J = 12.38$ Hz), 4.54 (d, 1H, Ph- CH_2 -O, $J = 12.38$ Hz), 4.48 (d, 1H, 1-H, $J_{\text{H}_1-\text{H}_2}=10.36$ Hz), 4.42 (m, 2H, NH_2 -Fmoc), 4.28 (bm, 1H, ACHC CONHCH HNCOCH), 4.14 (m, 5H, Fmoc-CH, H-6a, H-6b, Ph- CH_2 -NH), 3.94 (bs, 1H, ACHC CONHCH), 3.85 (m, 1H, C-5), 3.41 (m, 1H, ACHC HNCOCH), 2.67 (m, 2H, CH_2 Asp), 2.34 (m, 1H, ACHC HNCOCH), 2.08, 1.99, 1.93, 1.90 (s, 12H, CH_3 -Acetyl), 2.18-1.88 (m, 2H, ACHC CH_2), 1.78 - 1.52 (m, 5H, ACHC CH_2), 1.33 (s, 9H, tBu) 1.05-1.35 (m, 8H, ACHC CH_2).

^{13}C NMR(CDCl_3): $\delta = 174.3, 173.7, 172.0$, (COO ACHC, Asp), 170.6, 170.5, 170.3, 169.7 (COO Acetat), 156.3 (OCOO Fmoc), 141.4, 139.3, 135.4, 128.0, 127.8, 127.3, 127.2, 127.2, 125.4, 120.1 (Aryl), 99.9 (C-1), 81.7 C-(CH_3)₃, 77.4 (ACHC-NH-CH), 71.1 (C-3), 70.9 (C-5), 70.7 (Ph- CH_2 -O), 69.0 (C-2), 67.3 (C-4), 61.5 (Fmoc CH_2 , C-6), 58.2, 53.8 (ACHC NH-CH), 51.6 (Asp CH), 50.1, 49.4 (ACHC CH-CO) 47.3 (CH Fmoc), 43.5 (Fmoc- CH_2), 36.8 (CH_2

Asp), 33.2, 30.7, 30.6, 29.4 (ACHC CH₂) 28.4 (CH₃ *t*Bu), 25.1, 25.0, 24.9 (ACHC CH₂), 21.0, 20.9, 20.9, 20.8 (Acetyl- CH₃).

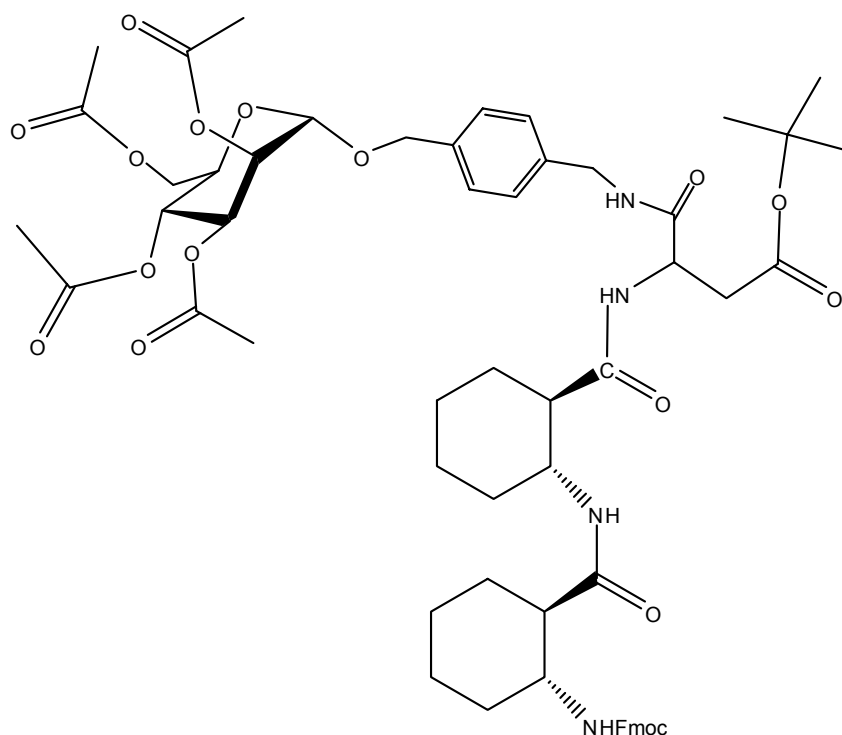
Ausbeute: 0.31 g (0.27 mmol) 80%

$[\alpha]_D^{20} = -29.1^\circ$ (c=1.00, DMF)

m/z (HRMS) = [m+Na]⁺ = 1133.49017 (ber.: 1133.4947)

Fmoc(ACHC-ACHC-(AcManBB))*Ot*Bu (44)

nach AAV 9



¹H-NMR (CDCl₃): δ= 7.80 (bs, 1H, Fmoc-Aryl), 7.73 (d, 2H, J = 17.33Hz, Spacer-Aryl), 7.59 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.26-7.38 (m, 6H, Fmoc-Aryl), 7.16 (d, 2H, Spacer-Aryl), 7.01 (bs, 1H, NH Spacer), 6.13 (bs, 1H, ACHC-NH), 5.39 (bs, 1H, Asp-NH), 5.34 (dd, 1H, H-3, J_{H3-H4}=5.81 Hz), 5.25 (d, 1H, H-4, J_{H3-H4}= 9.35 Hz), 5.23 (m, 1H, H-2), 4.84 (m, 1H, H-1), 4.81 (m, 1H, CH-Asp), 4.64 (d, 1H, Ph-CH₂-O, J= 12.37 Hz), 4.46 (d, 1H, Ph-CH₂-O, J= 12.37 Hz), 4.42 (m, 2H, Ph-CH₂-NH), 4.28 (bm, 1H, ACHC CONHCH HNCOCH), 4.25 (m, 3H, H6a, Fmoc-CH₂), 4.14(m, 1H, Fmoc-CH), 4.03 (m, 1H, H-6b), 3.97 (m, 2H, H-5, ACHC CONHCH), 3.44 (m, 1H, HNCOCH ACHC), 2.67 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.11(s, 3H, CH₃-Acetyl), 2.09(s, 3H, CH₃-Acetyl), 2.01(s, 3H, CH₃-Acetyl), 1.95 (s, 3H, CH₃-Acetyl), 2.18-1.88 (m, 2H, ACHC CH₂), 1,78 - 1.52 (m, 5H, ACHC CH₂), 1,37 (s, 9H, *t*Bu) 1.05-1.35 (m, 8H, ACHC CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$: $\delta = 174.1, 173.4, 171.7, (\text{COO ACHC, Asp}), 170.7, 170.0, 169.8, 168.7$
(COO Acetat), 156.1 (OCOO Fmoc), 141.2, 139.3, 134.7, 128.2, 128.0, 127.6, 127.1, 127.0,
125.2, 119.9 (Aryl), 96.8 (C1), 81.8 (C-(CH₃)₃), 77.4 (ACHC-NH-CH), 69.7 (C-2), 69.6 (Ph-
CH₂-O), 69.4 (C-3), 68.8 (C-5), 66.9 (Fmoc CH₂), 66.3 (C-4), 62.7 (C-6), 58.2, 53.5 (ACHC
NH-CH), 51.6 (Asp CH), 50.0, 49.4 (ACHC CH-CO) 47.3 (CH Fmoc), 43.5 (Ph-CH₂-NH),
36.9 (CH₂ Asp), 33.2, 29.4, 29.3 (ACHC CH₂), 28.2 (CH₃ *t*Bu), 25.1, 25.0, 24.9 (ACHC
CH₂), 21.1, 21.0, 20.9, 20.9 (Acetyl- CH₃)

Ausbeute: 0.31 g (27.1 mmol) 80%

$[\alpha]_D^{20} = +21.4^\circ$ (c=1.00, DMF)

m/z (HRMS) = $[m+\text{Na}]^+ = 1133.49015$, (ber.: 1133.4947)

Zu 4.5

AAV 10 Darstellung der Glycohexapeptide (46, 47)

30 mg (0,027 mMol) des geschützten Glycotripeptidbausteins **43, 44** werden in 3 ml 20% TFA in Chloroform gelöst und 18h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird nach vorheriger Zugabe von 3 ml Toluol abdestilliert und die TFA so oft coevaporiert.

Die freie Säure wird am Hochvakuum getrocknet und direkt weiter umgesetzt.

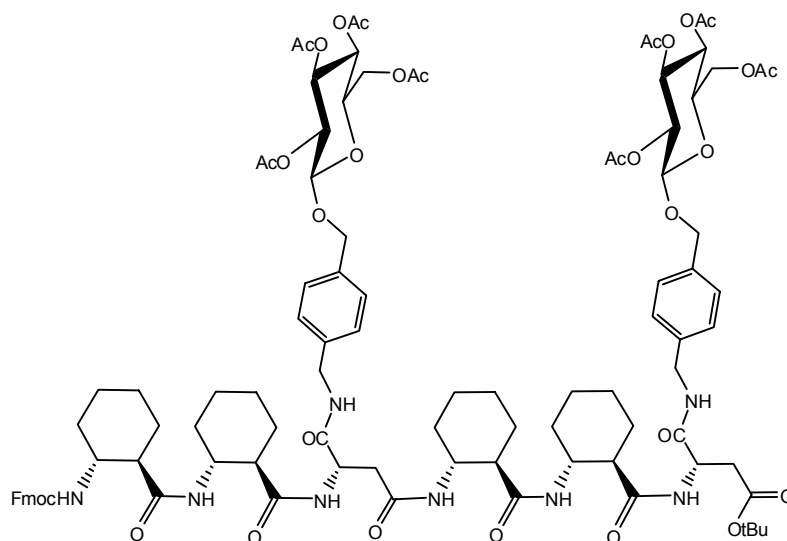
30 mg (0,027 mMol) des geschützten Glycotripeptidbausteins **43, 44** werden in 3ml 20 % Piperidin in DMF gelöst und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mehrmals mit Toluol coevaporiert.

Das freie Amin wird am Hochvakuum getrocknet und direkt weiter umgesetzt.

Das freie Amin aus **43, 44** und die freie Säure aus **43, 44** (jeweils aus 0.027 mmol Edukt) werden in 2 ml DMF gelöst. 5 mg HOBt (35mmol), 13mg HBTU (35mmol) und 9 μ l DIEA (0.054mmol) werden zugegeben und 40 min bei RT gerührt.

Die Reaktionsmischung wird mit einer Pipette in 20ml Wasser gespritzt, worauf das Rohprodukt als farbloser Feststoff ausfällt. Das Rohprodukt wird mit einer Fritte(Por. 4) abgenutscht, mit 60 ml Wasser nachgewaschen und trocken gezogen.

Das Produkt wird säulenchromatographisch (5% MeOH in Chloroform) gereinigt.

Fmoc(ACHC-ACHC-(AcGIBB)-ACHC-ACHC-(AcGIBB))OtBu (46)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 8.79 (bm, 1H, NH Asp), 8.37 (d, 1H, J = 6.34 Hz, NH Asp), 8.32 (t, 1H, J = 6.34 Hz, NH-Bn), 8.25 (d, 1H, J = 8.72 Hz, NH-ACHC), 8.06 (t, 1H, J = 5.95 Hz, NH-Bn), 7.95 (d, 1H, J = 7.48 Hz, Ar), 7.90 (d, 2H, J = 7.93 Hz, Ar) 7.82 (d, 1H, J = 7.53 Hz, Ar), 7.80 (d, 1H, J = 19.02 Hz, ACHC-NH), 7.55 (d, 1H, J = 8.71 Hz, NH-ACHC), 7.52 (d, 1H, J_2 = 16.65 Hz, NH-ACHC), 7.36 (m, 3H, Fmoc-Aryl), 7.25 (m, 4H, Fmoc-Aryl, Spacer-Aryl), 7.10 (dd, 4H, J_1 = 7.93 Hz, J_2 = 25.76 Hz, Spacer-Aryl), 5.15 (m, 2H, H-3), 5.11 (m, 1H, CH-Asp), 5.05 (m, 2H, H-4), 4.95 (m, 5H, CH-Asp, H-1, H-2), 4.85 (d, 1H, J = 11.89 Hz, O-Bn), 4.78 (d, 1H, Ph- CH_2 -O, J = 12.28 Hz), 4.54 (d, 1H, J = 11.89 Hz, Ph- CH_2 -O), 4.48 (d, 1H, Ph- CH_2 -O, J = 12.28 Hz), 4.35-3.93 (m, 16 H, Fmoc-CH, H-6a, ACHC- CHNH , H-6b, Fmoc- CH_2 , ACHC- CHNH , Ph- CH_2 -NH, C-5, ACHC- CHNH), 3.75 (bm, 1H, ACHC- CHNH), 2.75 (m, 6H, CH_2 Asp, 2 ACHC-COCH), 2.49 (m, 1H, ACHC-COCH), 2.36 (m, 1H, ACHC-COCH), 2.08, 2.06, 2.04, 2.04, 1.99, 1.99, 1.98 (s, 24H, CH_3 -Acetyl), 2.18-1.88 (m, 2H, ACHC CH_2), 1.90-1.70 (m, 14H, ACHC CH_2), 1.52 (s, 9H, *t*Bu) 1.47-1.15 (m, 16H, ACHC CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 174.5, 173.8, 172.2, 171.1 (COO ACHC, Asp), 170.8, 170.6, 169.8, 169.8 (COO Acetat), 156.5 (OCOO Fmoc), 144.4, 141.6, 139.5, 135.5, 128.4, 128.2, 128.0, 128.0, 127.4, 125.6, 120.4 (Aryl), 99.8, 99.7 (C1), 81.6 C-(CH_3)₃, 72.9 (C-3), 71.7 (C-2), 71.7 (C-5), 70.7, 70.4 (Ph- CH_2 -O), 69.0 (C-4), 66.4 (Fmoc CH_2), 62.3 (C-6), 51.3 (ACHC NH-CH), 50.7, 50.4, (Asp CH), 50.4, 50.2, 50.0, 49.8, 49.6, 49.3, 49.2 (ACHC CH-CO), (ACHC NH-CH), 47.4 (CH Fmoc), 42.5, 42.3 (Ph- CH_2 -NH), 38.6, 36.8, (CH_2 Asp), 35.7, 35.4, 33.7, 32.6, 31.0, 30.9, 30.8, 30.6, 30.2, 29.6, (ACHC CH_2), 27.9(CH_3 *t*Bu), 26.2, 25.9, 25.7, 25.7, 25.4, 25.2 (ACHC CH_2), 20.3, 20.2, 20.2, 20.1 (Acetyl- CH_3).

Tabelle 7: Signale von Protonen des Rückgrates, die der Sequenz zugewiesen werden konnten.

1 Asp	2 ACHC	3ACHC	4 Asp	5ACHC	6ACHC
8.77 NH	7.53 NH	7.78 NH	8.35 NH	8.25 NH	7.51 NH
4.83 CH	4.22 CHNH	3.84 CHNH	4.95 CH	4.21 CHNH	3.62 CHNH ₂
2.79 CH ₂	2.33 CHCO	2.82 CHCO	2.60-2.90 CH ₂	2.47 CHCO	2.77 CHCO
	2.06 CHNHCH ₂	1.97 CHNHCH ₂		1.86 CHNHCH ₂	2.08 CHNHCH ₂

Die Sequenz wurde mittels NOE aufgeklärt, wobei die NOE – Signale von NH (i) – C α (i+1) verwendet wurden.

Tabelle 8: Noe- Signale, die nicht zwischen am Rückgrat benachbarten Protonen auftreten

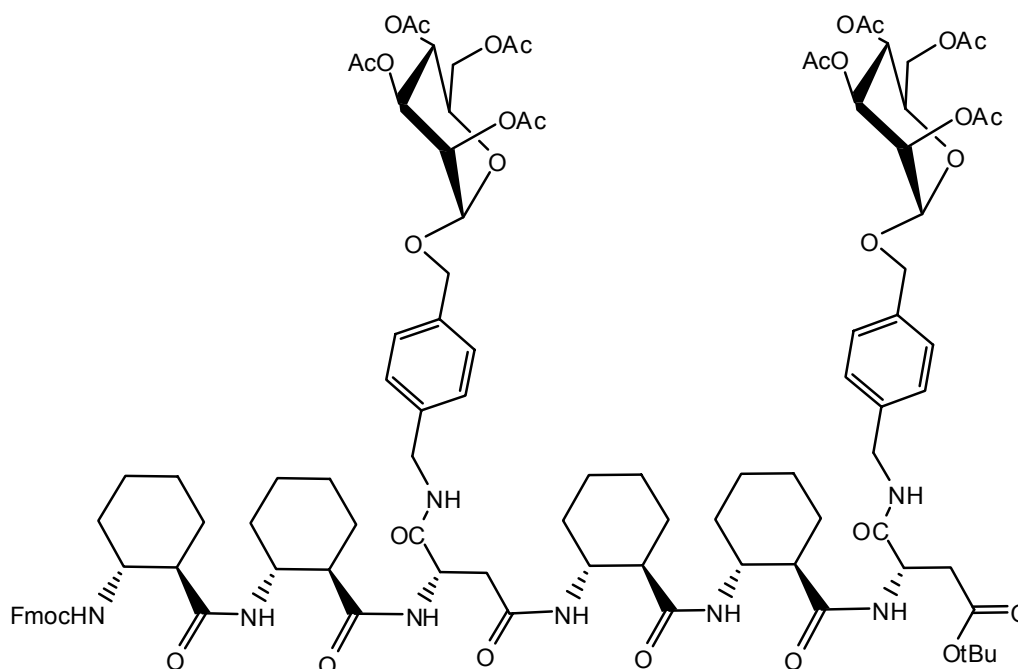
NH 1	NH 2	NH 3	NH 4	NH 5	NH 6
C β 4 C β 3	C α 5	C β 6	C β 1, C β 2	C β 3, C β 2	C β 3
C α 4			C α 1		
	C γ,δ 5	C γ,δ 6			

m/z (HRMS) = $[m+2H]^{2+} = 963.44046$, (ber.:963.4421)

Ausbeute: 33 mg (17 μ mol), 63%

Fmoc(ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB))OtBu (47)

nach AAV 10



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta =$ 8.29 (d, 1 H, $J = 8.59$ Hz, NH – Asp), 7.81 (d, 1 H, $J = 8.59$ Hz, NH-ACHC), 7.78- 7.62 (m, 4 H, NH-Asp, Aryl), 7.55 (d, 1H, $J = 7.33$ Hz, NH-ACHC), 7.44 (d, 1H, $J = 8.84$ Hz, NH-Asp), 7.34 (d, 1H, NH ACHC), 6.93-7.30 (m, 12 H, Ar, Ph- CH_2 -NH), 6.60-6.83 (m, 4H, Ar), 5.16-5.30 (m, 6H, H-3, H-4, H-2) 5.98 (m, 1H, Asp-NH), 4.88 (m, 1H, Asp-CH), 4.72-4.77 (m, 2H, H-1), 4.59 – 5.20 (m, 2H, Ph- CH_2 -O), 4.42 - 4.59 (m, 2H, Ph- CH_2 -O), 4.42 - 3.87 (m, 16 H, Fmoc- CH_2 , Fmoc-CH, Ph- CH_2 -NH, H-6, ACHC- CHNH , ACHC- CHNH , H-6, ACHC- CHNH , C-5), 3.85 - 3.60 (m, 3 H, ACHC- CHNH , NH- CH_2 -Ph), 2.90 - 2.72 (m, 4H, CH_2 -Asp), 2.71 - 2.28 (m, 6H, ACHC-COCH, ACHC-COCH, CH_2 -ACHC, ACHC-COCH), 2.25 - 2.14 (m, 1H, ACHC-CHCO) 2.13– 1.80 (m, 29 H, 2.05, 2.04, 2.03, 2.02, 1.96, 1.96, 1.91, 1.90 CH_3 -Acetyl ACHC-HCO, ACHC- CH_2), 2.18-1.80 (m, 2H, ACHC- CH_2), 1,78 - 1.52 (m, 9H, ACHC- CH_2), 1,45 (s, 9H, tBu) 1.05-1.55 (m, 18H, ACHC- CH_2).

^{13}C -NMR(CDCl_3): δ = 175.54, 174.55, 174.42, 172.86, 171.29, 171.11 (COO ACHC, Asp), 170.97, 170.24, 170.13, 170.12, 170.03, 170.01, 169.34, 168.62 (COO Acetat), 156.83 (OCOO Fmoc), 145.10, 144.33, 141.30, 141.25, 138.49, 137.45, 135.07, 135.00, 128.35, 128.31, 128.15, 127.55, 127.30, 127.10, 126.71, 125.88, 125.66, 119.84 (Aryl), 96.66, 96.61 (C-1), 82.44 (C-(CH_3)₃), 69.61 (C-2), 69.33, 69.27 (C-3), 69.14 (Ph- CH_2 -O), 68.71 (C-5), 67.04 (Fmoc CH_2), 66.67 (C-4), 62.52 (C-6), 51.23, 50.23 (ACHC NH-CH), 49.78 (Asp CH), 49.77,-49.43 (ACHC CH-CO) 47.51 (CH Fmoc), 42.55, 42.42 (Ph- CH_2 -NH), 36.80, 36.58 (CH_2 Asp), 33.23, 32.58, 32.50, 30.72, 30.64, 30.32, 29.80, 29.43 (ACHC CH_2), 28.24 (CH_3 *t*-Bu), 25.83, 25.48, 25.30, 24.99, 24.89 (ACHC CH_2), 20.92, 20.85, 20.83, 20.79, 20.73 (Acetyl- CH_3)

m/z (HRMS) = $[m+H]^+$ = 1925.87617 (ber.:1925.8764)

Ausbeute: 34 mg (18 μmol) 67%

Fmoc(ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB)-ACHC-ACHC-(AcManBB))*Ot*Bu (49)

15 mg ($7.8 \cdot 10^{-6}$ Mol) des geschützten Glycohexapeptids **47** werden in 3 ml 25% TFA in Chloroform gelöst und 12h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird nach vorheriger Zugabe von 3 ml Toluol abdestilliert und die TFA so oft coevaporiert, bis kein essigsaurer Geruch mehr festgestellt werden kann.

Die freie Säure wird am Hochvakuum getrocknet und direkt weiter umgesetzt.

15 mg ($7.8 \cdot 10^{-6}$ Mol) des geschützten Glycohexapeptids **47** werden in 3ml 20 % Piperidin in DMF gelöst und 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mehrmals mit Toluol coevaporiert, bis kein Geruch nach Piperidin mehr festgestellt werden kann.

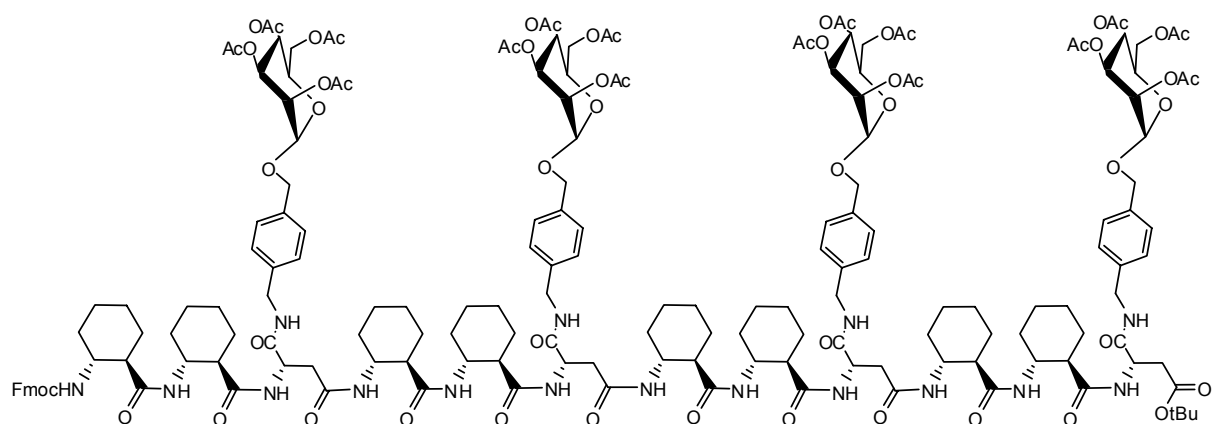
Das freie Amin wird am Hochvakuum getrocknet und direkt weiter umgesetzt.

Das freie Amin aus **47** und die freie Säure aus **47** (jeweils aus 15 mg, $7.8 \cdot 10^{-6}$ Mol) werden in 2 ml DMF gelöst. 3 mg HOBt ($8 \cdot 10^{-6}$ mol), 1.2 mg HBTU ($8.9 \cdot 10^{-6}$ mmol) und 1.5 μl DIEA ($9 \cdot 10^{-6}$ Mol) werden zugegeben und 70 min bei RT gerührt.

Die Reaktionsmischung wird mit einer Pipette in 10ml Wasser gespritzt, worauf das Rohprodukt als farbloser Feststoff ausfällt. Das Rohprodukt wird mit einer Fritte (Por. 4) abgenutscht, mit 30 ml Wasser nachgewaschen und trocken gezogen.

Das Produkt wird säulenchromatographisch (5% MeOH in Chloroform) gereinigt.

Da das Produkt noch nicht völlig sauber ist, wird es nochmals mittels HPLC (MeOH 0-20% in 20 min, dann isokratisch mit 20 % MeOH) gereinigt.



Das 600 MHz Kapillar-NMR-Spektrum war aus Auflösungsgründen kaum auszuwerten. Lediglich die Integration des *tert*-Butyl-Peaks konnte zum Integral der Acetylgruppen ins Verhältnis gesetzt werden und stimmten mit dem erwarteten Verhältnis 16:3 überein.

m/z (ESI-MS) = $[m+H+Na]^{2+} = 1788.79890$, $[m+2H]^{2+} = 1777.81267$ (ber.: 1777.80575)

Ausbeute: 11 mg, (3.1 μ mol) 40%

AAV 11 Entschützung

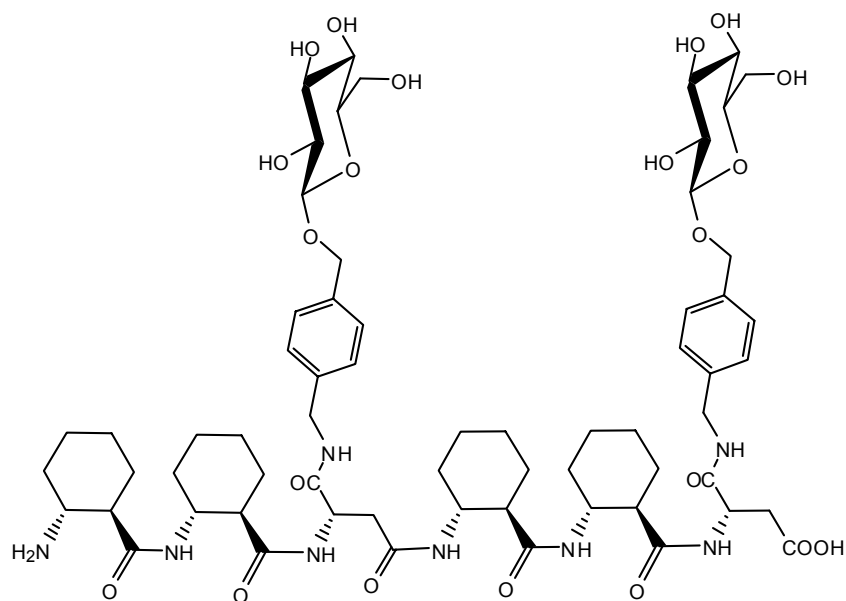
10 mg ($2.8 \cdot 10 \mu\text{mol}$ Glycopeptid werden in 3 ml 20% TFA in Chloroform gelöst und 18h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird nach vorheriger Zugabe von 3 ml Toluol abdestilliert und die TFA so oft coevaporiert, bis kein essigsaurer Geruch mehr festgestellt werden kann.

Die freie Säure wird am Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 4 ml 20 % Piperidin in DMF gelöst und 10 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mehrmals mit Toluol coevaporiert, bis kein Geruch nach Piperidin mehr festgestellt werden kann.

Das freie Amin wird am Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 5 ml 5M NH_3 in MeOH gelöst und 20 h bei RT gerührt. Danach wird Argon durch die Reaktionslösung geleitet, bis kein Geruch nach Ammoniak mehr festgestellt werden kann. Die Lösung wird am Vakuum eingengt und am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wird in 10 ml Wasser gelöst und dreimal mit je 5 ml Diethylether ausgeschüttelt. Abschließend wird es am Hochvakuum getrocknet.

(ACHC-ACHC-(GIBB)-ACHC-ACHC-(GIBB)) (48)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz Kapillar- NMR) (CDCl_3 , 5% CD_3OD): δ = 10.16 (COOH), 7.34-7.19 (m, 8H, Aryl), 4.97 (Asp-CH), 4.72 (d, 4H, Ph- CH_2 -O), 4.38 (H-1), 4.33 (ACHC-CHNH), 4.10 (ACHC-CHNH), 4.08 (ACHC-CHNH), 4.95, 4.1 (ACHC-CHCO), 3.87 (C-6a,b), 3.66 (C-5), 3.39 (H-3), 3.30 (ACHC-CHCO), 3.29 (H-4), 3.23 (H-2), 3.21 (m, Ph- CH_2 -NH), 3.29,

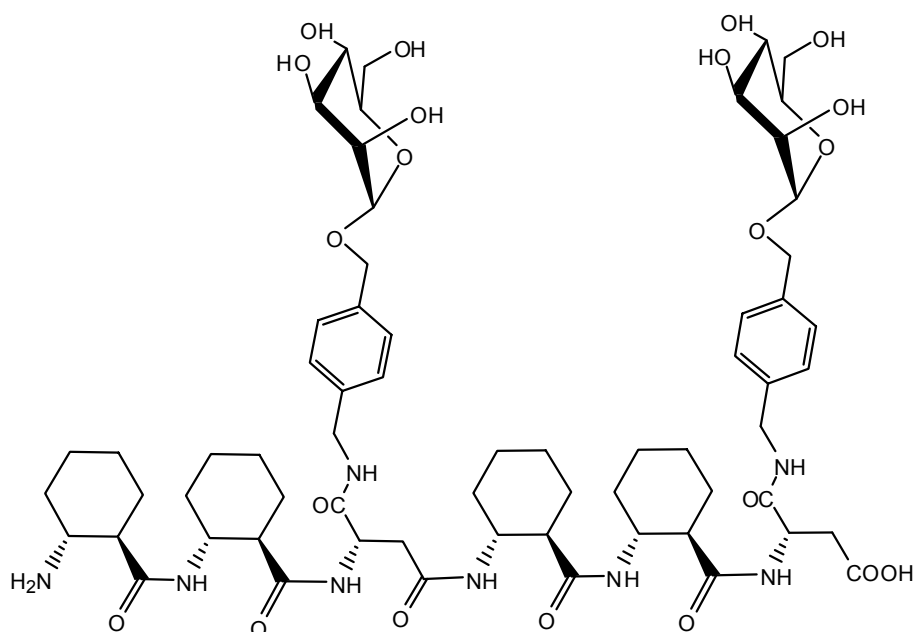
3.15 (Asp-CH₂), 3.06-2.53 (m, Asp-CH₂) 2.99, 2.93 (ACHC-CHCO), 2.80, 2.74, 2.54, 2.48 (ACHC-CHCO) 2.03 – 1.15 (m, 32 H, CH₂-ACHC).

¹³C-NMR: δ = 172.2 (COOH), (CONH – ACHC)), 127.7, 127.0, 126.8, 125.8, 125.3, 125.2 (Aryl), 102.9 (C-1), 77.6 (C-3), 77.6 (C-2) 74.4 (C-4),(71.0(C-6), 42.2 (ACHC-CHNH), 48.0, 49.0 (Asp-CH₂), 49.5, 49.7 (ACHC-CHNH), 40.8 (Ph-CH₂-NH), 39.5, 39.7 (Asp-CH₂), 38.0, 37.8, 35.8, 33.2 (ACHC-CHCO), 24.0- 33.1 (CH₂-ACHC).

m/z (HRMS) = $[m+H]^+$ = 1311.66131 (ber.: 1311.6612)

Ausbeute: 4.8 mg (3.64 μ mol) 70%

(ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB)) (50)



¹H-NMR (600 MHz Kapillar- NMR) δ = 8.87 (bd, 1 H, J = 8.97 Hz, Asp b –NH), 8.19 (m, 4 H, Asp a – NH), 4.80 (Asp a-CH), 4.75 (Asp b-CH), 4.47 (d, 2H, J = 127 Hz, Ph-CH₂-O), 4.424 (s, 1H Ph-CH₂-O), 4.27 (d, 2H, Ph-CH₂-NH, J = 90 Hz), 4.17 (s, 1H Ph-CH₂-O), 4.35 (s, 1H, Ph-CH₂-NH), 3.95 (m, 3H, ACHC-CHNH), 3.90– 3.5 (m, 14H, Man-CH, CH₂, Ph-CH₂-NH), 3.42 (ACHC CH-NH₂), 3.05 (m, 2H, CH₂-Asp), 2.8 (ACHC-NH₂ CHCO), 2.67 (m, 2H, CH₂-Asp), 2.66-1.10 (m, 32 H, ACHC-CH₂).

beobachtete NOEs:

NH 3	-	C α 4	
NH 4	-	C α 5	
C α 3	-	C β 6	→ zu erwarten bei 14 - Helix
CHNHCH ₂ 2	-	CHNHCH ₂ 5	→ zu erwarten bei 14 - Helix

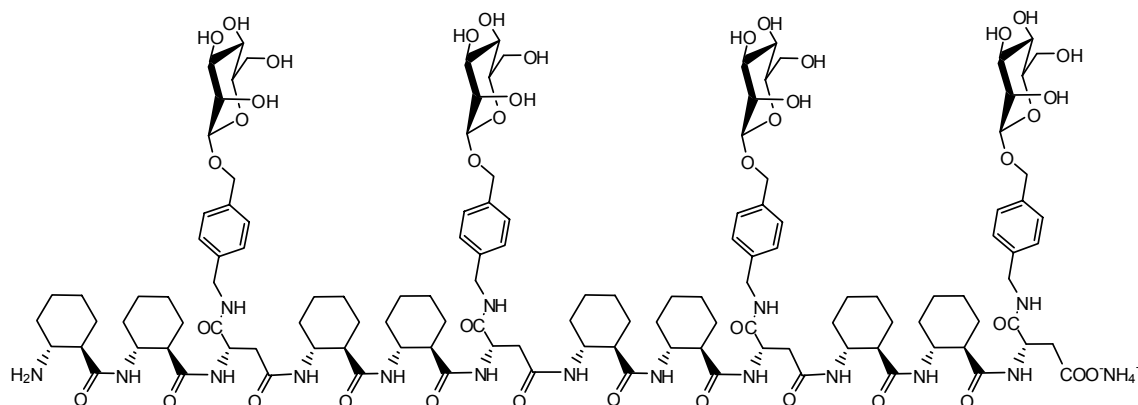
Tabelle 9: Signale von Protonen des Rückgrates, die der Sequenz zugewiesen werden konnten.

1 Asp	2 ACHC	3ACHC	4 Asp	5ACHC	6ACHC
8.28 NH	8.25 NH	8.25 NH	8.87 NH	8.25 NH	
4.88 CH	3.95 CHNH	3.95 CHNH	4.75 CH	3.95 CHNH	3.42 CHNH ₂
2.57 CH ₂	2.33 CHCO	2.86 CHCO	2.63-2.90 CH ₂	2.30 CHCO	2.80 CHCO
	1.81 CHNHCH ₂	1.97 CHNHCH ₂		1.92 CHNHCH ₂	2.14 CHNHCH ₂

m/z (HRMS) = $[m+H]^+$ = 1311.66009 (ber.: 1311.6612)

Ausbeute: 4.5 mg (3.43 μ mol) 66%

(ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB)-ACHC-ACHC-(ManBB))⁻ NH₄⁺ (51)



m/z (HRMS) = $[m + 2H]^{2+}$ = 1311.16614 (ber.: 1311.16915)

Ausbeute: 4.5 mg (1.7 μ mol) 62%

Zu 4.7**AAV 8 Aktivierung der Bausteine mit Pentafluorphenol**

1 mmol des geschützten Bausteins aus AAV 7 wird in 20 ml einer 20 % TFA – Lösung in DCM gelöst und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 20 ml Toluol verdünnt, um eine Konzentrierung der TFA beim Einengen zu vermeiden, und mehrfach mit Toluol coevaporiert, bis kein essigsaurer Geruch mehr festgestellt werden kann.

Das Produkt wird in Ethylacetat gelöst und 0.184 mg (1 mmol) Pentafluorphenol sowie 0.247 g (1.2 mmol) DCC zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 5 h bei RT gerührt, der entstandene Dicyclohexylharnstoff wird über Celite abfiltriert, die Lösung am Vakuum eingengt und das Produkt wird säulenchromatographisch (Kieselgel, Toluol : Aceton = 20 : 1) abgetrennt.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenylester (57)**

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.81 (bd, 2H, Fmoc-Aryl), 7.60 (d, 2H, Fmoc-Aryl) 7.26-7.45 (m, 8H, Aryl Spacer, Fmoc), 6.84 (s, 1H, NH-CH₂-Ph), 5.94 (b, 1H, CH-NH-CO), 5.11-5.24 (m, 3H, H-2, H-3, H-2), 4.81 (m, 2H, O-CH₂-Ph), 4.81 (bs, 1H, CH Asp), 4.64 – 4.58 (m, 5H, H-1, Fmoc – CH₂, NH-CH₂-Ph), 4.30 – 4.19 (m, 3H, H-6a, CH Asp, H-6b), 3.72 (m, 1H, C-5), 3.50 – 3.18 (m, 2H, Asp-CH₂), 2.15 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 2.07 (s, 3H, Acetyl-CH₃), 2.06 (s, 3H, Acetyl- CH₃), (s, 3H, Acetyl- CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 170.94 170.47, 169.61, 169.53 (COO Acetat), 167.82 (COO Asp), 156.31 (NCOO Fmoc), 143.62, 141.47, 137.49, 136.33, 128.20, 128.01, 127.86, 127.25, 125.05, 120.23 (Aryl), 99.59 (C-1), 72.94 (C-3), 71.94 (C-2), 71.43(C-5), 70.58 (O-CH₂-Ph), 68.54 (C-4), 67.51 (Fmoc CH₂), 62.07 (C-6), 51.22 (CH-Asp), 47.23 (CH Fmoc), 43.61 (NH-CH₂-Ph), 35.57 (CH₂ Asp), 20.88, 20.77, 20.75, 20.73 (Acetyl- CH₃).

Ausbeute: 0.78 g (0.8 mmol) 80 %

$[\alpha]_D^{20} = -18.7^\circ$ (c = 1, CHCl_3)

m/z (Fab) = 971.2 $[\text{m}+\text{H}]^+$ (ber.: 971.26)

Smp. = 110° C (Toluol)

EA: C H N

Ber.: 58.15 4.46 2.89

Gef.: 58.65 4.87 2.82

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β - pentafluorphenylester (59)**

^1H NMR (CDCl_3): δ = 7.69- 7.67 (q, 2H, Fmoc-Aryl), 7.47 (d, 2H, Fmoc-Aryl) 7.14-7.33 (m, 4H, Aryl Spacer, Fmoc), 6,62 (s, 1H, NH Spacer), 5.73 (d, 1H, CH-NH-CO), 5.41(d, 1H, H-4, $J_{\text{H3-H4}}=3.03$ Hz), 5.30 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{H2-H3}}= 10.36$ Hz), 5.01 (dd, 1H, H-3), 4.76 (bs, 1H, CH - Asp), 4.74 (dd, 2H, O- CH_2 -Ph), 4.52 (d, 1H, 1-H, $J_{\text{H1-H2}}= 12.36$ Hz), 4.46-4.43 (m, 4H, NH- CH_2 -Ph, CH_2 -Fmoc), 4.14-4.03 (m, 3H ,H-6a,b $J_{\text{H5-H6b}} J_{\text{H5-H6a}}=6.56$ Hz, Fmoc-CH), 3.80 (t, 1H, C-5), 3.28 – 3.02 (m, 2H, CH_2 Asp), 2,08(s, 3H, Acetyl- CH_3), 1.98 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 1.93 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 1.90 (s, 3H, Acetyl- CH_3).

^{13}C NMR(CDCl_3): δ = 170.50 170.36 , 169.65, 169.53, (COO Acetat), 167.97 (COO Asp), 156.20 (OCOO Fmoc) 143.64, 141.52, 137.48, 136.42, 128.23, 128.05, 127.89, 127.29, 125.09, 120.27, (Aryl), 100.08 (C1), 71.08(C-3), 70.88 (CH-Fmoc), 70.52 (O- CH_2 -Ph), 69.01 (C-5, C-2) 67.54 (Fmoc CH_2), 67.22 (C-4), 61.46 (C-6), 51.24 (CH-Asp), 47.27 (CH Fmoc), 43.66 (NH- CH_2 -Ph), 35.54 (CH_2 Asp), 20.91, 20.87, 20.85, 20,76 (Acetyl- CH_3).

Ausbeute: 0.73 g (0.75 mmol), 75 %

$[\alpha]_D^{20} = -16.2^\circ$ (c = 1, CHCl_3)

Smp. = 99°C (Toluol)

m/z (Fab) $[m+H]^+ = 971.2$ (ber.:971.26)

EA: C H N

Ber.: 58.15 4.46 2.89

Gef.: 58.02 4.81 2.65

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*p*-aminomethylbenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β - pentafluorphenylester (58)**

^1H NMR (CDCl_3): δ = 7.78 (m, 2H, Fmoc-Aryl), 7.57 (m, 2H, Fmoc-Aryl) 7.24-7.43 (m, 8H, Aryl Spacer, Fmoc), 6,90 (bs, 1H, NH Spacer), 6.00 (bd, 1H, CH-NH-CO), 5.39(dd, 1H, H-3, $J_{\text{H3-H4}}=10.11$ Hz), 5.34 (d, 1H, H-4,), 5.31 (m, 1H, H-2), 4.90 (bs, 1H, 1-H), 4.79 (bd, 1H, CH-Asp), 4.61 (dd, 2H, O- CH_2 -Ph), 4.47 (m, 4H, NH- CH_2 -Ph, CH_2 -Fmoc), 4.28 - 4.14 (m, 3H ,H-6a, Fmoc-CH, H-6b), 3.98-4.01 (m, 1H, C-5), 3.15 – 3.36 (m, 2H, CH_2 Asp), 2,17 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.13 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.05 (s, 3H, Acetyl- CH_3), 2.02 (s, 3H, Acetyl- CH_3).

^{13}C NMR(CDCl_3): δ = 170.93, 170.21, 170.09, 169.88, 169.61 (COO Acetat), 167.74 (COO Asp), 156.20 (OCOO Fmoc), 143.64, 141.46, 137.86, 135.85, 129.17, 128.73, 127.98, 127.95, 127.22, 125.07, 120.20, (m, Aryl), 97.01 (C1), 69.71(C-2), 69.29(O-CH₂-Ph), 69.01 (C-3), 68.72 (C-5,) 67.49 (Fmoc CH₂), 66.35 (C-4) 62.50(C-6), 51.24 (CH-Asp), 47.21 (CH Fmoc), 43.54 (NH-CH₂-Ph), 35.60 (CH₂ Asp), 21.05, 21.00, 20.89, 20.80 (Acetyl-CH₃).

Ausbeute: 0.68 g, (0.70 mmol) 70 %

$[\alpha]_D^{20} = +32.1^\circ$ (c = 1, CHCl_3)

Smp. = 106° C (Toluol)

m/z (Fab) $[m+H]^+ = 971.1$ (ber.: 971.26)

EA: C H N

Ber.: 58.15 4.46 2.89

Gef.: 58.05 4.60 2.68

Vorbereitung des Papiers:

1. Reinigen des Cellulose-Papiers: 16 Blätter Whatman CH 1 (Nr. 1001 917) 10 · 14 cm

- Dreimal 0,5 h unter leichtem Schütteln mit Dioxan (500 ml) waschen.
- Dreimal 0,5 h unter leichtem Schütteln mit Methanol (500 ml) waschen.
- Im Luftstrom und anschließend im Exsikkator am Hochvakuum vollständig trocknen.

2. Derivatisieren der Hydroxylgruppen auf der Celluloseoberfläche:

Die Papiere werden in einer großen DC-Kammer 2 h lang bei RT in einer 10% Epibromhydrin- Lösung in Dioxan mit 1% Perchlorsäure (50 ml) ziehen gelassen.

Danach wird wie in 1. gewaschen und getrocknet.

3. Auftragen des Safety-Catch-Linkers:

- Die Papiere werden in einer großen DC-Kammer 2 h lang bei RT in 50 ml einer 20% Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-Tridecandiamin in DMF ziehen gelassen.
- Die Papiere werden für 0,5 h in 100 ml einer 5 M methanolischer NaOMe-Lösung gewaschen.
- Es wird siebenmal mit je 500 ml Methanol nachgewaschen und am Vakuum im Exsikkator getrocknet.

4. Aufspalten des Rink-Amid-Linkers:

135 mg (0.25 mmol) Rink-Amid-Linker, 190 mg (0.50 mmol) HATU, in 25 ml NMP lösen und 85 µl DIEA zugeben.

Der Linker wird in den gleichen Volumina wie hinterher die Spot- Synthese geplant ist in zwei Zyklen mit einer Reaktionszeit von jeweils 90 min aufgetragen.

Danach wird dreimal zwei Minuten lang mit je 100 ml 4% Ac₂O in DMF geschwenkt.

Die Membranen werden einmal zwei Min mit 100 ml DMF und drei mal zwei Min mit je 100 ml MeOH gewaschen und anschließend wie oben beschrieben getrocknet.

5. Entschützen der Fmoc-Gruppen:

Die Papiere werden 30 min lang in einer 20% methanolischen Piperidin- Lösung ziehen gelassen.

Danach wird dreimal mit DMF und dreimal mit Methanol unter leichtem Schütteln gewaschen und im Exsikkator am Hochvakuum getrocknet.

6. Derivatisieren mit PFP- Fmoc- Glycin:

116 mg (0.25 mmol) PFP- Fmoc- Glycin werden in 1 ml NMP gelöst. Dazu werden 0.125 mmol (20.4 mg) HoDhbt gegeben.

Die Lösung wird in den gleichen Volumina wie hinterher die Spot- Synthese geplant ist doppelt mit einer Reaktionszeit von jeweils 90 min aufgetragen.

Danach wird dreimal zwei Minuten lang mit je 100 ml 4% Ac₂O in DMF geschwenkt.

Die Membranen werden einmal zwei min mit 100 ml DMF und drei mal zwei min mit je 100 ml MeOH gewaschen und anschließend wie oben beschrieben getrocknet.

Vor der Verwendung der Membrane muss Fmoc wie in 5. beschrieben abgespalten werden.

Bei den Waschvorgängen ist darauf zu achten, die Papiere einzeln in die Waschlösung zu geben, um ein Verkleben der Blätter zu vermeiden. Außerdem sollte das Schütteln auf das Nötigste beschränkt bleiben, da die Oberflächen der Membranen durch das Reiben aneinander stark beschädigt werden können.

Beim Trocknen sollten die Papiere gut getrennt stehen, da sonst die Trockenzeiten unverhältnismäßig hoch werden.

Durchführung der Spot- Synthese:

2×90 min 0.1 mmol des PFP- aktivierten Bausteins werden in 1 ml einer HoDhbt-
Lösung (0.06 mmol/ml) gelöst.

Diese Lösung wird zweimal mit 90 min Reaktionszeit auf die entschützte
Membrane aufgespottet.

Bei Bedarf 1 ml einer 1% Lösung von Bromphenolblau in DMF zu 30ml MeOH und die
Membran damit schwenken, um eventuell noch vorhandene Amingruppen anzufärben.

3×2 min Mit 4% Ac₂O in DMF acetylieren.

4×2 min Mit DMF waschen

4×2min Mit MeOH waschen

Bei Bedarf 1 ml einer 1% Lösung von Bromphenolblau in DMF zugeben, um die Spots
anzufärben

Trocknen

1×8min mit 20% Piperidin in DMF Fmoc abspalten

4×2 min Mit DMF waschen

4×2min Mit MeOH waschen

Bei Bedarf 1 ml einer 1% Lösung von Bromphenolblau in DMF zugeben, um die Spots
anzufärben.

Trocknen

Jetzt kann die nächste Aminosäure gekuppelt werden oder durch einen Acetylierungsschritt
die Festphasensynthese abgebrochen werden.

Acetyl-Entschützung:

Die Membran wird 15 h lang in 5 M NH₃ geschwenkt. Das Gefäß (Petrischale) wird dabei
mit Parafilm zusätzlich abgedichtet.

Die Membran kann nach dem Trocknen für Affinitätstest verwendet werden.

Spalten des Rink-Linkers und ablösen des Peptids von der Membran

Um das Produkt weiter zu untersuchen, oder um es z.B. auf eine Nitrozellulosemembran zu
übertragen, muss der Rink- Linker gespalten werden.

20 ml TFA und 20 ml CHCl₃ werden in eine große DC- Kammer oder in einen entfetteten
Exsikkator (um verharzen des Fettes zu verhindern) gegeben. Nach 30 min wird die Membran

auf einem Uhrglas in den TFA-Dampf gelegt. Sofortige Rotfärbung der Spots zeigt eine Reaktion an.

Nach 30 min. wird die Membran aus dem Dampf genommen, die einzelnen Spots werden ausgeschnitten und in Methanol extrahiert.

Bemerkungen:

DMF und NMP müssen frei von Aminen sein.

MeOH, Dioxan und Ac₂O wurden vor Gebrauch destilliert.

Zu 4.8.1

Lectin- Screening:

Puffer-Lösungen:

Stammlösungen 1 M:

A: Spülpuffer TBS pH 7.5:

121.14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan auf in 1 L dd H₂O

Mit 1 N HCl auf pH 7.5 eingestellt

B: Spülpuffer TBS /Tween

121.14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan auf in 1L dd H₂O, 2,5 g Tween 20 auf 1 L dd H₂O

Mit 1 N HCl auf pH 7.5 eingestellt

Gebrauchspuffer 20 mM:

2 % Lösungen der Stammlösungen in dd H₂O

Färbepuffer:

A: Acetatpuffer: pH 5.0: Gebrauchspuffer

4.10 g NaOAc in 900 mL dd H₂O

Mit konz. HCl auf pH 5.0 eingestellt

B: TBS-Puffer: pH 9.5

2.42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan auf in 1 L dd H₂O

Mit 1N NaOH auf pH 9.5 eingestellt

Lectinlösungen:

Die Standardkonzentration der Lectinlösungen liegt bei 0.05 μM . Je nach Anbindungsintensität kann die Konzentration angehoben oder gesenkt werden, um eine maximale Intensitätsbandbreite der Farbreaktion zu erhalten.

5 nmol Lectin werden in 100 ml TBS- Spülpuffer (pH 7.5) gelöst und 10 μL einer 0.1 M CaCl_2 – Lösung sowie 10 μL einer 0.1 M MnCl_2 – Lösung zugegeben.

Bei Phosphatase– Nachweisreaktionen kann die Lösung mit 50 μL einer 1M NaN_3 – Lösung haltbar gemacht werden, nicht aber bei Peroxidase – Nachweisreaktionen.

Lectintest mit POD – labeled Lectinen / AEC- Farbreaktion

1. Vorbereitung der Membran:

1 x 30 s, 2 x 5 min mit 25 ml TBS – Puffer (pH 7.5) spülen

1 x 5 min mit 25 ml TBS / Tween spülen

2. Inkubation mit Peroxidase labeled Lectin:

1 x 1 h Membran mit 25 ml POD – Lectin – Lösung inkubieren. (Lösung kann wieder verwendet werden).

1 x 30 s, 2 x 5 min mit 25 ml TBS – Puffer (pH 7.5) spülen

1 x 5 min mit 25 ml TBS / Tween spülen

3. Färbungsreaktion mit AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol):

5 – 15 min mit 50 ml frisch hergestellter H_2O_2 / AEC / Acetatpuffer – Färbelösung schwenken:

→ 20 mg AEC in 2.5 ml DMF lösen und mit 47.5 ml Acetatpuffer (50 mM, pH 5.0) in einem separaten Gefäß mischen, 25 μL 30% H_2O_2 zugeben und direkt verwenden.

Bei Erreichen der gewünschten Farbintensität wird die Färbereaktion durch Zugabe von 20 ml H_2O gestoppt. Die Membran wird gescannt.

Zu 4.8.2

Mit den entschützten Glycopeptiden werden Stammlösungen von 1mmol/l hergestellt.

Diese werden um jeweils eine Zehnerpotenz weiter verdünnt (0.1 mmol/l, 0.01 mmol/l, 0.001 mmol/l).

Auf eine Nitrocellulosemembran werden jeweils 0.5 µl der Lösung aufgetragen und trocknen gelassen.

Die Membran wurde 3 × 5 min mit TBS-Puffer gespült

Die Membran wird 30 min in 3% BSA in TBS (Blockierlösung) geschwenkt.

Die Blockierlösung ist wieder verwendbar und wird daher ins Vorratsgefäß zurückgegeben.

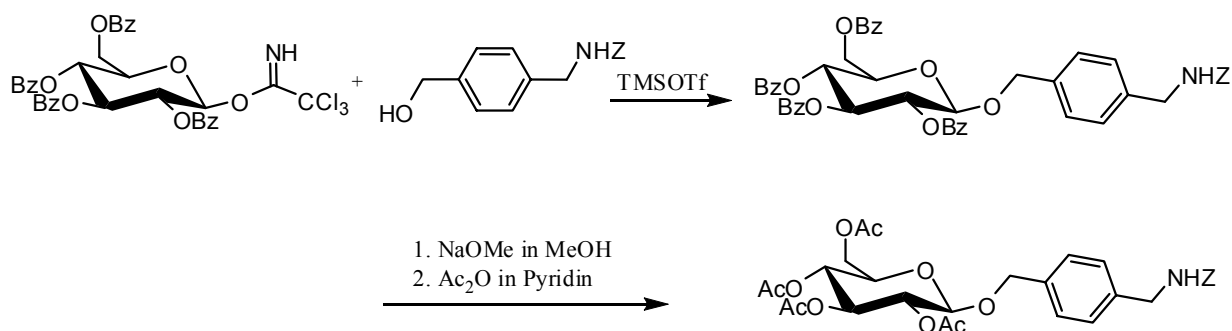
Die Membran wird 3 × 5 min mit 25 ml TBS- Puffer gespült.

Danach wird wie in 4.8.1 beschrieben mit POD- labeled Lectin inkubiert und getestet.

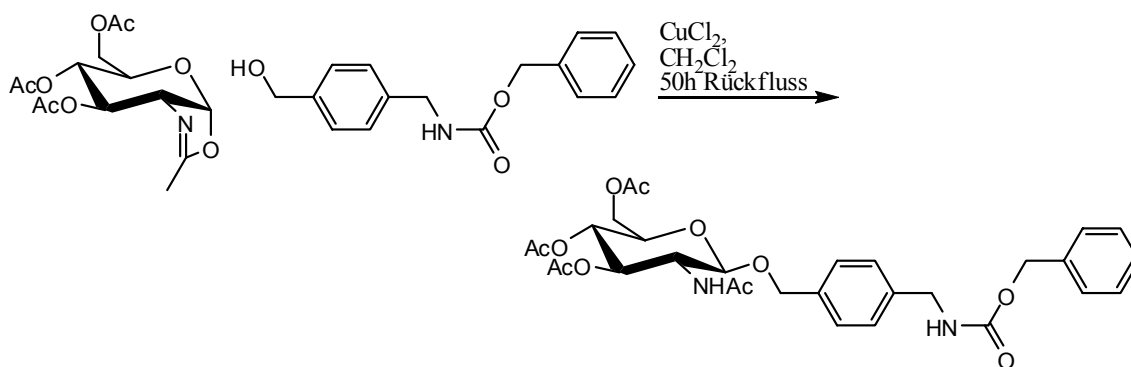
6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein in unserer Gruppe entwickeltes System zur Darstellung von Oligosaccharidmimetika, bei dem über einen Spacer glycosylierte Asparaginsäurebausteine in einer Festphasen-Spot-Synthese miteinander verknüpft werden, um *O*-glycosidische Bausteine mit einem benzylichen Linkersystem erweitert. Der benzyliche Spacer wurde aufgrund seiner Hydrolyseunempfindlichkeit, hohen Steifigkeit und seiner Aromatizität ausgewählt. Diese Eigenschaften sind wichtig, um die Zucker an einem rigiden Rückgrat starr anbinden zu können. Außerdem wird der aromatische Charakter in manchen Fällen zur Anbindung an Lectine benötigt.

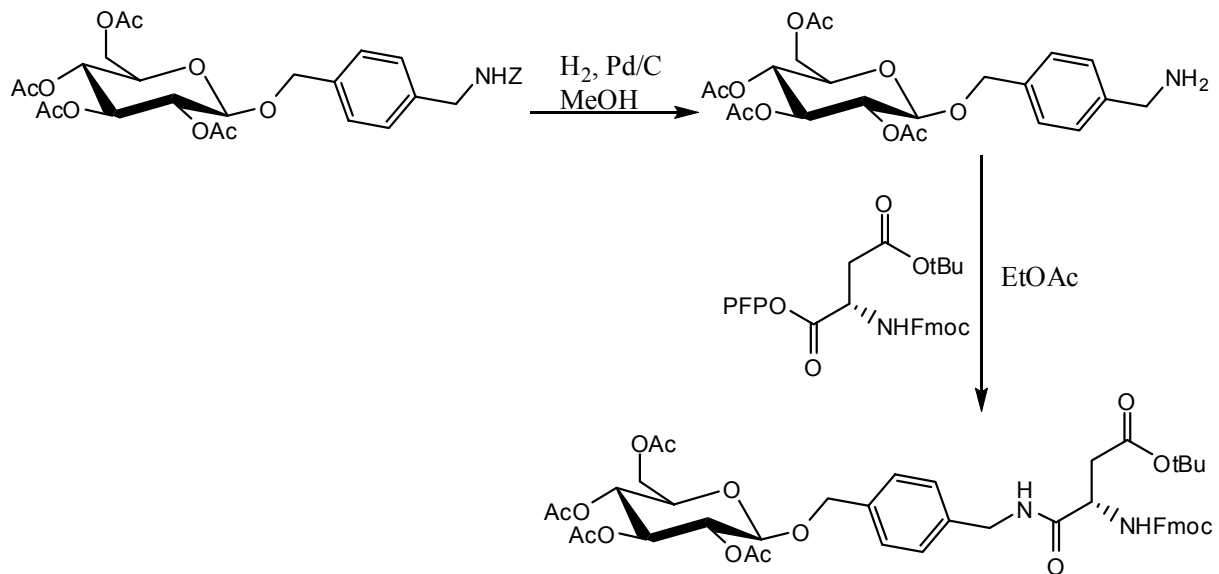
In der Bausteinsynthese wurden leicht zugängliche benzoylgeschützte Monosaccharidtrichloracetimidate von Glucose, Mannose, Galactose und Rhamnose mit *N*-Benzyloxycarbonyl-*p*-aminomethylbenzylalkohol als Spacermolekül glycosyliert. Danach musste auf Acetylschutzgruppen umgeschützt werden, da sie am Ende der Synthese unter milden Bedingungen mit 5M Ammoniak in Methanol abgespalten werden kann. Die Glycosylierung und Umschützung lief mit guten Ausbeute (68-76%) ab.



Im Falle von *N*-Acetylglucosamin war die Aktivierung durch Bildung des Acetyloxazolins und die Glycosylierung mit CuCl₂ nötig.

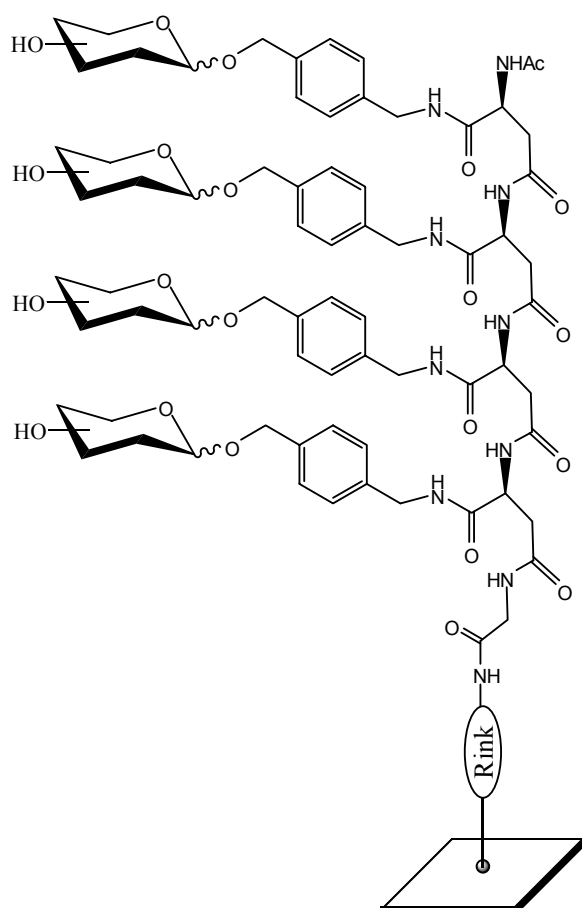


Nach Umschützung auf Acetyl- Schutzgruppen und Entschützung der Aminofunktion des Spacers wurde mit Pentafluorphenol-aktivierter, Fmoc und *t*Bu geschützter Asparaginsäure zum vollständigen Baustein gekuppelt.



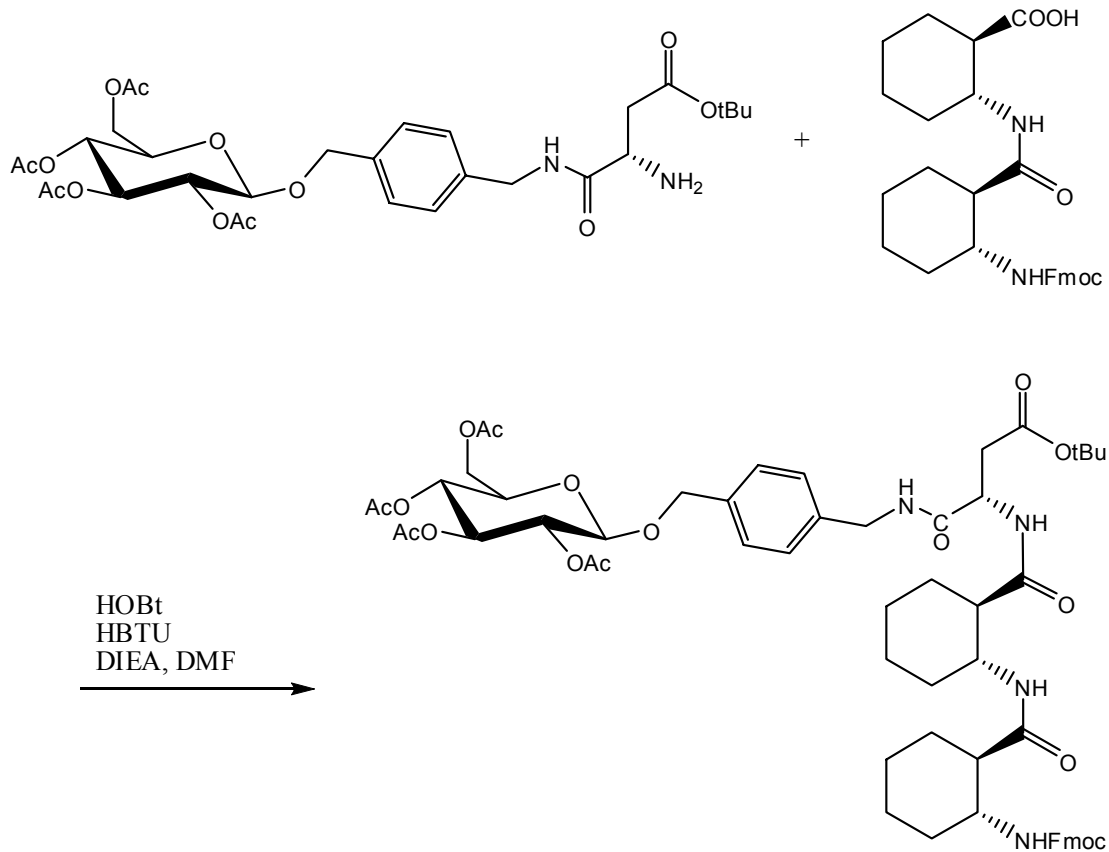
Die Umsetzungen liefen nach einigen Optimierungen, speziell bei der Synthese des Spacermoleküls und der Z- Entschützung des Glycosids, mit guten Ausbeuten ab (42-85%)

Die so erhaltenen Bausteine konnten dann zur Erstellung von Glycopeptidbibliotheken auf modifizierten Zellulosemembranen durch Spot- Synthese nach der Fmoc- Strategie und für anschließende Affinitätstests mit Lectinen verwendet werden. dabei konnte gezeigt werden, dass die Zuckerreste von Mannose erkennendem ConA gut und spezifisch erkannt wurden, während erst ab einer Kettenlänge von vier Asparaginsäurebausteinen eine spezifische Affinität zu GNA nachgewiesen werden konnte.



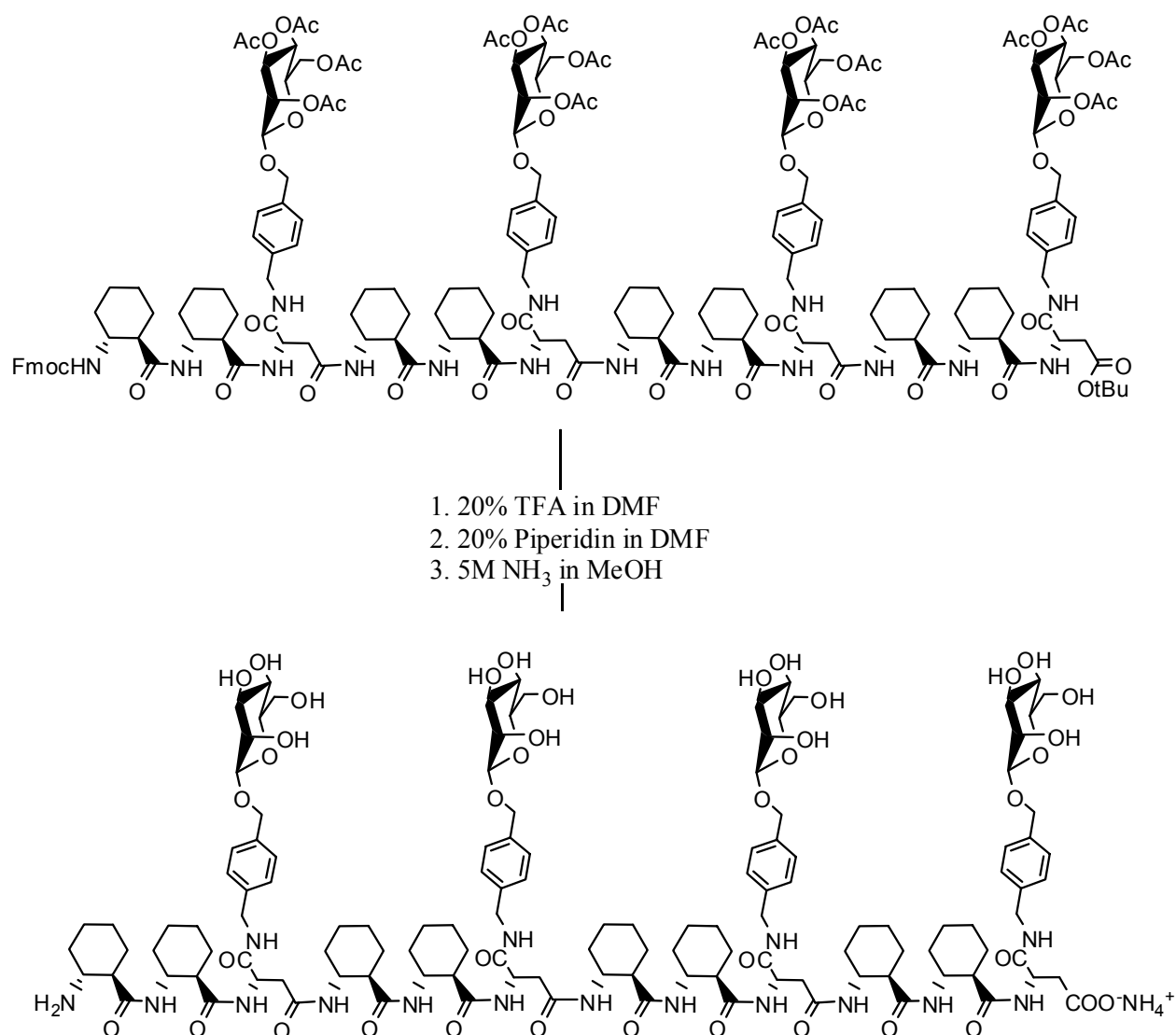
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die bestehenden Bausteine bei der Synthese helixförmiger β -Peptide zu integrieren, um dadurch Mimetika mit einer hohen Steifigkeit und vorhersagbarer Sekundärstruktur zu erhalten.

Um eine Möglichst stabile Helix zu erhalten, bei der immer die vierte Aminosäure wieder über der ersten liegt, eine so genannte „14-Helix“, fiel die Wahl auf die β - Aminosäuren (*R,R*)-*trans*-2-Aminocyclohexylcarbonsäure „ACHC“, die als extrem Helix-stabilisierend bekannt ist und außerdem zur Ausbildung der erwünschten „14-Helix“ führt. Die ACHC-Dipeptide wurden nach einer Boc/benzyl- Strategie dargestellt und dann auf Fmoc umgeschützt, da wegen des benzylichen Spacers eine Fmoc- Strategie angewandt werden musste. Diese Dipeptide konnten dann mit HBTU/HOBt/DIEA in sehr guten Ausbeuten mit den schon bestehenden Bausteinen zu Tripeptiden gekuppelt werden.

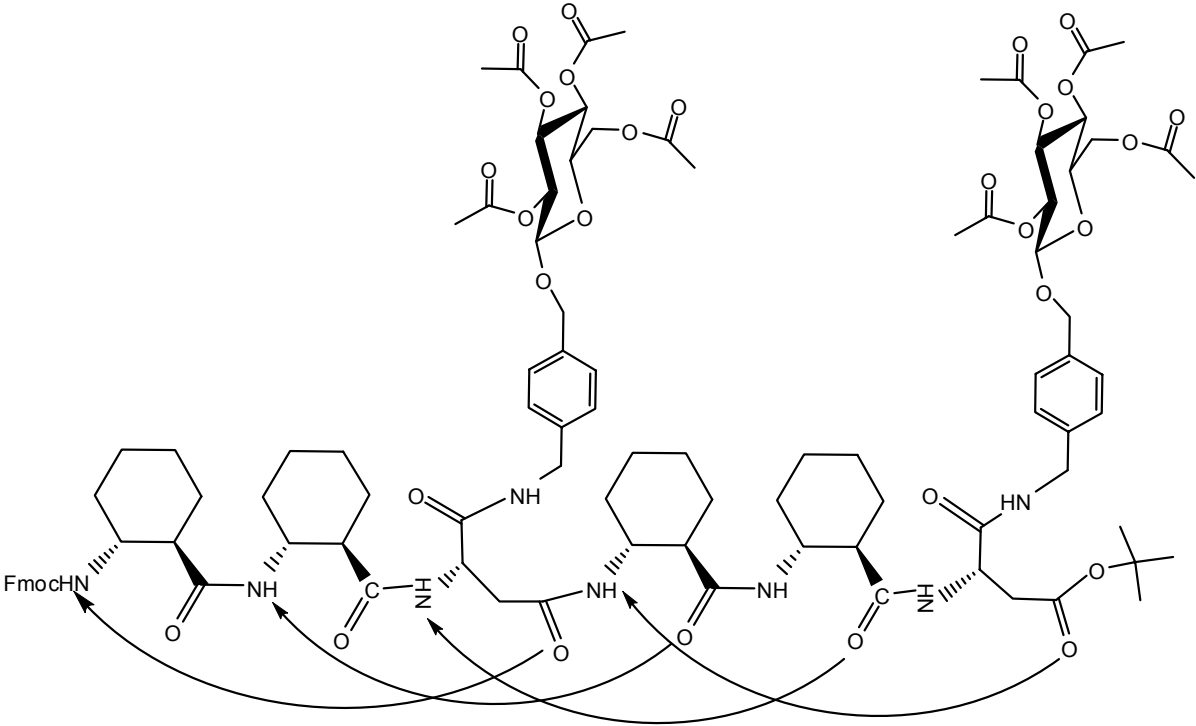


Durch Kupplung dieser glycosylierten Tripeptide konnten dann mit der gleichen Kupplungsmethode mit HBTU/HOBt/DIEA Hexapeptide und durch Kupplung der Hexapeptide Dodecapeptide synthetisiert werden.

Diese Hexapeptide und Dodecapeptide konnten anschließend vollständig entschützt und einem Affinitätstest mit Lectinen unterworfen werden. Dabei wurde zusätzlich zu der schon beschriebenen hohen Affinität der mannosehaltiger Glycopeptide zu ConA eine hohe Affinität der mannose- und glucosehaltigen Hexa- und Dodecapeptide zu GNA festgestellt werden.



Die vermutete „14-Helix“ der geschützten Hexapeptide konnte durch NOE- Experimente bestätigt werden. Dabei wurden speziell die long-range-NOE-Kopplungen zwischen den NH-Protonen des Rückgrates und den *CH- α* und *CH- β* der Ringe betrachtet. Die gefundenen Kopplungen deuten auf eine Helixstabilisierung durch die Wasserstoffbrückenbindungen $C=O(i) \cdots H-N(i-2)$, wie für andere „14-Helices“ beschrieben, hin.



7. Literaturverzeichnis:

- 1 S. André, H. Kaltner, J. Kopitz, H.-C. Siebert, *Biospektrum*, **2006**, *12*, 706-709.
- 2 S. Roseman, *J.Biol.Chem.* **2001**, *45*, 41527-41542.
- 3 R.C. Bertozzi, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **2001**, *98*, 12870-12871.
- 4 J. Kreuger, M. Salmivirta, L. Sturiale, G. Gimenez-Gallego, U. Lindahl, *J.Biol.Chem.* **2001**, *276*, 30744-30752.
- 5 C.-C. Tsai, P. Emau, Y. Jiang, M. B. Agy, R. J. Shattock, A. Schmidt, W. R. Morton, K.R. Gustafson, M.R. Boyd, *AIDS Research and Human Retroviruses*, **2004**, *20*, 11-18.
- 6 N. Aboitiz, M. Villa-Perelló, P. Groves, J. L. Asensio, D. Andreu, F. J. Cañada, J. Jimenez-Barbero, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 1245-1255.
- 7 R.A. Laine, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759-767.
- 8 S.E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1325-1328.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **1996**, *35*,1230-1233.
- 9 A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2364 – 2369.
- 10 R. Kornfels, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
- 11 H.Schachter, I. Brockhausen in *Glycoconjugates*, **1992**, Marcel Decker, New York, Hrsg. H.J. Allen.
- 12 E.G. Berger, E. Buddecke, J.P. Kammerling, A. Kobata, J.C. Paulson, J.F.G. Vliegthart, *Experimenta* **1982**, *38*, 1129-1139.
- 13 T. Muramatsu, *J.Biochem.* **2000**, *127*, 171-176.
- 14 P. M. Rudd, T. Elliot, P. Cresswell, I. A. Willson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370-2376.
- 15 Y. van Kooyk, T.B.H. Geijtenbeek, *Nat. Rev. Immun.* **2003**, *3*, 697-709.
- 16 T.Lübke, T. Marquardt, A. Etzioni, E. Hartmann, K.v. Figura, C. Körner, *Nat. Genet.*, **2001**, *28*, 73-76.
- 17 A. Hamilton-Andreotti, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3352-3358.
- 18 F.-G. Hanisch, C.A. Reis, H. Clausen, H. Paulsen, *Glycobiology*, **2001**, *11*, 731-740.
- 19 B.M Vertel, *Trends Cell. Biol.* **1995**, *5*, 458 – 464.
- 20 O. Seitz, *ChemBioChem*, **2000**, *1*, 214-246.
- 21 S.O. Kolset, K. Prydz, G.Pejler, *Biochem.J*, **2004**, *379*, 217-227.
- 22 C.S. Arnold, G.V.W. Johnson, R.N. Cole, D.L.-Y. Dong, M. Lee, G.W. Hart, *J.Biol.Chem.* **1996**, *271*, 28741-28744.
- 23 M.A. Brun, M.D. Disney, P.H. Seeberger, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 421-424.

-
- 24 R.J. Pieters, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 721-728.
- 25 I. Shin, S. Park, M.r. Lee, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2894-2901.
- 26 H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184-201.
Angew.Chem.int.Ed.Engl. **1982**, *21*, 155-172.
- 27 H.M.I. Osborne in *Carbohydrates: Best synthetic Methods*, **1996**, Academic Press: England, 1-427.
- 28 G.J. Booms, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1095-1121.
- 29 S.H. Khan, R.A. O'Neil in *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*, **1996**, Harwood Academic Amsterdam
- 30 J.Y. Baek, T.J. Choi, H.B. Jeon, K.S. Kim, *Angew.Chem.int.Ed.* **2006**, *45*, 7436-744
- 31 E. Attolio, A.J. Fairbanks, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3061-3064.
- 32 S. Califice, V. Castronovo, F. van den Brûlen, *Int.J.Oncolog.* **2004**, *25*, 983-992.
- 33 F-T. Liu, G.A. Rabinovich, *Nat.Rev.Cancer*, **2005**, *5*, 29-41.
- 34 S. Nakashara, N. Oka, A. Raz, *Apoptosis*, **2005**, *10*, 267-275.
- 35 G.A. Rabinovich, M.A. Toscano, J.M. Ilarregui, N. Rubinstein, *Glycoconjugate J.* **2004**, *19*, 565-573.
- 36 B.G. Davis, M.A. Robinson, *Curr.Opin.Drug.Discovery Dev.* **2002**, *5*, 279-288.
- 37 L. Schofield, M.C. Hewitt, K. Evans, M-A. Siomos, P.H. Seeberger, *Nature*, **2002**, *418*, 785-789.
- 38 H. Li, L.-X. Wang, *Org.Biomol.Chem.* **2004**, *2*, 483-488.
- 39 K.J. Doores, D.G. Gamblin, B.G. Davis, *Chem.Eur.J.* **2006**, *12*, 656-665.
- 40 T.K. Lindhorst, *Topics Curr. Chem.* **2002**, *218*, 201-235.
- 41 M.K. Tong, G. Papandreou, B. Ganem, *J.Am.Chem.Soc.* **1990**, *112*, 6137-6139.
- 42 F. Gessier, T. Tschamber, C. Tarnus, M. Neuburger, W. Huber, J. Streith, *Eur.J.Org.Chem.* **2001**, 4111-4125.
- 43 A. Liu, K. Dillon, R. Campbell, D.C. Cox, D.R. Huryn, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 3785-3788.
- 44 T. Marron, T. Woltering, G. Weitz-Schmidt, C.H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9037-9040.
- 45 M. Christensen, M. Meldal, K. Bock, H. Cordes, S. Mouritsen, H. Elsner, *J.Chem.Soc.,Perkin Trans.*, **1995**, *1*, 2883-2898.
- 46 C.Y. Tsai, X. Huang, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9499-9503.
- 47 R. Ferritto, P. Vogel, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 3517-3518.
- 48 E.F. Fuchs, J. Lehmann, *Carbohydr.Res.* **1976**, *49*, 267-273.

-
- 49 F. Schweizer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 240-264.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **2002**, *41*, 230-253.
- 50 S.A.W. Gruner, V. Traffault, G. Voll, E. Locardi, M. Stöckle, H. Kessler, *Chem.Eur.J.* **2002**, *8*, 4365-4376.
- 51 Y. Suhara, Y. Yamaguchi, B. Collins, R.L. Schnaar, M. Yanagishita, J.E.K. Hildreth, I. Shimada, Y. Ichikawa, *Bioorg.Med.Chem.* **2002**, *10*, 1999-2013.
- 52 N. Röckendorf, T.K. Lindhorst, *J.Org.Chem.* **2004**, *69*, 4441-4445.
- 53 J.M. Kim, R. Roy, *Carbohydrate Res.* **1997**, *298*, 173-179.
- 54 T.F.J. Lampe, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew.Chem.* **1998**, *110*, 1761-1764.
Angew.Chem.Int.Ed. **1998**, *37*, 1707-1711.
- 55 M.K. Christensen, M. Meldal, K. Bock, H. Cordes, S. Mouritsen, H. Elsner, *J. Chem Soc.,Perkin Trans.1*, **1994**, 1299-1310.
- 56 L. Jobron, G. Hummel, *Angew.Chem.* **2000**, *112*, 1704-1707.
Angew. Chem.,Int.Ed. **2000**, *39*, 1621-1624.
- 57 K.M.K. Kutterer, M.L. Barnes, P. Arya, *J.Comb.Chem.* **1999**, *1*, 28-31.
- 58 C. Böttcher, K. Burger, *Tetrahedron Let.* **2003**, *44*,4223-4226.
- 59 J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lönnberg, *J.Org.Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.
- 60 K. Sato, N. Hada, T. Takeda, *Tetrahedron Let.* **2003**, *44*, 9331-9335
- 61 T. Ziegler, D. Röseling, L.R. Subramanian, *Tetrahedron: Asymmetrie*, **2002**, *13*, 911-914.
- 62 C. Schips, T. Ziegler, *J.Carbohydr.Chem.* **2005**, *24*, 773-788.
- 63 D.Seebach, M.Overhand, F.N.M. Kühnle, B.Martinoni, L.Oberer, U.Hommel, H. Widmer, *Helv.Chim.Acta*, **1996**, *79*, 913-941.
- 64 J. Frankenpohl, P.I. Arvidson, J.V. Schreiber, D. Seebach, *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 445-455.
- 65 S.H. Gellman, *Acc.Chem.Res.* **1998**, *31*, 173-180.
- 66 D.J. Hill, M.J. Mio, R.B. Prince, T.S. Hughes, J.S. Moore, *Chem.Rev.* **2001**, *101*, 3893-4011.
- 67 D.Seebach, J.L. Matthews, *Chem.Comm.* **1997**, 2015-2022.
- 68 R.P. Cheng, S.H. Gellman, W.F. DeGrado, *Chem.Rev.* **2001**, *101* ,3219-3232.
- 69 F.A. Syud, J.F. Espinosa, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1999**, *121*, 11577-11578.
- 70 D.H. Apella, L.A. Christianson, D.A. Klein, D.R. Powell, D.E R.X. Huang, *Nature*, **1997**, *387*, 381-384.

-
- 71 J.M. Langenhan, S.H. Gellman, *Org.Lett.* **2004**, *6*, 937-940.
- 72 D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J.L. Mathews, J.V. Schreiber, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta*, **1998**, *81*, 932-982.
- 73 A.M. Brückner, M. Garcia, A. Marsh, S.H. Gellman, U. Diederichsen, *Eur.J.Org.Chem.* **2003**, 3555-3561
- 74 J. Applequist, K.A. Bode, D.H. Apella, L.A. Christianson, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1998**, *120*, 4891-4892.
- 75 X. Wang, J.F. Espinosa, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 4821-4822.
- 76 J.S. Park, H.S. Lee, J.R. Lai, B.M. Kim, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2003**, *125*, 8539-8545.
- 77 P.R. LePlae, J.D. Fisk, E.A. Porter, B. Weisblum, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2002**, *124*, 6820-6821.
- 78 X. Wang, J.F. Espinosa, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 4821-4822.
- 79 D.H. Apella, J.J. Barchi, S.R. Durell, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1999**, *121*, 2309-2310.
- 80 J.J. Barchi, X. Huang, D.H. Apella, L.A. Christianson, S.R. Durell, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2000**, *122*, 2711-2718.
- 81 W.C. Pomerantz, N.L. Abbott, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2006**, *128*, 8730-8731.
- 82 T.L. Raguse, J.R. Lai, P.R. LePlae, S.H. Gellman, *Org.Lett.* **2001**, *3*, 3963-3966.
- 83 J.K. Murray, B. Farooqi, J.D. Sadowski, M. Scalf, W.A. Freund, L.M. Smith, J. Chen, S.H. Gellman, *J.Am.Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13271-13280.
- 84 S. Abele, G. Guichard, D. Seebach, *Helv. chim. Acta*, **1998**, *81*, 2141-2156.
- 85 B.W. Gung, D. Zou, A.M. Stalcup, C.E. Cotrell, *J.Org.Chem.* **1999**, *64*, 2176-2177.
- 86 R.P. Cheng, W.F. DeGrado, *J.Am.Chem.Soc.* **2001**, *123*, 5162-5163.
- 87 P.I. Arvidson, M. Rueping, D. Seebach, *Chem. Commun.* **2001**, 649-650.
- 88 A.J. Doig, R.L. Baldwin, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1325-1335.
- 89 C.A. Rohl, A. Charkrabarty, R.L. Baldwin, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 2623-2633.
- 90 M.A. Schmitt, S.H. Choi, L.A. Guzei, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2006**, *128*, 4538-4539.
- 91 J.D. Sadowski, M.A. Schmitt, H.-S. Lee, N. Umezawa, S. Wang, Y. Tomita, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 11966-11968.
- 92 D.H. Apella, L.A. Christianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1996**, *118*, 13071-13072.

-
- 93 D. Liu, W.F. DeGrado, *J.Am.Chem.Soc.* **2001**, *123*, 7553-7559.
- 94 T.L. Raguse, J.R. Lai, S.H. Gellman, *Helv.Chim.Acta*, **2002**, *85*, 4154-4164.
- 95 J.K. Murray, S.H. Gellman, *J.Comb.Chem.* **2006**, *8*, 58-65.
- 96 J.K. Murray, S.H. Gellman, *Org.Lett.* **2005**, *7*, 1517-1520.
- 97 E.A. Porter, B. Weisblum, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 11516-11529.
- 98 D. Seebach, M.Overhand, F.N.M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer, *Helv.Chim.Acta*, **1996**, *79*, 2043-2066.
- 99 J. Podlech, D. Seebach, *Liebigs Ann.* **1995**, 1217-1228.
- 100 J. Podlech, D. Seebach *Helv.Chim.Acta*, **1995**, *78*, 1238-1246.
- 101 J.W. Tiley, W. Danho, S. Shiuey, I. Kulesha, J. Swistok, R. Makofske, J. Michalewski, J. Triscari, D. Nelson, S. Weatherford, V. Madison, D. Fry, C. Cook, *J.Med.Chem.* **1992**, *35*, 3774-3783.
- 102 H.S. Lee, P.R. LePlae, E.A. Porter, S.H. Gellman, *J.Org.Chem.* **2001**, *66*, 3597-3599.
- 103 S.Y. Han, Y.A. Kim, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 2447-2467.
- 104 C.A.G.N Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- 105 L.A. Carpino, A. El-Faham, *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.
- 106 L.A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc.Chem.Res.* **1996**, *29*, 268-274.
- 107 H. A. Staab, *Justus Liebigs Ann.Chem.* **1957**, *609*, 75-83.
- 108 R. Paul, W. Anderson, *J.Am.Chem.Soc.* **1960** *82* 4596 – 4600.
- 109 J.C. Sheehan, G.P. Hess, *J.Am.Chem.Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- 110 J.C. Sheehan, P.A. Cruickshank, *J.Org.Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- 111 L.A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 6813-6830.
- 112 U. Ragnarson, L. Grehn, *Acc.Chem.Res.* **1998**, *31*, 494-501.
- 113 G.C. Windridge, E.C. Jorgensen, *J.Am.Chem.Soc.* **1971**, *17*, 6318-6319.
- 114 R.C.F. Jones, J. Dickson, *J.Peptide Sci.* **2001**, *7*, 220-223.
- 115 B. Castro, J.-R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *14*, 1219-1222.
- 116 B. Castro, J.-R. Dormoy, V. Dourtoglou, G. Evin, C.Selve, J.-C. Ziegler, *Synthesis*, **1976**, 751.
- 117 J. Coste, E. Frerot, P.Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- 118 W. Wang, J.S. McMurray, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2501-2504.
- 119 G.R. Pettit, S.R. Taylor, *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 2322-2325.
- 120 R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.

-
- 121 V. Dourtoglou, J-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *15*, 1269-1272.
- 122 R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- 123 V. Dourtoglou, J-C. Ziegler, B. Gross, *Synthesis*, **1984**, 572-574.
- 124 I. Abdelmoty, F. Albericio, L.A. Carpino, B.M. Foxman, S.A. Kates, *Lett.Pept.Sci.* **1994**, *1*, 57-67.
- 125 L.A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F.J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B.M. Foxman, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew.Chem.* **2002**, *114*, 457-461.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **2002**, *41*, 441-445.
- 126 L.A. Carpino, P. Henklein, B.M. Foxman, I. Abdelmoty, B. Costisella, V. Wray, T. Domke, A. El-Faham, C. Mügge, *J.Org. Chem*, **2001**, *66*, 5245-5274.
- 127 R. Roy, *Trends Glycosci.Glycotech.* **1996**, *8*, 79.
- 128 R. Roy, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* **1988**, 1058.
- 129 R. Roy, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* **1995**, 2571-2573.
- 130 S.-I. Nishimura, K.B. Lee, K. Matsuoka, Y.C. Lee, *Biochem.Biophys.Rev.Commun.* **1994**, *199*, 249-254.
- 131 Th. K. Lindhorst, *Chem. Unserer Zeit*, **2000**, *1*, 38-52.
- 132 G.L. Simpson, A.H. Gordon, D.M. Lindsay, N. Promsavan, M.P. Crump, K. Mulholland, B.R. Hayter, T. Gallagher, *J.Am.Chem.Soc.* **2006**, *128*, 10638-10639.
- 133 A.M. Brückner, P. Chakraborty, S.H. Gellman, U. Diederichsen, *Angew.Chem.* **2003**, *115*, 4532-4536.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **2003**, *42*, 4395-4399.
- 134 M.D. Disney, D.F. Hook, K. Namoto, P.H. Seeberger, D. Seebach, *Chem. Biodiversity*, **2005**, *2*, 1624-1633.
- 135 W.F. DeGrado, C.M. Summa, V. Pavone, F. Nastro, A. Lombardi, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 779-819.
- 136 J.M. Heemstra, J.S. Moore, *Chem.Commun.* **2004**, 1480-1481.
- 137 J. Maier, *Zulassungsarbeit Universität Tübingen*, **2003**.
- 138 K. Toshima, K. Tatsuka, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503-1531.
- 139 a) W. Szeja, *Synthesis*, **1988**, *3*, 223-224.
b) W. Szeja, K. Bogusiak, *Synthesis*, **1988**, *3*, 224-225.
- 140 W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.*, **1901**, *34*, 957.

-
- 141 T. Mukaiama, Y. Murai, S. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, *111*, 431-432.
- 142 S. Hashimoto, M. Hayashi, R. Noyori, *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 1379-1382.
- 143 M. Kreuzer, J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, **1986**, *149*, 347-361.
- 144 T. Ogawa, K. Beppu, S. Nakabayashi, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, C6.
- 145 B.G. Davis, A.J. Fairbanks, *Carbohydrate Chemistry*, **2002**, Oxford university press, 33.
- 146 G. Müller, *Ber.Dtsch.Chem.Ges.* **1885**, *18*, 2485.
- 147 M. Bergmann, L. Zervas, *Ber.Dtsch.Chem.Ges.*, **1932**, *65*, 1192
- 148 K.-I. Oyama, T.Kondo, *Synlett*, **1999**, *10*, 1627-1629.
- 149 J. Dahmen, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.* **1983**, *114*, 328-330.
- 150 K.C. Nicolaou, A. Chucholowski, R.E. Dolle, J.L. Randall, *J.Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1984**, 1155-1156.
- 151 A.V. Nicolaev, I.A. Inanova, V.N. Shibaef, N.K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1990**, *204*, 65-78.
- 152 T. Ziegler, P. Kovac, C.P.J. Glaudemans. *Liebigs Ann.Chem*, **1990**, 613-615.
- 153 F. Bien, T. Ziegler, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 781 – 790.
- 154 R. R. Schmidt, J. C. Castro – Palomino, O. Retz, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 729 - 744.
- 155 R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213 – 236.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **1986**, *25*, 212-235.
- 156 Thisbe K.Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry, VCH*, **2000**, 47.
- 157 S. Nakabayashi, C.D. Warren, R.W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1986**, *150*, 279- 289.
- 158 S. Nakabayashi, C.D. Warren, R.W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1988**, 279-289.
- 159 V. Wittmann, D. Lennarz, *Eur.J.Org.Chem.* **2002**, 1363-1367.
- 160 D.H. Apella, L.A. Chritianson, I.L. Karle, D.R. Powell, S.H. Gellman, *J.Am.Chem.Soc.* **1999**, *121*, 6206-6212.
- 161 H. Koch, J. Kotlan, *Monatsh.Chem.* **1966**, *6*, 1649-1659.
- 162 K. Roth, *Chem.Unserer Zeit*, **2006**, *40*, 398-406.
- 163 P. Arizzabalaga, P. Castan, J.-P. Laurent, *J.Am.Chem.Soc.* **1984**, *106*, 4814-4818.
- 164 A. Berkessel, K. Glaubitz, J. Lex, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *17*, 2948-2952.
- 165 S. Abele, G. Guichard, D. Seebach, *Helv.Chim.Acta*, **1998**, *81*, 2141.
- 166 E. Vaz, L. Brunsveld, *Org.Lett.* **2006**, *8*, 4199-4202.
- 167 D. Seebach, M. Rueping, K. Gademann, M. Ernst, B. Jaun, *Helv.Chim.Acta*, **2000**, *83*, 2115-2140.

-
- 168 P.I. Arvidson, M. Rueping, D. Seebach, *Chem. Commun.* **2001**, 123, 649-650.
- 169 R.P. Cheng, W.F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11564-11565.
- 170 S.A. Hart, A.B.F. Bahadoor, E.E. Mathews, X.J. Qiu, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11564-11565.
- 171 R.P. Cheng, W.F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5162-5163
- 172 S.A. Hart, A.B.F. Bahadoor, E.E. Mathews, X. Y.J. Qiu, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4022-4023.
- 173 J.A. Kritzer, J. Tirado-Rives, S.A. Hart, J.D. Lear, W.L. Jorgensen, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 167-178.
- 174 W.F. DeGrado, C.M. Summa, V. Pavone, F. Nastro, A. Lombardi, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 779-819.
- 175 R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- 176 R.B. Merrifield, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161-214.
- 177 B. Gutte, R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 501.
- 178 R.B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 801.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1985**, 24, 799.
- 179 H.M. Geysen, S.J. Bartling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 82, 5313-5335.
- 180 P.W. Davis, D. Hudson, M. Lyttle, N.D. Sinaha, N. Usman, M. Weiss, P. Wright, *Innovation and Perspektive in Solid Phase Synthesis*, (Ed.: R. Epton), Intercept, Andover, 1992.
- 181 S.J. Danishefsky, K.F. McClure, J.T. Randolph, R.B. Ruggeri, *Science*, **1993**, 260, 1307.
- 182 R. Ojeda, J.-L. de Paz, M. Martin-Lomas, *Chem. Commun.* **2003**, 2486-2487.
- 183 D. Roemer, H.-H. Buescher, R.C. Hill, J. Pless, W. Bauer, F. Cardinaux, A. Closse, D. Hauser, R. Hugenin, *Nature*, **1977**, 286, 547.
- 184 A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 487-493.
- 185 R. Frank, R. Döring, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 6031-6040.
- 186 J. Eichler, M. Beyermann, M. Bienert, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, 54, 1746-1752.
- 187 R. Frank, *J. Biotechnol.* **1995**, 41, 259-272.
- 188 A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Methods Mol. Biol.* **1998**, 87, 25-39.
- 189 S.P.A. Fodor, J. L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, *Science*, **1991**, 251, 767-773.

-
- 190 M.-R. Lee, I. Shin, *Angew.Chem.* **2005**, *117*, 2941-2944.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **2005**, *44*, 2881-2884.
- 191 H.J. Müller, T. Röder „*Der Experimentator Microarrays*“ Spektrum: Elsevier **2004**.
- 192 M.A. Brun, M.D. Disney, P.H. Seeberger, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 421-424.
- 193 V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2000**, *112 (23)*, 4508-4512.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **2000**, *112*, 4348-4352.
- 194 F. Kanie, Y. Baresi, Y. Ding, J. Labbe, A. Otter, L.S. Forsberg, B. Ernst, O. Hindsgaul, *Angew.Chem.* **1995**, *107*, 2912-2914.
Angew.Chem.int.Ed. **1995**, *34*, 2720-2722.
- 195 R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W.C. Still, D. Kahne, *Science*, **1996**, *274*, 1520-1522.
- 196 S. Park, I. Shin, *Angew.Chem.* **2002**, *114*, 3312-3314.
- 197 S. Park, M.-r. Lee, S.-J. Pyo, I. Shin, *J.Am.Chem.Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- 198 D.M. Ratner, E.W. Adams, H.R. Bokesch, J.B. McMahon, B.R. O'Keefe, P.H. Seeberger, *Chem.Biol.* **2004**, *5*, 379-382.
- 199 M. Meldal, K. Bock, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6987-6990.
- 200 P.M. StHillaire, M. Meldal, *Angew.Chem.* **2000**, *112*, 1210-1228.
Angew.Chem.int.Ed. **2000**, *39*, 1162-1179.
- 201 P.M. StHillaire, T.L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J.Am.Chem.Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320.
- 202 I. Christiansen- Brahms, M. Meldal, K. Bock, *J.Chem. Soc. Perkin Trans.1*, **1993**, 1461-1471.
- 203 T. Ziegler, C. Schips, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1987-1994.
- 204 T. Ast, N. Heine, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4317-4318.
- 205 Carsten Schips, *Doktorarbeit Universität Tübingen*, **2005**.
- 206 M.D. Bowman, R.C. Jeske, H.E. Blackwell, *Org.Lett.* **2004**, *6 (12)*, 2019-2022.
- 207 A.R. Katritzky, K. Suzuki, S.K. Singh, *ARKIVOC* **2004**, *1*, 12-35.
- 208 M. Schinnerl, J.K. Murray, J.M. Langenhan, S.H. Gellman, *Eur.J.Org.Chem.* **2003**, 721-726.
- 209 D.L. Boger, S. Miyazaki, S.H. Kim, J.H. Wu, S.L. Castle, O. Loiseleur, Q. Jin, *J.Am.Chem.Soc.* **1999**, *121*, 10004-10011.
- 210 B. Cao, H. Park, M.M. Joullié, *J.Am.Chem.Soc.* **2002**, *124*, 520-521.

-
- 211 A.K. Gosh, E. Fan, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 165-168.
- 212 C. Yu. M Malesevic, G. Jahreis, M. Schutowski, G. Fischer, C. Schiene- Fischer, *Angew.Chem.* **2005**, *117*, 1432-1437.
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **2005**, *44*, 1408-1412.
- 213 D. Seebach, T. Kimmerling, R. Sebesta, M.A. Campo, A.K. Beck, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7455-7506.
- 214 T. Kimmerling, D. Seebach, *Helv.Chim.Acta*, **2003**, *86*, 2098-2103.
- 215 N. Sharon, H. Lis, *Science*, **1989**, *246*, 227-233.
- 216 N. Sharon, H. Lis, *Lectins*, **2003**, Kluwer academic publisher, Netherlands, 1-441.
- 217 N. Sharon, H. Lis, *Sci.Am.* **1993**, *268*, 74-81.
- 218 W.I. Weis, *Annu.Rev.Biochem.* **1996**, *65*, 441-473.
- 219 J.E. Gestwicki, C.W. Cairo, L.E. Strong, K.A. Oetjen, L.L. Kiessling, *J.Am.Chem.Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- 220 N. Sharon, *Lectin Blocking, a new Strategie for the Prevention and Therapy of Tumor, Metastasis and infectious Diseases*, **1994**, J. Beut, G. Pulverer Eds. Gustaf Fischer Verlag Stuttgart.
- 221 B.A. Williams, M.C. Chervenak, E. Toone jr., *J.Biol.Chem.* **1992**, *267*, 22907.
- 222 J. Boukaert, T. Hamelryck, L. Wyns, R. Loris, *Curr.Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 572-577.
- 223 J.-C. Promé, *Curr.Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 671-678.
- 224 D. Vestweber, J.E. Blanks, *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 181-213.
- 225 A. Helenius, M. Aebi, *Science*, **2001**, *291*, 2364-2369.
- 226 A. Helenius, M. Aebi, *Ann.Rev.Biochem.* **2004**, *73*, 1019-1049.
- 227 E.E. Simanek, G.J. McGarvey, J.A. Jablonski, C.H. Wong, *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 833-862.
- 228 N.M. Drahms, M.K. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *1572*, 317-340.
- 229 G.N. Reeke Jr., J.W. Becker, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **1988**, *139*, 35-58.
- 230 E.J.M. Van Damme, A.K. Allen, W.J. Peumans, *FEBS Letters*, **1987**, *215*, 140-144.
- 231 N. Shibuya, I.J. Goldstein, E.J.M Van Damme, *J.Biol.Chem.* **1988**, *263*, 728-734.
- 232 E.J.M. Van damme, H. Kaku, I.J. Goldstein, B. Peeters, F. Yagi, B. Decock, W.J. Peumans, *Eur.J.Biochem.* **1991**, *202*, 23-30.
- 233 I. Shin, S. Park, M.R. Lee, *Chem.Eur. J.* **2005**, *11*, 2894-2901.
- 234 D. Wang, S. Liu, B.J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat.Biotechnol.* **2002**, *20*, 275-281.

-
- 235 W.G.T. Willats, S.E. Rasmussen, T. Kristensen, J.D. Mikkelsen, J.P. Knox, *Proteomics*, **2002**, *41*, 3180-3182.
- 236 S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A.M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1011-1017.
- 237 Stuart L. Schreiber, Sternson Scott *U.S. Pat. Appl. Publ.*, (2004), 177 pp., Cont. – in – part of U.S. Pat. Appl. 2003 – 187,027. CODEN: USXXCO US 2004072849 A1 20040415.
- 238 N. B. D'Accorso, I. M. E. Thiele, M. Schüler, *Carbohydr. Res.* **1983**, *124* 177- 184.
- 239 R. K. Ness, H. G. Fletcher Jr., C.S. Hudson, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 296 – 300.
- 240 H.G. Fletcher jr. in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Hrsg. R.L. Whistler, M.L. Wolfram), Vol. 2, Academic Press, New York, **1963**, 226 – 228.
- 241 Bock, Pedersen, *Acta Chem. Scand. Ser. B.* **1974**, *28*, 1041-1042.
- 242 P. Kovac, R. B. Taylor, C. P.J. Glaudemans, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5323 – 5333.
- 243 A.V. Nikolaev, T.J. Rutherford, M.A.J. Fergusson, J.S. Brimacombe, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.* **1995**, *16*, 1977-1988.
- 244 B.N.A. Mbadhuga, F.M. Menger *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4041 – 4044.
- 245 A. E. Salinas, *Carbohydr. Res.* **1999**, *316*, 34 – 46.
- 246 J. Fiandor, M.T. Garcia-Lopez, F.G. De Las Heras, P.P. Mendez-Castrillon, *Synthesis*, **1985**, *12*, 1121 – 1123.
- 247 T. Ziegler, C. Jurisch, *Tetrahedron: Asymm.*, **2000**, *11*, 3403-3418.
- 248 D. Lafont, M.-N. Bouchu, A. Girard-Egrot, P. Boullanger, *Carbohydr. Res.* **2001**, *336*, 181 – 194.
- 249 J. Zhang, F. Kong, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 391-396.
- 250 B. P. Gangadhar, S. D.S. Jois, A. Balasubramanian, *Tetrahedron Lett.* **2004** *45*, 355 – 358.
- 251 Z. J. Kaminski, B. Kolesinska, J. Kolesinska, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *48*, 16912 – 16920.
- 252 A. Werner, H.E. Conrad, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3046-3055.

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Oligosaccharidmimetika in Form von benzylichen *O*-Glycosiden dargestellt. Um die Glycoside an einem β -Peptidrückgrat aufreihen zu können, wurden die Glycoside jeweils mit der α -Carboxylfunktion einer Asparaginsäure verknüpft. Diese so glycosylierten Asparaginsäurebausteine konnten nach Aktivierung mit Pentafluorphenol und HO₂t über eine Fmoc-Strategie durch Spotsynthese miteinander verknüpft werden. Die entstandene Substanzbibliothek konnte mit Lectinen einem Affinitätstest unterzogen werden.

Um ein steiferes Rückgrat zu erhalten, wurde die Eigenschaft von β -Peptiden schon bei sehr kurzer Kettenlänge ab sechs Aminosäuren starre Helixstrukturen auszubilden ausgenutzt.

Deshalb wurden die Asparaginsäurebausteine mit einem Fmoc- geschützten *R,R*-Aminocyclohexancarbonsäure- Dipeptid über eine Fmoc- Strategie mit HOBt/HBTU/DIEA-Aktivierung in Lösung zu β -Tripeptidbausteinen verknüpft. Diese Tripeptidbausteine konnten ihrerseits nach der gleichen Strategie miteinander zu glycosylierten β -Hexapeptiden verknüpft werden. Über NOE-Messungen konnte eine 14-Helixstruktur der geschützten β -Hexapeptide nachgewiesen werden. Die vorgefertigten β -Tripeptidbausteine entsprechen also einem Umgehung der Helix. Durch die Möglichkeit, pro Kupplungsreaktion einen variablen Zuckerer an der Helix zu positionieren, ergibt sich eine hohe Flexibilität der Zuckersequenz am Rückgrat.

Die glycosylierten β -Hexapeptide konnten ihrerseits nach der gleichen Strategie miteinander zu glycosylierten β -Dodecapeptiden verknüpft werden wie für die glycosylierten Tri- und Hexapeptide beschrieben.

Nach dem vollständigen Entschützen der glycosylierten β -Peptide konnten sie auf einer Nitrozellulosemembrane immobilisiert werden und einem Affinitätstest mit Lectinen unterzogen werden. Der Test verlief im Falle von Con A wie erwartet für Mannose haltige Glycopeptide positiv aus. Allerdings konnte im Fall von GNA, einem Man- α -1,3-Man Oligomere erkennenden Lectin eine im Gegensatz zu den aus reinen Asparaginsäurebausteinen bestehenden Glycopeptiden stark erhöhte Affinität schon bei kurzen Zuckersequenzen festgestellt werden.

Abstract

The present work describes the synthesis of benzylic *O*-Glycosides as new oligosaccharidemimics. The glycoside is linked to the α - carboxylic group of aspartic acid thus being able to be arranged along a β -peptide backbone. These glycosylated aspartic acid buildingblocks were coupled by spot synthesis using a Fmoc- strategy after activation via PFP/HODhbt. The developed substance bibliotheca could be subjected to an affinity screening by lectins.

To afford a more rigid backbone the character of β -peptides forming a inflexible helix structure actually in short chain length about six amino acids was exploited.

Thus the aspartic acid building blocks were linked to a R,R- aminocyclohexanecarboxylic acid dipeptide by a coupling reaction using HOBt/HBTU/DIEA activation and Fmoc-strategy in solution affording β -tripeptide building blocks. These tripeptide building blocks could be coupled among themselves to afford glycosylated β -hexapeptides using the same strategy. By using NOE-NMR-methods a 14-Helix structure of the protected glycosylated β -Hexapeptides could be detected. The precast β -tripeptide building blocks correspond to one turn on the helix. Using the possibility of positioning one variable sugar per coupling reaction on the on the helix a high flexibility of the sugar sequence is afforded.

The hexapeptide building blocks could be coupled among themselves affording glycosylated β -dodecapeptides by using the same strategy as described for the glycosylated tri- and hexapeptides.

After complete deprotection the glycosylated β -peptides could be immobilized on nitrocellulose membrane and subjected to an affinity screening by lectins. The screening with Con A, a mannose binding lectin, proceeded positive as expected for mannose containing glycopeptides. For GNA, a Man- α -1,3-Man oligomere recognizing lectin a significantly raised affinity for short sugar sequences in contrast to the glycopeptides containing solely aspartic acid building blocks was determined.

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Oligosaccharidmimetika in Form von benzyliischen *O*-Glycosiden dargestellt. Um die Glycoside an einem β -Peptidrückgrat aufreihen zu können, wurden die Glycoside jeweils mit der α -Carboxylfunktion einer Asparaginsäure verknüpft. Diese so glycosylierten Asparaginsäurebausteine konnten nach Aktivierung mit Pentafluorphenol und HODhbt über eine Fmoc-Strategie durch Spotsynthese miteinander verknüpft werden. Die entstandene Substanzbibliothek konnte mit Lectinen einem Affinitätstest unterzogen werden.

Um ein steiferes Rückgrat zu erhalten, wurde die Eigenschaft von β -Peptiden schon bei sehr kurzer Kettenlänge ab sechs Aminosäuren starre Helixstrukturen auszubilden ausgenutzt.

Deshalb wurden die Asparaginsäurebausteine mit einem Fmoc- geschützten *R,R*-Aminocyclohexancarbonsäure- Dipeptid über eine Fmoc- Strategie mit HOBt/HBTU/DIEA-Aktivierung in Lösung zu β -Tripeptidbausteinen verknüpft. Diese Tripeptidbausteine konnten ihrerseits nach der gleichen Strategie miteinander zu glycosylierten β -Hexapeptiden verknüpft werden. Über NOE-Messungen konnte eine 14-Helixstruktur der geschützten β -Hexapeptide nachgewiesen werden. Die vorgefertigten β -Tripeptidbausteine entsprechen also einem Umgehung der Helix. Durch die Möglichkeit, pro Kupplungsreaktion einen variablen Zuckerer an der Helix zu positionieren, ergibt sich eine hohe Flexibilität der Zuckersequenz am Rückgrat.

Die glycosylierten β -Hexapeptide konnten ihrerseits nach der gleichen Strategie miteinander zu glycosylierten β -Dodecapeptiden verknüpft werden wie für die glycosylierten Tri- und Hexapeptide beschrieben.

Nach dem vollständigen Entschützen der glycosylierten β -Peptide konnten sie auf einer Nitrozellulosemembrane immobilisiert werden und einem Affinitätstest mit Lectinen unterzogen werden. Der Test verlief im Falle von Con A wie erwartet für Mannose haltige Glycopeptide positiv aus. Allerdings konnte im Fall von GNA, einem Man- α -1,3-Man Oligomere erkennenden Lectin eine im Gegensatz zu den aus reinen Asparaginsäurebausteinen bestehenden Glycopeptiden stark erhöhte Affinität schon bei kurzen Zuckersequenzen festgestellt werden.

Abstract

The present work describes the synthesis of benzylic *O*-Glycosides as new oligosaccharidemimics. The glycoside is linked to the α - carboxylic group of aspartic acid thus being able to be arranged along a β -peptide backbone. These glycosylated aspartic acid buildingblocks were coupled by spot synthesis using a Fmoc- strategy after activation via PFP/HODhbt. The developed substance bibliotheca could be subjected to an affinity screening by lectins.

To afford a more rigid backbone the character of β -peptides forming a inflexible helix structure actually in short chain length about six amino acids was exploited.

Thus the aspartic acid building blocks were linked to a *R,R*- aminocyclohexanecarboxylic acid dipeptide by a coupling reaction using HOBt/HBTU/DIEA activation and Fmoc-strategy in solution affording β -tripeptide building blocks. These tripeptide building blocks could be coupled among themselves to afford glycosylated β -hexapeptides using the same strategy. By using NOE-NMR-methods a 14-Helix structure of the protected glycosylated β -Hexapeptides could be detected. The precast β -tripeptide building blocks correspond to one turn on the helix. Using the possibility of positioning one variable sugar per coupling reaction on the on the helix a high flexibility of the sugar sequence is afforded.

The hexapeptide building blocks could be coupled among themselves affording glycosylated β -dodecapeptides by using the same strategy as described for the glycosylated tri- and hexapeptides.

After complete deprotection the glycosylated β -peptides could be immobilized on nitrocellulose membrane and subjected to an affinity screening by lectins. The screening with Con A, a mannose binding lectin, proceeded positive as expected for mannose containing glycopeptides. For GNA, a Man- α -1,3-Man oligomere recognizing lectin a significantly raised affinity for short sugar sequences in contrast to the glycopeptides containing solely aspartic acid building blocks was determined.

Meine Akademischen Lehrer waren die Dozenten und Professoren:

K. Albert
D. Christen
G. Häfelinger
M. Hanack
D. Hoffmann
V. Hoffmann
D. Krug
N. Kuhn
E. Lindner
M.E. Maier
H.-J. Meyer
U. Nagel
H. Oberhammer
B. Speiser
J. Strähle
K.-P. Zeller
Th. Ziegler

Ich versichere, dass ich die mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von **Prof. Dr. Thomas Ziegler** betreut worden.

Lebenslauf Jan Ruben Hörzer geb. Maier

- 07.02.1977.1 geboren in Tübingen
Mutter: Monika Maier geb. Hübel
Vater: Rudolf Maier
- ab Sept. 1983 Einschulung Grundschule Mähringen
- ab Sept. 1987 Wildermuthgymnasium Tübingen
- 27.06.96 Abitur am Wildermuthgymnasium
- 02.09.96 – 30.09.97 Zivildienst im Rettungsdienst und Krankentransport des DRK Tübingen
- WS 97-98 bis SS 03 Studium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
- 04.06.03 Erstes Staatsexamen
- Juni 03
bis Oktober 07 Promotion im AK Prof. Dr. Th. Ziegler am Institut für organische Chemie II an der Eberhard Karls Universität Tübingen.
Titel der Doktorarbeit: „Glycosylierte β -Peptide als Oligosaccharidmimetika“
- 28.10.05 Abschlussprüfung ÜL „C“ mit Erfolg abgelegt.
09. 2005 bis 08.2006 Lehrtätigkeit an der Geschwister Scholl Schule Tübingen
- Seit Januar 07 Referendariat für das Lehramt an Gymnasien am Seminar für Schulpädagogik Tübingen.