Glykopeptidmimetika: Synthesen und Strukturen von glykosylierten Hexa-β-peptiden

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Ralf Daiber

Tag der mündlichen Prüfung:	28. März 2008
Dekan:	Prof. Dr. L. Wesemann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Th. Ziegler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. E. Maier

Meiner Familie in großer
Dankbarkeit gewidmet

Mein besonderer Dank gilt:

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

Herrn Dr. G. Lemanski für die Unterstützung, Diskussionsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Ziegler für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Praktikanten, die an meiner Arbeit mitgearbeitet haben.

Herrn P. Schuler für die zahlreichen NMR-Messungen.

Herrn G. Nicholson für die Messung der FT-ICR-Massenspektren.

Fr. A. Frickenschmidt und B. Kammerer für die Durchführung der MALDI-TOF Messungen.

Den Herrn H. Bartholomä und R. Müller für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren.

Fr. U. Neu für die Anfertigung der CD-Spektren.

Meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Geduld.

Inhaltsverzeichnis:

1.Einleitung und Aufgabenstellung....1
2. Allgemeiner Teil....5
2.1 Oligosaccharide....5
2.1.1 Vorkommen und Funktion....5
2.1.2 Synthese von Oligosacchariden....5
2.1.3 Glykopeptide....6
2.1.4 Glykomimetika....8
2.2 β-Aminosäuren und D-Aminosäuren....10
2.2.1 Sekundärstrukturen von Peptiden....11
2.2.2 β-Peptide: Vorkommen, Funktion und Sekundärstrukturen....13
2.3 Synthekonzept für Oligosaccharidglykomimetika....15
2.3.1 Aufbau eines Neo-Glykopeptidbausteins....16
2.3.2 Verwendete Kohlenhydrate....16
2.3.3 Verwendetes Spacermolekül....17
2.3.4 Verwendete Glykosylierungsmethode....18
2.3.4.1 Synthese der Glykopeptidbausteine (3) und (4)....19
2.3.5 Darstellung der enantiomerenreinen β-Aminosäuren....20
2.3.5.1 Darstellung von trans-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (6) mittels fraktionierte Kristallisation....20
2.3.5.2 Darstellung von trans-(-)-Cyclohexancarbonsäure (6) mittels Enzyme....21
2.3.5.3 Darstellung der Fmoc-(1R,2R)-Aminocyclohexancarbonsäure (8)....22
2.3.5.4 Darstellung von trans-(1S,2S)-Aminocyclopentancarbonsäure (9)....23
2.4 Die Peptidsynthese....27
2.4.1 Allgemeine Aspekte der Peptidsynthese....27
2.4.2 Die chemische Peptidknüpfung....28
2.4.3 Besonderheiten bei Peptidsynthesen in Lösung....28
2.4.4 Synthesestrategie und Racemisierung....29
2.4.5 Kupplungsmethoden....30
2.4.6 Carbodiimid- und Aktivester-Methode....31
2.4.6.1 Darstellung von Fmoc-Asp-OPfp-OBn (19)....32
2.4.6.2 Darstellung von Fmoc-β-Alanin-OPfp (20) und Fmoc-Aib-OPfp (21)....32
2.4.7 Phosphonium-Methode....33
2.4.8 Uronium/Guanindinium-Methode....34
2.4.9 Unerwünschte Reaktionen bei der Peptidsynthese....35
2.4.9.1 Nebenreaktion N-Guanylierung....36
2.4.9.2 Nebenreaktion Aspartimidbildung....36
2.5 Die Tripeptidsynthesen....37
2.5.1 Synthese der Tripeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (28) und Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-OtBu (29)....38
2.5.2 Darstellung von Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (37) und Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-OtBu (38)....43
2.5.3 Darstellung des Tripeptids Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (37) über den Dipeptidbaustein Fmoc-[Asp-(AcGalBB)]-OtBu (39)....49

2.5.4 Darstellung der Tripeptide Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (43) und Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-OtBu (44).....51
2.5.5 Darstellung des Tripeptids Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (47)..... 54
2.5.6 Darstellung der Tripeptide Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (50) und Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-OtBu (51).....57
2.5.7 Darstellung der Tripeptide Fmoc-[ACPC-β-Ala-(AcGlucBB)]-OtBu (54) und Fmoc-[β-Ala-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (57).....60
2.6 Hexapeptidsynthesen.....63
2.6.1 Synthese des Hexapeptids Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (60).....63
2.6.2 Hexapeptidsynthese mit den Tripeptiden (37) und (38).....67
2.6.3 Hexapeptidsynthese mit den Tripeptiden (43) und (44).....68
2.6.4 Darstellung von Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (71).....69
2.6.5 Darstellung des Hexapeptids Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (75).....72
2.6.6 Darstellung des Hexapeptids Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (78).....74
2.7 NMR-Untersuchung der Peptide.....77
2.7.1 Allgemeines zur Peptid-Kernspinspektroskopie.....77
2.7.2 NOESY- und TOCSY-Spektren.....77
2.7.3 Chemische Verschiebung und Random-Coil-Struktur.....81
2.7.4 Strukturaufklärung der Hexapeptide.....81
2.8 CD-Spektren und Auswertung der Peptide.....82
2.9 Lektin-Screening.....87
2.9.1 Allgemeine Bedeutung und Wirkungsweise von Lektinen.....87
2.9.2 Lektine und ihre Wechselwirkungen.....88
2.9.3 Auswahl der Lektine und Färbemethode.....89
2.9.4 Lektin-Screening auf Nitrocellulose.....90
3. Experimentieller Teil.....94
3.1 Chemikalienliste.....94
3.2 Verwendete Geräte.....95
3.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften.....97
3.4 Darstellungen.....102
zu Kapitel 2.3.4.1.....102
zu Kapitel 2.3.5.1.....103
zu Kapitel 2.3.5.2.....104
zu Kapitel 2.3.5.3.....105
zu Kapitel 2.3.5.4.....106
zu Kapitel 2.4.6.1.....110
zu Kapitel 2.4.6.2.....111
zu Kapitel 2.5.1.....112
zu Kapitel 2.5.2.....123
Zu Kapitel 2.5.3.....130
zu Kapitel 2.5.4.....132
zu Kapitel 2.5.5.....136
zu Kapitel 2.5.6.....139
zu Kapitel 2.5.7.....143

zu Kapitel 2.6.1.....148
zu Kapitel 2.6.2.....153
zu Kapitel 2.6.3.....154
zu Kapitel 2.6.4.....154
zu Kapitel 2.6.5.....159
zu Kapitel 2.6.6.....162
zu Kapitel 2.9.3.....166
4. Zusammenfassung.....168
5. Anhang.....172
5.1 Bezifferung der Verbindungen.....172
5.2 Abkürzungen.....175
6. Literaturverzeichnis.....179

1.Einleitung und Aufgabenstellung

Neben Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren sind Kohlenhydrate in allen lebenden Organismen von elementarer Bedeutung in Form von Monosacchariden, Oligosacchariden und Polysacchariden. Sie übernehmen in den Organismen als Gerüst- und Stützsubstanzen sowie auch als Energiespeicher wichtige Funktionen. Weiter besitzen Kohlenhydrate auf kleinsten Raum die meisten Stereozentren unter den Naturstoffen. Zum einen sind Verknüpfung zu linearen Strukturen und stark verzweigten Oligomere möglich, aber auch die Derivatisierung der Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate bietet eine unglaubliche strukturelle Vielfalt[1][2]. Besonders in den letzten Jahren wurde die Bedeutung der Kohlenhydrate als Glykomimetika immer wichtiger. Hier rückt die Rolle der Kohlenhydrate als Informationsüberträger in den Vordergrund[3].

Untersuchungen haben gezeigt, dass Oligosaccharide in Form von Glykoproteinen auf der äußeren Zellmembran Informationen für die molekulare Erkennungsprozesse kodieren und unerlässlich für die zelluläre Erkennung des Immunsystems sind[4][5]. Diese Dekodierung der Information findet zwischen Proteinen (Lektinen) und den Oligosacchariden auf der Zellmembranoberfläche statt, welche wiederum weitere biochemische Prozesse auslöst[6]. Oberflächenglykane kontrollieren die Membranpermeabilität von Zellen und wirken so als Regulatoren des Zellmetabolismus und der Zellteilung. Diese Funktion ist eine Ursache für das entartete Verhalten von Krebszellen. Eine Strukturvariation der Oberflächenglykane zieht eine Veränderung des Zellmetabolismus und der unkontrollierten Zellteilung mit sich. Hierdurch kann die entarte Krebszelle von der gesunden Zelle unterschieden werden[7]. Aber auch Infektionen mit Bakterien und Viren (HIV) erfolgt über die Erkennung der Glykokonjungate[8]. Aus diesem Grund ist die Erforschung und Entschlüssung der Informationscodierung von Kohlenhydraten und Glykoproteinen von großem wissenschaftlichen und medizinischen Interesse. Bis heute sind diese Erkennungsprozesse noch nicht vollständig aufgeklärt, weil diese Glykoproteine aufgrund ihres vielfältigen Vorkommen und schwierigen Verfügbarkeit aus Naturstoffen die Aufklärung erschweren. Trotz moderner analytischen Methoden ist

es immer noch schwierig bei der Strukturaufklärung die Konformation der Oligosaccharide zu entschüsseln. Besonders Informationen über die dreidimensionale Struktur mit den unterschiedlichen räumlichen Anordnung der Hydroxylgruppen ist sehr lückenhaft[9]. Da dieser Teil des Glykoproteins die Rolle des Rezeptors gegenüber Hormonen, Enzymen, Viren, Pilzen und Bakterien übernimmt, ist es sehr wichtig, die Einzelheiten dieser interzellulären und immunologischen Prozesse aufzuklären, um dann Oligosaccharidmimetika entwickeln zu können, die in diese Prozesse eingreifen[10].

Die geringen Substanzmengen von Glykoproteinen aus Naturstoffen hat die Kohlenhydratchemie vor neuen Herausforderungen gestellt. Zu einem werden Synthesen entwickelt, um genügend Substanzmengen in hoher Reinheit zu erhalten. Zum anderen wird nach Glykomimetika gesucht, die diese Glykoproteine in den interzellulären und immunologischen Prozessen imitieren können. Es hat sich gezeigt, dass synthetisierte Oligosaccharide und Glykokonjugate gute Liganden für Lektine darstellen. Dadurch ergab sich ein neuer Weg zur Erforschung der Wechselwirkung zwischen Glykomimetika und Lektinen. Um diese Glykoproteine und Glykomimetika darzustellen, stellt die Synthesechemie vor neue Probleme, wie das Auffinden von geeigneten Kupplungsmethoden und neuen Schutzgruppenstrategien[11]. Aus diesem Grund wird versucht die komplexen Strukturen von Oligosacchariden und Glykoproteinen, auf der Basis eines einfachen Synthesekonzept für Mimetika, zu imitieren. Das Konzept sollte wie ein Baukastensystem aufgebaut sein und eine hohe Flexibilität für die Modifizierung der Glykomimetika zulassen. Des weiteren sollte das Synthesekonzept für die Festphasen- und Spotsynthese kompatibel bleiben, um Bibliotheken von Glykomimetika aufzubauen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits von D. Röseling Glykomimetika in Form von Tetrapeptiden mit einem Asparaginsäurerückgrat dargestellt[12]. Diese Mimetika besitzen eine relativ flexible multivalente Struktur, die sich an die Liganden der Lektine anpassen kann. C. Schips führt dieses Prinzip der multivalenten Struktur fort, erkannte aber, dass das Asparaginsäurerückgrat nicht wesentliche zur Erkennung von Lektinen beiträgt. Hingegen erhöht der Einbau von aromatischen Spacern die

Affinität zu Lektinen[13]. Beide Erkenntnisse führten zur Arbeit von J. Hörzer aus unserer Arbeitsgruppe, der nicht-multivalente Stukturen in Form von β-Glykopeptiden synthetisierte. Hierfür wurden Triglykopeptide synthetisiert,die zu Hexaglykopeptiden und Dodecaglykopeptiden verknüpft wurden (Abbildung 1). Durch den Einbau eines aromatischen Spacers und eines β-Dipeptides aus zwei ACHC-Einheiten konnte die Affinität von Lektinen stark erhöht werden, allerdings verliert die Struktur die Möglichkeit das Rückgrat mit weiteren Kohlenhydratresten zu funktionalisieren[14].

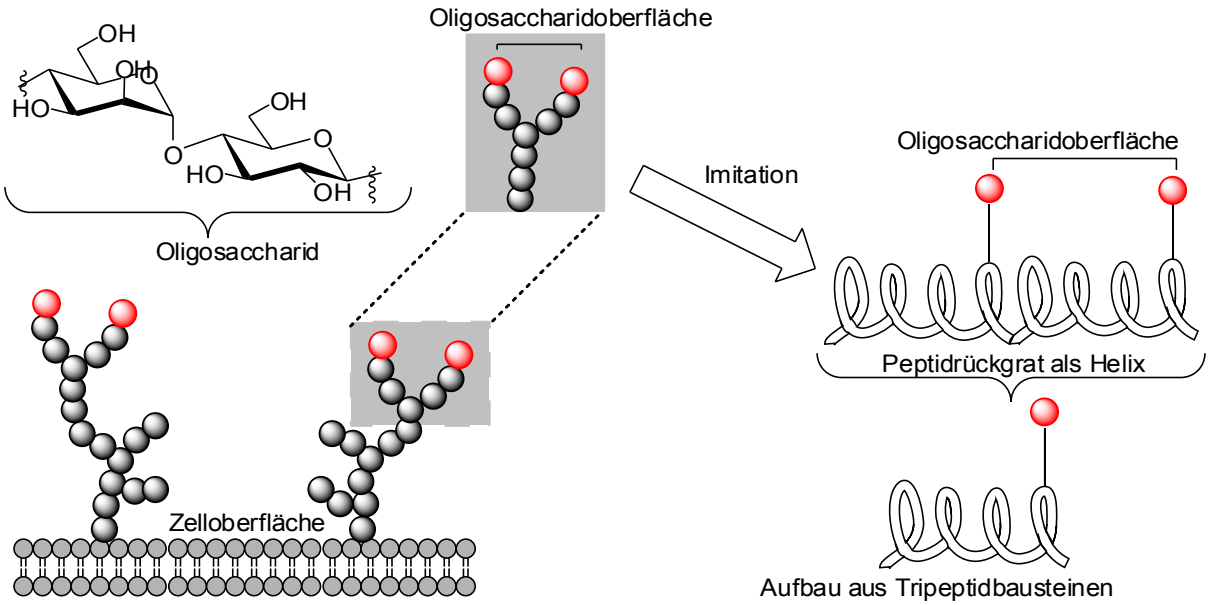


Abb.1. Imitation der Oligosaccharidoberfläche

Die oben genannten Aspekte wurden in dieser Arbeit aufgegriffen. Die Glykopeptidbausteine der Glucose und Galactose von D. Röseling werden unverändert übernommen[12]. Auf den Einbau von einer S-glykosiden Bindung und eines aromatischen Spacers wurde verzichtet. Vielmehr wurde das Augenmerk auf das Rückgrat des β-Peptides gerichtet. Im Gegensatz zur Arbeit von J. Hörzer[14] sollte das Rückgrat mit verschiedenen Aminosäuren variiert werden. Die trifunktinonelle Aminosäure Asparaginsäure wurde im Rückgrat beibehalten, wie in der Arbeit von D. Röseling[15]. Durch diese Trifunktionalität kann die zweite Carboxylgruppe, wenn gewünscht, modifiziert werden, worauf in dieser Arbeit aber verzichtet wurde. Durch den Einbau von einer sterisch gehinderten α-Aminosäuren oder β-Aminosäuren wurde untersucht, ob diese strukturbildende Aminosäuren die

Affinität zu Lektinen verbessert. Dazu wurden starre Sekundärstrukturen mit flexiblen Sekundärstrukturen von Hexa-β-glykopeptiden verglichen, wie sich die Modifikation des Rückgrates auf NMR-Spektren, CD-Spektren und das Lektin-Screening auswirkten (Abbildung 2).

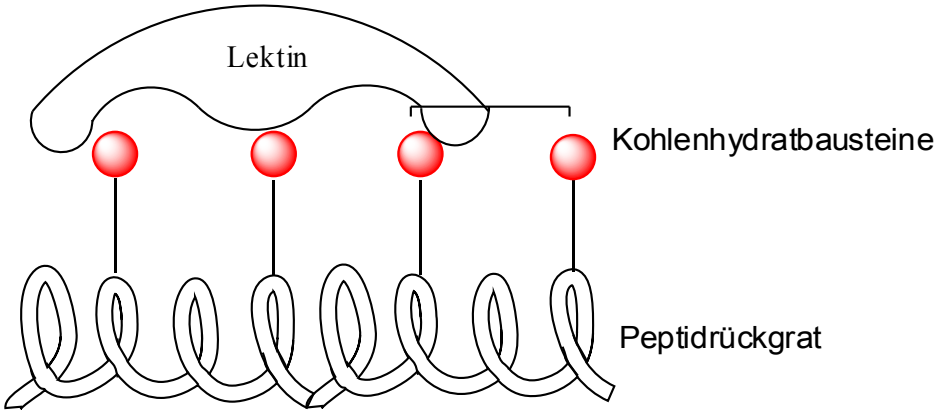


Abb.2: Anbindung von Lektinen an Oligosaccharidmimetika

Übersicht der Zielsetzung dieser Arbeit:

- Synthese von Tri- und Hexa-β-glykopeptiden mit *O*-glysidischen Glykopeptidbausteinen nach Baukastenprinzip
- Modifikation des Peptidrückgrates mit α- und β-Aminosäuren, welche stabile Sekundärstruktur ausbilden
- Untersuchung der Sekundärstruktur der synthetisierten β-Hexaglykopeptide mittels NMR- und CD-Spektroskopie
- Überprüfung der Lektinaffinität

2. Allgemeiner Teil

2.1 Oligosaccharide

2.1.1 Vorkommen und Funktion

Oligosaccharide kommen in allen Organismen vor und übernehmen dort eine Vielzahl von Funktionen. Vor einigen Jahren fand man heraus, dass sie in ihrer Bedeutung den der Proteinen und Nucleinsäuren gleichkommt. Der Grund liegt an der unglaublich riesigen Zahl von möglichen Kombinationen an Oligosacchariden, zum Beispiel sind bei einen Hexasaccharid rechnerisch ca. $1{,}05 \times 10^{12}$ Oligosaccharidenstruktren möglich[2].
Am häufigsten kommen Oligosaccharide in Kombination mit einem Protein als Glykopeptid oder in Verbindung mit einem Lipid als Glykolipid vor[16][17]. Ihre intrazelluläre Biosynthese erfolgt im rauhen endoplasmastischen Retikulum und dem Golgiappart der Zelle. Dazu werden exogene Monosaccharide von der Zelle aufgenommen und in aktivierte Metabolite wie Nucleosiddiphophat-Zucker umgewandelt. Diese Monosaccharidbauteine werden im nächsten Schritt mit einem Protein oder Lipid intrazellulär glycosyliert und schrittweise zu Oligossaccharidstrukturen und Glykokonjugaten verknüpft. Diese Vorgänge sind sehr komplex und es sind eine Vielzahl von spezifischen Glykosyltransferasen und Glykosidasen beteiligt. Die Regioselektivität der Glykosylierungsposition und die Konstitution der Oligosaccharide ist das Ergebnis von sensitiven Regulierungen von Enzymkaskaden, die nur zum Teil aufgeklärt sind[18][19].

2.1.2 Synthese von Oligosacchariden

Die Synthese von Oligosaccharidstrukturen, die in der Natur vorkommen, ist für die heutige Forschung von großer Bedeutung. Zum einem werden größere Mengen an Oligosacchariden benötigt, zum anderen ist es aufgrund ihrer Komplexität schwierig Oligosaccharide in hoher Reinheit aus Naturstoffen zu isolieren. Die Verfügbarkeit von Oligosacchariden ist aber wichtig für das Auffinden von neuen Impfstoffen oder das Durchführen von serologischen Test[20][21][22]..

Die Synthese von Oligosacchariden stellt aber oft nahezu unlösbare Probleme dar[23], die trotz verbesserter Schutzgruppenstrategien und Aktivierungsmöglichkeiten bei der Glykosylierung noch immer mit einem großen synthetischen Aufwand verbunden sind[24][25][26][27]. Auch aus diesem Grund wird nach Glykomimetika gesucht, die diese Oligosaccharidstrukturen imitieren können. Diese Glykomimetika sind meist einfachere Strukturen im Vergleich zu den Oligosacchariden, deren Synthese dann auch weniger Probleme aufwirft. Auf diese Weise könnten die aufwendigen Synthesen von Oligosaccharide umgangen werden.

2.1.3 Glykopeptide

Glykoproteine sind Proteine, an die über glykosidische Bindungen Kohlenhydrate geknüpft sind. Die Bindung des Kohlenhydratrestes erfolgt entweder *O*-glycosidisch über die Hydroxy-Gruppen von Serin- oder Threonin oder *N*-glycosidisch über die Amino-Gruppe von Lysin oder die Amid-Gruppe von Asparagin (Abbildung 3). Die Zuckereinheiten sind häufig verzweigt und bestehen im Allgemeinen aus mehreren Monosaccharid-Einheiten, wobei häufig Hexosen wie Mannose und Galactose sowie *N*-acetylierte Hexosamine wie *N*-Acetylglucosamin vorkommen. In den peripheren Teilen der Kohlenhydratketten der Glykoproteine befindet sich häufig die L-Fucose sowie Sialinsäure[28][29][30].

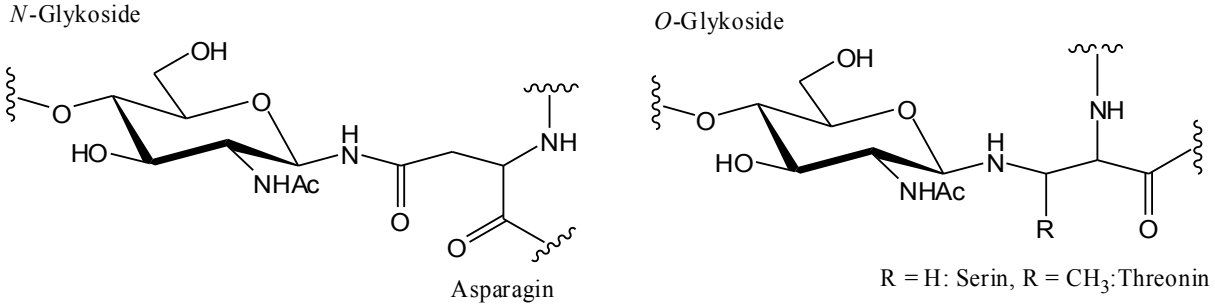


Abb.3: Verschiedene Glykopeptidklassen

Bei Zellmembranen liegen die Kohlenhydratreste häufig extrazellulär und können antigen oder rezeptiv wirken. So binden diese Oligosaccharide Hormone, Viren, Bakterien und Zellen. (Abbildung 4)

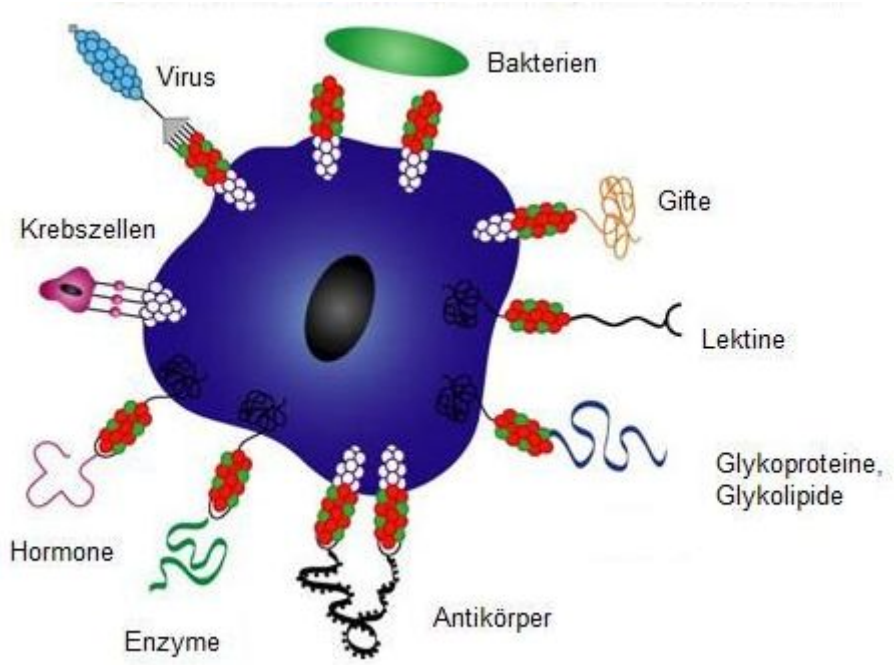


Abb.4: Erkennungsprozesse der Glykopeptide[31]

Die Proteine können Strukturproteine (Kollagen), Enzyme (z.B. Ribonuclease, Amylase, Acetylcholinesterase), Transportproteine (z.B. Caerulosplasmin, Transferrin) oder Peptidhormone (z.B. Luteinisierungshormone, follikelstimulierendes Hormon u. a.) sein. Aber auch Immunglobuline, Fibrinogen und Blutgruppensubstanzen gehören zur Gruppe der Glykoproteine.

In den meisten eukaryonten Zellen, aber auch in Bakterien und Viren kommen Glykoproteine und Glykopeptide vor. Sie üben eine Reihe von Funktionen aus, worin ihre biologische Bedeutung beruht. So bilden sie Strukturmoleküle (Zellwände, Kollagen, Elastin), wirken als Schmiermittel (Mucine), bilden Transportmoleküle für Vitamine, Lipide usw. und dienen der körpereigenen Abwehr (Immunoglobuline, Histokompatibilitätsantigene, Interferon). Weiter gehören auch eine Vielzahl von Enzymen und Bestandteile der Zellmembran zur Klasse der Glykoproteine[32].

2.1.4 Glykomimetika

Wie bereits erwähnt, ist die Synthese von Oligosaccharide und Glykopeptide mit einem enormen synthetischen Aufwand verbunden. Jedes einzelne Oligosaccharid benötigt seine eigene Schutzgruppenstrategie und eigene Aktivierungsmethoden für die Glykosylierung. Aus diesem Grund wird seit geraumer Zeit nach Molekülen gesucht, welche die Aufgaben der Oligosaccharide und Glykopeptide imitieren können, aber einfach zu synthetisieren sind. Diese Glykomimetika benötigen eine ähnliche Oberfläche wie das zu imitierende Glykan. Oft reichen für die Erkennung durch Rezeptoren nur die nicht-reduzierenden Enden der Kohlenhydrate aus.
Zur Zeit kennt man zwei verschiedene Typen von Mimetika. Der erste Typ versucht die Liganden für die Lektine bereitzustellen, wie im Fall von Galektinen, die eine bedeutende Rolle bei Krebserkrankungen[21][33] und im Immunsystem[34] spielen. Der zweite Typus versucht durch kompetitive Hemmung Enzyme in der Oligosaccharid-Biosynthese auszuschalten[35][36].(Abbildung 5)

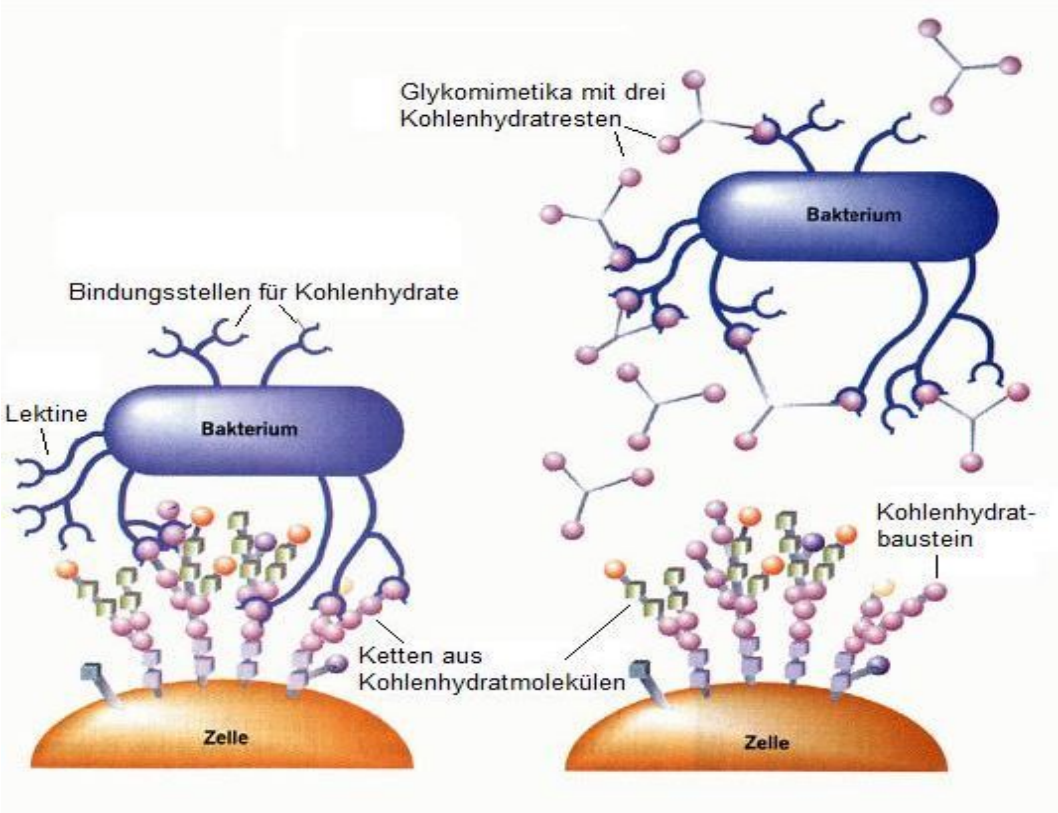


Abb. 5: Erkennungsprozesse von Glykomimetika [37]

Wie die meisten Naturstoffen, unterliegen auch Oligosaccharide dem enzymatischen Abbau. Dieser Abbau kann man durch die Verwendung von C-Glykosiden oder benzylischen Glykosiden unterbinden. Ein weiterer Ansatz beruht auf der Einführung einer Peptidbindung, damit eine direkte glykosidische Bindungen vermieden wird[38][39]. Hierfür gibt es zwei Ansätze. Der erste Ansatz geht von einer Funktionalisierung des Zuckermonomers aus. Hier wird die Hydroxylgruppe am ersten Kohlenstoffatom durch eine Carboxylgruppe und eine weitere Hydroxylgruppe durch eine Aminofunktion ersetzt. Diese „Sugar Amino Acids“ werden dann mit Aminosäuren zu Mimetika verknüpft, welche die Zelladhäsion oder die Infektion mit Viren verhindern[40][41]. Der anderen Ansatz geht von der Verknüpfung von Zuckerbausteinen mit einer Aminosäuren aus, die dann zu einem Peptidrückgrat verbunden werden[42][43][44][45]. Dieser Ansatz wurde in unserem Arbeitskreis[15][46] verwendet und es wurden Neo-Glykopeptide dargestellt, wie das von D. Röseling hergestellte Tetramer mit Asparaginsäurerückgrat (Abbildung 6).

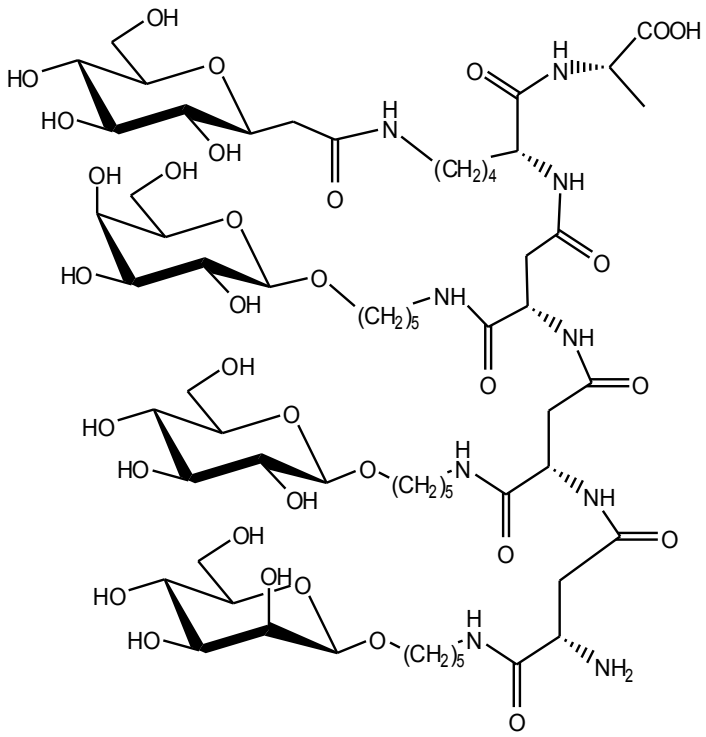


Abb. 6: Beispiel eines Tetramers aus unserer Arbeitsgruppe[15].

2.2 β-Aminosäuren und D-Aminosäuren

In natürlichen Glykopeptiden werden α-Aminosäuren mit einem Kohlenhydratbaustein verknüpft, diese vereinen allerdings auch die Nachteile von α-Aminosäuren wie Racemisierung, geringere metabolische Stabilität im Gegensatz zu den seltener vorkommenden β-Aminosäuren. Bisher kennt man aus der belebten Natur über 260 verschiedene Aminosäuren, zu denen die 20 proteinogenen α-Aminosäuren gehören, die zum Aufbau von Proteinen benutzt werden. Außerdem findet man auch seltenere Aminosäuren, die man als nicht proteinogene Aminosäuren charakterisiert. Diese Definition beinhaltet die nicht proteinogene Aminosäuren, zu denen β-Alanin und das D-Alanin gehören. β-Alanin entsteht durch Decarboxylierung von Asparaginsäure, aber auch beim Abbau von Pyrimidin-Basen. β-Alanin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die dennoch in einigen Peptiden vorkommt, z.B. in Carnosin (β-Alanyl-histidin) und Anserin (3-Methyl-carnosin), zwei im Muskelgewebe gefundene Neuropeptide. Zusammen mit Cysteamin ist β-Alanin Bestandteil des Coenzyms A[47]. Weitere β-Aminosäuren, die natürlichen Ursprungs sind, sind alicyclische β-Aminosäuren wie zum Beispiel (-)-(1*R*,2*S*)-2-Aminocyclopentancarbonsäure (Cispentacin), das bei der Fermentierung von *Streptomyces steronii* und *Bacillius cereus* isoliert werden konnte. Es besitzt eine bemerkenswerte therapeutische Wirksamkeit gegen Infektionskrankheiten durch die Pilzgattung *Candida albicans* [48].

Ebenso zu den nicht proteinogenen Aminosäuren gehören die D-Aminosäuren wie das D-Alanin als Bestandteil der Teichonsäure (Baustein von Bakterienzellwänden) und als Baustein des Mureins für den Aufbau der Bakterienzellwände dient. Ebenso das D-Valin, welches Bestandteil des Antibiotikum Valinomycin ist. Wie die β-Peptide sind die Peptide aus D-Aminosäuren von medizinischen Interesse in der HIV-Forschung. Aus diesem Grund ist die heutige Forschung an der Synthese von enantiomerenreinen β-Peptiden und D-Peptiden interessiert[49].

2.2.1 Sekundärstrukturen von Peptiden

Peptide besitzen definierte Sekundärstrukturen, die bekannteste hierunter ist die α-Helix, die von L. Pauling und R. Corey in den 50er Jahren bereits vorher gesagt wurde[50]. So bilden Peptide mit mindestens 15 α-Aminosäuren eine α-Helix, β-Aminosäuren dagegen bilden schon stabile Helices ab 6 Aminosäuren[51]. Zwei Parameter beschreiben eine Helix, erstens die Anzahl der Aminosäuren, die an der Helixwindung beteiligt sind und die Zahl der Atome, die einen Ring über eine Wasserstoffbrücke bilden. Die klassische α-Helix wird demnach als 3.6_{13}-Helix bezeichnet. Hier bilden 3.6 Aminosäuren eine Wasserstoffbrücke in einem 13-gliedrigen Ring. Dann gibt es noch die β-Helix, auch 3_{10}-Helix genannt, sie tritt auch bei β-Peptide auf. Sie unterscheiden sich in Ganghöhe und Umfang von einer 3.6_{13}-Helix[52](Abbildung 7).

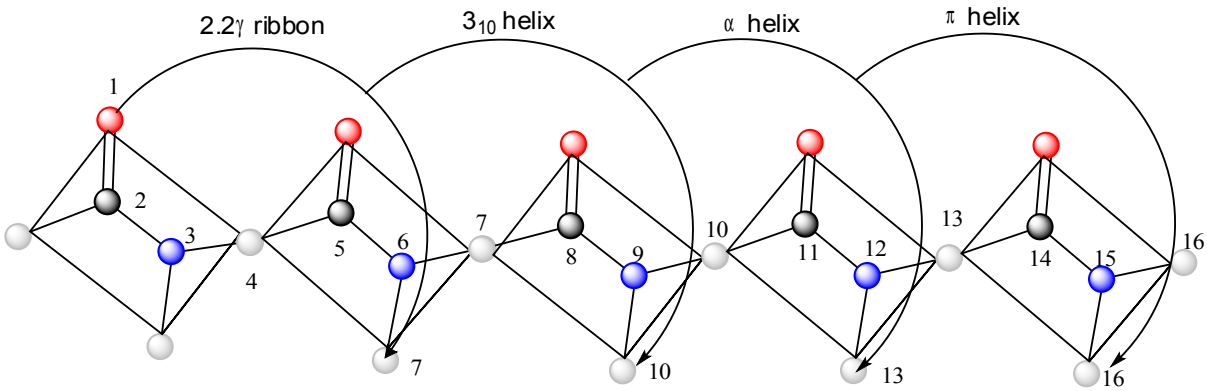


Abb. 7: Beispiele von Helices

Ein andere Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen ist das β-Faltblatt (sheets). Hier sind die Peptidketten etwas länger gestreckt und das Rückgrat der Polypeptidketten liegt in Zick-Zack-Struktur vor. Auch hier können Wasserstoffbrücken ausgebildet werden, allerdings zu benachbarten Ketten, deren Anordnung dann parallel oder antiparallel verlaufen kann. Die antiparallele Anordnung ist aufgrund der besseren Orientierung der Wasserstoffbrücken etwas stabiler als die parallele Anordnung (Abbildung 8).

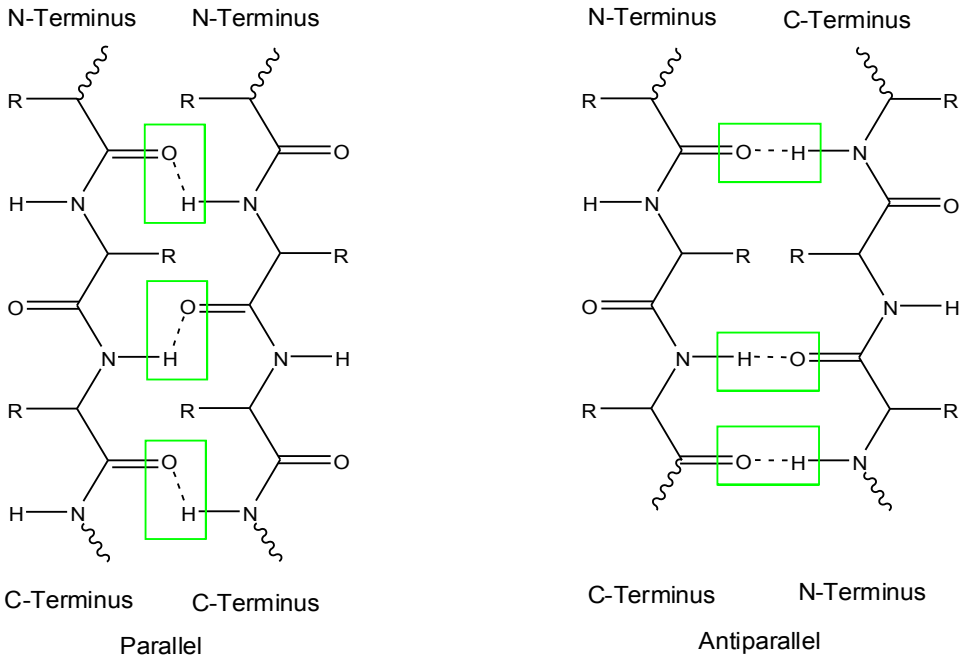
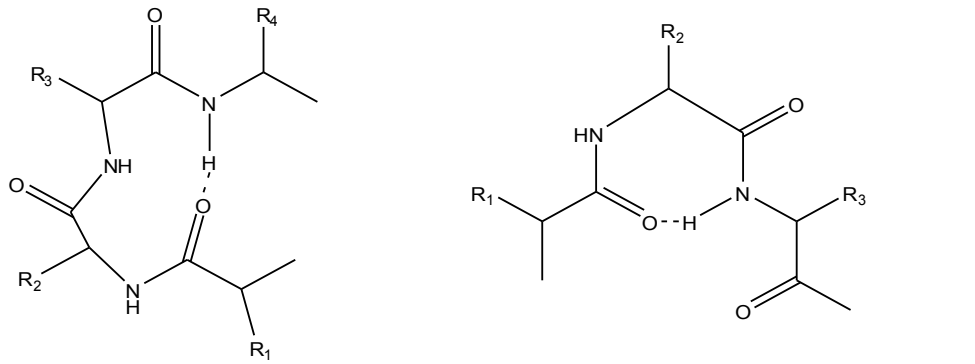


Abb. 8: β-Faltblatt-Struktur

Sind die Peptidketten noch kürzer als 15 Aminosäuren bei α-Peptiden, dann wird die vorherrschende Sekundärstruktur schleifenähnlich (turns), die eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung zwischen den Proteinen spielen. Die Unterscheidung der Schleifen erfolgt nach Anzahl der beteiligten Aminosäuren wie π- (sechs), α- (fünf), β(vier) und γ-turns (drei Aminosäuren). Auch hier erfolgt die Stabilisierung der Schleifen über Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen dem Carboxyl-Sauerstoff der ersten Aminosäure und dem Amid-Wasserstoff der letzten beteiligten Aminosäure erfolgt (Abbildung 9).



β-Turn: Wasserstoffbrücke zwischen Resten i und i + 3, ein Ring aus 10 Atomen

γ-Turn: Wasserstoffbrücke zwischen Resten i und i + 2, ein Ring aus 7 Atomen

Abb.9: Beispiel eines β- und γ-Turns

2.2.2 β-Peptide: Vorkommen, Funktion und Sekundärstrukturen

Biologische Untersuchungen zeigen, dass die β-Peptide gegen den enzymatischen Abbau resistent sind, was sie für pharmakologische Zwecke interessant macht. In der Tat, einige β-Peptide zeigen eine biologische Aktivität z. B. gegen HIV, Krebs und Bakterien[51] . Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass die Peptidasen und Proteinasen die β-Peptidbindungen nicht spalten können. Die Blutserumkonzentration einfacher wasserlöslicher β-Peptide blieb über Stunden konstant. Des weiteren hatten Mikroorganismen Schwierigkeiten sich von kleinen β-Peptiden als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu ernähren[53][54].
Weiter nützen mehrzellige Organismen unterschiedlich kurzkettige Peptide, um sich gegen mikrobielle Angreifer zu verteidigen. Diese Peptide, die den Wirt verteidigen, sind gewöhnlich Kationen, welche die mikrobielle Membran durchdringen, dabei nehmen sie spezifische Sekundärstrukturen an, zum Beispiel eine α-helikale Konformation wie in den Peptiden Magainin (von Fröschen) und Cecropin (von Insekten)[55].

Die Arbeiten von D. Seebach und S. H. Gellmann und ihren Mitarbeitern zeigten, dass β-Peptide verschiedene Sekundärstrukturen annehmen können wie z.B. 14-Helix, 12-Helix, 10/12-Helix, 10-Helix, 2_8-Bänder, Gewinde und Faltblätter[52][56]. Diese Oligomere (β-Peptide) werden durch intramolekulare Wasserstoffbindungen stabilisiert. Dabei können die Carbonyle in Richtung der NH-Gruppen am endständigen C-Atom zeigen und Wasserstoffbrücken ausbilden wie am Beispiel der 12-Helix. Im Gegensatz hierzu bilden bei den 14-Helices und den 10-Helices die Carbonylgruppe zu den Aminogruppen am endständigen Stickstoffatom eine Wasserstoffbrücke aus (Abbildung 10).

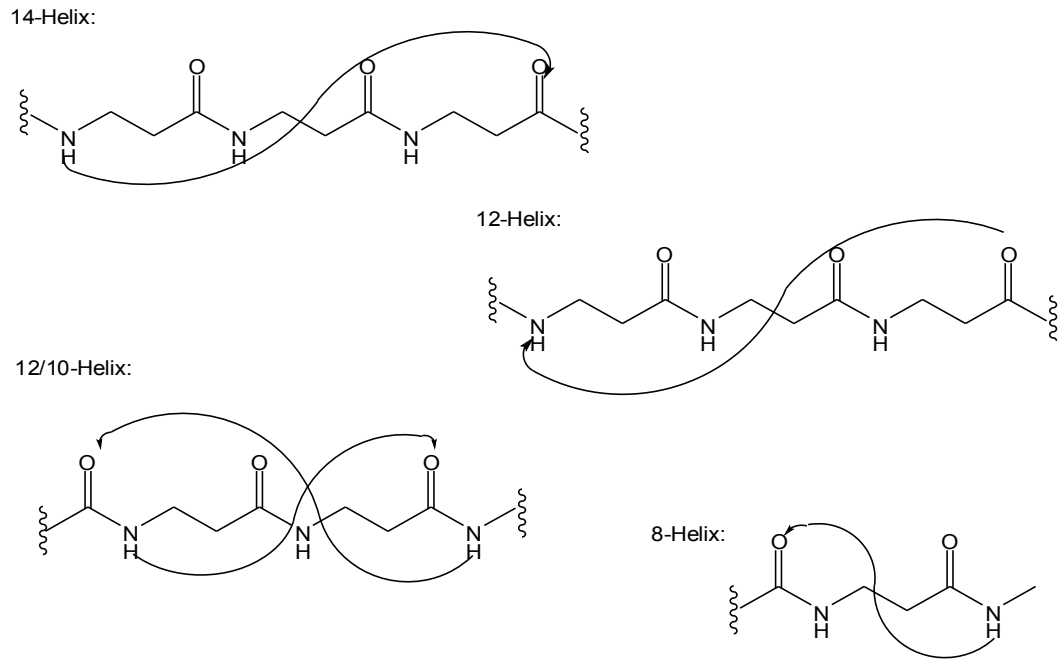


Abb. 10: 14-Helix, 12-Helix, 12/10-Helix, 8-Helix mit Wasserstoffbrückenbindungen

Alle Helices unterschieden sich in Umfang und Ganghöhe. So benötigt z.B. eine 14-Helix nur 3.2 Aminosäuren pro Windung, im Vergleich zur α-Helix mit 3.6 Aminosäuren pro Windung[57]. Der Abstand zwischen einer Windung ist bei der 14-Helix mit 5.1 Å kleiner als 5.4 Å bei der α-Helix. Viele β-Peptide und Analoga wurden von Seebach et al. synthetisiert und charakterisiert[54][58]. Im Vergleich zu den α-Peptiden bilden β-Peptide bereits in kurzen Peptidketten stabile Sekundärstrukturen aus. α-Peptide benötigen meistens 15 und mehr α-Aminosäuren-Einheiten im Peptidrückgrat, um stabile Sekundärstrukturen wie Helices oder Faltblätter auszubilden[59].

Man nimmt an, dass die zusätzlichen Kohlenstoffatome die besonderen Eigenschaften der β-Peptide bestimmen. Die zusätzliche „freirotierende“ C-C-σ-Bindung in den β-Aminosäurenbausteinen hat eine geringere Tendenz zur Ausbildung von hochgeordneten Strukturen (Knäuel) als die α-Aminosäuren-Analoga[58]. Es gibt aber auch α-Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften wie die β-Aminosäuren zum Beispiel die α-Aminoisobuttersäure. Sie leitet sich von L-Alanin ab, allerdings wird das H-Atom am α-C-Atom durch eine zweiten Methylgruppe

ersetzt. Hierdurch ist die Drehbarkeit eingeschränkt und die Helicesbildung wird gefördert. Die Aminoisobuttersäure gehört wie das β-Alanin zu den achiralen Aminosäuren, welche die Racemisierung bei der Peptidsynthese umgehen[60][61].

Für die Glykopeptid-Chemie stellen diese Aspekte ebenfalls neue Möglichkeiten dar, am β-Peptidrückgrat die verschiedenen Kohlenhydratbausteine in verschiedene geometrische Stellungen anzuordnen. Diese geometrische Anordnung kann zu einer Änderung der Affinität zu Lektinen führen. Man modifiziert das Rückgrat der Glykopeptide, indem man mit verschiedenen β-Aminosäuren das Rückgrat zur Ausbildung der 14-Helix oder 12-Helix drängt. Im Fall der 14-Helix befindet sich die 1. Aminosäure-Einheit nach einer Windung über der 4. Aminosäure-Einheit. Auf diese Weise kann ein Kohlenhydratrest an der 1. Stelle im Peptidrückgrat, zusammen mit einem Kohlenhydratrest an der 4.Stelle ein Disaccharid imitieren. Ein zusätzlicher Aspekte ist, dass eine antimikrobielle Aktivität für die 14-helikalen und die 12-helikalen β-Peptide beobachtet worden ist. Somit sind β-Peptide für die Darstellung von Glykomimetika zusätzlich interessant[56][62][63].

2.3 Synthekonzept für Oligosaccharidglykomimetika

Aus den Arbeiten von Roy[64][65] und Lee[66] sind multivalente Glykomimetika bekannt, die eine unspezifische Oberfläche von Kohlenhydratresten für die Anbindung der Lektine anbieten oder als Liganden für Lektine fungieren. Diese Strukturen sind flexibel und nehmen keine definierte Sekundärstruktur an. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Synthesekonzept entwickelt zur Darstellung von Glykomimetika, die definierte Sekundärstrukturen besitzen[13][14][15]. Ohne eine stabile Sekundärstruktur der Glykomimetika kann eine bestimmte Sequenz von Oligosaccharidstrukturen nicht imitiert werden. Die Kohlenhydratreste an den Enden dieser flexiblen Glykomimetika binden sich an die Bindungstaschen der Lektine. Deshalb werden in dieser Arbeit Hexa-β-Glykomimetika aufgebaut mit β-Aminosäuren im Rückgrat, die ab einer Kettenlänge von 6 Aminosäuren definierte Sekundärstruktur in Lösung ausbilden und auf diese Weise Disaccharidstrukturen imitieren können[54][58][63][67].

2.3.1 Aufbau der Neo-Glykopeptidbausteine

Für das Synthesekonzept der Glykomimetika in unserer Arbeitsgruppe, wurden die beiden neo-Glykopeptidbausteinen (**3**) und (**4**) von D. Röseling[12] unverändert verwendet. Diese Bausteine wurden in Peptidknüpfungsreaktionen mit aliphatischen und alicyclischen β-Aminosäuren zu Di-, und Tripeptide verknüpft. Diese Tripeptide wiederum fungieren als Bausteine in einem Baukastensystem, die in einer weiteren Peptidknüpfungreaktion zu Hexapeptiden gekuppelt wurden. Dieses Konzept hat sich bereits für die Synthese von Tripeptiden und Hexapeptiden in unserer Arbeitsgruppe bewährt und wurde in dieser Arbeit angewendet[14].

2.3.2 Verwendete Kohlenhydrate

Der neo-Glykopeptidbaustein wird anstatt der glykosidischen Bindung innerhalb des Oligosaccharids über ein Spacermolekül an eine trifunktionelle Aminosäure gebunden (Abbildung 11).

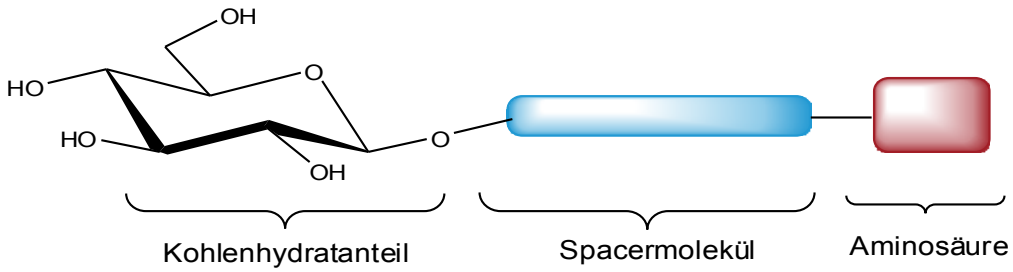


Abb. 11: Allgemeiner Aufbau eines neo-Glykopeptidbausteines

Das Konzept bietet auf diese Weise eine hohe Flexibilität bei der Wahl der Zuckerreste an, wobei in dieser Dissertation nur die neo-Glykopeptidbausteine von D-Glucose und D-Galactose verwendet wurden[12](Abbildung 12).

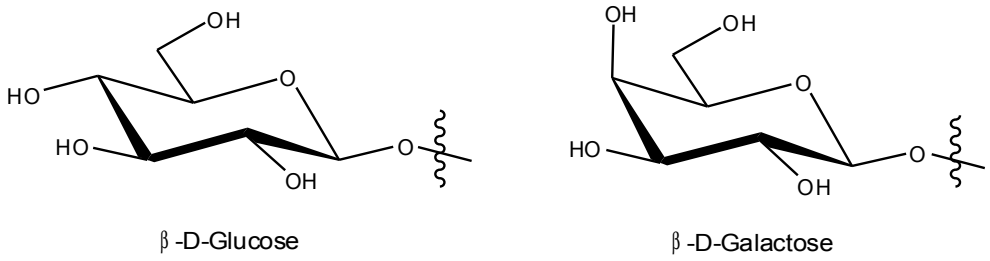


Abb.12: Verwendete Kohlenhydratbausteine

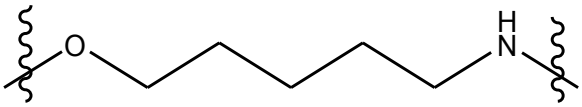
Der andere Aspekt hängt mit der Schutzgruppe am Zuckeranteil zusammen. So wurde die Acetylgruppe gewählt, weil sie sich orthogonal zu den Folgenschritten sowohl für die Glykosylierung des Spacermoleküls also auch für die Anbindung der Asparaginsäure verhält[68]. Die Acetylgruppe kann die Bedingungen der Peptidknüpfung in Lösung unbeschaden überstehen. Für das Lektin-Screening wurden die Acetylschutzgruppen im letzten Syntheseschritt unproblematisch mit Ammoniak in Methanol entfernt[12].

2.3.3 Verwendetes Spacermolekül

Das Protein-Kohlenhydrat-Bindungsmodell wurde von Roy et al.[69] an einer Vielzahl von Glycokonjugaten unterschiedlicher Größe untersucht. Die synthetisierten Glycokonjugate sind den natürlichen Glycopolymeren (glycosylierte polymere Proteine), Glycodendrimeren (definierte, sternförmigverzweigte Oligoglycopeptide) und Glycosylclustern nachempfunden. Roy et. al. verwenden bifunktionelle Alkyl-, Ether- bzw. Thioetherketten mit einer idealen Länge von 4-8 Atomen. Diese verwendeten Spacermoleküle nehmen durch die Kettenlänge Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen den Oligosaccharidfragmenten und den Polypeptidketten (β-Faltblatt oder α-Helix).

Eine andere Arbeit von Sasaki et al.[70] untersuchte die Spacerlänge von Galactosylliposomen. Es wurde nachgewiesen, dass der Spacer sowohl hydrophile Eigenschaften besitzen muss, um eine ausreichende Löslichkeit des Liganden zu gewährleisten. Ebenso wichtig ist eine bestimmte Kettenlänge, die einen optimalen Abstand zwischen Glycon und Liposomenrest garantiert.

Für die Synthese des neo-Glycopeptids wurde 5-Aminopentanol verwendet. (Abbildung 13) In vielen Naturstoffen wird diese Verbindung ferner als Ankergruppe zur Immobilisierung auf Festphasenträger verwendet und hat sich als geeigneten Spacer bewährt[12].



5-Aminopentylspacer

Abb.13: Verwendetes Spacermolekül

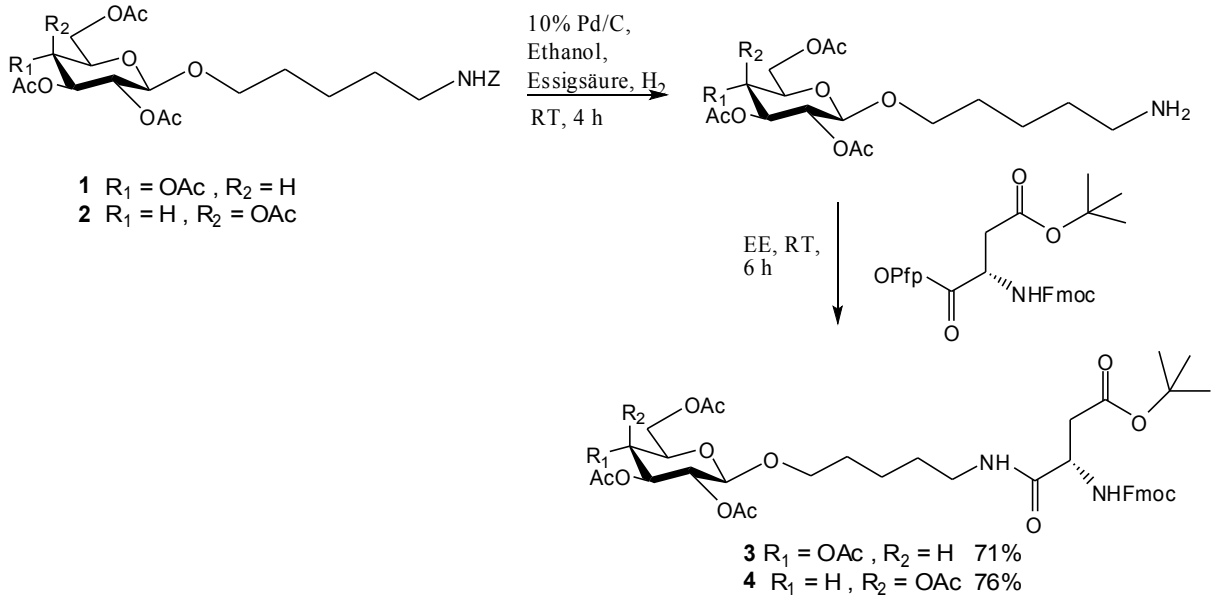
2.3.4 Verwendete Glykosylierungsmethode

Seit dem Anfang des letzten Jahrhunderts haben sich eine Vielzahl von chemischen Glykosylierungsmethoden[71][72][73][74][75] etabliert. Das Problem der Glykosylierungsmethoden ist bei allen Methoden die Regioselektivität. Die Suche nach einem geeigneten Glykosyldonor, dessen Hydroxylfunktionen aufgrund der Verknüpfungsmöglichkeiten selektiv zu schützen sind. Dieser Donor wird durch die Aktivierung seines Anomerenzentrums auf einen Glykosylakzeptor (Alkohol, Amin usw.) mit einer freien nukleophilen Gruppe übertragen.

Die Fischer-Glykosylierung ist eine einfache Methode für die Synthese Glycosiden, bei denen die nichtbeteiligten Hydroxylgruppen sowohl geschützt und als auch ungeschützt vorliegen dürfen. Hierbei wird der Zucker im entsprechenden Alkohol gelöst und mittels Säurekatalyse thermodynamisch kontrolliert zum Glykosid umgesetzt. Diese Glykosylierungsmethode liefert im Falle der Glucose vorwiegend das α-Anomere[76]. Für anomerenselektive Verknüpfungen wird diese Methode allerdings nur dann verwendet, wenn der Alkohol preiswert ist. Eine andere Methode ist die Königs-Knorr-Mehode, die von geschützten Halogenosen (Br, Cl) ausgehen und durch Silbersalzen in molaren Mengen aktiviert werden. Sie ermöglicht die stereospezifische Synthese von 1,2-*trans*-Glykosiden[77]. Diese Methode wurde von Helferich variiert, indem er Quecksilber(II)cyanid mit katalytischen Mengen Quecksilber(II)bromid verwendet, das die Reaktivität des Promotors stark erhöhen.

2.3.4.1 Synthese der Glykopeptidbausteine (3) und (4)

Für die Synthese der neo-Glykopeptidbausteine wurde die Helferich-Methode[78] verwendet, weil sie sich in unserem Arbeitskreis bereits bewährt hat[12][13][79]. Diese Methode verläuft β-selektiv und verknüpft das Spacermolekül Z-Aminopentanol mit den beiden Acetyl-geschützten Kohlenhydraten Glucose und Galactose zu den beiden Glykobausteine (**1**) und (**2**). Anschließend erfolgte die Abspaltung der Z-Schutzgruppe der beide Glykobausteine (**1**) und (**2**) mittels 10% Pd/C unter Wasserstoffatmosphäre in Ethanol. Die beiden NH_2-freien Glykobausteine wurden ohne weitere Aufreinigung mit der pentafluorphenolaktivierten Asparaginsäure zum Glykopeptidbaustein (**3**) und (**4**) gekuppelt. Nach Aufreinigung an Kieselgel hat man den Glucosebaustein (**3**) mit einer Ausbeute von 71% und der Galactosebaustein (**4**) mit 76% Ausbeute erhalten (Schema 1).



Schema 1

2.3.5 Darstellung der enantiomerenreinen β-Aminosäuren

Anschließend wurden die Tripeptide mit verschieden β-Aminosäuren verknüpft. Dafür mussten die β-Aminosäuren in ausreichender Menge und enantiomerenrein dargestellt werden. Für die beiden β-Aminosäuren (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbon-

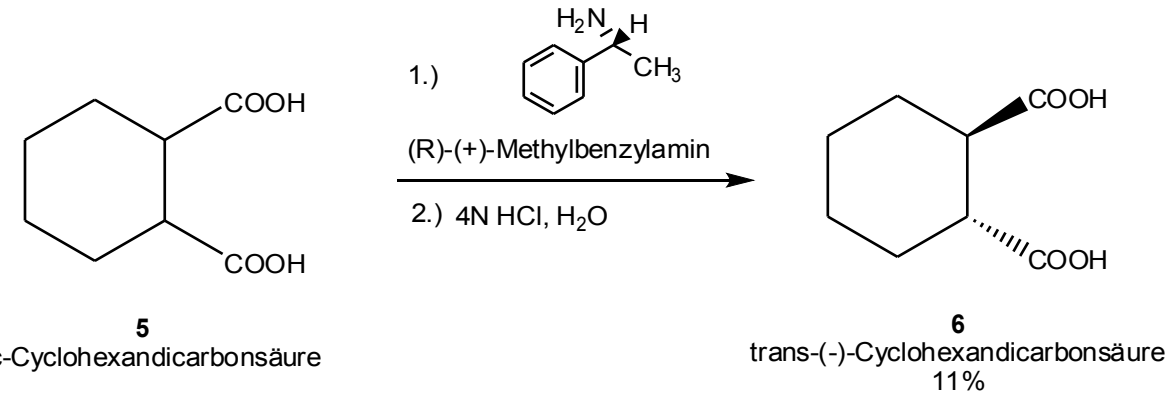
säure (**7**) und (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**9**) wurden mehrere Darstellungsmethoden angewendet und optimiert.

2.3.5.1 Darstellung von trans-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (6) mittels fraktionierte Kristallisation

Bei den meisten chemischen β-Aminosäurensynthesen entsteht ein racemisches Gemisch von (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren. Um enantiomerenreine β-Aminosäuren zu erhalten, müssen beide voneinander getrennt werden. Das bekannteste und älteste Verfahren ist die fraktionierte Kristallisation, die von Emil Fischer bei der Trennung der Weinsäure-Enantiomere zum Einsatz kam. Ausgangspunkt der fraktionierten Kristallisation ist die Umsetzung des Racemats mit einem chiralen Auxiliar zu einem Diastereomerenpaar. Durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels kann man durch Kristallisation eines der beiden Enantiomere anreichern. Als chirale Hilfsreagenzien kommen Wein-, Mandel- und Camphersulfonsäure zum Einsatz.

Für die Trennung der racemischen *trans*-Cyclohexandicarbonsäure (**5**) zur *trans*-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (**6**) wurde nach der Vorschrift von Berkessel et al. gearbeitet[80]. Zuerst wurde die racemische *trans*-Cyclohexandicarbonsäure (**5**) aus cis-Hexahydrophthalsäureanhydrid hergestellt[81]. Die racemische *trans*-Cyclohexandicarbonsäure (**5**) wurde mit der chiralen Base (*R*)-(+)-Methylethylamin bei -78°C umgesetzt, anschließend mehrmals umkristallisiert aus Ethanol/Toluol. Die Trennung in die enantiomerenreine *trans*-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (**6**) gelang nur, im Gegensatz zur Literatur, wenn das Diastereomerensalz mindestens 2 Tage lang im Vakuum getrocknet und anschließend mit genau 4N HCl angesäuert wurde. Dann konnte die reine *trans*-(-)-Cyclohexancarbonsäure (**6**) mit Diethylether mit einer Ausbeute von 11% extrahiert werden. Nur bei einer vollständig klaren Lösung nach Ansäuern mit der 4N Salzsäure war ein Enantiomerentrennung möglich, blieb ein Trübung zurück, erhielt man nach Extrahieren mit Diethylether das Diastereomerensalz zurück (Schema 2). Diese Erkenntnis bei Dicarbonsäuren hat B. Wallfisch in seiner Dissertation herausgefunden. So ist die Trennung des entstandenen Diastereomerenpaares mittels Säuren nicht immer möglich. Meistens

isoliert man bei Dicarbonsäuren nur das Diastereomerensalz wieder, welches einen typischen Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ von ±1 aufweist[82].



5
rac-Cyclohexandicarbonsäure

6
trans-(-)-Cyclohexandicarbonsäure
11%

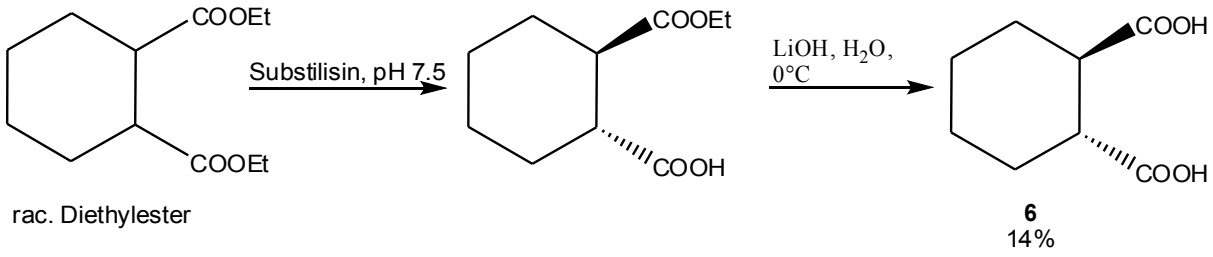
Schema 2

2.3.5.2 Darstellung von trans-(-)-Cyclohexancarbonsäure (6) mittels Enzymen

In neueren Veröffentlichungen nutzt man Enzyme zur Enantiomerentrennung der racemischen Aminocyclohexancarbonsäure wie Kanerva und Fülüp et al. herausgefunden haben[83]. Hierbei geht man von racemischem Aminocyclohexancarbonsäuremonoethylester aus. Unter Verwendung von *Pseudomonas cepacia* Lipase PS und *Candida antarctica* Lipase A erfolgt eine enantioselektive Acylierung mit 2,2,2-Trifluorethylester. Das R-Enantiomer wird mittels Enzym acyliert, während man das S-Enantiomer als Ester unberührt in Lösung bleibt. Nach chromatographischer Separation der beiden Komponenten wird das S-Enantiomer mit Lithiumhydroxid verseift und man erhält das S-Enantiomer (1*S*,2*S*)-Aminocyclohexancarbonsäure. Diese elegante Methode ist allerdings aufgrund des teuren Enzymes unrentabal und die Aufarbeitung für das R-Enantiomer aufwendiger. Aus diesem Grund wurde der Weg über die Dicarbonsäure gewählt, indem man die racemische *trans*-Cyclohexandicarbonsäure mittels Enzyme trennt und anschließend zur trans-(1R,2R)-Aminocyclohexansäure (**7**) umsetzt[84].

Diese Möglichkeit die *trans*-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (**6**) enantiomerenrein darzustellen wurde von Norin et al. veröffentlicht[84]. Durch den Einsatz von Schweineleberesterase oder von Subtilisin kann selektiv hydrolysiert werden.

Ausgangsmaterial war racemischer *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäure-diethylester, nach Rogan et al.[85] dargestellt, der in einen enantiomerenreinen Monoester umgewandelt wird. Nach Abtrennung des (*1S,2S*)-Cyclohexandicarbonsäure-diethylester konnte durch Verseifung mit LiOH konnte enantiomerenreine *trans*-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (**6**) erhalten werden. Allerdings waren die Ausbeute von 14% und der teure Einsatz der Schweineleberesterase oder von Subtilisin für die Darstellung größerer Mengen an *trans*-(-)-Cylcohexandicarbonsäure (**6**) unrentabel (Schema 3).



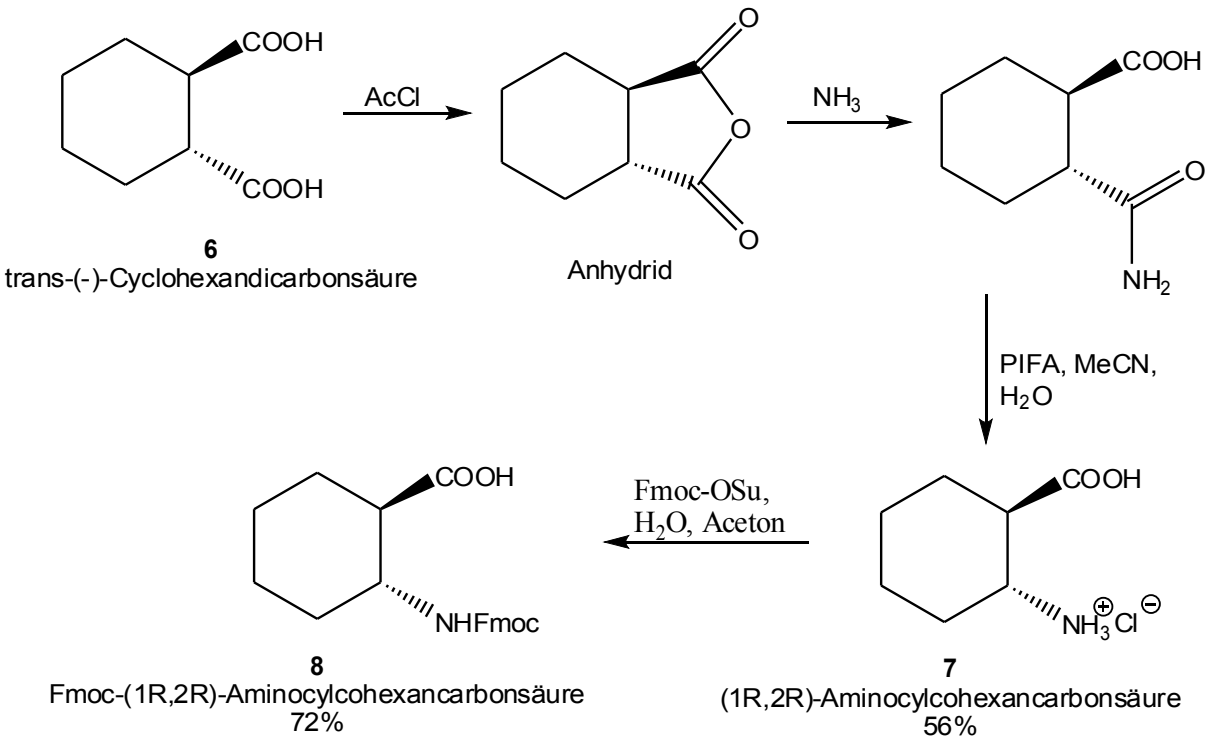
rac. Diethylester

6
14%

Schema 3

2.3.5.3 Darstellung der Fmoc-(1R,2R)-Aminocyclohexancarbonsäure (8)

Die alicyclische β-Aminosäure, die einen stabilisierenden Effekt auf das Peptidrückgrat bewirken sollte und die 14-Helix begünstigt, ist die (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**), die nach Berkessel et al. [80] synthetisiert wurde. Ausgangspunkt ist die enantiomerenreine *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäure (**6**), die bereits in den vorangegangen Kapitel dargestellt wurde. Diese Dicarbonsäure (**6**) wurde mit Acetylchlorid in das *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäureanhydrid überführt. Nach Entfernung des Acetylchlorid und der entstandenen Essigsäure wurde das Anhydrid mit trockenen Ammoniakgas in Dichlormethan zum *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäuremonoamid geöffnet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt mittels Hoffmann-Abbau mit Phenyliod(III)bis-(trifluoroacetat) umgesetzt. Nach Aufarbeitung und Umkristallisation aus Ethanol hat man die (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**) mit einer Ausbeute von 56% erhalten. Anschließend wurde die Verbindung (**7**) Fmoc-geschützt zu Fmoc-(1R,2R)-Aminocyclohexancarbonsäure (8) mit einer Ausbeute von 72% (Schema 4).



6
trans-(-)-Cyclohexandicarbonsäure

Anhydrid

8
Fmoc-(1R,2R)-Aminocylcohexancarbonsäure
72%

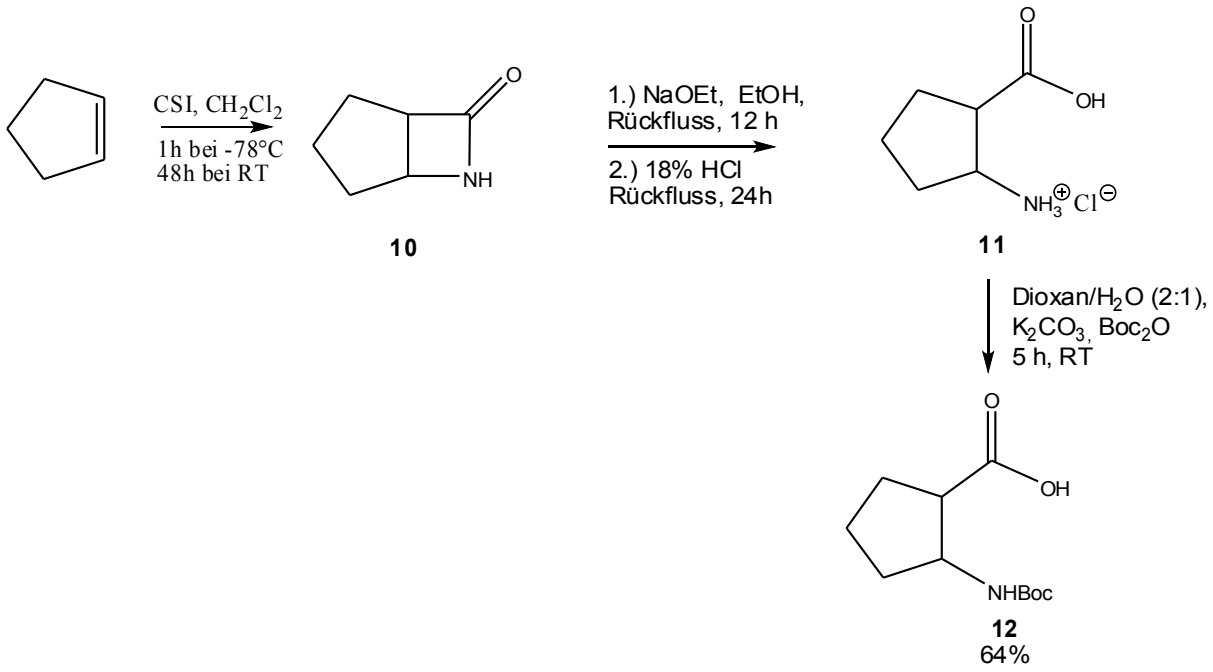
7
(1R,2R)-Aminocylcohexancarbonsäure
56%

Schema 4

2.3.5.4 Darstellung von trans-(1S,2S)-Aminocyclopentancarbonsäure (9)

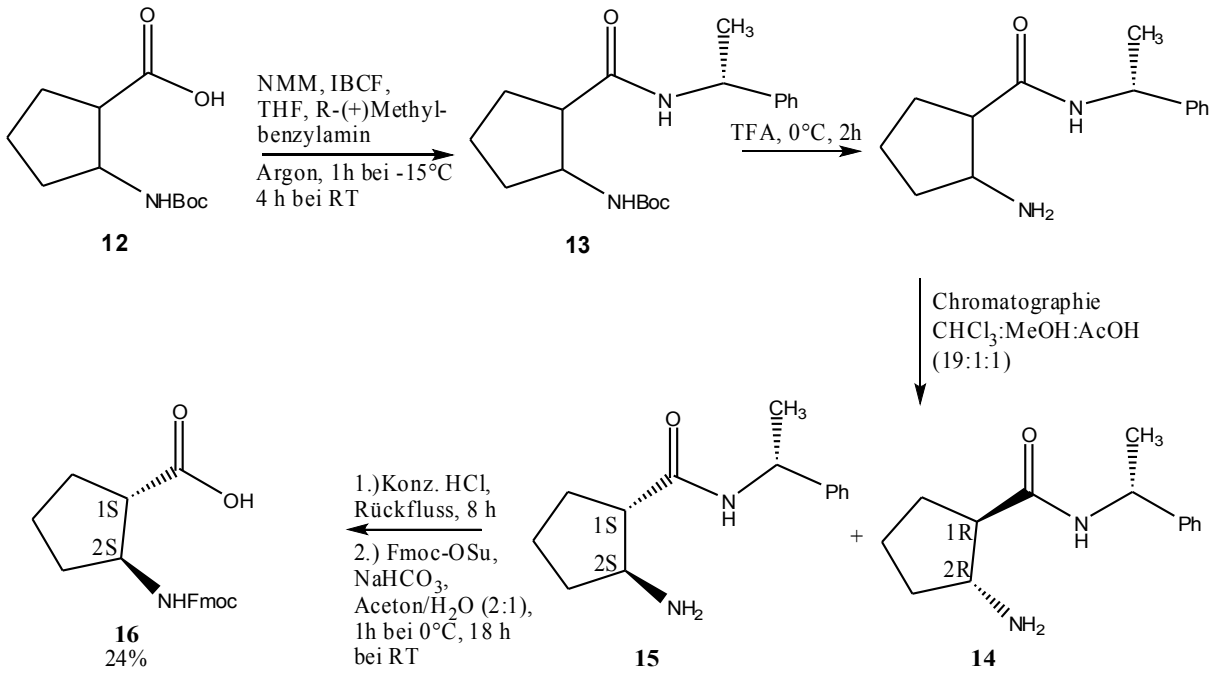
Für die enantiomerenreinen Synthese von *trans*-(1S,2S)-Aminocyclopentancarbonsäure (**9**) wurden zwei Synthesewege in dieser Arbeit verwendet und optimiert. Die Methode von T. Yamazaki et al. erweist sich als vorteilhaft, wenn man beide Enantiomere innerhalb einer Synthese herstellen möchte[86]. Man umgeht in dieser Arbeitsvorschrift zwei separate Synthesen, indem man die beiden Enantiomeren im entscheidenden Schritt chromatographisch voneinander trennt. Hierbei stellte man zuerst die *trans*-(±)-Aminocyclopentancarbonsäure (**11**) über das entsprechende Lactam (**10**) her, welches in einer [2+2]-Cycloaddition mit Cyclopenten und Chlorsulfonylisocyanat und anschließender Hydrolyse erhalten werden konnte[87]. Das 6-Azabicyclo[3.2.0]heptan-7-on (**10**) wurde mit Natriumethanolat und anschließendem Erhitzen am Rückfluss mit 18%iger Salzsäure selektiv zur *trans*-(±)-Aminocyclopentancarbonsäure (**11**) geöffnet und nach Kristallisation in Ethanol Boc-geschützt. Die *N*-Boc-*trans*-2-

Aminocyclopentancarbonsäure (**12**) wurde mit einer Ausbeute von 64% erhalten[88](Schema 5).



Schema 5

Die *N*-Boc-*trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure (**12**) wurde dann mit (*R*)-(+)-α-Methylbenzylamin nach der gemischten Anhydrid-Methode zur [(*N*-Boc)-*trans*-2-aminocyclopentancarboxyl]-(*R*)-(+)-α-methylbenzylamin (**13**) acyliert. Dann wurde die Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure abgespalten und mittels Säulenchromatographie in beide Diastereomeren (**14**) und (**15**) getrennt. Das Diastereomer *trans*-(1*S*,2*S*)-2-Aminocyclopentancarbonyl)-(*R*)-(+)-α-methylbenzylamin (**15**) wurde mit halbkonztrierter Salzsäure hydrolysiert. Dann wurde die Säulenchromatographie am Ionentauscher ausgelassen und das Rohmaterial mit Fmoc-OSu zur (1*S*,2*S*)-2-(*9H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-cyclopentancarbonsäure (**16**) mit einer Ausbeute von 24% umgesetzt[86]. Die Darstellung von (1*S*,2*S*)-2-(*9H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-cyclopentancarbonsäure (**16**) ist für größere Produktmengen, wie sie in dieser Arbeit benötigt werden, ungeeignet. Vorteil dieser Methode ist allerdings, dass man beide Enantiomere in einer Synthese isoliert kann(Schema 6).

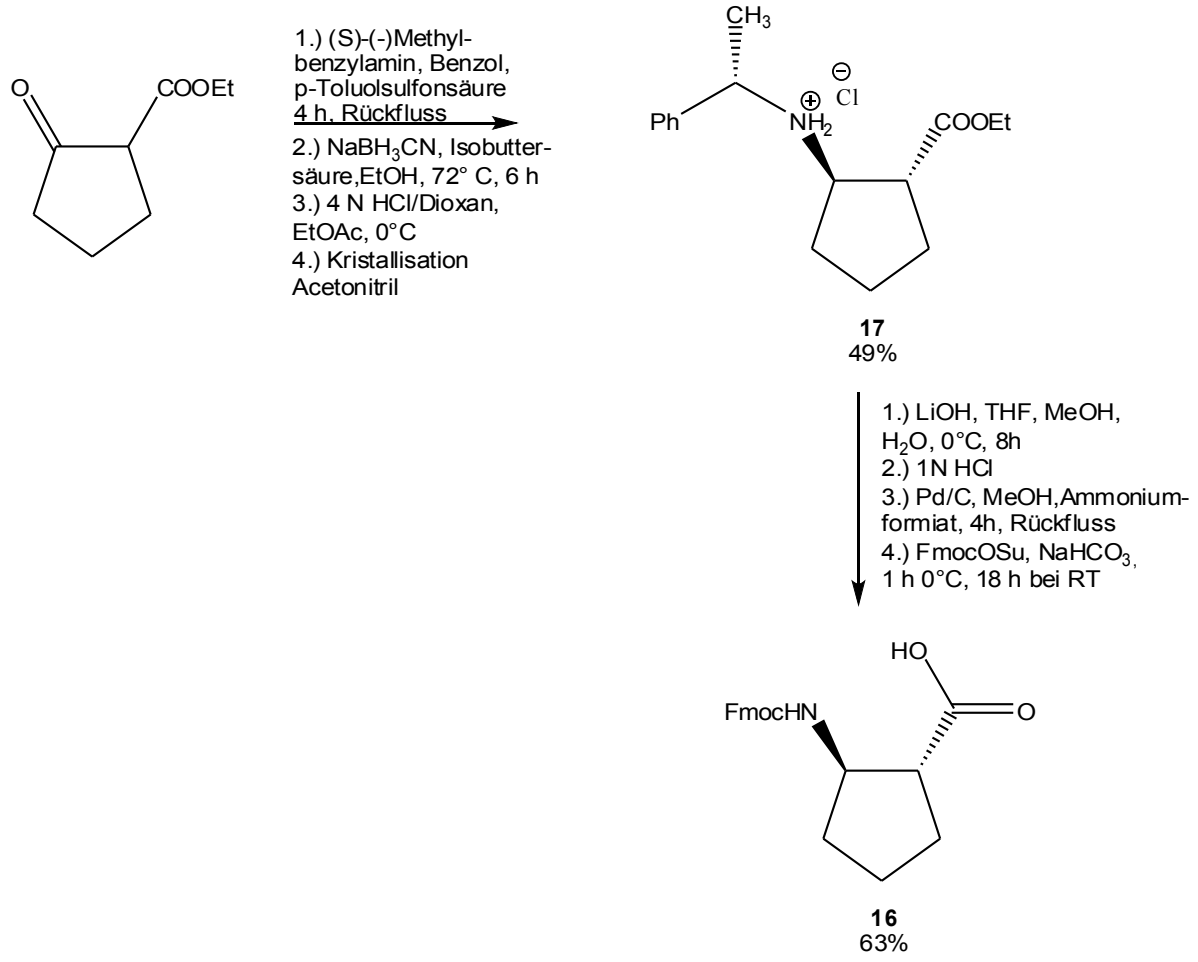


Schema 6

Aus diesem Grund wurde die nächste Möglichkeit gewählt, um die enantiomerenreine Fmoc-(1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**16**) in größeren Mengen erhalten. Das Prinzip besteht in der Reduktion von enantiomerenreinem β-Enaminoester mit Natriumborhydrid im sauren Milieu, die zu einer hohen Diastereoselektivität und Enantioselektivität führt, wenn α-Methylbenzylamine als chirale Seitenkette verwendet wird. Allerdings ist das Hauptprodukt immer die cis-Konfiguration[89]. Wird Natriumborhydrid durch Natriumcyanoborhydrid ersetzt, dann erhält man als Hauptprodukt das *trans*-Produkt[90]. Man hat auf diesen Syntheseweg von Gellmann et al. die *N*-Fmoc-2-Aminosäurecyclopentansäure (**16**) mit einer Ausbeute von 59% erhalten[90].

Vorteilhafter hat sich die Darstellung von *N*-Fmoc-2-Aminosäurecyclopentansäure (**15**) mit einer Kombination beider Syntheserouten von Gellmann et. al.[90][91]. bewährt. Hierfür wurde der Syntheseweg, der zur Darstellung von *trans*-4-Aminopiperidin-3-carbonsäure auf die Synthese von *N*-Fmoc-2-Aminosäurecyclopentansäure (**16**) angewendet. Im Gegensatz zum Literaturweg von Gellmann et. al.[90] erfolgte die Darstellung des Enanine mit dem β-Ketoester mit (*S*)-(-)-α-Methylbenzylamin am

Wasserabscheider mit p-Toluolsulfonsäure in Benzol. Anschließend wurde nach Abzug des Lösungsmittel ohne Destillation in abs. Ethanol aufnommen, mit Isobuttersäure angesäuert und anschließender Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid. Nach Abziehen des Lösungsmittel und Extraktion mit Diethylether, Filtration über Kieselgel und nach Entfernen des Diethylether wurde das *trans*-Diastereomer als Ethyl-(1*S*,2*S*)-2-[(1'*S*)-Phenylethyl]-aminocyclopentan-carbonsäurehydrochlorid (**17**) isoliert. Das Salz (**17**) wurde dann in einer Mischung aus THF/MeOH/H_2O gelöst und mit Lithiumhydroxid bei Raumtemperatur für 8h gerührt, dann mit verdünnt Salzsäure neutralisiert, eingeengt und dann mit Ammoniumformiat und Pd/C in Methanol am Rückfluss für 4h hydriert. Mittels DC-Kontrolle wurde die Hydrierung kontrolliert, dann über Celite filtriert und das Filtrat eingeengt und sofort mit Fmoc-Succinimid geschützt. Man hat *N*-Fmoc-(1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**16**) mit einer Ausbeute von 63% erhalten[90](Schema 7).



Schema 7

2.4 Die Peptidsynthese

Die beiden β-Aminosäuren (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**) und (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**9**) wurden enantiomerenrein dargestellt. Um sie mit den Glykopeptidbausteinen (**3**) und (**4**) in Peptidkupplungen zu Di- und Tripeptiden zu verknüpfen, musste zuvor die Schutzgruppenstrategie und Kupplungsmethode gewählt werden.

2.4.1 Allgemeine Aspekte der Peptidsynthese

Zur Knüpfung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren gibt es viele Hindernisse, die innerhalb der Synthese der Peptide auftreten. Für die Kondensation, der Wasserabspaltung zwischen zwei Aminosäuren wird eine Aktivierung der Carboxygruppe nötig. Da die Aminogruppe zu schwach nukleophil ist, um direkt mit der Carboxylgruppe ein Amid zu liefern, liegt das Gleichgewicht unter Normalbedingungen auf der Seite der Edukte. Das Dipeptid bildet sich nicht spontan aus, die Peptidknüpfungsreaktion ist endergonisch. Liegen die beiden Aminosäuren allerdings noch ungeschützt vor, so kann die aktivierte Aminosäure weiter mit dem Dipeptid reagieren und es kommt zur Ausbildung von zahlreichen Nebenprodukten neben dem gewünschten Dipeptid. Aus diesem Grund müssen alle funktionelle Gruppen bei der Peptidsynthese geschützt werden, sowohl temporär als auch permanent (Abbildung 14).

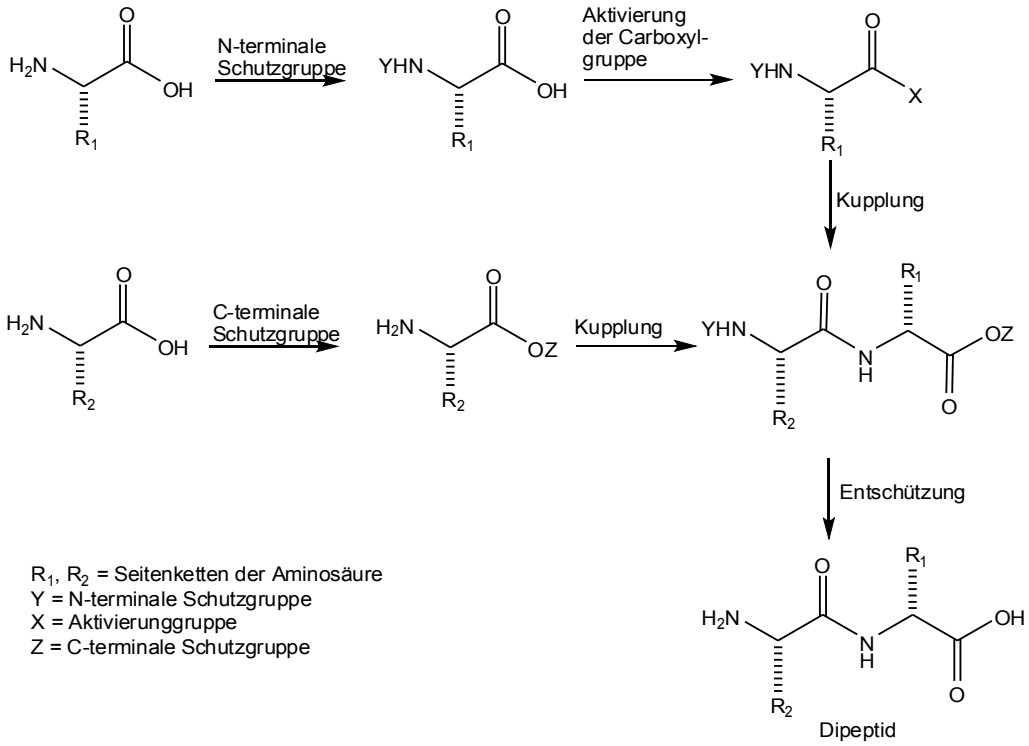


Abb. 14: Allgemeiner Ablauf der Peptidsynthese

2.4.2 Die chemische Peptidknüpfung

Zwei Methoden haben sich in der chemischen Peptidsynthese etabliert, die Festphasensynthese (Solid Phase Peptide Synthesis) and die Synthese in Lösung, bei der die Zwischenstufen nach jeder Kupplung gereinigt werden müssen. Außerdem nimmt die Löslichkeit mit zunehmender Peptidgröße mehr und mehr ab und die Aufreinigung wird zunehmender schwieriger. Weiter wird in der klassischen Peptidsynthese in Lösung die Boc/Bzl-Schutzgruppenstrategie verwendet, die Fmoc/*tert.*Butyl-Schutzgruppenstrategie wurde erst im Zuge der Festphasensynthese interessant[92]. Dieses Löslichkeitsheitsproblem wird bei der Festphasensynthese unterbunden, die von B. M. Merrifield 1963 eingeführt wurde. Man verknüpft den Aminoterminus, einer geschützten C-terminalen Aminosäure an einen Linker, der an einen unlöslichen Träger (Harz) gebunden ist. Nach der Abspaltung der *N*-terminalen temporären Schutzgruppe kann die nächste Aminosäure an die erste Aminosäure angeknüpft werden, bis das gewünschte Peptid entstanden ist. Nach jedem Kupplungsschritt muss das Harz mehrmals gewaschen werden, um überschüssige

Reagenzien zu entfernen. Dann muss beachtet werden, dass nicht jeder Kupplungsschritt vollständig abläuft, mit anderen Worten, die nicht umgesetzten Aminoendungen müssen nach dem Kupplungsschritt gekappt werden. Abschließend wird das Peptid vom Harz abgeschalten und chromatographisch aufgereinigt.

2.4.3 Besonderheiten bei Peptidsynthesen in Lösung

Für Peptidsynthesen in Lösung müssen andere Voraussetzungen erfüllt werden als bei Peptidsynthesen an fester Phase. In der klassischen Peptidsynthese in Lösung verwendet man die, im Jahre 1932 von Bergmann und Zervas, entwickelte Benzyloxycarbonylgruppe als Schutzgruppe[93]. Es war der Startpunkt für die Peptidsynthesen in Lösung. Die Z-Schutzgruppe ist gegenüber den meisten Säuren wie TFA, Salzsäure und Schwefelsäure stabil. Auch gegenüber den meisten sterisch gehinderten Basen wie DIPEA, DPU, Triethylamin ist die Z-Schutzgruppe stabil, allerdings instabil gegenüber Ammoniak. Sie lässt sich leicht durch Hydrierung an Palladium auf Aktivkohle bei Raumtemperatur und bei Atmosphärendruck entfernen, wobei die Peptidbindungen und die meisten Seitenkettenschutzgruppen nicht angegriffen werden. Als Abspaltungsprodukte entstehen Toluol und Kohlendioxid, die leicht im Vakuum entfernt werden können. Des weiteren gibt es noch weitere Möglichkeiten die Z-Gruppe abzuspalten, zu einem durch Natrium in flüssigen Ammoniak[94] und durch Acidolyse mit HBr[95]. Die temporäre Schutzgruppe ist die Boc-Schutzgruppe, die leicht durch TFA abgespalten werden kann, aber die Z-Schutzgruppe unberührt lässt. Das Abspaltungsprodukt ist Isobuten, welches leicht im Vakuum oder durch Säulenchromatographie entfernt werden kann.

2.4.4 Synthesestrategie und Racemisierung

In der Literatur sind nur wenige Beispiele bekannt für die Fmoc/*tert*.Butyl-Strategie in Lösung[96]. Meistens wird die Fmoc-Gruppierung als permanente Schutzgruppe für den *N*-Terminus benutzt, die Peptidkettenverlängerung erfolgt über Aminosäuren, der Cbz/*tert*.Butyl-Schutzgruppenstrategie. Die Fmoc-Aminosäure wird mittels Aktivestermethode Pentafluorphenol aktiviert, die zweite Z-geschützte Aminosäure

wird *tert*.Butyl-geschützt, damit durch katalytische Hydrierung die Aminogruppe freigesetzt werden kann. Dieses Prinzip wurde bereits in meiner Diplomarbeit angewendet und hat sich für die Dipeptidsynthese gut geeignet[79]. Die Verlängerungsprozedur in Lösung eignet sich für kleinere Peptide mit Kettenlänge bis zu 12 Aminosäuren[92] oder zur Darstellung von Peptidfragmenten mit Kettenlängen von 3-6 Aminosäuren. Für die Synthese längerer Peptide und Proteinen bis zu 36 Aminosäuren wird Harzsynthese an die fester Phase verwendet. Die schrittweise Verlängerungprozedur von Peptiden in Lösung wird mit zunehmender Kettenlänge schwieriger, weil nach jedem Kupplungsschritt ein chromatographischer Aufreinigungsschritt folgen muss. Daraus folgt ein Ausbeuteverlust nach jedem Schritt und mit zunehmender Kettenlänge, auch ein Löslichkeitsproblem, weil die Löslichkeit selbst in DMF und NMP abnimmt[97][98].

Erste Peptidsynthesen zur Darstellung eines Hexapeptides mit β-Alanin-Bausteinen wurde am Wang-Harz durchgeführt[79]. Es zeigte sich, dass erstens mit dreifachen Äquivalenten an Baustein je Kupplungsschritt gearbeitet werden muss. Weiter waren die Ausbeuten schon nach der ersten Anbindung an das Harz mit einem Dipeptidbaustein unbefriedigend. Aus diesem Grund wurden die Tri- und Hexapeptide in dieser Arbeit in Lösung dargestellt. Für die Darstellung der Peptide zur Untersuchung des β-Aminosäurerückgrates wurde die klassische Darstellung in Lösung abgewandelt angewendet. Die Glykopeptidbausteine (**3**) und (**4**) sind nach der Fmoc/*tert*.Butylstrategie synthetisiert worden, damit sie jederzeit in der Festphasen- bzw. Spotsynthese angewendet werden können.

2.4.5 Kupplungsmethoden

Für die Peptidknüpfung gibt es zahlreiche Methoden, die nach ihren Kupplungsreagenzien benannt werden. Die erste Methode, die bereits im Jahre 1902 von. Curtius zur Aktivierung der Carboxylgruppe die Acylazide eingeführt wurde ist die Azidmethode[99][100]. Diese Methode war lange Zeit als die einzige racemisierungsfreie Methode bekannt, bis die gemischte Anhydridmethode im Jahre 1951 von Wieland, Boissonnas und Vaughan nahezu gleichzeitig entdeckt

wurde[101][102][103]. Bis heute werden immer weitere Kupplungsreagenzien entdeckt, welche die Racemisierung unterdrücken und schwierige Peptidkupplung bei sterischer Hinderung ermöglichen. Diese Peptidkupplungen verwenden Phosphoniumreagenzien[104][105], Uroniumreagenzien[106][107], Carbodiimid-Reagenzien[108], Säurehalogenide[109][110] und Aktivester[111][112]. Die Immoniumreagenzien[113] sind modifizierte Uroniumreagenzien. Phosphororganische Reagenzien[114] und Chloroformiat-Reagenzien[115][116] basieren auf der gemischten Anhydridmethode und die Imidazolreagenzien[117][118] basieren auf den Carbodiimidenreagenzien. In dieser Arbeit wurde die Carbodiimid- und die Aktivestermethode benutzt. Sie haben sich vor allem bei der Dipeptidsynthese und für die Aktivestersynthese bewährt, außerdem kann man die Pentafluorphenolester gut lagern[79]. Die Phosphonium- und Uroniumreagenzien werden für die Tri- und Hexapeptidkupplungen verwendet, weil sie für sterisch gehinderte Peptidkupplungen gut geeignet sind[119]. Des weiteren haben sich diese Kupplungsreagenzien in unserer Arbeitsgruppe bei der Peptidkupplung mit Glykopeptiden und mit β-Aminosäuren bewährt[12][13][14].

2.4.6 Carbodiimid- und Aktivester-Methode

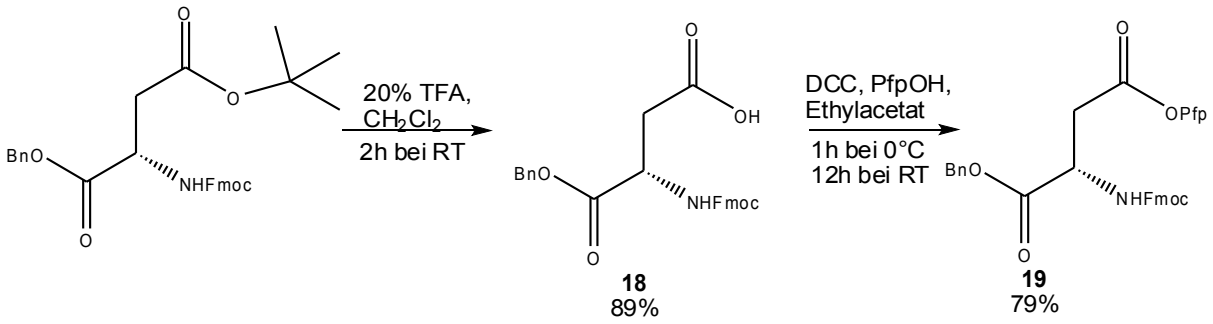
Die Carbodiimid-Methode[108], welche 1955 von Sheehan publiziert wurde, wird in dieser Arbeit für Darstellung der Pentafluorphenolester genutzt. Hierfür wird *N,N′*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) verwendet, weil es nach Aktivierung der Carboxylgruppe in das korrespondierende Harnstoffderviat umgesetzt wird und bequem aus der Reaktion entfernt werden kann. Nachteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit Oxazolon zu bilden, das bei der Aktivierung eintreten kann und dann zur Racemisierung führen kann. Deshalb ist diese Methode in der Peptidsynthese nur bedingt einsetzbar. Man kann diese Nebenreaktion mit dem Einsatz von Additiven wie *N*-Hydroxysuccinimid[120] oder 1-Hydroxybenzotriazol[121] zurückdrängen, indem sie das O-Acylisoharnstoffderivat abfangen und in ein weniger hochreaktives Zwischenprodukt umwandeln, welches dann weiter racemisierungsfrei mit der Aminokomponente zum gewünschten Peptid reagiert. Neuere Methoden verwenden *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N′*-ethylcarbodiimide (EDCI). Diese werden nach der

Peptidknüpfung mit verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt, weil es nicht wie das Harnstoffderivat des DCC während der Reaktion ausfällt. Die Ausbeuten waren denen des DCC entsprechend, allerdings hat sich das EDCl bei sterisch gehinderten Peptiden bewährt[122].

Die Bildung des Aktivesters kann auch der eigentlichen Kupplungsreaktion als isolierbare Zwischenstufe vorgelagert werden. Kisfaludy und Schön fanden heraus, dass die Veresterung der α-Carboxylfunktion von Aminosäuren mittels Pentafluorphenol unter Katalyse von Dicyclohexylcarbodiimid bei 0°C durchgeführt werden kann. Die isolierten Pentafluorphenolester lassen sich in Essigsäureethylester, Dichlormethan oder DMF ohne weitere Kupplungsreagenzien mit einem primären oder sekundären Amin umsetzen. Die Aminogruppe greift an die Carboxylgruppe unter Ausbildung eines tetrahedrischen Übergangszustandes an. Anschließend wird der Alkohol abgespalten und die Peptidbindung ausgebildet. Als geeignete Esterabgangsgruppen haben sich Thiophenole, Hydroxyacetonitril, Nitrophenole, Pentachlor- oder Pentafluorphenole erwiesen[111][112].

2.4.6.1 Darstellung von Fmoc-Asp-OPfp-OBn (19)

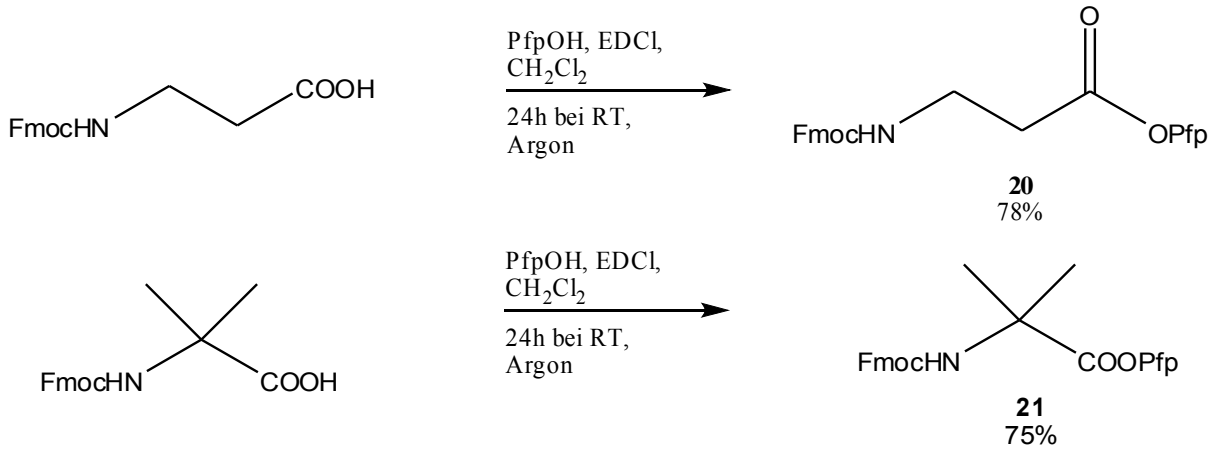
Um die β-Carboxylgruppe des Asparaginsäurebausteines Fmoc-Asp-*Ot*Bu-OBn mit Pentafluorphenol zu aktivieren, muss zuvor die *tert*.Butylschutzgruppe mit Trifluoressigsäurelösung in Dichlormethan entschützt werden. Nach Aufreinigung wurde Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) mit einer Ausbeute von 89% erhalten. Der Baustein wurde zusammen mit Pentafluorphenol in Ethylacetat gelöst und nach Zugabe des DCC und anschließender Aufarbeitung hat man den aktivierten Baustein Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**19**) mit einer Ausbeute von 79% erhalten (Schema 8).



Schema 8

2.4.6.2 Darstellung von Fmoc-β-Alanin-OPfp (20) und Fmoc-Aib-OPfp (21)

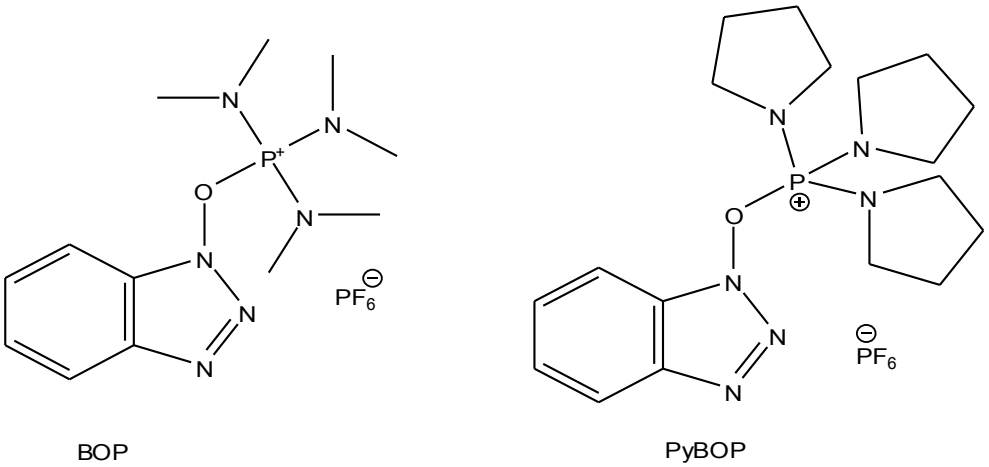
Für die Darstellung von Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) wurde nach der Vorschrift von Watts et. al.[96] gearbeitet. Anstatt von DCC wurde das *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDCl) verwendet, welches einfach mit verdünnter Salzsäure aus der Reaktionslösung entfernt werden kann. Zu einer Lösung von 3-(*9H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-aminopropionsäure, welche nach Capino et al.[123] synthetisiert wurde, wurde zusammen mit Pentafluorphenol in Dichlormethan EDCl zugegeben. Nach Aufreinigung wurde Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) mit einer Ausbeute von 78% isoliert. Um den Baustein Fmoc-Aib-OH, welcher nach Valle et al.[124] dargestellt wurde, mit Pentafluorphenol zu aktivieren wurde auf gleiche Weise vorgegangen. Nach Aufarbeitung hat man Fmoc-Aib-OPfp (**21**) mit einer Ausbeute von 75% erhalten(Schema 9).



Schema 9

2.4.7 Phosphonium-Methode

Zu dieser Methodengruppe der Aktivester gehört auch die Phosphoniumreagenzien, die eine Art in-situ-Generierung zum Aktivester darstellen. In den frühen 70er Jahren hat die Arbeitsgruppe um Castro die Vertreter Chlortris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorphosphat (CloP) und Bromtris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorphosphat (BroP) als Peptidkupplungsreagenz vorgestellt[104][105]. Durch die Entdeckung von HOBt durch Geiger und König[121], entstand der einfachste Vertreter, das Benzotriazolol-1-yloxy-tris(dimethylamino)phoshoiumhexafluorphophat, kurz BOP[119] genannt, dass ebenfalls von Castro et al. 1975 eingeführt wurde und gute Kupplungseigenschaften zeigt. Nachteil von BOP ist die Entstehung von Hexamethylphosphoramid, das nachweislich krebserregend ist und eine hohe Racemisierungstendenz, die sich letztendlich in der Peptidsynthese unpraktikabel erweist. Später wurde durch die Einführung von PyBOP, bei welchem der Dimethylaminrest durch einen Pyrrolidinrest ersetzt wurde, machten die Phosphoniumreagenzien wieder praktikabel. Das giftige Hexamethylphosphoramid kann nicht mehr als Nebenprodukt gebildet werden und die Ausbeuten sind im Vergleich zu BOP gestiegen[119](Abbildung 15).



BOP PyBOP

Abb.15: Phosphoniumreagenzien

Der Vorteil der Phosphoniumreagenzien liegt in der unkomplizierten Zugabe in die Reaktionsmischung, weil sie mit der freien α-Aminogruppe nicht reagiert. Für die

Deprotonierung wird ein tertiäres Amin zugeben, in den meisten Fällen DIPEA oder Methylmorpholidin, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.4.8 Uronium/Guanindinium-Methode

1978 führten Gross et al. eine andere bedeutende Gruppe der Peptidkupplungsreagenzien ein, die Uronium/Guanidinium-Reagenzien[106]. Sie entstanden aus den Additiven HOBt und HOAt und wurden mit einer Reihe verschiedenen Dialkylaminosubstituenten am Ring von Knorr et. al.[107] modifiziert (Abbildung 16)

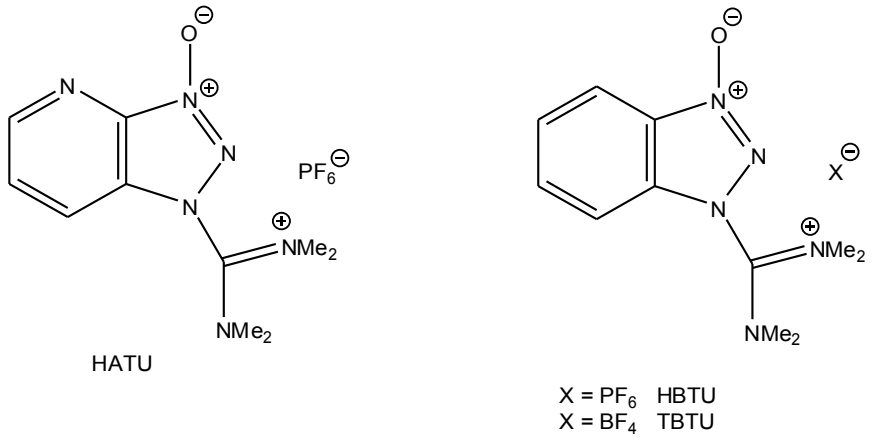


Abb.16: Uroniumreagenzien

Carpino et. al hat durch Röntgenstrukturanalyse herausgefunden, dass die Struktur der Uroniumreagenzien mehr als Guanidinium-*N*-oxid-Struktur vorliegt, nur in Lösung liegen beide Strukturen im Gleichgewicht vor[125] Wie die Phosphonium-Reagenzien reagieren auch die Uronium/Guanidinium-Kupplungsreagenzien. Der nukleophile Angriff erfolgt von der Carboxylfunktion der Aminosäure zum *N,N,N′,N′*-Tetramethyluroniumderivat. Anschließend bildet sich der Aktivester mit dem Benzotriazol-Rest aus, der mit einer freien Aminfunktion der zweiten Aminosäure die Peptidbindung knüpft. Durch die Beteiligung der Guanidinum-*N*-Oxid-Form findet eine Acylwanderung statt, welche wichtig für die Aktivesterbildung ist.

2.4.9 Unerwünschte Reaktionen bei der Peptidsynthese

Von allen natürlichen Aminosäuren sind Alanin und Leucin nicht den typischen Seitenkettenreaktionen unterworfen und müssen nicht zusätzlich durch weitere Schutzgruppen bei der Peptidsynthese geschützt werden. Allerdings kann auch hierbei Racemisierung in der Peptidsynthese auftreten. Die β-Aminosäuren sind gegen diese Racemisierung weitgehend inert. Durch die Verwendung der Asparaginsäure im Glucose- und Galactobaustein sind alle Peptidsynthesen einer Racemisierung unterworfen, um sie zu vermeiden ist das Verständnis der Racemisierung wichtig.

2.4.9.1 Nebenreaktion N-Guanylierung

Durch die Verwendung von Uronium/Guanidiniumreagenzien wie HBTU oder TBTU können endständige Aminogruppen ein Guanidinium-Derivat bei der Peptidsynthese ausbilden. Hier ist die Geschwindigkeit für die Aktivierung der Carboxylgruppe geringer als die Geschwindigkeit der Peptidknüpfung, besonders wenn die Aminokomponenten sterisch abgeschirmt ist[126]. Es kommt zur Cyclisierung des Peptides, wenn lineare Peptidketten vorhanden sind, mit denen das *N*-Guanylierungsprodukt reagieren kann[127] (Abbildung 17). Um diese Nebenreaktion zu vermeiden, wurde bei den Peptidkupplungen in dieser Arbeit meistens mit Phosphoniumreagenzien gearbeitet.

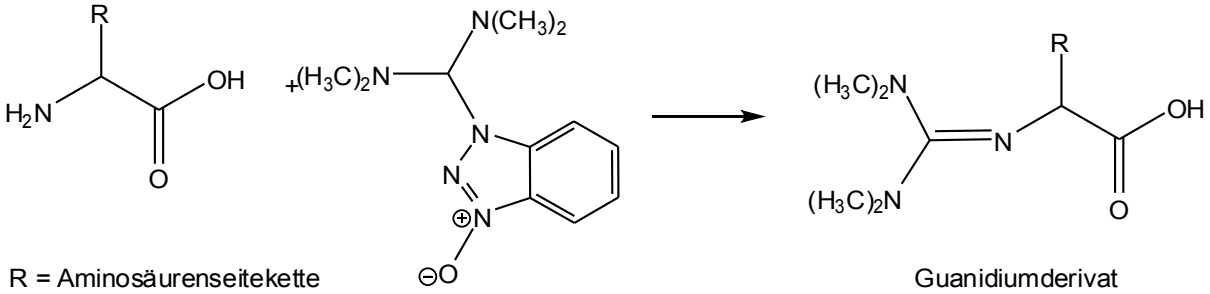


Abb. 17: *N*-Guanylierung

2.4.9.2 Nebenreaktion Aspartimidbildung[128]

Die beiden Glykopeptidbausteine (**3**) und (**4**) enthalten die natürliche α-Aminosäure Asparaginsäure, Durch deren Verwendung kommt es häufig zu Bildung von Aminosuccinaten und von cyclischen Aspartimiden als Nebenreaktion. Dies wird häufig beobachtet, wenn es die Sequenzen Asp-Gly, Asp-Ala oder Asp-Ser in der Peptidkette vorhanden ist. In dieser Arbeit kann diese Nebenreaktion bei der Verknüpfung des Glykopeptidbausteines (**3**) und (**4**) mit der Asparaginsäureeinheit mit einer β-Alanin-Einheit auftreten. Aber auch die Kupplung der Asparaginsäure mit einer anderen Asparaginsäureeinheit könnte die Aspartimidbildung auslösen. Initiiert wird diese Nebenreaktion bei der säurekatalysierten Abspaltung der Peptidkette vom Harz mit Trifluoressigsäure oder bei der basenkatalysierten Entschützung der Fmoc-Gruppe durch Piperidin[129], die in dieser Arbeit bei fast jeder Peptidkupplung vorausgeht.

Weiter ist bekannt, dass Peptide, die Asparaginsäurebausteine enthalten, in wässrigen Lösung Aminosuccinatderivate bilden[130]. Um die Aspartimidbildung zu verhindern, wurde in dieser Arbeit mit verdünnter Piperidinlösung arbeiten. Eine 5%ige Piperidinlösung in DMF oder NMP verhindert diese Nebenreaktion weitgehend und die Ausbeuten fallen höher aus als bei Verwendung der üblichen 20%igen Piperidinlösung in DMF[131]. Alternativ konnte auch eine Diethylaminlösung in Dichlormethan verwendet werden, die schwächere Basizität verlängert aber die Abspaltungszeiten auf 2 bis 4 Stunden[132] .

2.5 Die Tripeptidsynthesen

Für die Kettenverlängerung des Peptidrückgrates sollte nun herausgefunden werden, welche konvergente Synthese für die Darstellung der Tripeptiden mit Kohlenhydratresten effektiver verläuft und bei der weniger Nebenprodukte entstehen. Ist es unproblematischer, den Glykopeptidbaustein zuerst mit einem Monobaustein der β-Aminosäuren zu verknüpfen und erst im zweiten Schritt zum Tripeptid zu kuppeln, oder ist es effizienter, zuerst den Dipeptidbaustein darzustellen und im zweiten Schritt mit dem Glykopeptid zu kuppeln? In welchen Fällen ist die Racemisierung geringer? Welche Synthesestrategie liefert höhere Ausbeuten und eröffnet eine größere Variation in der Peptidrückgratsequenz? Aus diesem Grund werden verschiedene Tripeptide mit aliphatischen und alicyclischen α- und β-Aminosäuren dargestellt. Im Anschluss werden diese Tripeptidbaustein zu Hexapeptiden verknüpft, nach dem Baukastenprinzip, um herauszufinden, ob dieses Prinzip auf alle Tripeptide Anwendung findet (Abbildung 18).

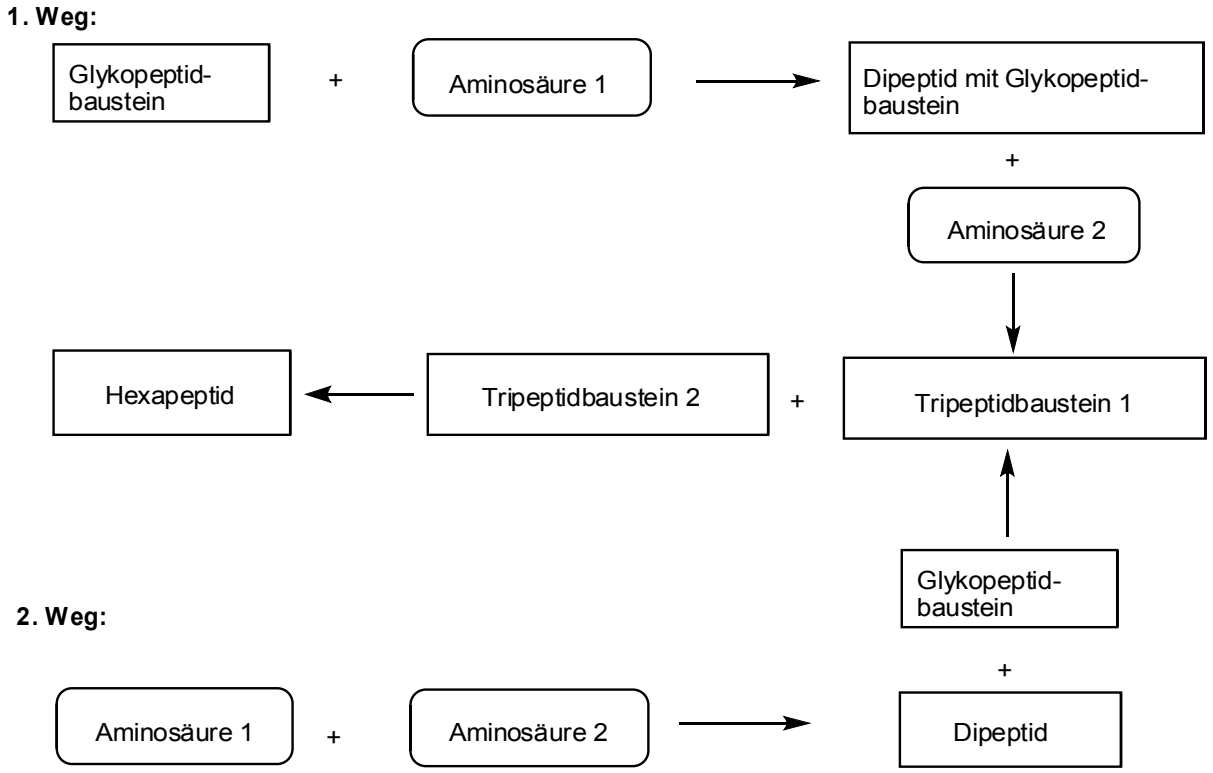
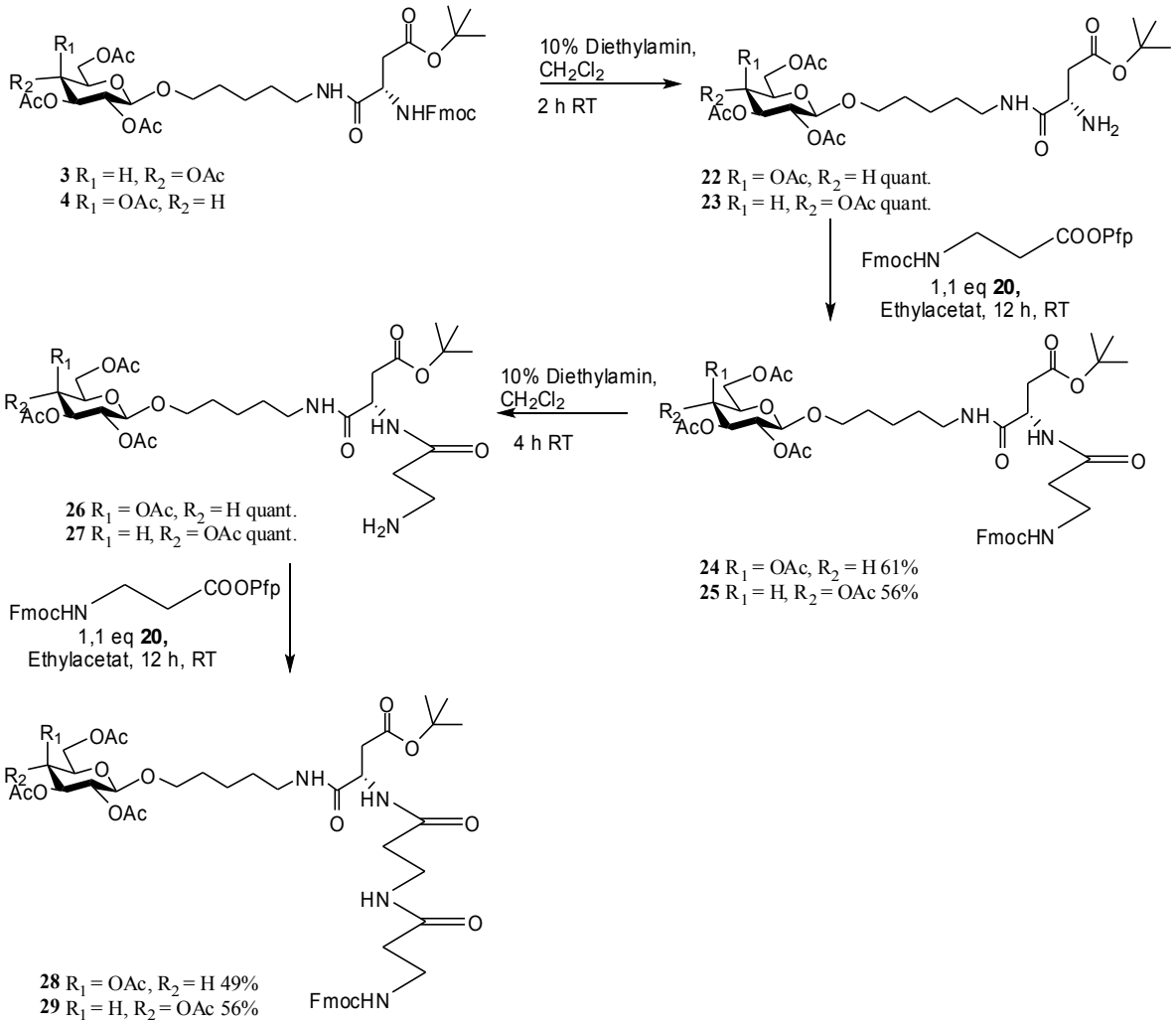


Abb.18: Konvergente Synthesen

2.5.1 Synthese der Tripeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (28) und Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (29)

Zuerst wurde ein einfacher Monobaustein Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) an die Asparaginsäure des Galactose- (**4**) oder Glucosebausteines (**3**) geknüpft. Hierfür wurde der Galatosebaustein (**11**) zuerst mit 10% Diethylamin in Dichlormethan zum Fmoc-entschützten Galactosebaustein (**22**) entschützt. Anschließend wurde der Rückstand in Ethylacetat gelöst und Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) hinzugefügt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufreinigung an Kieselgel hat man das Dipeptid Fmoc-[β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**24**) mit einer Ausbeute von 65% erhalten. Das entstandene Dipeptid Fmoc-[β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**24**) wurde wiederholt mit 10% Diethylamin in Dichlormethan zum Dipeptidbaustein NH_2-[β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**26**) entschützt und anschließend in Dichlormethan gelöst. Dann wurde der aktivierte Monobaustein Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) hinzugefügt. Nach der Aufreinigung an Kieselgel mit Chloroform/Ethanol (19:1) hat man das Galatosetripeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**28**) mit einer Ausbeute von 56% erhalten.

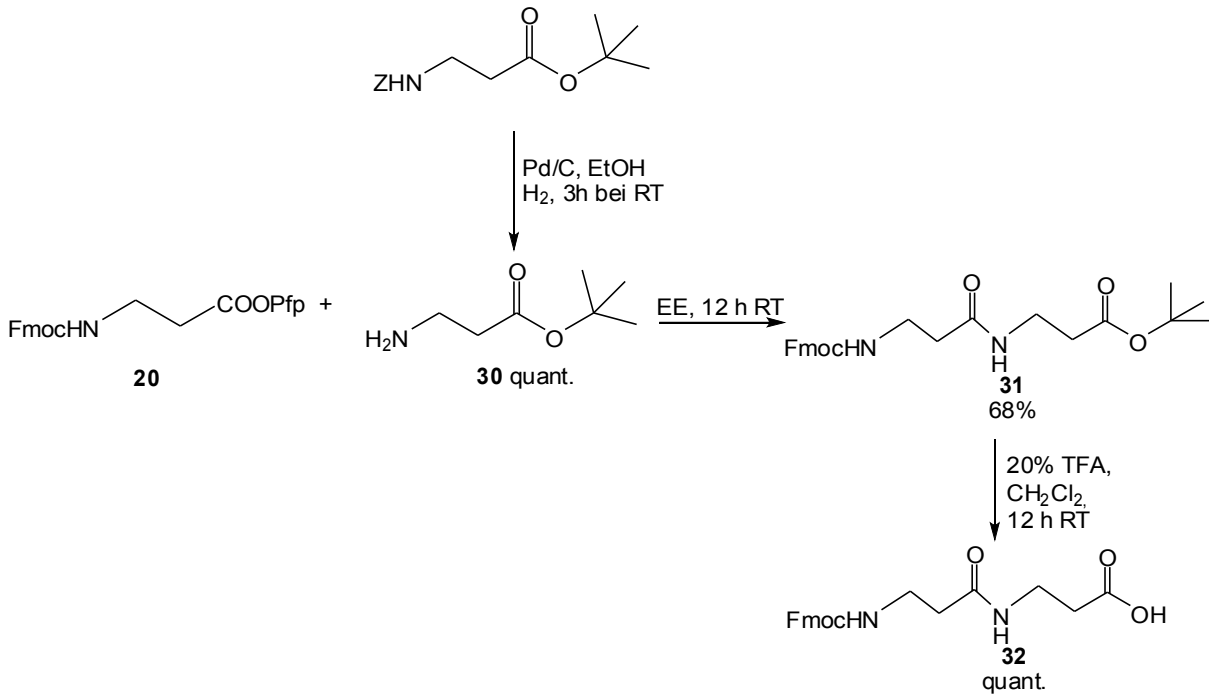
Dieselbe Prozedur wurde auf den Glucosebaustein Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**29**) angewendet, die Ausbeute für den Dipeptidbaustein Fmoc-[β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**25**) lag bei 61%, der anschließend mit 5% Piperidinlösung in DMF zum NH_2-[β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**27**) entschützt. Die weitere Kupplung mit Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) ergab den Tripeptidbaustein Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**29**) mit einer Ausbeute von 49% (Schema 10).



Schema 10

Ein anderer Syntheseansatz ging von der Darstellung des β-Dipeptides (**31**) aus. Hierbei wurde die klassische Peptidchemie angewendet und als finalen Schritt an den Glykobaustein der Galastose (**4**) oder Glucose (**3**) gekuppelt. Der erste Dipeptidbaustein Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-*tert*.Butylester (**31**) für die Darstellung des ersten Tripeptidbausteines Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**28**) wurde nach der Sythesestrategie Fmoc/*tert*.Butyl und durch die Pentafluorphenol-Aktivestermethode dargestellt, die sich in meiner Diplomarbeit schon bewährt hat[79]. Hierfür wurde zuerst Z-β-Alanin-*tert*.Butylester in Ethanol gelöst und mittels Hydrierung an Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatomosphäre Z-entschützt. Nach Entfernung des Lösungsmittel wurde der Rückstand von *tert*.Butyl-Alanin (**30**) ohne weitere Aufarbeitung mit dem ersten Monobaustein Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) in

Ethylacetat umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Aufreinigung an Kieselgel mit einer Ausbeute von 68% erhalten. Anschließend wurde das Dipeptid Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-*tert*.Butylester (**31**) mit einer 20%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan *tert*.Butyl-entschützt. Man hat das Dipeptid Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-OH (**32**) in quantitativer Ausbeute erhalten. (Schema 11)

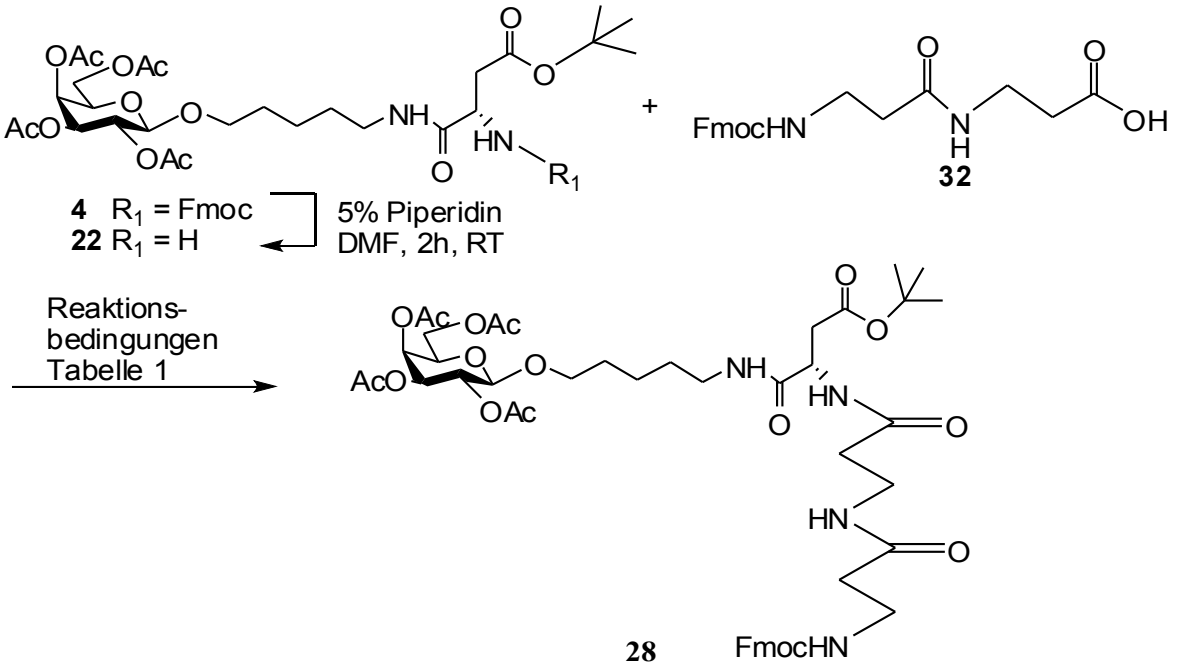


Schema 11

Der Galatosebaustein (**4**) wurde mit einer 10%igen Diethylaminlösung in Dichlormethan zum Galactosebaustein mit freier Aminofunktion (**22**) entschützt. Zur Knüpfung der Dipeptidkomponente Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH (**32**) mit den Galactosebaustein (**22**) wurden mehrere Kupplungsreagenzien getestet. (Tabelle 1 und Schema 12).

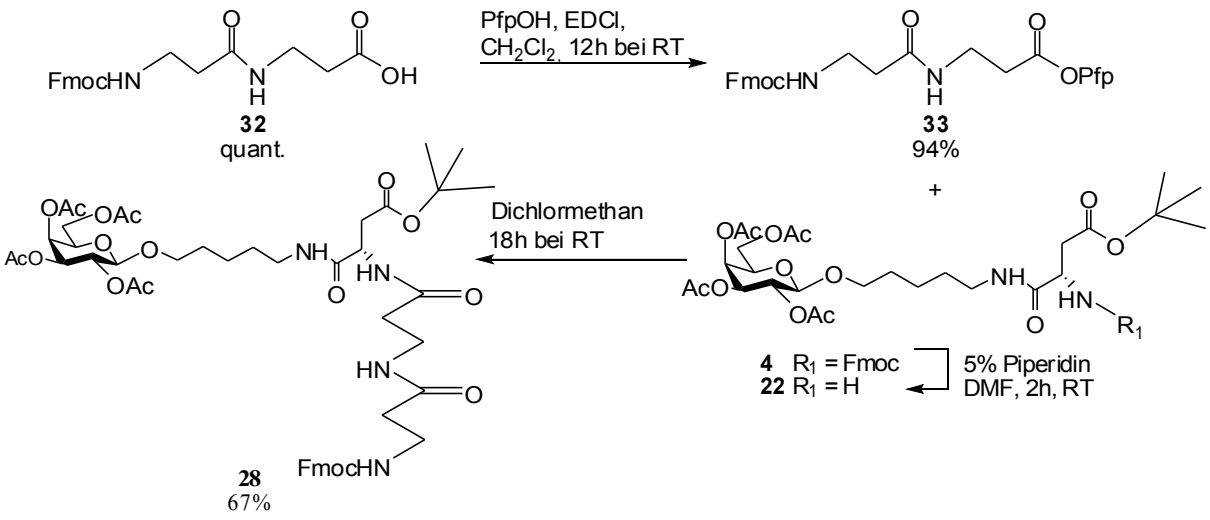
Tabelle 1: Optimierung der Kupplungsmethode mit dem Galactosebaustein (**22**) und mit dem Dipeptidbaustein (**32**) oder (**33**) zum Tripeptidbaustein (**28**)

Methode:	Verwendete Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
Aktivestermethode	Dipeptid-PfpEster (**33**) Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	CH_2Cl_2	18h	67%
EDCI/HOBt	EDCI, HOBt, NMM, Dipeptid-OH-frei (**32**), Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	1h bei 0°C, 18h bei RT	12%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Dipeptid-OH-frei (**32**), Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	5h	54%
TBTU/HOBt	TBTU, HOBt, DIPEA, Dipeptid-OH-frei (**32**), Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	4h	34%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Dipeptid-OH-frei (**32**), Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	4h	44%



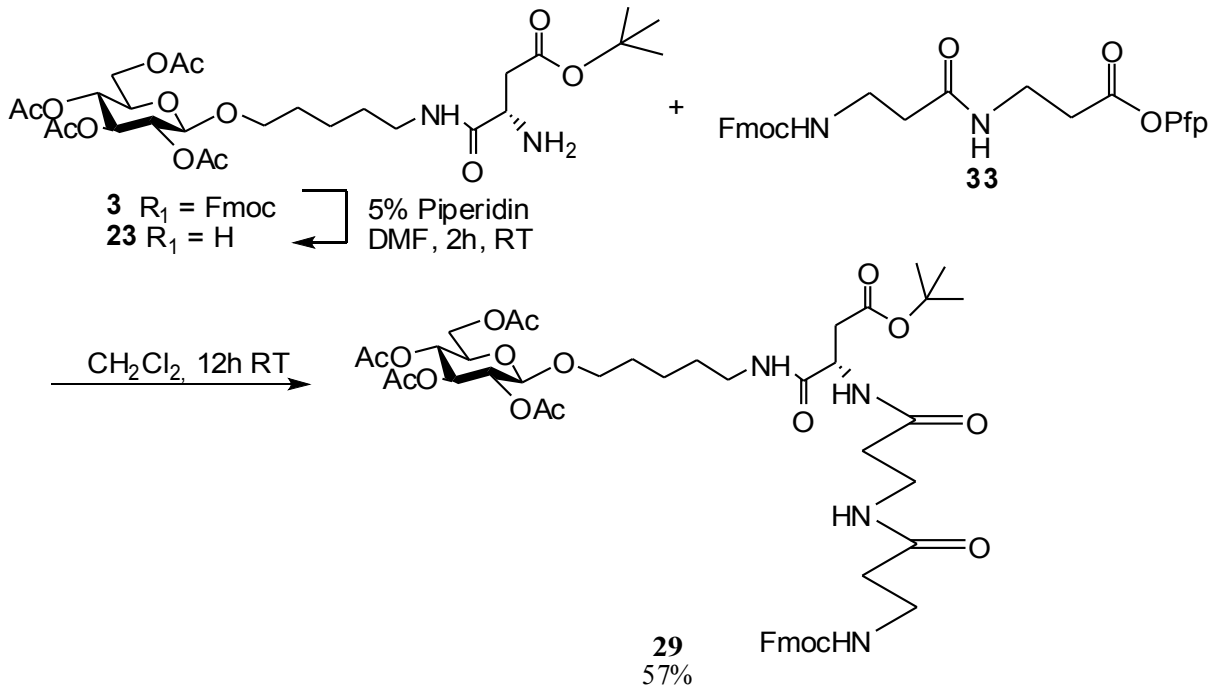
Schema 12

Für die Pentafluorphenol-Aktivester-Methode wurde das Dipeptid Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH (**44**) zusammen mit Pentafluorphenol in Dichlormethan unter Argon gelöst, dann wurde EDCI-Methode angewendet. Nach Aufarbeitung erhält man das aktivierte Dipeptid Fmoc-β-Ala-β-Ala-OPfp (**45**) mit einer Ausbeute von 94%. Zusammen mit dem Galactosebaustein **(34)** ergab sich der Tripeptidbaustein (**40**) in einer Ausbeute von 67% (Schema 13).



Schema 13

Die besten Ausbeuten nach Tabelle 1 ergaben sich mit der Kupplungsreagenzien der Aktivester- und der PyBOP-Methode. Aufgrund der wenigen Nebenprodukte bei der Darstellung des Tripeptidbausteines (**28**) mit der Aktivestermethode, wurde der Glucosetripeptidbaustein Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**29**) analog hierzu dargestellt. Der Glucosebaustein (**23**) mit freier Aminofunktion wurde in Dichlormethan mit Fmoc-β-Ala-β-Ala-OPfp (**33**) für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung hat man den Tripeptidbaustein Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**29**) mit einer Ausbeute von 57% erhalten (Schema 14).



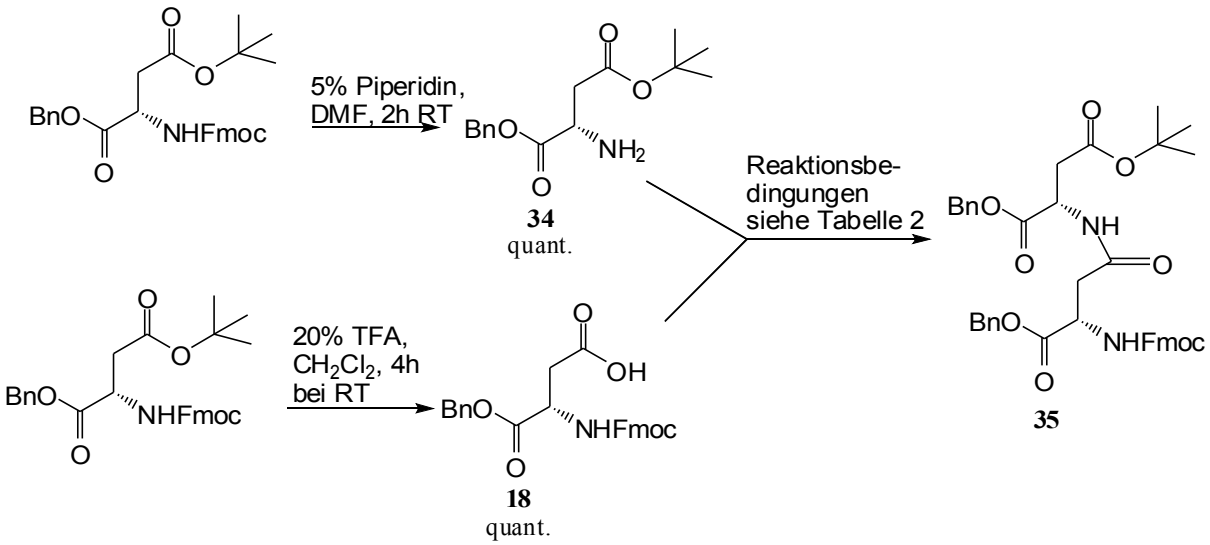
Schema 14

2.5.2 Darstellung von Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (37) und Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (38)

Für die Darstellung der Tripeptide Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-OtBu (**37**) und Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-OtBu (**38**) mit einem reinen Asparaginsäurerückgrat wurde zuerst der Dipeptidbaustein Fmoc-(Asp-Asp)-*Ot*Bu (**35**) dargestellt. Hierfür wurde der α-benzylgeschützter Asparaginsäurebaustein Fmoc-Asp-*Ot*Bu-OBn verwendet, der weiterhin Fmoc/*tert*.Butyl-geschützt ist. Der Baustein Fmoc-Asp-*Ot*Bu-OBn wurde hierzu für 1h bei RT mit einer Anisol/TFA-Lösung *tert*.Butyl-entschützt. Nach Abzug des Lösungsmittels und Aufreinigung wurde der Asparaginsäurebaustein Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) mit einer Ausbeute von 87% erhalten. Der zweite Asparaginsäurebaustein Fmoc-Asp-*Ot*Bu-OBn wurde mit einer 5%igen Piperdinlösung in DMF bei Raumtemperatur für 2 Stunden Fmoc-entschützt. Nach Trocknen im Vakuum wurde der Asparaginsäurebaustein NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) ohne weitere Aufreinigung zum Dipeptid Fmoc-(Asp-Asp)-*Ot*Bu (**35**) gekuppelt. (Tabelle 2 und Schema 15)

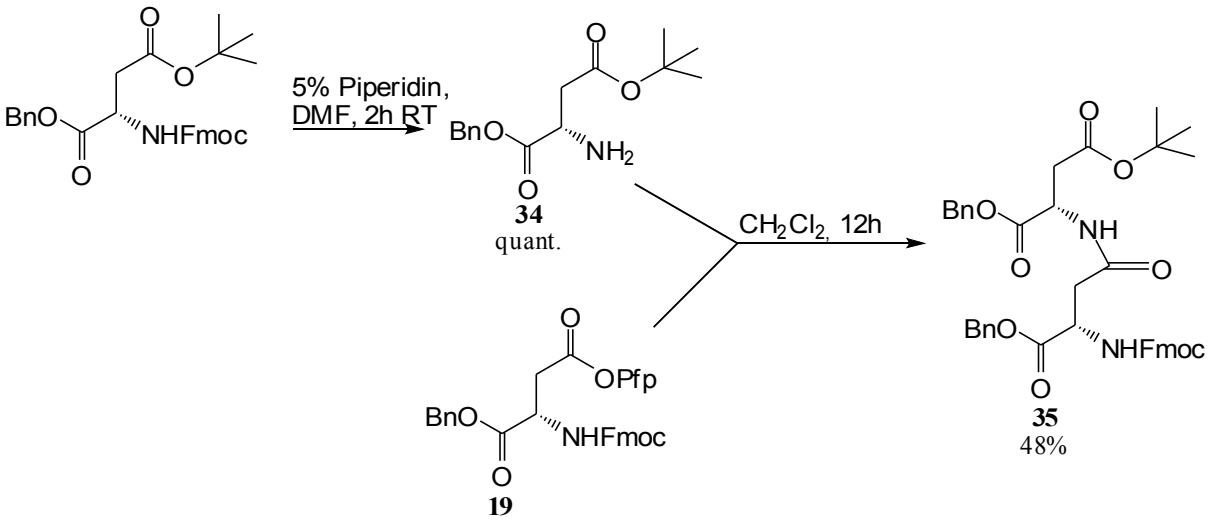
Tabelle 2: Optimierung der Kupplungsmethode mit den Bausteinen Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) und NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) zu Fmoc-(Asp-Asp)-*Ot*Bu (**35**)

Methode:	Verwendete Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
EDCI/HOBt	EDCI, HOBt, NMM Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**), NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**)	CH_2Cl_2	1h bei 0°C, 18h bei RT	34%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**), NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**)	CH_2Cl_2	2h	50%
TBTU/HOBt	TBTU, HOBt, DIPEA, Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**), NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**)	CH_2Cl_2	3h	31%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**), NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**)	CH_2Cl_2	2h	43%



Schema 15

Eine weitere Möglichkeit für die Dipeptiddarstellung von (**35**) war die Aktivestermethode. Hierbei wurde der aktivierte Baustein Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**19**) mit dem Asparaginsäurebaustein NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) in Ethylacetat gerührt. Nach Aufarbeitung hat man den Dipeptidbaustein Fmoc-(Asp-Asp)-O*t*Bu (**35**) mit einer Ausbeute von 48% erhalten (Schema 16).



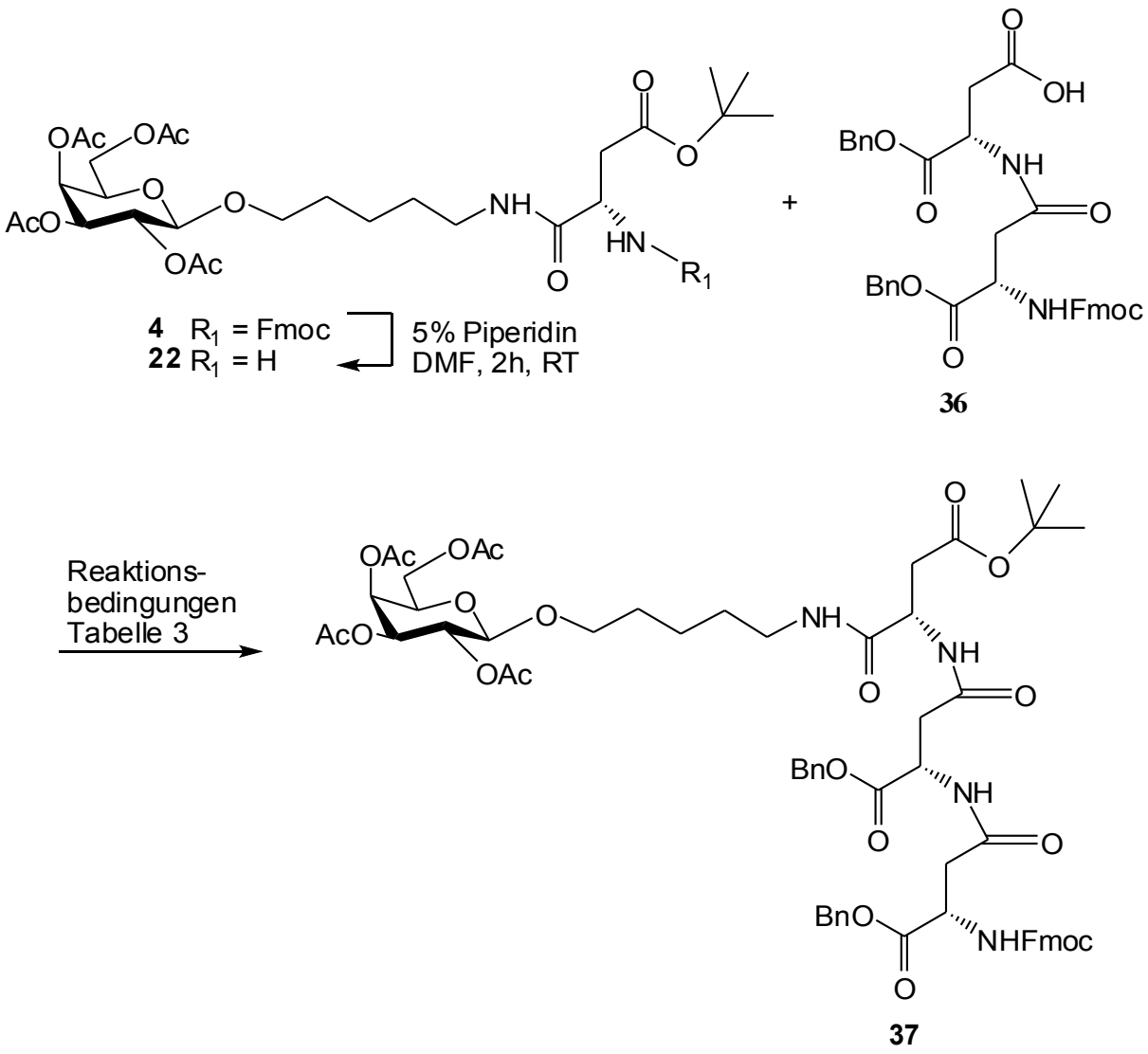
Schema 16

Von den getesteten Methoden hatte sich PyBOP/HOBt- und die Aktivestermethode mit Pentafluorphenol bewährt. Allerdings kam es bei der Kupplung zwischen den beiden Asparaginsäurenderivaten Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**31**) und NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**46**) mit der Pfp-Aktivierung zu Nebenreaktionen, die auf Racemisierung und Aspartimidbildung zurückzuführen waren. Bei Verwendung der PyBOP/HOBt-Methode wurden diese hinreichend minimiert.

Der aufgereinigte Dipeptidbaustein Fmoc-(Asp-Asp)-O*t*Bu (**35**) wurde anschließend mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zum Dipeptid Fmoc-(Asp-Asp)-O*H* (**36**) umgesetzt. Der Galastosebaustein (**4**) wurde analog dazu mit 5%iger Piperdinlösung in DMF zum Galatosebaustein (**22**) entschützt. Die beiden Rohprodukte (**22**) und (**36**) wurden anschließend zum Tripeptid Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-O*t*Bu (**37**) gekuppelt. (Tabelle 3 und Schema 17)

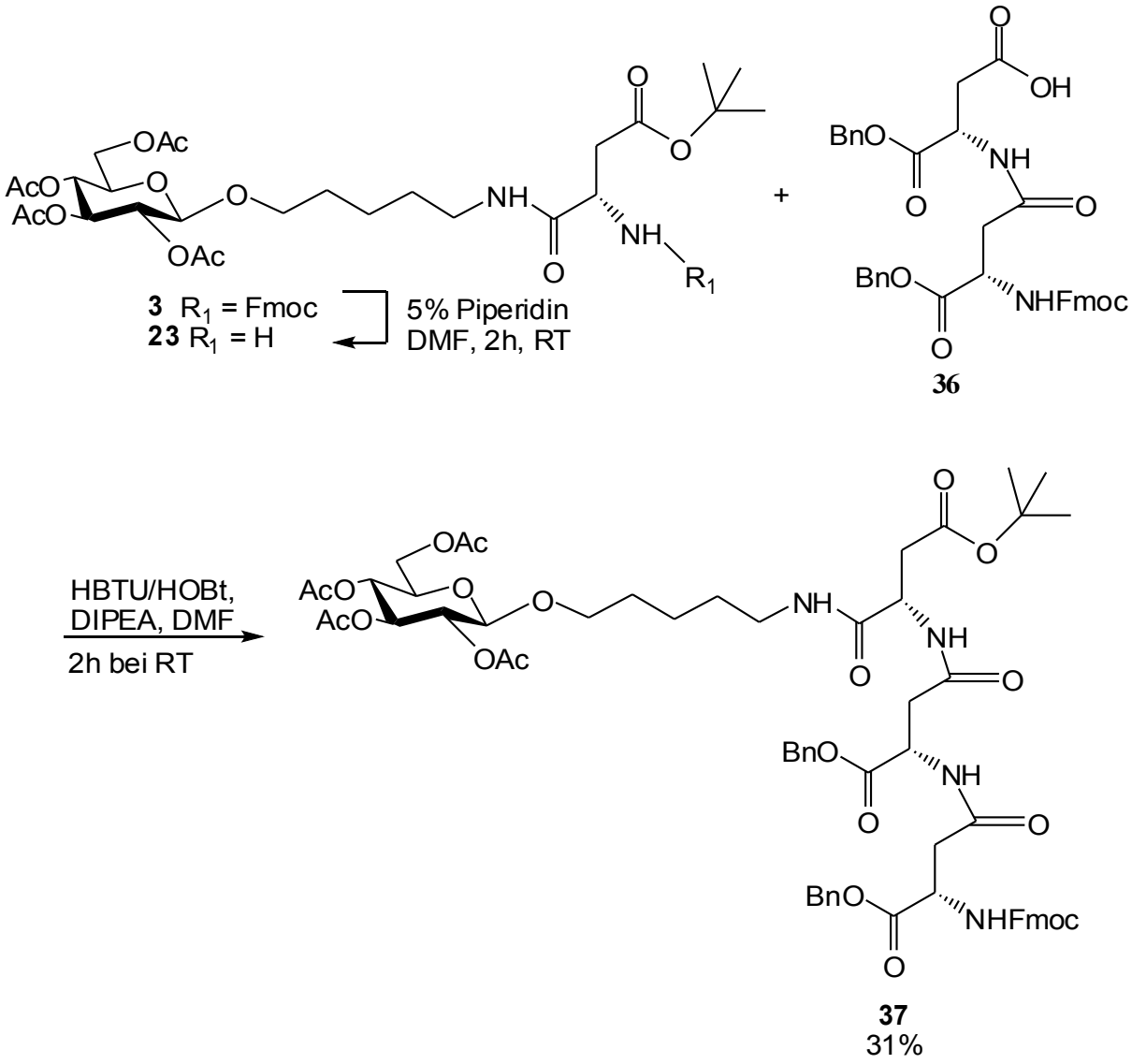
Tabelle 3: Optimierung der Kupplungmethode mit den Bausteinen Fmoc-(Asp-Asp)-*O*H (**36**) und Galatosetripeptid-NH_2 (**22**) zu Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**37**)

Methode:	Verwendete Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Galatosetripeptid-NH_2 (**22**), Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**)	DMF	4h	11%
EDCI/HOBt	EDCI, HOBt, NMM, Galatosetripeptid-NH_2 (**22**), Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**)	CH_2Cl_2	1h bei 0°C, 18h bei RT	9%
TBTU/HOBt	TBTU, HOBt, DIPEA, Galatosetripeptid-NH_2 (**22**), Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**)	DMF	2h	18%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Galatosetripeptid-NH_2 (**22**), Fmoc-(Asp-Asp)-*O*H (**36**)	DMF	2h	32%
HATU/HOBt	HATU, HOBt, DIPEA, Galatosetripeptid-NH_2 (**22**), Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**)	DMF	3h	28%



Schema 17

Die gleiche Prozedur wurde für den Glucosebaustein Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**38**) angewendet. Hierfür wurde die HBTU-Methode gewählt, weil sie sich bei der Optimierung des Galactosebausteines (**37**) bewährt hat. Hierzu wurde das Dipeptid Fmoc-(Asp-Asp)-*O*H (**36**) und der Glucosebaustein (**23**) mit freier Aminofunktion nach der HTBU-Methode zum Tripeptid (**38**) gekuppelt. Nach Aufarbeitung konnte das Tripeptid Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**38**) mit einer Ausbeute von 31% isoliert werden. (Schema 18)

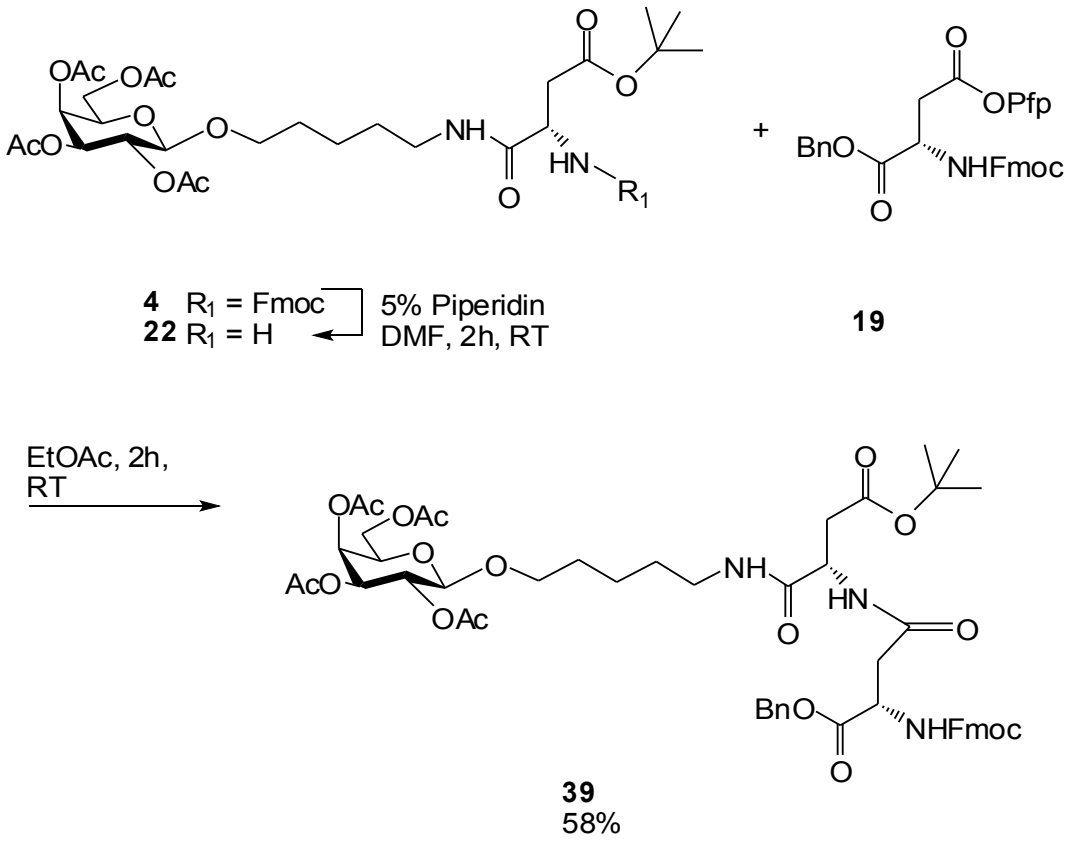


Schema 18

Alle erhaltenen Ausbeuten der Tripeptide (**37**) und (**38**) mit reinem Asparaginsäurepeptidrückgrat waren unbefriedigend, gleich welche Kupplungsmethode angewendet wurde. Bei der Kupplung kam es häufig zu Nebenreaktionen, die bei Peptiden mit Asparaginsäureeinheiten laut Literatur auftreten[133][134][128][129][130]. Synthesen von Dipeptide von zwei benachbarten Asparaginsäuren wurden auch in der Literatur gefunden, allerdings findet man wenige Beispiele von Tri- oder Oligopeptiden mit Asparaginsäurebausteinen, die nebeneinander verknüpft sind. Meistens werden sie mit biochemischen Verfahren aus Proteinen isoliert oder mit der Festphasensynthese aus mehreren Einzelbausteinen aufgebaut[135].

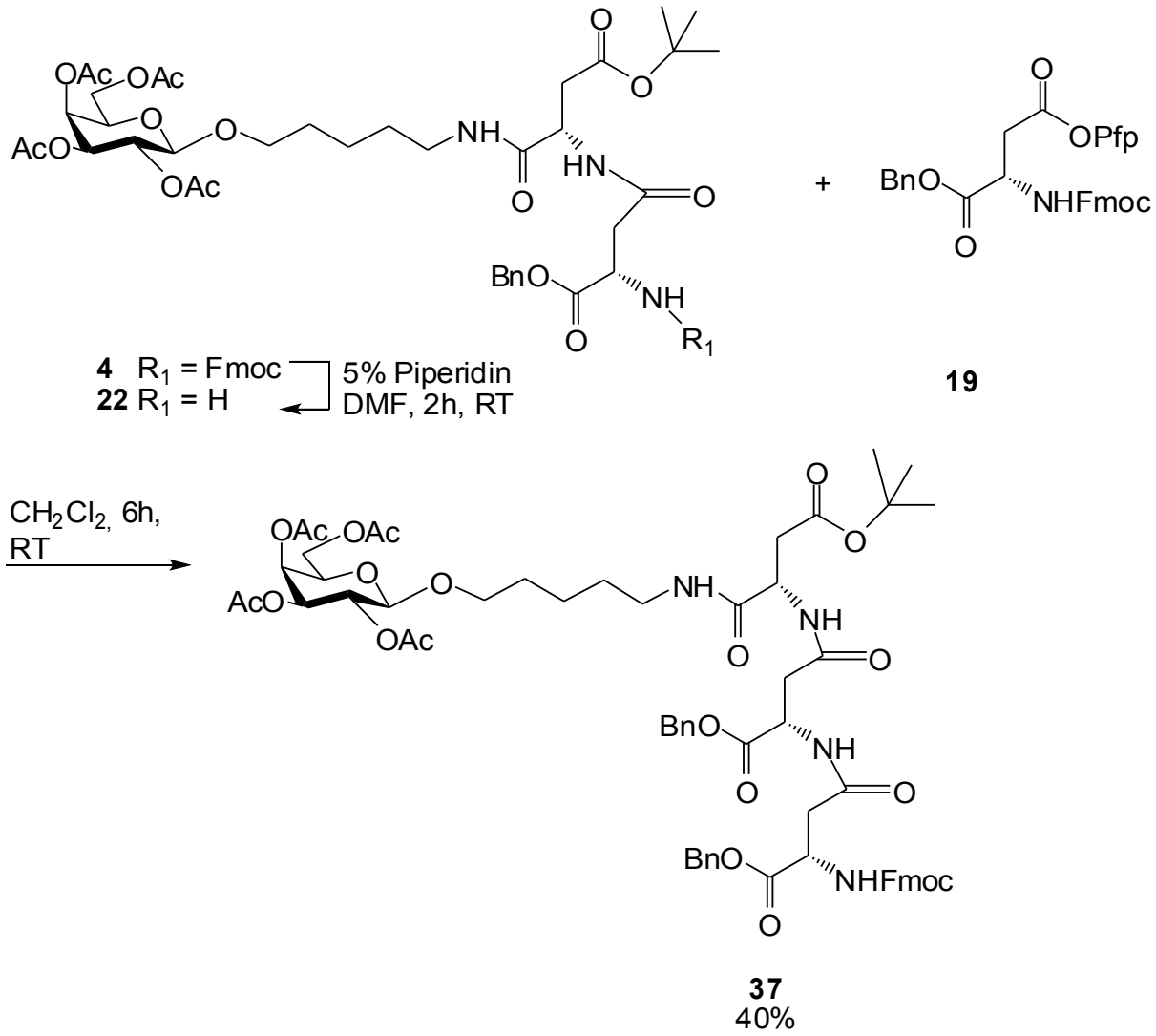
2.5.3 Darstellung des Tripeptids Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (37) über den Dipeptidbaustein Fmoc-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (39)

Aufgrund der unbefriedigenden Ausbeuten der Tripeptide (**37**) und (**38**) wurde der Versuch gestartet, wie bei den Tripeptiden (**28**) und (**29**), zuerst der Glykopeptidbaustein (**22**) mit einem Monobaustein Asparaginsäure Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**19**) nach der Aktivestermethode zum Dipeptidbaustein Fmoc-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**39**) zu verknüpfen. Nach anschließender Aufreinigung hat man den Dipeptidbaustein (**39**) mit einer Ausbeute von 58% erhalten (Schema 19).



Schema 19

Der isolierte Dipeptidbaustein Fmoc-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**39**) wurde im nächsten Schritt mit 5%iger Piperidinlösung in Dichlormethan zum Baustein (**40**) Fmoc-entschützt, und ohne weitere Aufreinigung mit einem weiteren Asparaginsäurebaustein Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**19**) nach der Aktivestermethode zum Tripeptid (**37**) gekuppelt (Schema 20).



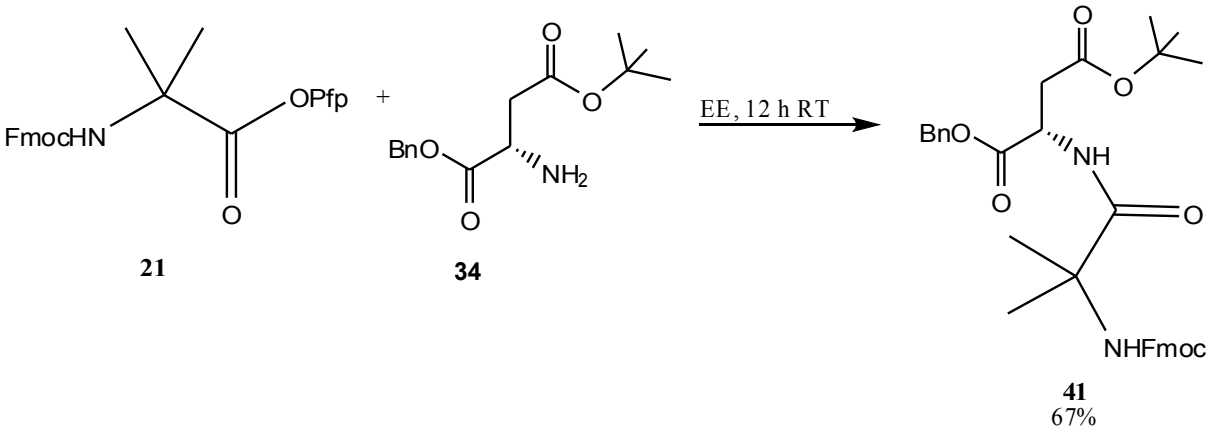
Schema 20

Die Ausbeute betrug 40% des Tripeptids (**37**), etwas besser als bei der zuvor vorgestellten Methode. Beide Methoden lieferten dennoch unbefriedigende Ergebnisse und müssen im Zusammenhang mit der Asparaginsäure stehen, die sich mit den Schutzgruppen Benzyl und Fmoc schlecht zu den Tripeptiden (**37**) und (**38**) kuppeln lässt.

2.5.4 Darstellung der Tripeptide Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (43) und Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (44)

Um die endständige Asparaginsäure in den Tripeptiden (**37**) und (**38**) zu ersetzen, wurden in den beiden Tripeptiden Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**43**) und Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**44**) eine aliphatische, helixerzwingende α-Aminosäure in das Peptidrückgrat eingebaut. Eine einfache, ebenfalls achirale α-Aminosäure ist die Aminoisobuttersäure, die zu den α,α-Dialkylaminosäuren zählt[61]. Durch den zusätzlichen Einbau der zweiten Methylgruppe am α-C-Atom wird die Drehbarkeit der Peptidbindung herabgesetzt. Das Peptidrückgrat wird gefestigt und in die α-Helix gezwungen. Des weiteren ist bekannt, dass die Aminoisobuttersäure Asparaginsäure-, Phenylalanin- und D-Alaninbausteine in Naturstoffen ersetzen kann, ohne ihre biologische Aktivität zu schmälern[136]. Aus diesem Grund wurde die endständige Asparaginsäure in den Tripeptiden (**37**) und (**38**) durch den Aminoisobuttersäurenbaustein (**21**) ersetzt.

Es wurde mit der Darstellung des Dipeptidbausteines Fmoc-(Aib-Asp)-*Ot*Bu (**41**) begonnen. Der α-benzylgeschützte Asparaginsäurebaustein NH_2-Asp-*Ot*Bu-OBn (**34**) wurde mit dem Aminoisobuttersäurebaustein Fmoc-Aib-OPfp (**21**) nach der Aktivestermethode zum Dipeptidbaustein (**41**) gekuppelt. Nach anschließender Aufreinigung hat man den Dipeptidbaustein Fmoc-(Aib-Asp)-*Ot*Bu (**41**) mit einer Ausbeute von 67% erhalten (Schema 21).



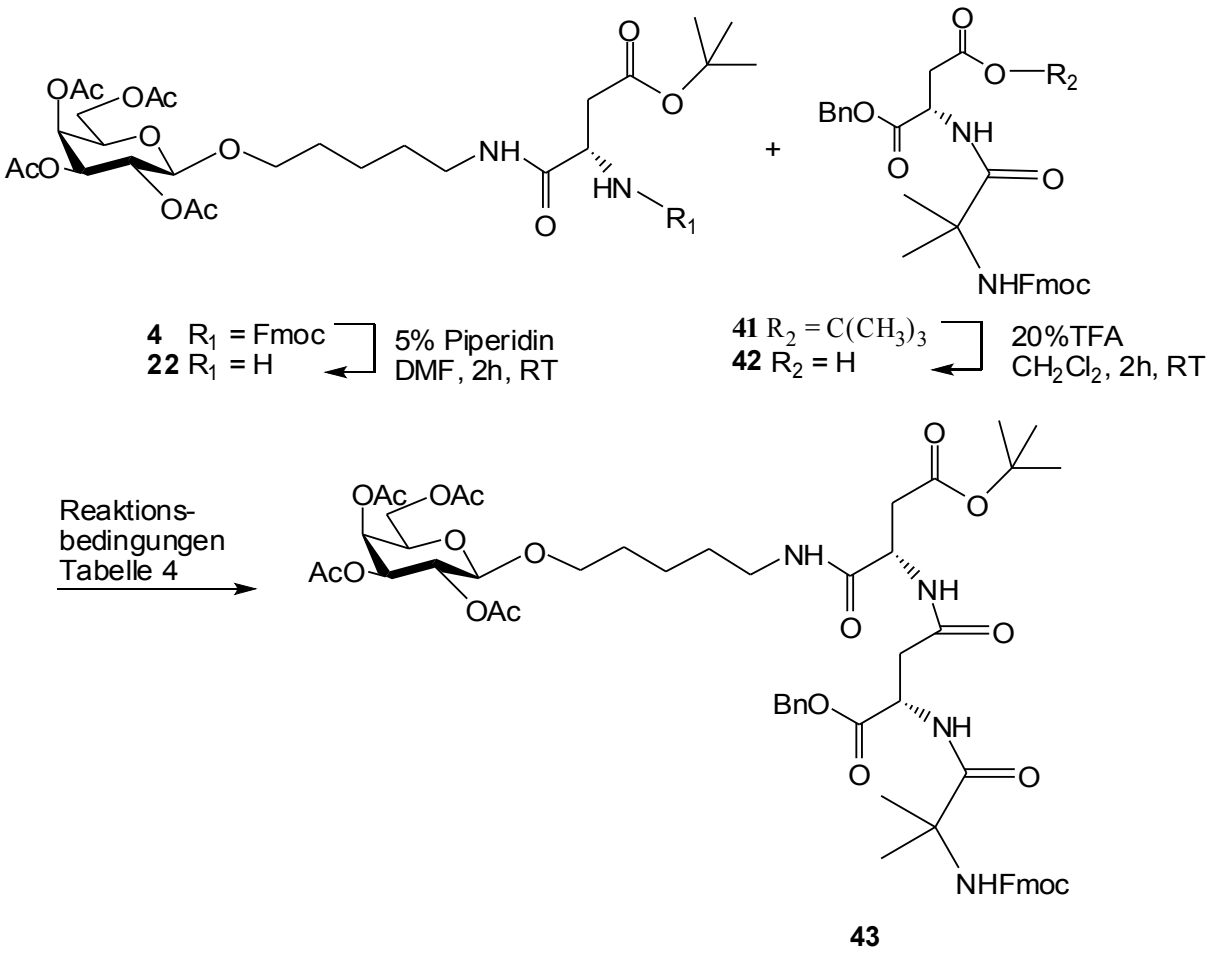
21 **34** **41**
67%

Schema 21

Das Dipeptid Fmoc-(Aib-Asp)-*Ot*Bu (**41**) wurde anschließend mit 10% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zum Dipeptid Fmoc-(Aib-Asp)-*O*H (**42**) entschützt und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt. Der Galactosebaustein (**4**) wurde mit einer 5%igen Piperdinlösung in DMF zum Galatosebaustein (**22**) entschützt. Die beiden Rohprodukte (**22**) und (**42**) wurden anschließend zum Tripeptid Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**43**) gekuppelt (Tabelle 4 und Schema 22).

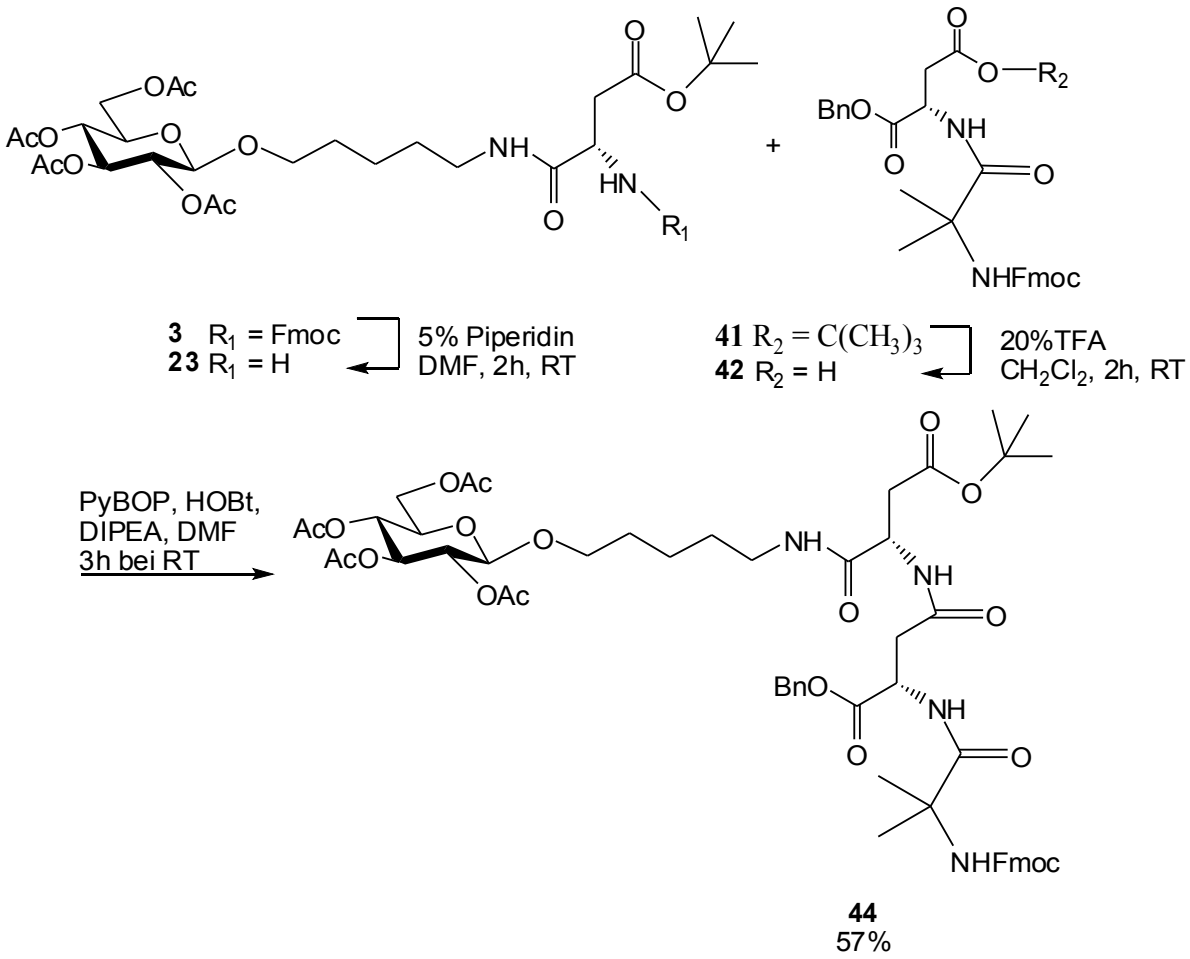
Tabelle 4: Optimierung der Kupplungsmethode mit Fmoc-(Aib-Asp)-*O*H (**42**) und dem Galactosebaustein (**22**) zum Tripeptides Fmoc-(Aib-Asp-(AcGalBB))-*Ot*Bu (**43**)

Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Fmoc-(Aib-Asp)-*O*H (**42**) Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	2 h	46%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Fmoc-(Aib-Asp)-*O*H (**42**), Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	3h	62%



Schema 22

Die gleiche Prozedur wurde für den Glucosebaustein Fmoc-(Asp-Asp-(AcGlucBB))-*Ot*Bu (**44**) angewendet. Das Dipeptid Fmoc-(Aib-Asp)-*Ot*Bu (**41**) wurde mit 10% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zum Dipeptid Fmoc-(Aib-Asp)-*O*H (**42**) entschützt und ohne weitere Aufreinigung umgesetzt. Der Glucosebaustein (**3**) wurde ebenfalls mit einer 5%igen Piperdinlösung in DMF zum Glucosebaustein (**22**) Fmoc-entschützt. Die beiden Rohprodukte (**22**) und (**42**) wurden nach der PyBOP-Methode, die sich beim Galactosebaustein (**43**) bewährt hat, anschließend zum Tripeptid Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**44**) gekuppelt. Nach Aufarbeitung hat man das Tripeptid Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**44**) mit einer Ausbeute von 57% erhalten(Schema 23).

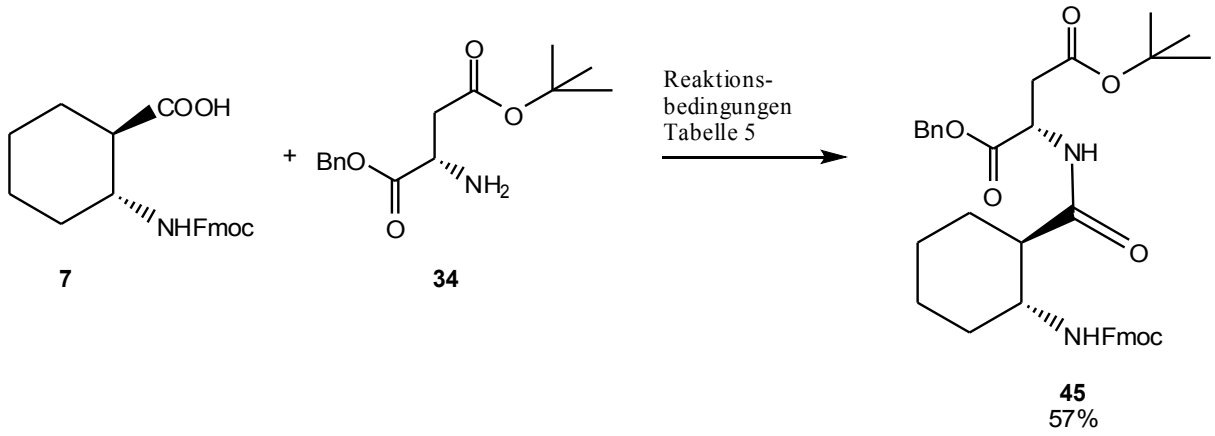


Schema 23

2.5.5 Darstellung des Tripeptids Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (47)

Im nächsten Tripeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) wurde eine alicyclische β-Aminosäure im Peptidrückgrat eingebaut. Viele Literaturzitate verweisen auf die (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**), die das Peptidrückgrat in die 14-Helix zwingen kann, wenn das Peptidrückgrat aus mehr als 2/3 von (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure-Einheiten besteht[52][91]. Es sollte aber zusätzlich untersucht werden, wie sich der Einbau von nur einer Einheit von (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**) auf das Peptidrückgrat auswirkt. Ausgangspunkt war die Darstellung des Dipeptides Fmoc-(ACHC-Asp)-*Ot*Bu (**45**). Hierzu wurde der Aminosäurenbaustein Fmoc-ACHC-OH (**8**) direkt mit dem Asparaginsäurebaustein NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) gekuppelt (Tabelle 5 und Schema 24).

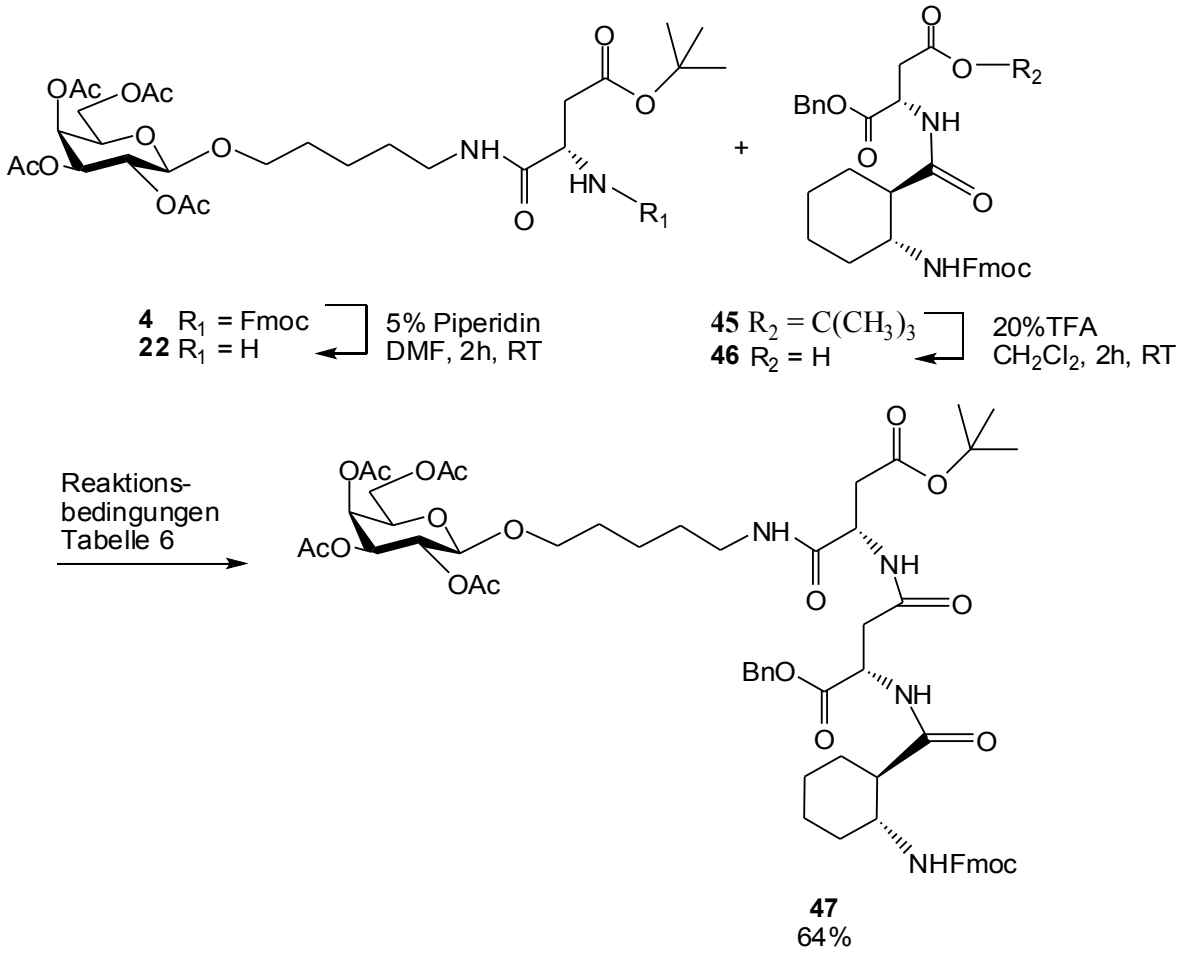
Tabelle 5: Optimierung der Kupplungsmethode von Fmoc-ACHC-OH (**8**) mit NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) zum Dipeptidbaustein Fmoc-(ACHC-Asp)-O*t*Bu (**45**)				
Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, 1Fmoc-ACHC-OH (**8**), NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**)	DMF	2h	57%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Fmoc-ACHC-OH (**8**), NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**)	DMF	3h	54%



Schema 24

Das Dipeptid Fmoc-(ACHC-Asp)-O*t*Bu (**45**) wurde anschließend mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zum Dipeptidbaustein Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**) entschützt und ohne weitere Aufreinigung mit dem Galactosebaustein (**22**) umgesetzt, der zuvor mit einer 5%igen Piperdinlösung in DMF Fmoc-entschützt wurde. Danach erfolgte die Knüpfung des Galactosebausteines (**22**) mit dem Baustein Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**) zum Tripeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-O*t*Bu (**47**). (Tabelle 6 und Schema 25)

Tabelle 6: Optimierung der Kupplungsmethode des Galactosebausteins (**22**) mit Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**) zum Tripeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**)				
Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
HATU/HOBt	HATU, HOBt, DIPEA, Galatosebaustein-NH_2 (**22**), Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**)	DMF	3h	56%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**), Galatosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	2h	64%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**), Galatosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	3h	55%



Schema 25

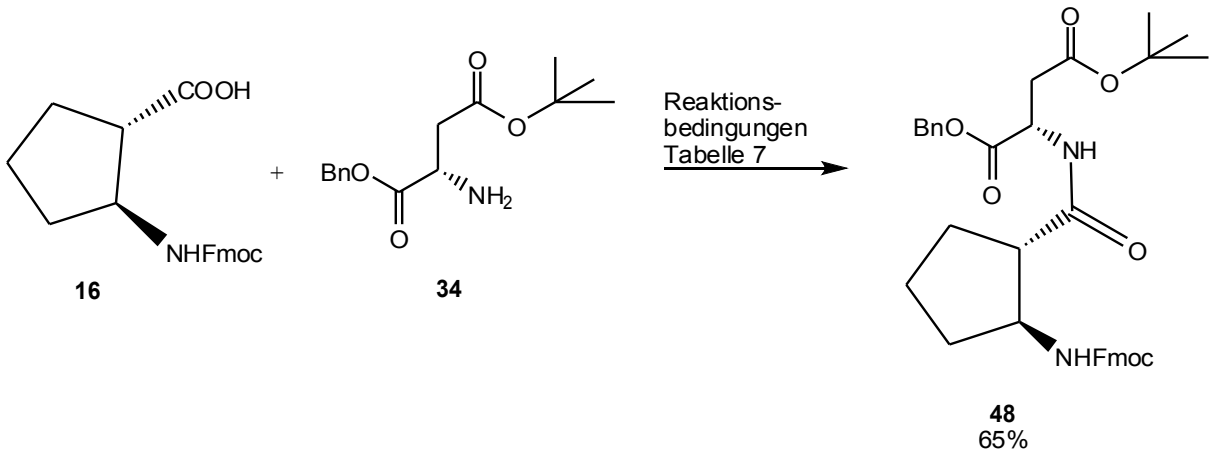
Aufgrund der schlechten Ausbeuten von 14% der Ausgangsverbindung *trans*-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (**6**) bei der Enantiomerentrennung der (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**) wurde auf einen zweiten Tripeptidbaustein mit Glucose verzichtet (siehe Seite 25).

2.5.6 Darstellung der Tripeptide Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (50) und Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (51)

Bei den Tripeptiden Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) und Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**51**) wurde eine zweite alicyclische β-Aminosäure im Peptidrückgrat eingebaut. Die (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**9**) kann wie (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**) das Peptidrückgrat in die Helixform zwingen, wenn das Peptidrückgrat aus mehr als 2/3 von (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure-Einheiten besteht. Allerdings wird die 12-Helix bevorzugt[52][137]. Es sollte wieder untersucht werden, wie sich der Einbau von nur einer Einheit von (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**7**) auf das Peptidrückgrat auswirkt. Hierfür wurde zuerst der Dipeptidbaustein Fmoc-(ACPC-Asp)-*Ot*Bu (**48**) synthetisiert. Dazu wurde die Fmoc-(1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**16**) mit dem Asparaginsäurebausteines NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) zum Dipeptid Fmoc-(ACPC-Asp)-*Ot*Bu (**48**) verknüpft. (Tabelle 7 und Schema 26).

Tabelle 7: Optimierung der Kupplungsmethode des Bausteines Fmoc-ACPC-OH (**16**) und NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) zum Dipeptid Fmoc-(ACPC-Asp)-*Ot*Bu (**48**)

Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**), Fmoc-ACPC-OH (**16**)	DMF	2h	62%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**), Fmoc-ACPC-OH (**16**)	DMF	3h	65%



Schema 26

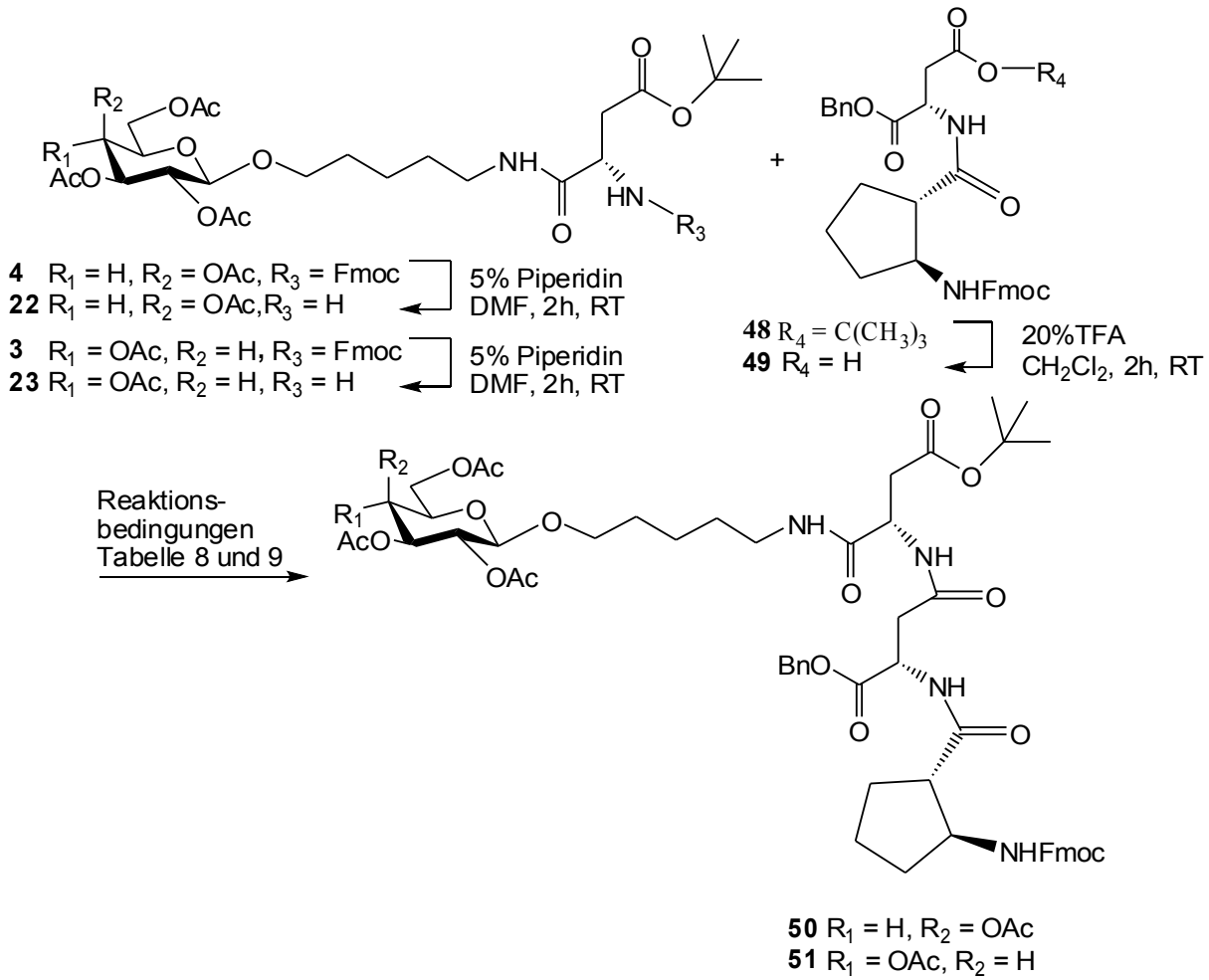
Der Dipeptidbaustein (**48**) wurde mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zu Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) *tert.*Butyl-entschützt. Anschließend wurde dieser Baustein mit dem Galactosebaustein (**22**), der zuvor mit 5%iger Piperdinlösung in DMF Fmoc-entschützt wurde, zum Tripeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) verknüpft (Tabelle 8 und Schema 27).

Tabelle 8: Optimierung der Kupplungsmethode mit Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) und dem Galactosebaustein (**22**) zum Tripeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**)

Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**), Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	2h	62%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**), Galactosebaustein-NH_2 (**22**)	DMF	3h	60%

Analog wurde für den zweiten Tripeptidbaustein der Glucose Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**51**) verfahren. Hierfür wurde der Dipeptidbaustein Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) mit dem Glucosebaustein (**23**) gekuppelt. (Tabelle 9 und Schema 27)

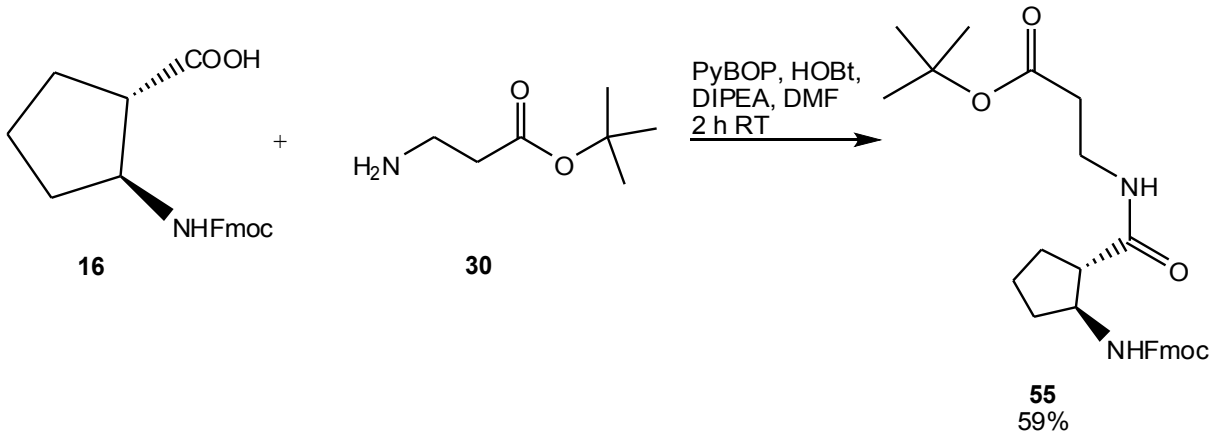
Tabelle 9: Optimierung der Kupplungsmethode mit Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) und dem Glucosebaustein (**23**) zum Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**51**)				
Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**), Glucosebaustein-NH_2 (**23**)	DMF	2h	57%
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**), Glucosebaustein-NH_2 (**23**)	DMF	3h	49%



Schema 27

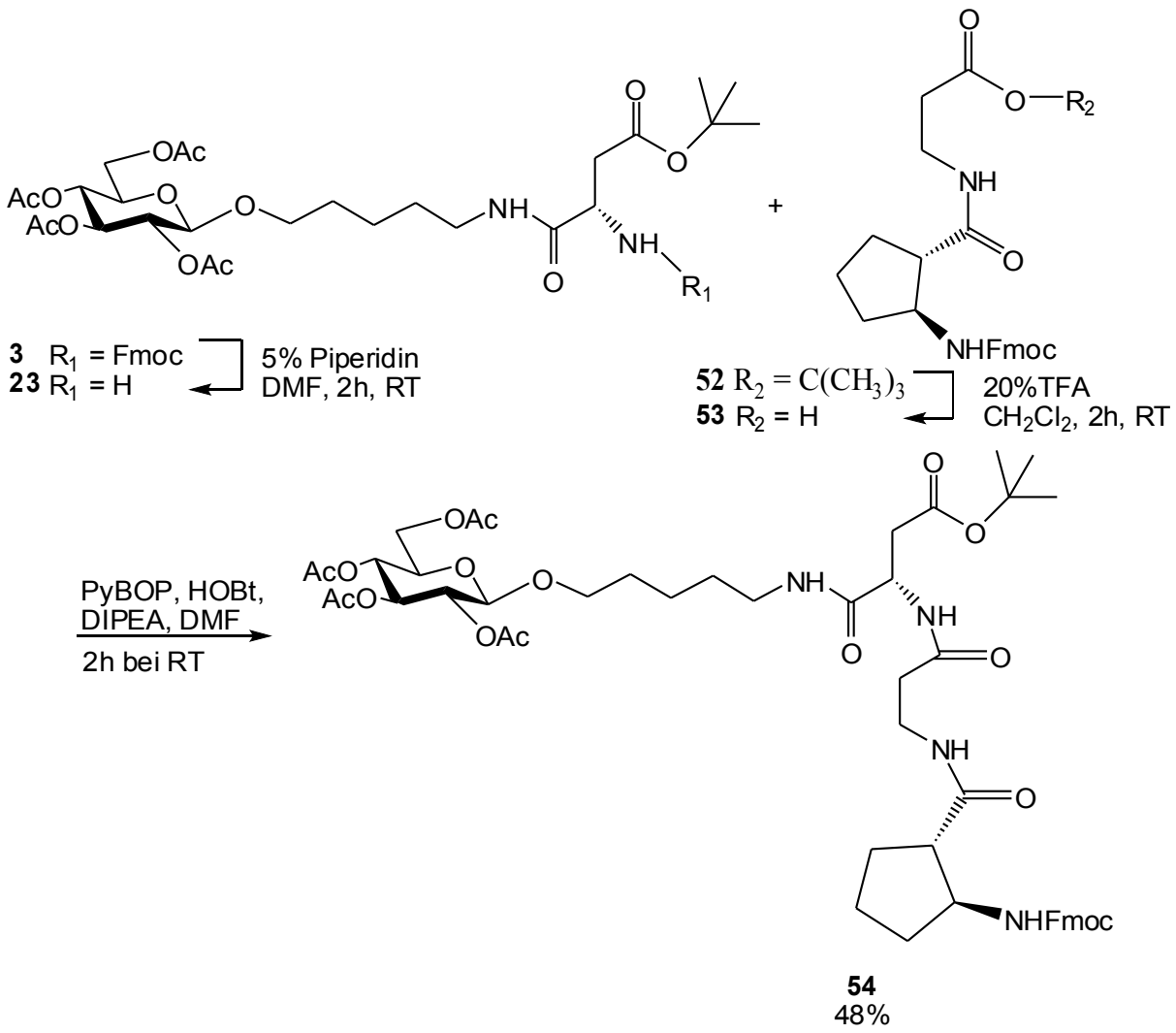
2.5.7 Darstellung der Tripeptide Fmoc-[ACPC-β-Ala-(AcGlucBB)]-O*t*Bu (54) und Fmoc-[β-Ala-Asp-(AcGalBB)]-O*t*Bu (57)

Als nächstes wurden die beiden Tripeptidbausteine (**54**) und (**57**) synthetisiert. Im ersten Tripeptid (**54**) wurde die mittlere Asparaginsäure-Einheit im Tripeptid (**51**) gegen die β-Aminosäure β-Alanin ersetzt und im zweiten Tripeptid (**57**) wurde die endständige Asparaginsäure im Tripeptid (**37**) gegen die β-Aminosäure β-Alanin ersetzt. Sie dienten der NMR-Strukturaufklärung der Tripeptide. Für die Darstellung des Tripeptids Fmoc-[ACPC-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**54**) wurde wieder zuerst das Dipeptid Fmoc-(ACPC-β-Ala)-O*t*Bu (**52**) aus den beiden Bausteinen Fmoc-ACPC-OH (**17**) und NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) nach der PyBOP/HOBt-Methode dargestellt, die sich in den letzten Kapitel gut bewährt hat. Nach Aufarbeitung hat man das Dipeptid Fmoc-(ACPC-β-Ala)-O*t*Bu (**52**) mit einer Ausbeute von 59% erhalten.(Schema 28)



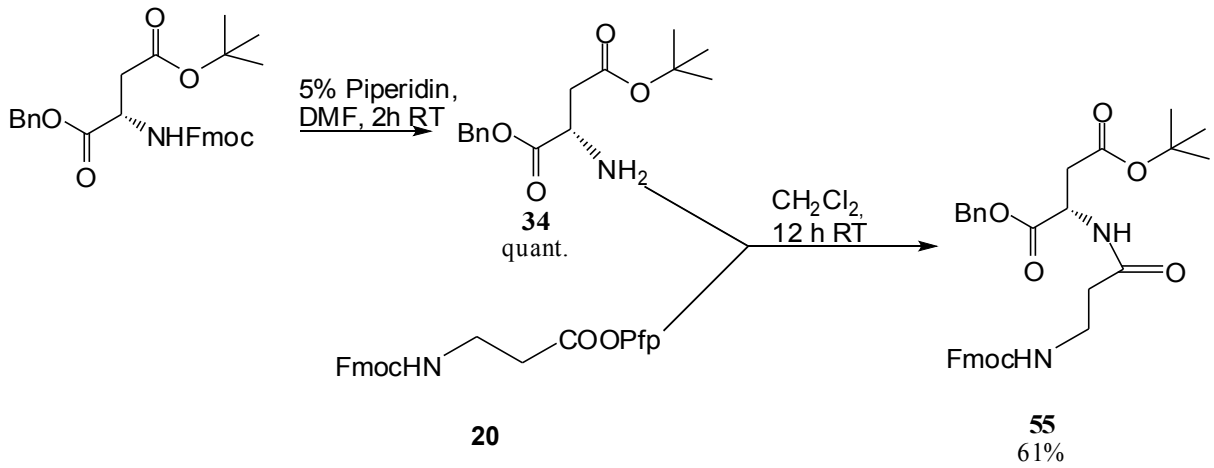
Schema 28

Anschließend wurde der Dipeptidbaustein (**52**) mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan *tert.*Butyl-entschützt. Man erhält Fmoc-(ACPC-β-Ala)-OH (**53**), welches ohne Aufarbeitung weiterverwendet wurde. Zusammen mit dem Glucosebaustein (**23**) wurde nach der PyBOP/HOBt-Methode der Tripeptidbaustein Fmoc-[ACPC-β-Ala-(AcGluclBB)]-O*t*Bu (**54**) mit einer Ausbeute von 48% erhalten (Schema 29). Das Beispiel zeigt, dass das Ersetzen von Asparaginsäure durch β-Alanin für das Tripeptid (**54**) keine Erhöhung der Ausbeute mit sich brachte.



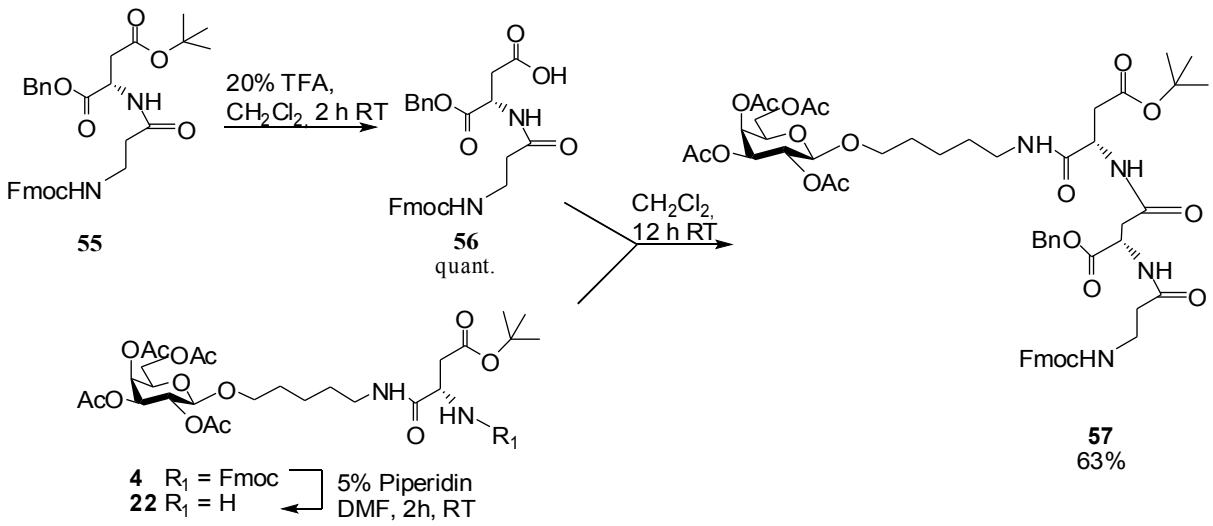
Schema 29

Für die Darstellung des Tripeptides Fmoc-[β-Ala-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**57**) wurde zuerst das Dipeptid Fmoc-(β-Ala-Asp)-O*t*Bu (**55**) aus den beiden Bausteinen Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) und NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) nach der Aktivestermethode dargestellt. Nach Aufarbeitung hat man das Dipeptid Fmoc-(β-Ala-Asp)-O*t*Bu (**55**) mit einer Ausbeute von 61% erhalten.(Schema 30)



Schema 30

Anschließend wurde der Dipeptidbaustein (**55**) mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan *tert*.Butyl-entschützt. Man erhält Fmoc-(β-Ala-Asp)-OH (**56**), welches ohne Aufarbeitung weiterverwendet wurde. Mit dem Galactosebaustein (**22**), der zuvor mit 10%iger Diethylaminlösung Fmoc-entschützt wurde, hat man nach der PyBOP/HOBt-Methode den Tripeptidbaustein Fmoc-[β-Ala-Asp-(AcGalBB)]-O*t*Bu (**57**) mit einer Ausbeute von 63% erhalten. (Schema 31)



Schema 31

Die Ausbeute konnte durch den Einbau von β-Alanin gesteigert werden. Die Asparaginsäure mit den Schutzgruppen Benzyl- und Fmoc führen zu einer

sterischen Hinderung, welche zum Beispiel die Kupplung zum Tripeptid (**37**) erschweren. Zusammen mit dem Ergebnis des Tripeptides (**47**) ergibt sich ein Zusammenhang der Ausbeuten mit der endständigen Aminosäure des Tripeptides. Die alicyclischen β-Aminosäuren (**8**) und (**17**) lieferte gute Ausbeuten 57-64% in den Tripeptiden, während die α-Aminosäure Asparaginsäure unbefriedigende Ausbeuten lieferte. Dagegen hatte die β-Aminosäure β-Alanin und die sterisch gehinderte Aminoisobuttersäure keinen sterischen Einfluss auf die Peptidkupplung zum Tripeptid. Im nächsten Kapitel wird untersucht, wie sich dieser Einfluss der endständigen Aminosäuren auf die Hexapeptidsynthese auswirkt, wenn man verschiedene Tripeptide miteinander verknüpft.

2.6 Hexapeptidsynthesen

2.6.1 Synthese des Hexapeptids Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (60)

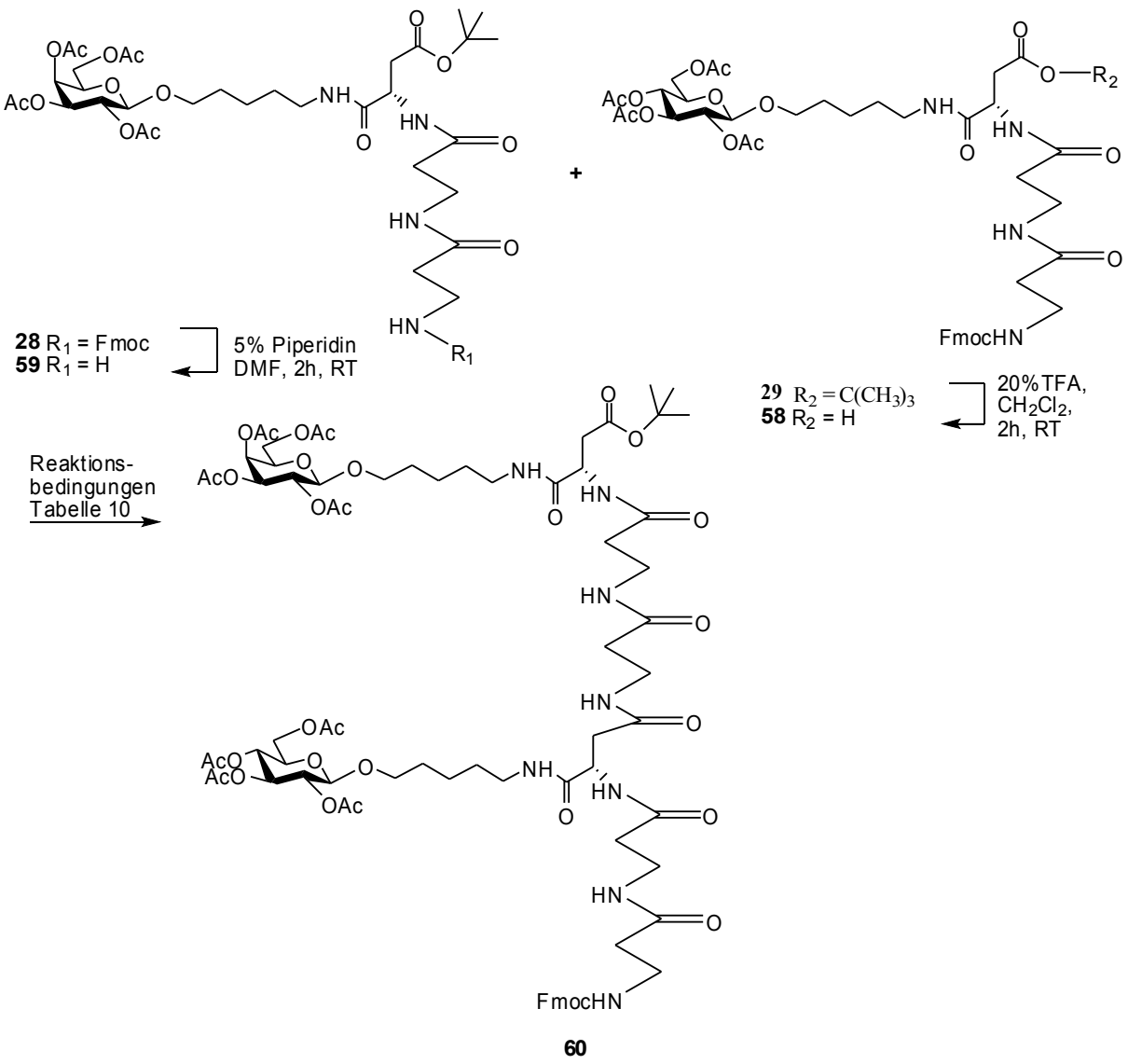
Am Beispiel des einfachsten Vertreters des Hexapeptides mit der Abfolge Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**60**) wurden die Aspekte der Hexapeptidsynthese nach dem Baukastenprinzip erarbeitet und dann auf weitere Hexapeptidsynthesen mit den dargestellten Tripeptiden aus Kapitel 2.7 übertragen.

Für die finale Kupplung der beiden Tripeptide Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**28**) und Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**29**) wurde als erstes der Tripeptidbaustein Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**29**) mit 20% Trifluoressigsäure zum Glucosebaustein Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-OH (**58**) entschützt. Das Tripeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**28**) wurde zeitgleich mit 20%iger Piperidin-Lösung in DMF zum Galactosebaustein NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**59**) Fmoc entschützt. Für die Kupplung der beiden Tripeptidbausteine (**58**) und (**59**) wurden die PyBOP/HOBt-Methode und andere Kupplungsmethoden verwendet (Tabelle 10 und Schema 32).

Tabelle 10: Optimierung der Kupplungsmethode mit dem Galatosetripeptid-NH_2 (**59**) und dem Glucosetripeptid-OH (**58**) zum Hexapeptid (**60**)

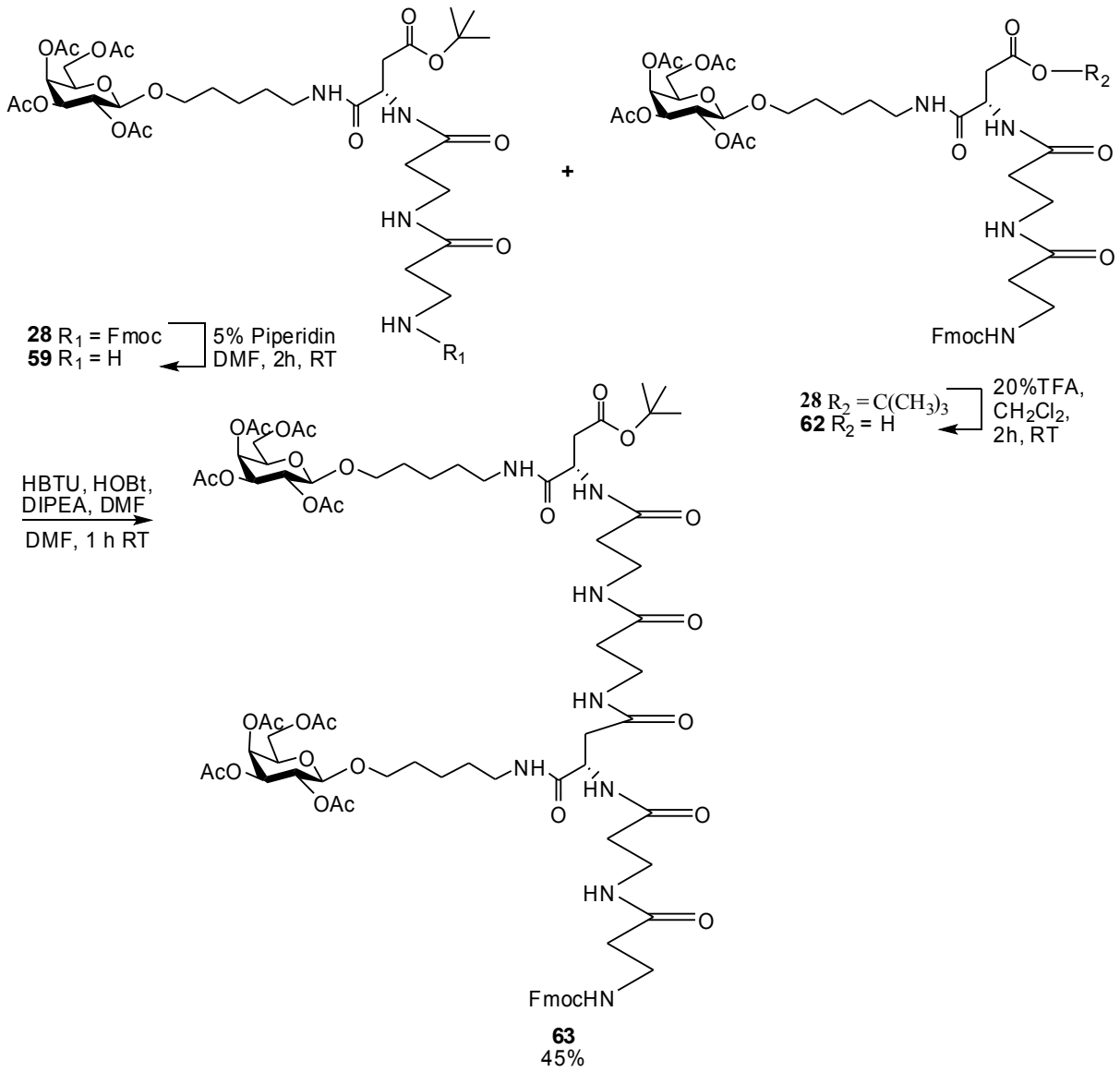
Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
EDCI/HOBt	EDCI, HOBt, NMM, Galatosetripeptid-NH_2 (**59**), Glucosetripeptid-OH (**58**)	DMF	1h bei 0°C, 24 h bei RT	kein Umsatz
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Galatosetripeptid-NH_2 (**59**), Glucosetripeptid-OH (**58**)	DMF	2h	56%
TBTU/HOBt	TBTU, HOBt, DIPEA, Galatosetripeptid-NH_2 (**59**), 1 eq Glucosetripeptid-OH (**58**)	DMF	2h	22%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Galatosetripeptid-NH_2 (**59**), Glucosetripeptid-OH (**58**)	DMF	2h	61%

Auf gleiche Weise wurde ebenfalls ein weiteres Hexapeptid aus zwei Galatcosebausteinen Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**28**) verknüpft. Hierfür wurde NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**59**) mit dem Galatosebaustein Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OH (62**)**, der zuvor mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan entschützt wurde, zum Hexapeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**63**) umgesetzt. Es wurde die HBTU/HOBt-Methode verwendet, sie hatte sich schon beim Hexapeptid (**60**) bewährt. Nach der Aufarbeitung konnte das Hexapeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**63**) mit einer Ausbeute von 45% erhalten werden(Schema 33).


28 R1 = Fmoc
59 R1 = H
5% Piperidin
DMF, 2h, RT
29 R2 = C(CH3)3
58 R2 = H
20% TFA,
CH2Cl2,
2h, RT
Reaktions-
bedingungen
Tabelle 10
FmocHN

60

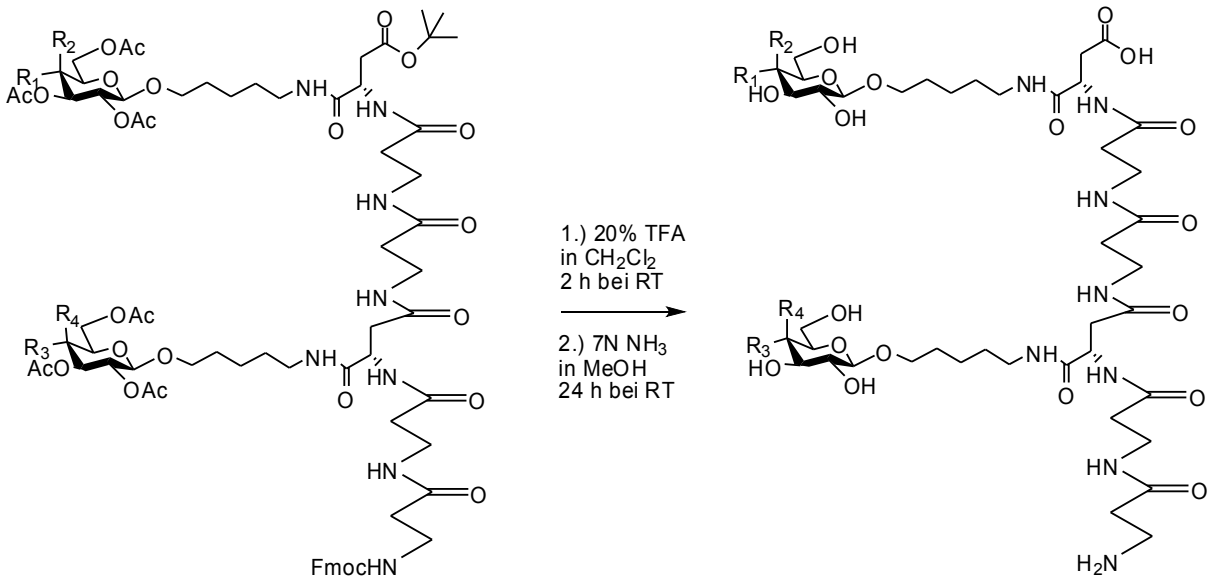
Schema 32



Schema 33

Für die Strukturuntersuchung mittels CD-Spektroskopie und Lektinanbindung war es notwendig, das Hexapeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**60**) vollständig zu entschützen, um Wasserstoffbrückenbindung in 2D-NMR zu erkennen und die Anbindung von Lektinen möglich zu machen. Zuerst wurde mit 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan die *tert*.Butylgruppe entschützt. Anschließend wurden die Acetylschutzgruppen und die Fmoc-Gruppe durch 7N Ammoniaklösung in Methanol entfernt[138]. Auf diese Weise wurden auch die Benzylschutzgruppen an der Fmoc-Asp-*Ot*Bu-OBn-Derviaten entfernt und die α-Carboxylgruppe der Asparaginsäure wurde als Säureamid erhalten.

Das Hexapeptid Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**60**) wurde mit einer Lösung von 20% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde der Rückstand mit 7N Ammoniaklösung in Methanol für 24h bei Raumtemperatur gerührt, der Rückstand im Vakuum entfernt und in Wasser aufgenommen. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Biogel, die wässrige Phasen wurden lyophilisiert, man hat weiße Flocken mit einer Ausbeute von 71% des entschützten Hexapeptid NH_2-(β-Ala-β-Ala-GlucBB-β-Ala-β-Ala-GalBB)-OH (**61**) erhalten. Auf gleiche Weise wurde das Hexapeptid NH_2-(β-Ala-β-Ala-GalB-β-Ala-β-Ala-GalBB)-OH (**64**) für die CD-Spektroskopie und das Lektinscreening mit einer Ausbeute von 67% synthetisiert (Schema 34).



60 R_1 = H, R_2 = OAc, R_3 = OAc, R_4 = H
63 R_1 = H, R_2 = OAc, R_3 = H, R_4 = OAc

61 R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH, R_4 = H **71%**
64 R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H, R_4 = OH **67%**

Schema 34

2.6.2 Hexapeptidsynthese mit den Tripeptiden (37) und (38)

Um ein reines Asparaginsäurerückgrat aufzubauen und um herauszufinden, wie sich die Struktur der aneinandergeknüpften Glykotripeptidbausteine in Hexapeptiden verändert, sollten nun die Tripeptide Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**37**) und Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**38**) zu einem Hexapeptid verknüpft werden. Dazu wur-

de der Galactosebaustein Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**37**) mit 5%iger Piperidinlösung in DMF zum NH_2-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**66**) entschützt. Zeitgleich wurde mit 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan der Glucosebaustein Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**39**) zum Glucosebaustein Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-OH (**65**) entschützt. Versuche die beiden Tripeptide (**65**) und (**66**) zum Hexapeptid in Lösung zu kuppeln blieben erfolglos. Von allen hier vorgestellten Kuppplungsmethoden (PyBOP, HBTU, EDCl, TBTU, HATU) brachte keine das gewünschte Hexapeptid mit reinem Asparaginsäurerückgrat.

2.6.3 Hexapeptidsynthese mit den Tripeptiden (43) und (44)

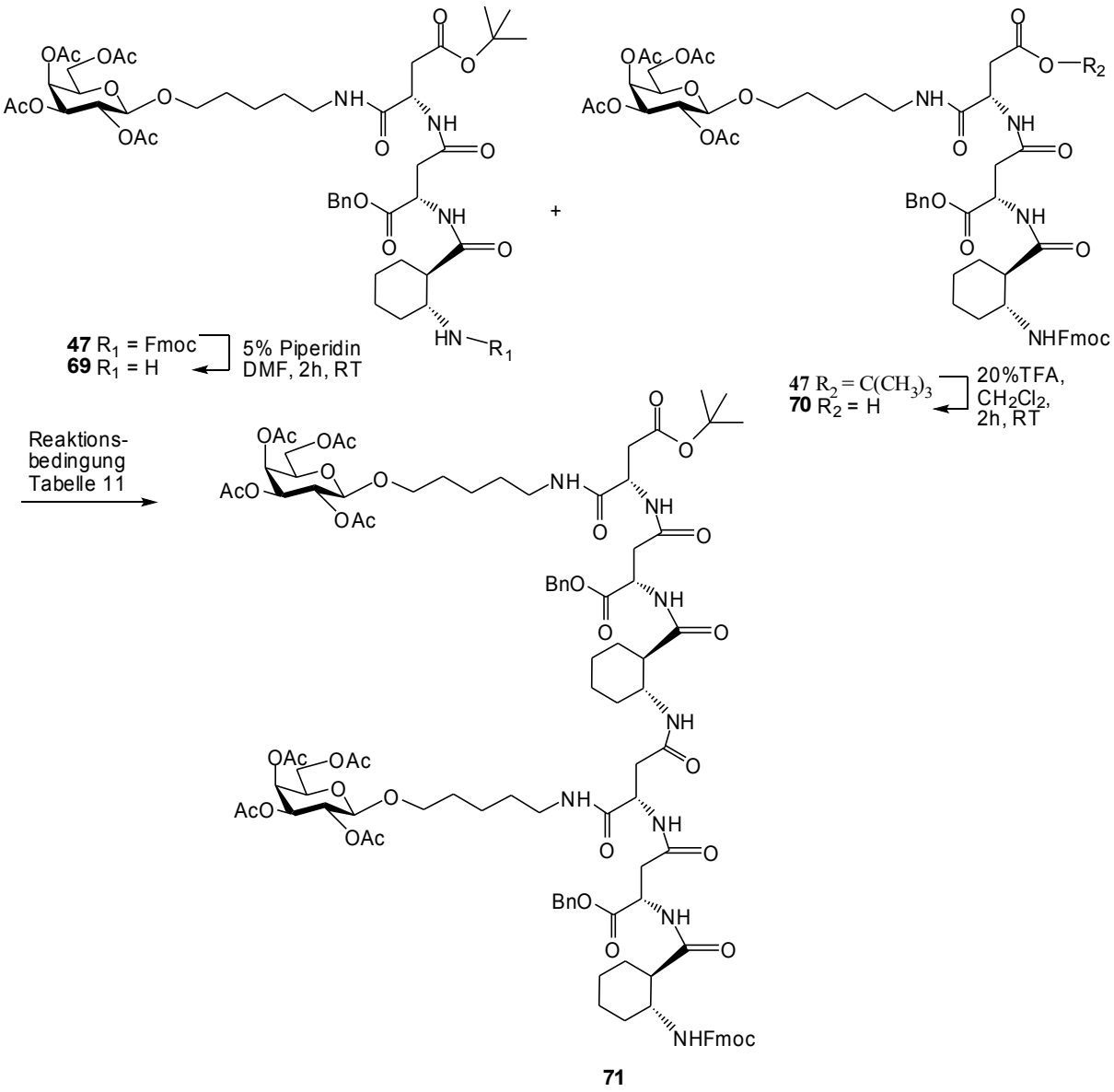
Um eine weitere α-Aminosäuren im Peptidrückgrat zu verwenden, sollte nun herausgefunden werden, ob sich die Kupplungsreaktivität verbessert, wenn man eine einfach achirale, aber helicesfördernde Aminoisobuttersäure an 3. Stelle der Tripeptide verwendet. Hierfür wurden die Tripeptide Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**44**) und Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**43**) zu einem Hexapeptid verknüpft.
Hierfür wurde der Galactosebaustein Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**43**) mit 5% Piperidinlösung in DMF zum NH_2-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**68**) entschützt. Zeitgleich wurde mit 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan der Glucosebaustein Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**44**) zum Glucosebaustein Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*O*H (**67**) entschützt. Versuche die beiden Tripeptide (**67**) und (**68**) zum Hexapeptid in Lösung zu kuppeln blieben ebenso wie bei den Tripeptiden (**65**) und (**66**) erfolglos. Von allen hier vorgestellten Kuppplungsmethoden (PyBOP, HBTU, EDCl, TBTU, HATU) brachte keine das gewünschte Hexapeptid mit reinem Asparaginsäurerückgrat.

2.6.4 Darstellung von Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (71)

Nachdem der Aufbau eines reinen Asparaginsäurerückgrates mit den Tripeptiden (**65**) und (**66**) und auch der Ersatz der 3. Aminosäure im Rückgrat mit Aminoisobuttersäure in den Tripeptiden (**67**) und (**68**) keine Verbesserung in der Hexapeptidsynthese brachte, wurde nun untersucht, ob die Verknüpfung zum Hexapeptid möglich wird, wenn nach zwei Asparaginsäure-Einheiten wie schon beim ersten Hexapeptid (**60**) eine β-Aminosäure folgt. Aus diesem Grund wurde das Tripeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) zur Hexapeptidsynthese verwendet. Der Tripeptidbaustein Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) wurde nun zum Hexapeptid (**71**) verknüpft, das Tripeptid (**47**) mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zum Galactosetripeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OH (**70**) entschützt. Zeitgleich wurde das Tripeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) mit 5%iger Piperidinlösung in DMF zum Tripeptidbaustein NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**69**) Fmoc-entschützt. Anschließend wurden beide Tripeptidbausteine (**69**) und (**70**) zum Hexapeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**71**) mit der PyBOP- und HBTU-Methode umgesetzt, weil sich diese Methoden bei der Darstellung des Hexapeptids (**71**) bewährt haben (Tabelle 11 und Schema 35).

Tabelle 11: Optimierung der Kupplungsmethode mit den Tripeptiden (**69**) und (**70**) zum Hexapeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**71**)

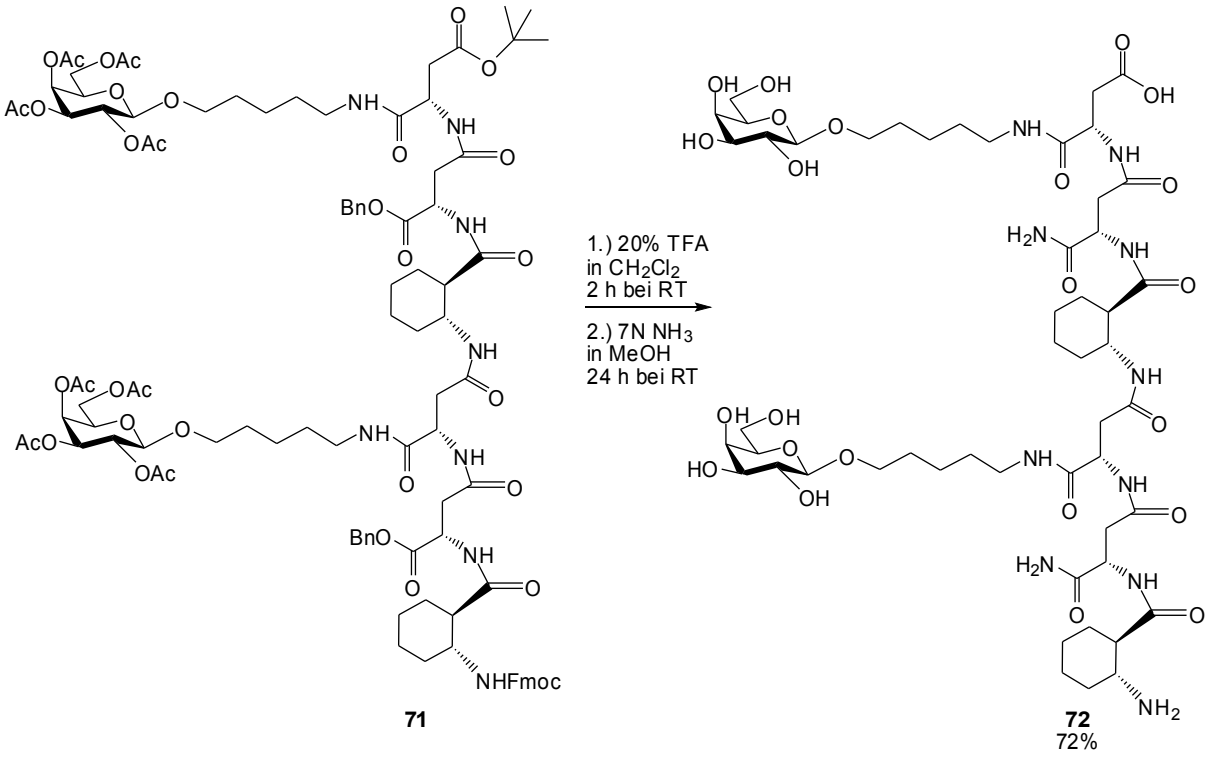
Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Tripeptid-NH_2 (**69**) Tripeptid-OH (**70**)	DMF	1h	31%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Tripeptid-OH (**70**) Tripeptid-NH_2 (**69**)	DMF	1,5h	59%



Schema 35

Die Ausbeute war mit 59% für die Synthese eines Hexapeptides Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**71**) gut. Im Gegensatz zur Peptidknüpfung mit reinem Asparaginsäurerückgrat und mit der Aminoisobuttersäure, bei dem keine Knüpfung zum Hexapeptid erfolgte, kann gesagt werden, dass die Kupplung von der entständigen β-Aminosäure abhängt. Aus diesem Grund war auch die Synthese des ersten Hexapeptides (**60**) möglich, weil die endständige Aminosäure des Tripeptides (**47**) eine β-Aminosäure war.

Weiter wurde das Hexapeptid (**71**) noch vollständig entschützt. Hierfür wurde das Hexapeptid Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**71**) mit einer Lösung von 20% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid tert.Butyl-entschützt. Anschließend mit 7N Ammoniaklösung in Methanol von den restlichen Schutzgruppen befreit. Die Reinigung erfolgte an Biogel und man hat weiße Flocken des entschützten Hexapeptid NH_2-(ACHC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH (**72**) mit einer Ausbeute von 72% erhalten (Schema 36).



71 **72** 72%

Schema 36

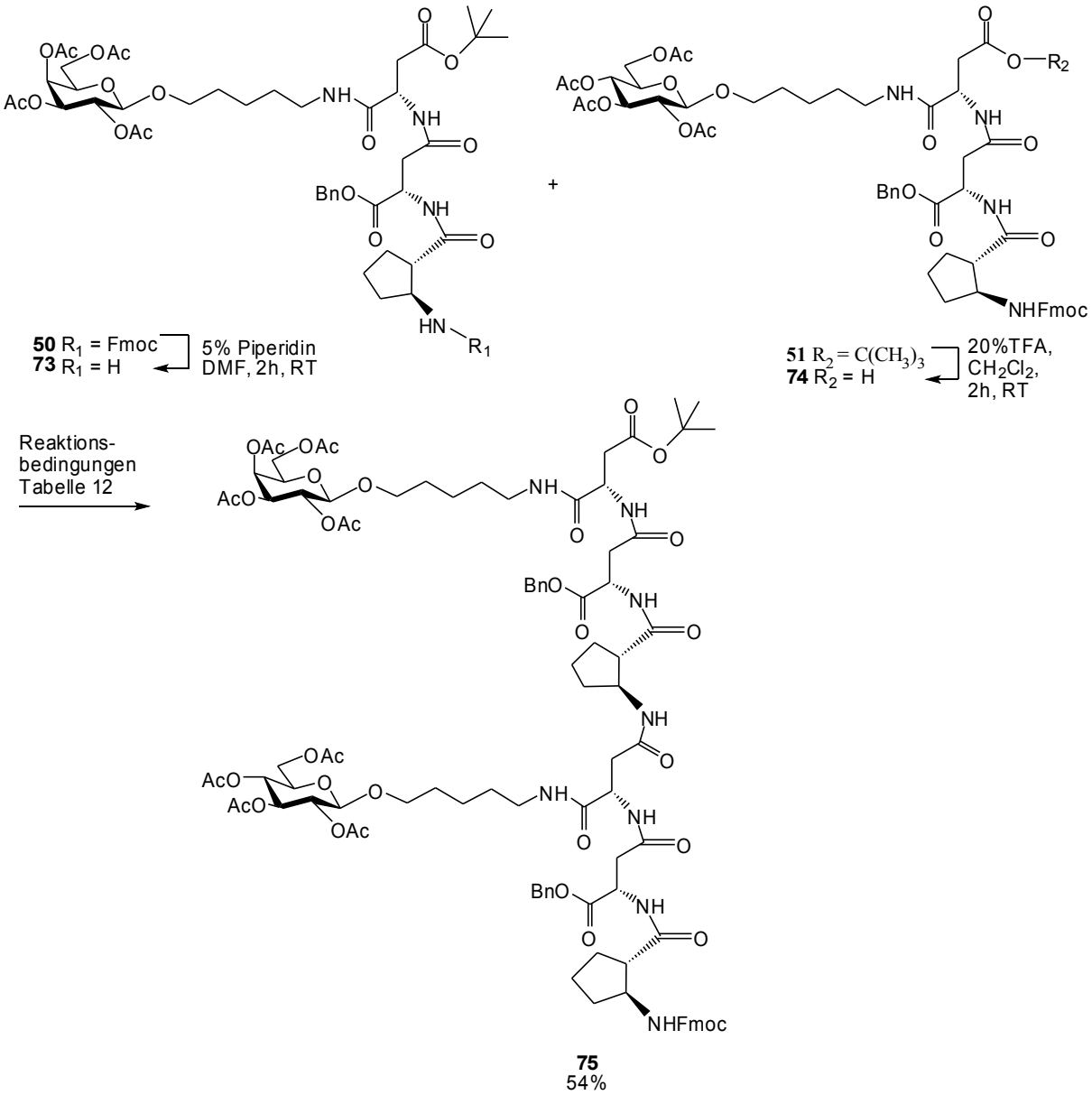
2.6.5 Darstellung des Hexapeptids Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (75)

Zur Gegenüberstellung der (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure (**7**), welche die 14-Helix bevorzugt, wird in neuerer Literatur die (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure (**9**) für die Ausbildung von 12-Helixstrukturen in Peptidketten eingebaut. Als Zwischenglied zwischen zwei Tripeptideinheiten hat sich im Hexapeptid (**71**) eine alicylische β-Aminosäure bewährt. Nun wurde untersucht, ob sich die (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentacarbonsäure (**9**) ebenso für die Hexapeptidsynthese eignet und wie sich die Struktur hierdurch verändert[52].

Die beiden Tripeptidbausteine Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) und Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**51**) mit der Peptidabfolge Asp-Asp-ACPC werden nun zum Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**75**) verknüpft. Hierfür wurde zuerst der Glucosebaustein Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**51**) mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zum Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-OH (**74**) entschützt. Der Galactosebaustein Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) wurde mit 5%iger Piperidinlösung in DMF zum NH_2-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**73**) entschützt, dann zusammen mit dem Tripeptid (**74**) zum Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**75**) umgesetzt (Tabelle 12 und Schema 37).

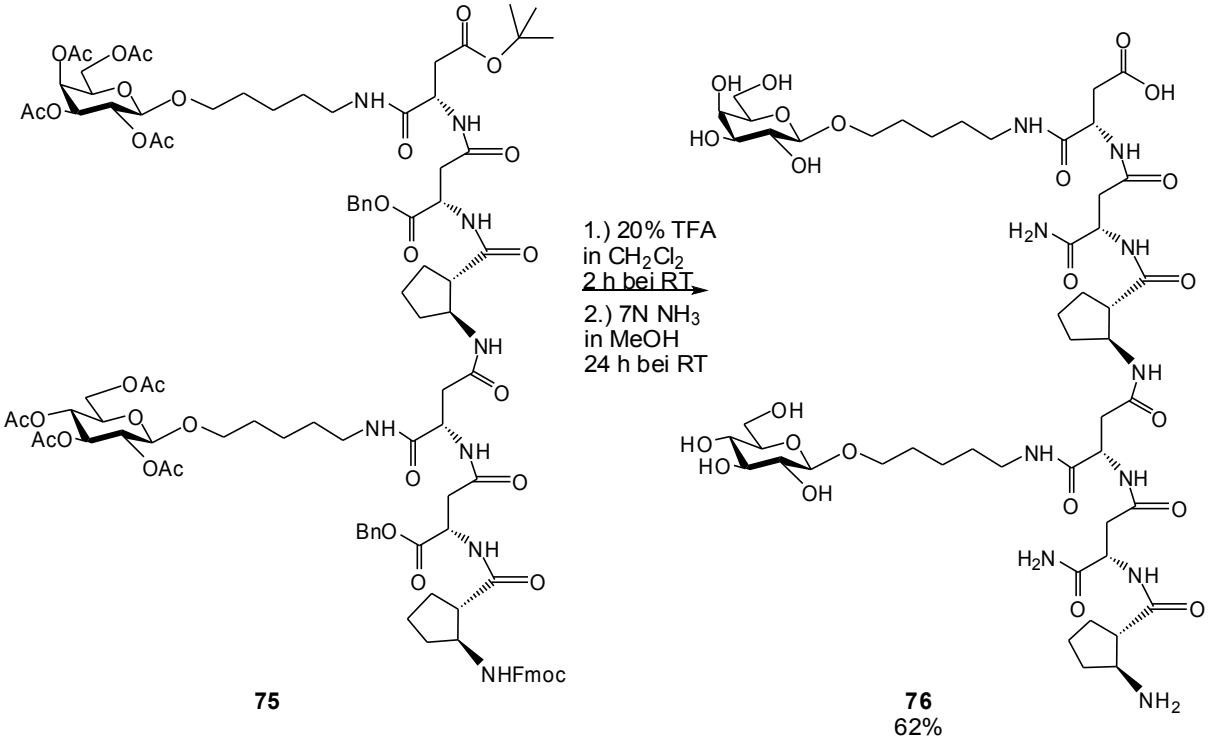
Tabelle 12: Optimierung der Kupplungsmethode mit den Bausteinen (**73**) und (**74**) zum Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**75**)

Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Tripeptid-NH_2 (**73**) Tripeptid-OH (**74**)	DMF	1h	33%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Tripeptid-NH_2 (**73**), Tripeptid-OH (**74**)	DMF	1,5h	54%



Schema 37

Für die komplette Entschützung wurde das Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**75**) mit einer Lösung von 20% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid *tert*.Butyl-entschützt, danach für die Entfernung der Acetylschutzgruppen, der Fmoc-Gruppe und den Benzylschutzgruppen mit 7N Ammoniaklösung in Methanol behandelt. Man hat das entschützte Hexapeptid NH_2-(ACPC-Asp-GlucBB-ACPC-Asp-GalBB)-OH (**76**) mit einer Ausbeute von 42%. erhalten (Schema 38).



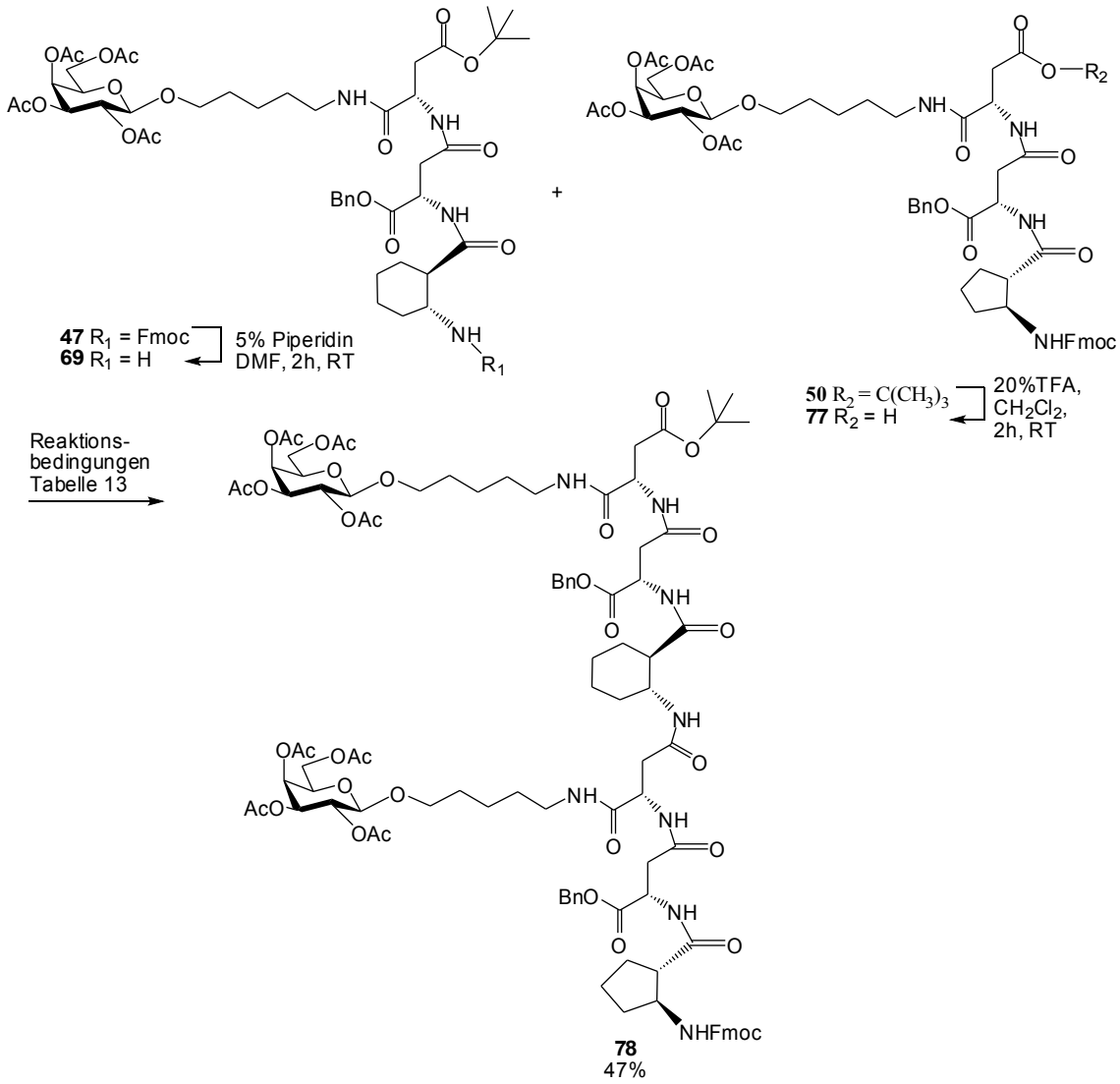
75 **76** 62%

Schema 38

2.6.6 Darstellung des Hexapeptids Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (78)

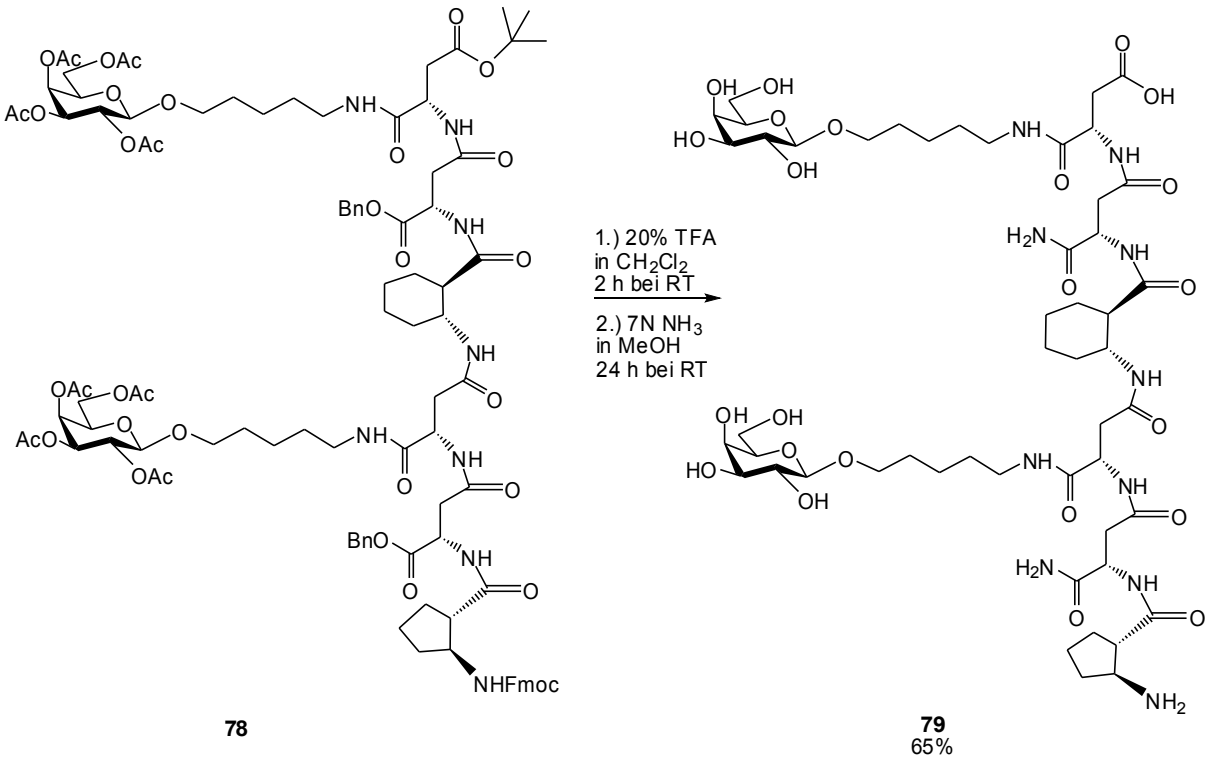
Als Abschluss wurde noch ein gemischtes Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**78**) aus den beiden Tripeptiden Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) und Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) hergestellt. Mit dem 14-Helixbildner ACHC (**7**) und mit dem 12-Helixbildner ACPC (**9**) sollte untersucht werden, wie sich die beide Effekte in der Struktur in einem Hexapeptid auswirkten. Hierfür wurde der Galactosebaustein Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zum Baustein Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OH (**77**) *tert*.Butyl-entschützt. Der Galactosebaustein Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) wurde mit 5% Piperidinlösung in DMF zum Galactosebaustein NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**69**) entschützt. Dann wurde der Tripeptidbaustein (**81**) mit dem Tripeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OH (**77**) zum Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**78**) umgesetzt (Tabelle 13 und Schema 39).

Tabelle 13: Optimierung der Kupplungsmethode mit den Tripeptiden (**69**) und (**77**) zum Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**78**)				
Methode:	Reagentien:	Lösungs-mittel:	Dauer:	Ausbeute:
PyBOP/HOBt	PyBOP, HOBt, DIPEA, Tripeptid-NH_2 (**69**) Tripeptid-OH (**77**)	DMF	1h	32%
HBTU/HOBt	HBTU, HOBt, DIPEA, Tripeptid-NH_2 (**69**) Tripeptid-OH (**77**)	DMF	1,5h	47%



Schema 39

Das Hexapeptid Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**78**) wurde schließlich mit einer Lösung von 20% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid zuerst *tert.*Butyl-entschützt, dann mit einer 7N Ammoniaklösung in Methanol von den restlichen Schutzgruppen befreit. Man hat das entschützten Hexapeptid NH_2-(ACPC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH (**79**) mit einer Ausbeute von 65 % erhalten. (Schema 40)



78 **79** 65%

Schema 40

2.7 NMR-Untersuchung der Peptide

2.7.1 Allgemeines zur Peptid-Kernspinspektroskopie

Aminosäuren liegen von Natur aus meistens in der L-Konfiguration vor, mit Ausnahme von Cystein liegen sie alle in der *S*-Form vor. Die Amidbindung liegt meistens in der *trans*-Konfiguration vor, Ausnahme bildet das Prolin, welches in Peptidsträngen auch *cis*-Anteile erkennen lassen. Diese *cis*-Anteile kann man im NMR-Spekrum gut erkennen. Auf diese Weise kann man die NMR-Spektroskopie zur Aufklärung von Peptidstrukturen miteinbeziehen.
Kurze Peptide liegen meistens in untergeordneten, nicht strukturierten „Zufallsknäuel“ (random coil) vor, längere Peptide können dagegen in gefalteter Form wie Helices oder Blätter vorliegen. Die Besonderheiten von β-Aminosäuren wurde in Kapitel 2 ausführlich erörtert, sie können schon ab 6 β-Aminosäuren stabile Helices ausbilden[58].Verifiziert wird die Struktur von Peptiden anhand von Daten aus TOCSY und NOESY-Spektren, aber auch ROESY-Spektren können bei der Zuordnung behilflich sein.

2.7.2 NOESY- und TOCSY-Spektren

Ein wichtigstes Experiment zur Strukturaufklärung von Peptiden ist das NOESY-Experiment, weil es Informationen für die Protonen/Protonen-Wechselwirkung für den Raum enthält. Wichtig für die Zuordnung der Protonen sind die Kreuzsignale, die in Abbildung 19 schematisch dargestellt sind[139]. Ein typisches Merkmal von α-Helices sind Kreuzsignalen im Bereich der Amidprotonen H^N-H^N des NOESY-Spektrums, die aufgrund der räumlichen Nähe benachbarter Aminosäuren entstehen. Der NH-Signalbereichs von 7.5-9 ppm in NMR-Spektrum und deren Kupplungen mit Signalen aus dem H^N-H^α und H^N-Aliphaten lässt erkennen, ob eine α-Helix vorliegt oder nicht[140] (Abbildung 19).

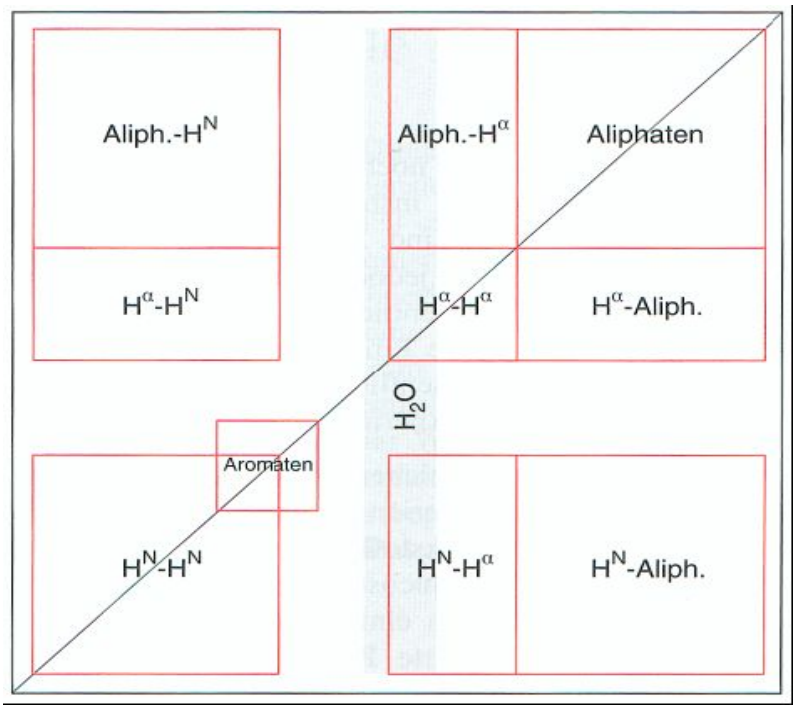


Abb.19: Schematische Zuordnung der Protonen-Kreuzsignale im NOESY nach F. Lottspeich und H. Zorbas [139]

Für die Strukturaufklärung der Hexapeptide (**61**), (**72**) (**76**) und (**79**) wurde neben den NOESY-Spektren die TOCSY-Spektren benötigt, um zwischen intraresidualen und interresidualen Kupplungen zu unterscheiden. Im TOCSY-Spektrum werden nur Kreuzsignale aufgezeigt, die innerhalb eines Spinsystems entstehen. Durch übereinanderlegungen von beiden Spektren, können die Signale im NOESY zur Strukturaufklärung beitragen. Im Unterschied zum TOSCY-Spektrum, tauchen im im NOESY-Spektrum die zahlreichen H^N-H^N-Kupplungen auf, die im TOCSY nicht erscheinen. Die Gegenüberstellung der beiden NMR-Spektren der Hexapeptide (**72**) durch Übereinanderlegen der NOESY-Spektren mit den TOCSY-Spektren (Abbildung 20) zeigen das Auftreten von H^N-H^N-Kupplungen. Dies ist ein Indiz für das Vorliegen einer geordneten Struktur wie Helix oder Faltblatt. In α-Helices treten starke NOE-Signale zwischen dem H_α-Proton des Aminosäurerestes i und dem H^N-Proton des Aminosäurerestes i+3 ($_\alpha$N(i+3)) auf. Des weiteren treten über mittlere Distanzen (i, i+2 – i, i+4) Signale auf, die ebenfalls die Helixstruktur untermauern. Durch den Einbau von ACHC-Bausteinen wurde eine stabile Sekundärstruktur ausgebildet, die eine α-Helix darstellt[141].

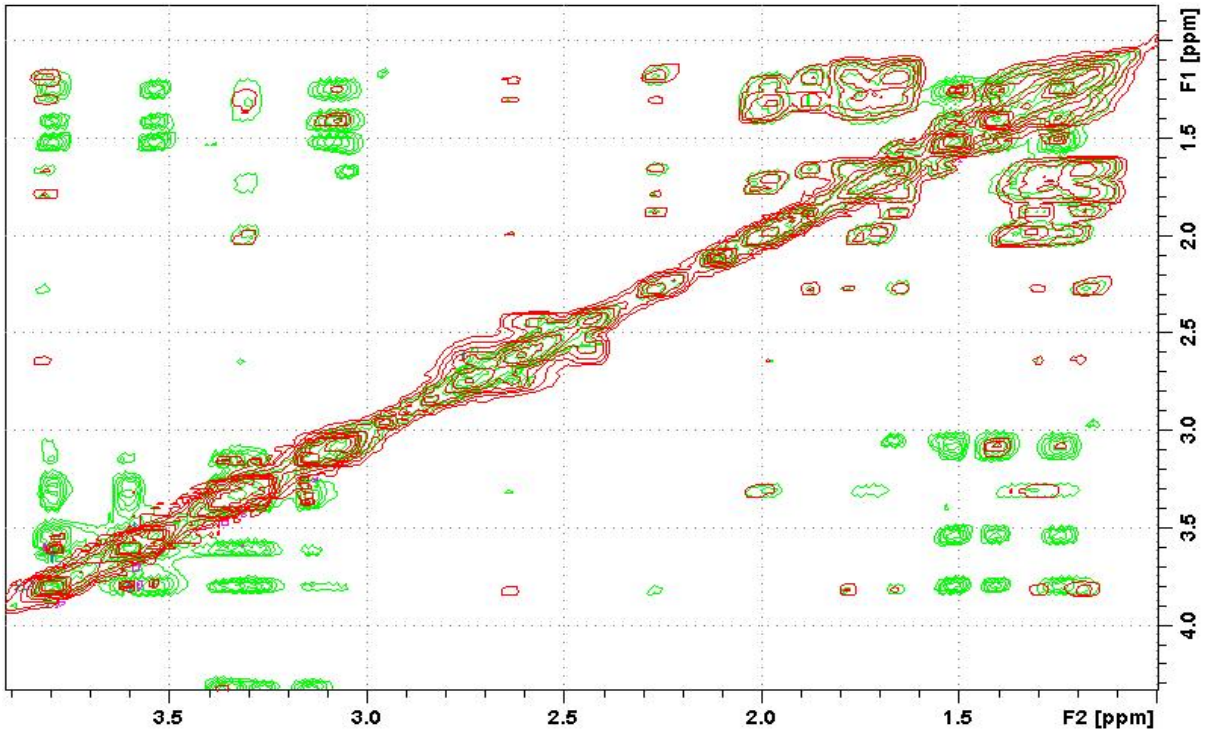


Abb. 20: NMR-Spektrum des Hexapeptides (**72**) in D_2O/H_2O (9:1). Grüne Signale: TOCSY-Spektrum, pinke Signale: NOESY-Spektrum

Im Vergleich hierzu der gleiche Bereich des Hexapeptides (**61**). Hier treten keine zusätzlichen Signale im NOESY-Spektrum auf. Hier liegt eine offenkettige Struktur vor, Kupplung über den Raum sind nicht zu erkennen. (Abbildung 21)

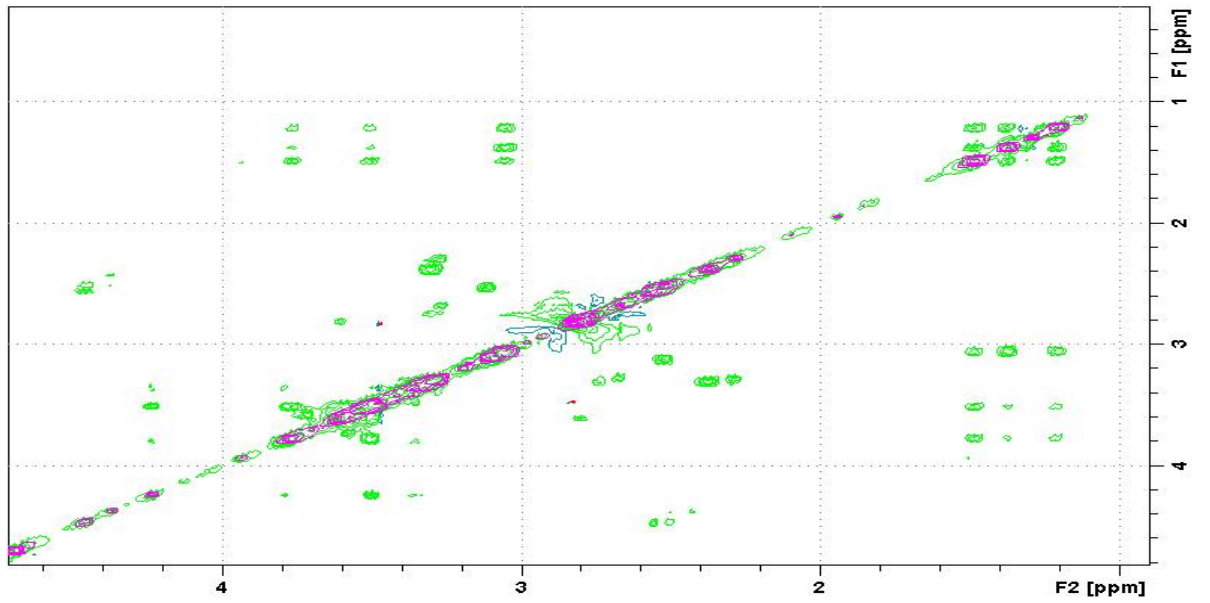


Abb. 21: NMR-Spektrum des Hexapeptides (**61**) in D_2O/H_2O (9:1). Grüne Signale: TOCSY-Spektrum, rote Signale: NOESY-Spektrum

Die Spektren beim Hexapeptid (**76**) und (**79**) gleichen sich zum Hexapeptid (**61**). Auch hier treten keine zusätzlichen Signale im NOESY-Spektrum auf. Es liegen ebenfalls offenkettige Strukturen vor, Kupplungen über den Raum sind nicht zu erkennen. (Abbildung 22 und 23)

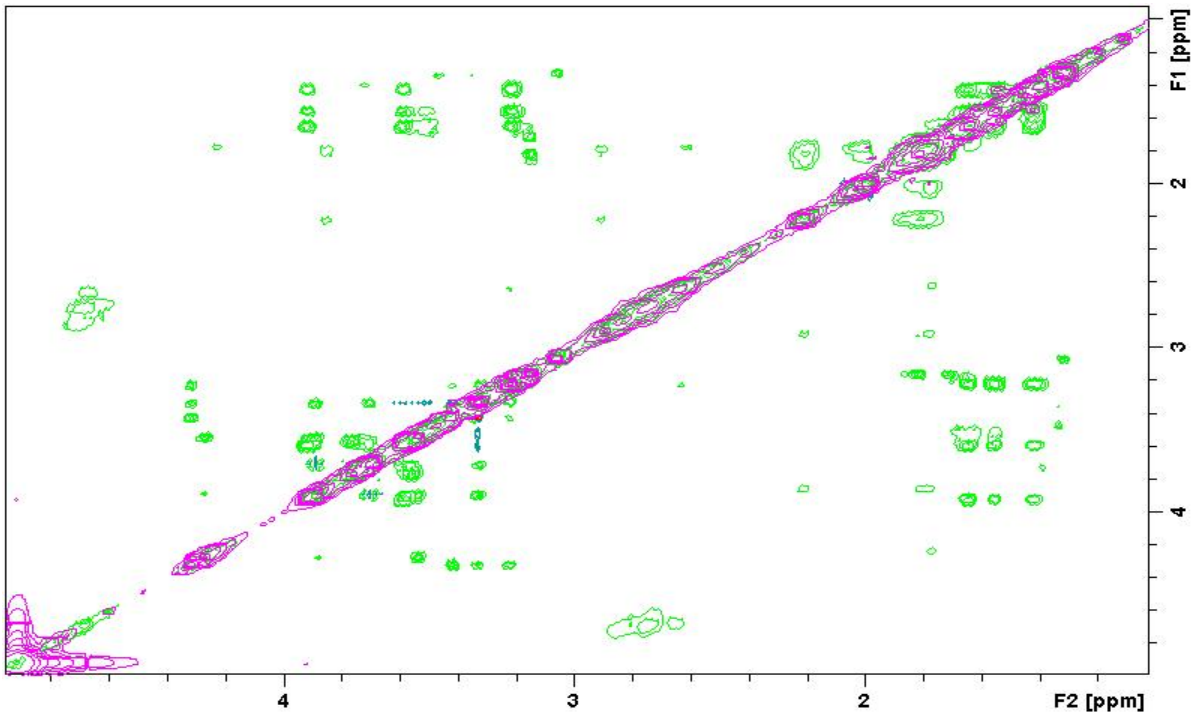


Abb 22.: NMR-Spektrum des Hexapeptides (**76**) in D_2O/H_2O/AcOH (9:1:0.5). Grüne Signale: TOCSY-Spektrum, rote Signale: NOESY-Spektrum

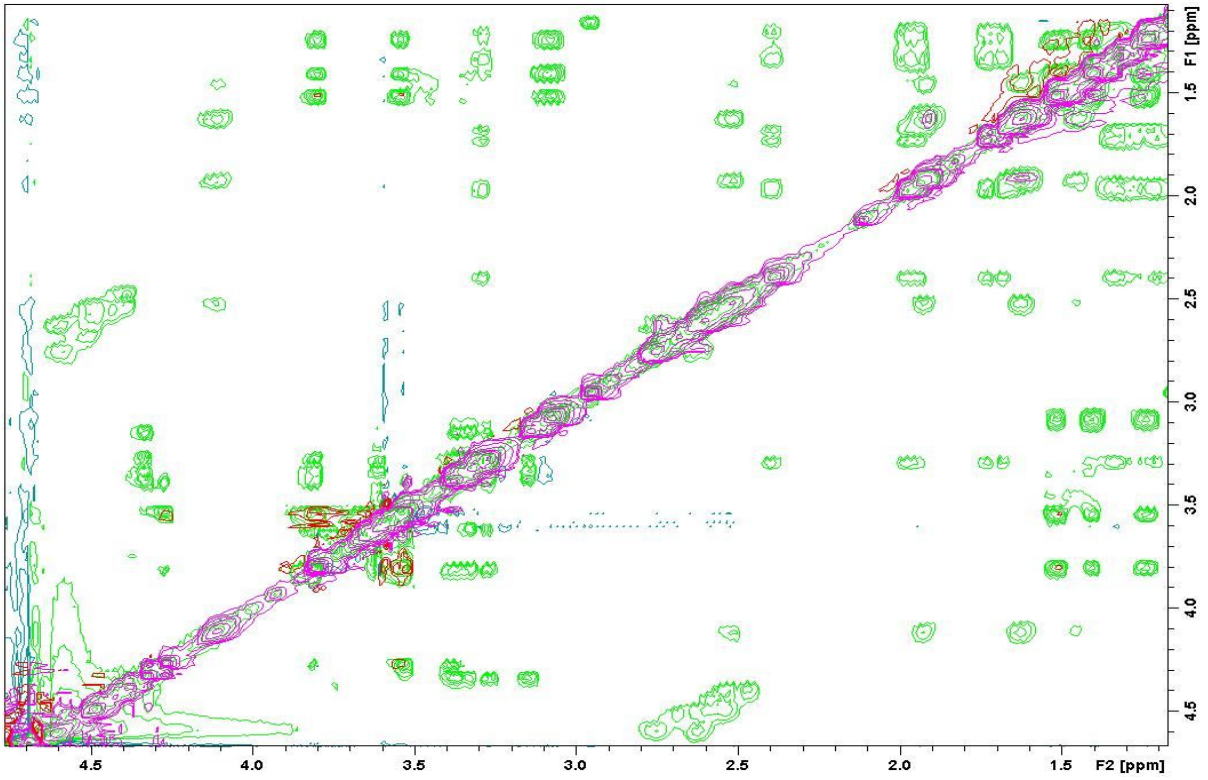


Abb 23: NMR-Spektrum des Hexapeptides (**79**) in D_2O/H_2O (9:1).Grüne Signale: TOCSY-Spektrum, rote Signale: NOESY-Spektrum

2.7.3 Chemische Verschiebung und Random-Coil-Struktur

Die chemische Verschiebung ist ebenfalls ein wichtiger Indikator für die Aussagen zur Sekundärstruktur eines Peptids oder Proteins[142]. Diese Methode erlaubt es, eine qualitative Interpretation von $^{1}H_{\alpha}$-, und $^{13}C_{\alpha}$- Verschiebungen in NMR-Spektren. Hierbei wurde ein Vergleich der experimentell ermittelten chemischen Verschiebungen mit den für eine *random coil*-Struktur zu erwartenden chemischen Verschiebungen gemacht. Auf diese Weise kann eine Unterscheidung zwischen α-helikalen-, β-Faltblatt- und *random coil*-Strukturen bei den Hexapeptiden (**61**), (**72**), (**76**) und (**79**) erfolgen. In allen Hexapeptiden sind die beiden Glykobausteine (**3**) und (**4**) verwendet worden, die einen Asparaginsäure-Baustein enthalten. Die chemische Verschiebung von Asparaginsäure in Helices, in β-Faltblatt- und Random Coil-

Strukturen ist mehrfach tabelliert kann somit zur Strukturaufklärung herangezogen werden. Die α-CH-Gruppe besitzt in willkürlichen Strukturen eine Verschiebung von 4.62 ppm. Bei einer Random Coil-Struktur bleibt dieser Wert unverändert, bei einem β-Faltblatt verschiebt sich das α-CH-Signal auf einen Wert um 5.07 ppm und helicalen Strukturen zu Werten um 4.45 ppm. Im Hexapeptid (**61**) verschiebt sich der Wert zu 5.17 ppm ins Tieffeld, welches einer β-Faltblattstruktur entsprechen würde. In den Hexapeptiden (**76**) und (**79**) verschiebt sich der Wert nur minimal zu 4.59 ppm, das einer Random-Coil-Struktur entspricht und beim Hexapeptid (**72**) zeigt die Verschiebung des α-CH-Signal zu 4.45 ppm eine deutliche Verschiebung in Richtung Hochfeld und deutet auf eine helicale Struktur hin[142][143][144].

2.7.4 Strukturaufklärung der Hexapeptide

Zahlreiches auftreten von NOE-Signale zwischen i und i+3 Positionen sind ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer α-helikalen Konformation in dem Hexapeptid (**72**). Hingegen fehlen diese Signale im Hexapeptid (**61**) mit reinem β-Alaninrückgrat und in den Hexapeptiden (**76**) und (**79**) mit den beiden β-Aminosäuren ACHC (**7**) und ACPC (**9**). In diesen Strukturen liegt eine willkürliche Struktur vor (random coil). Ein zusätzlicher Beweis für die Struktur der Hexapeptide (**61**), (**72**), (**76**) und (**79**) wurde im Zusammenhang mit den CD-Spektren der Hexapeptide (**61**), (**72**), (**76**) und (**79**) diskutiert.

2.8 CD-Spektren und Auswertung der Peptide

Zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von Peptiden und Proteinen kommen neben NMR-Spektroskopie auch die CD-Spektroskopie zum Einsatz, um auf schnelle Weise an Informationen zur Sekundärstruktur zu bekommen. Die Circulardichroismus (CD)-Methode lässt erkennen, ob ein Protein oder Peptid ungefaltet, eher helikal oder als β-Faltblatt vorliegt.

Die chromophoren Gruppen in Peptiden werden mit den beiden Komponenten circular rechts polarisiertem Licht und circular links polarisiertem Licht in Wechselwirkung treten, so dass eine Absorptionsänderung auftritt. Diese Wechselwirkung kommt immer dann in Molekülen vor, wenn eine optisch-aktive Verbindung vorliegt. Außerdem ist die Absorption abhängig von der Wellenlänge, die eingestrahlt wird. In regelmäßigen Sekundärstrukturen kommt es wegen der definierten Anordnung der Chromophore zueinander zu einer gegenseitigen Wechselwirkung, die sich wiederum auf die Absorption und deren Frequenz auswirkt.

Anhand von CD-Spektren kann man schnell erkennen, ob eine Faltung vorliegt oder nicht, allerdings repräsentiert sie nur die Summe aller Sekundärstrukturen und erlauben ohne NMR-Spektren keine exakten Schlüsse auf die räumliche Gestalt[145] (Abbildung 24).

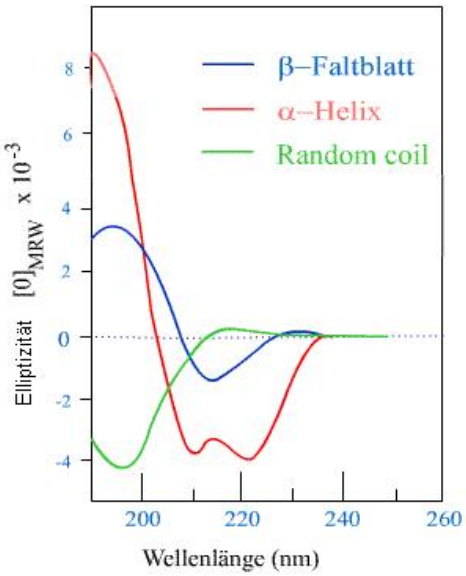
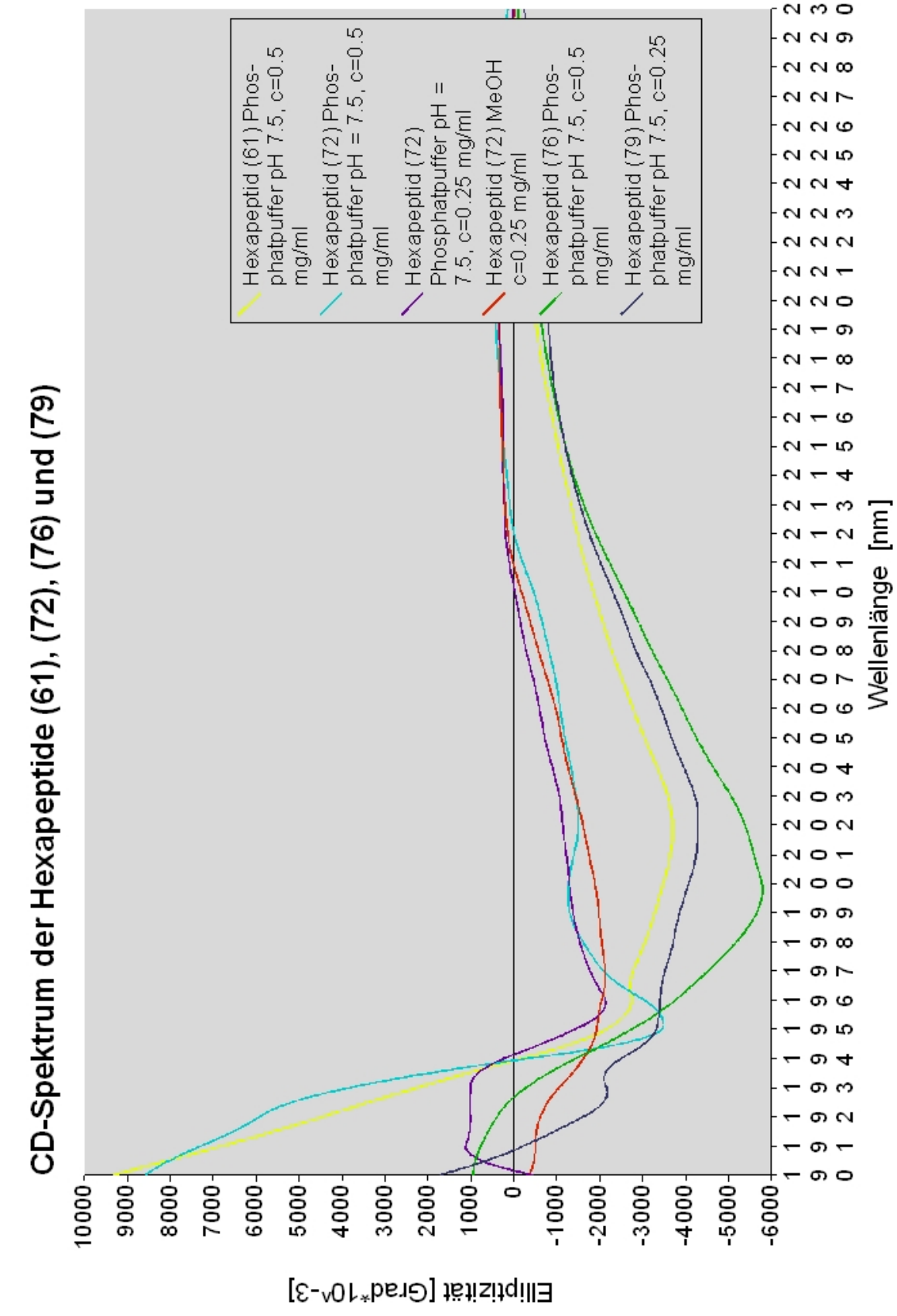


Abb.24: CD-Spektren von Poly-L-Lysin[146]

Im Fall von α- und β-Peptiden erlaubt die CD-Spektroskopie die Erkennung, welcher Typ von Helix sich ausgebildet hat. Die Spektren können unterscheiden zwischen einer 3_{10}-Helix, 14-Helix 12-Helix, 12/10-Helix, 10-Helix, eines β-Faltblattes oder einer ungeordneten Struktur (random coil)[56] .Die verschiedenen Strukturtypen unterscheiden sich in ihren Maxima und Minima. Eingehend ist die 14-Helix-Struktur von β-Peptiden von D. Seebach et al. untersucht worden. Hier liegt das Minimum bei 215-216 nm und das Maximum bei 197 nm[147]. Durch den Einbau von ACHC-Einheiten kann die 14-Helix-Struktur weiter stabilisiert werden und selbst pH-Schwankungen von pH 2 bis pH 12 überstehen. Weiter sollte die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel für die CD-Messung stabilisierend auf die Helixausbildung wirken[148]. Neben der 14-Helix stellte Appella et al. die 12-Helix vor, die durch den Einbau von ACPC-Einheiten aufgebaut werden kann. Ihre charaktistischen Signale im CD-Spektrum unterscheiden sich grundlegend von dem der 14-Helix. Das Maximum liegt bei 204 nm und der Nulldurchgang ist bei 214 nm. Das Minimum hingegen liegt bei 221 nm[62][149] . Anders zeichnet sich die 12/10-Helix aus, die sich mit einem einzigen Maximum bei 205 nm mit einem hoher Elliziptität auszeichnet[150]. Neben den Helices können noch andere Strukturen vorliegen, das β-Faltblatt mit einem Maximum bei 187-195 nm und einem schwachen Minimum bei 217 nm[151]. Des weiteren kann man eine ungeordnete Struktur (random coil) im CD-Spektroskopie erkennen, wenn ein Maximum bei 212 nm und das Minimum um 190 nm vorliegt. Allerdings darf der Kurvenverlauf nach 190 nm kein Maximum mehr erkennen lassen[58](Abbildung 25).

Abb. 25 nächste Seite: CD-Spektren der Hexapeptide (**72**) im Phosphatpuffer pH = 7.5 mit den Konzentrationen c = 0.5 mg/ml (hellblaue Linie) und c = 0.25 mg/ml (magentafarbene Linie) und in Methanol (rote Linie) mit einer Konzentration von c = 0.5 mg/ml, Hexapeptid (**76**) im Phophatpuffer pH = 7.5 und Konzentration c = 0.5 mg/ml (grüne Linie), Hexapeptid (**79**) im Phosphatpuffer pH = 7.5 mit den Konzentrationen c = 0.25 mg/ml (dunkelblaue Linie) und dem Hexapeptid (**61**) im Phosphatpuffer pH = 7.5. Konzentration c = 0.5 mg/ml (gelbe Linie).


CD-Spektrum der Hexapeptide (61), (72), (76) und (79)
Hexapeptid (61) Phosphatpuffer pH 7.5, c=0.5 mg/ml
Hexapeptid (72) Phosphatpuffer pH = 7.5, c=0.5 mg/ml
Hexapeptid (72) Phosphatpuffer pH = 7.5, c=0.25 mg/ml
Hexapeptid (72) MeOH c=0.25 mg/ml
Hexapeptid (76) Phosphatpuffer pH 7.5, c=0.5 mg/ml
Hexapeptid (79) Phosphatpuffer pH 7.5, c=0.25 mg/ml
Ellipzität [Grad*10^-3]
Wellenlänge [nm]

Das Hexapeptid (**61**) mit reinem β-Alanin zeigt bereits eine Verschiebung des Minimums zu 200 nm und ein Maximum bei 190 nm wie in einer β-Faltblattstruktur, allerdings kann diese Struktur nicht in Einklang mit den 2D-NMR-Daten gebracht werden. Die chemische Verschiebung der beiden Asparaginsäure-Signale würden für ein β-Faltblattstruktur sprechen[143]. Auffällig hierzu ist noch, dass das Maximum bei stabilen Sekundärstrukturen nach 190 nm im positiven Bereich liegen muss, im Gegensatz zum Random Coil, dass kein Maximum nach 190 nm zeigt [152][153].

Auch dieser Anhaltspunkt ist beim Hexapeptid (**72**) deutlich zu sehen. Somit kann man das Spektrum des Hexapeptides (**72**) einer helicalen Struktur zuordnen. Das Minimum liegt beim Hexapeptid (**72**) mit der Konzentration c = 0.5 mg/ml im Phosphatpuffer pH 7.5 bei 192 nm und ein zweites Minimum bei 204 nm. Die positive Bande bei 219 nm des n →p*-Übergangs ist nur schwach erkennbar, kommt allerdings bei Random Coil Strukturen vor, allerdings bei 212 nm und stärker in der positiven Auslenkung [151]. Ausgeschlossen werden kann die 12-Helix und 10/12-Helix, die jeweils über positive Maxima bei 204 nm bzw. 220 nm verfügen. Allerdings zeigt die Verwendung von Methanol keine Stabilisierung der Helixstruktur [154][149].

Alle Hinweise sprechen für eine stabile Sekundärstruktur in helicaler Form. Literaturstellen mit CD-Spektren von Peptiden zeigen einen analogen Verlauf wie beim Hexapeptid (**72**) im Phosphatpuffer pH 7.5[147][155][156]. Eine andere Veröffentlichung von Shepard et al. zeigt ebenfalls CD-Spekren von α-helikalen Strukturen, allerdings von cyclischen Penta- und Hexapeptiden[141]. Zusammen mit den Ergebnissen der NMR-Daten, der chemischen Verschiebung und den vorliegenden Kreuzsignalen im NOESY kann gesagt werden, dass eine helicale Struktur vorliegt, durch den Einbau von ACHC eine 14-Helix [56].

Die Sekundärstruktur für das Hexapeptid (**72**) ist eine helicale Struktur, das Hexapeptid (**61**) hat die Tendenz zum Ausbilden eines β-Faltblattes und die Hexapeptide (**76**) und (**79**) liegen in einer Random-Coil-Struktur vor in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 7.5.

2.9 Lektin-Screening

2.9.1 Allgemeine Bedeutung und Wirkungsweise von Lektinen

Proteine sind in der Lage mit Kohlenhydraten in Wechselwirkung zu treten wie Enzyme und Antikörper. Eine andere Spezies dieser Gruppe sind Lektine, die in der Lage sind Mono- und Oligosaccharidstrukturen reversibel und spezifisch zu binden. Im Gegensatz zu den Enzymen haben Lektine keine katalytische Aktivität und sie gehören wie die Antikörper nicht zur Immunabwehr. Jedes Lektin besitzt zwei oder mehr CRDs (Carbohydrate Recognition Domain), welche Kohlenhydrate binden können. Je nach Bindung sind Lektine dann di- oder polyvalent angebunden wie am Beispiel der Erythrozyten, mit denen sich Lektine nicht nur oberflächlich mit den Kohlenhydraten verbinden, sondern auch Querbindung mit dem ganzen Erythrozyten eingehen. Dieses Phänomen wird Zellagglutination genannt. Durch die Anbindung kommt es zur Ausfällung der Lektin-Erythrozyten-Verbindung. Diese Eigenschaft der Lektine wird zum Nachweis und Charakterisierung benutzt[6]. Ihr Vorkommen reicht von Viren, Bakterien über Pflanzen bis hin zu Tieren. Lektine wurden ursprünglich nur aus Pflanzenextrakten isoliert und zur Anlagerung an Blutzellen wie Erythrozyten eingesetzt wurden. Später fand man heraus, dass sich Lektine auch aus tierischen Organen gewinnen lassen und dass sie keineswegs alle an Erythrozyten binden. W.C. Boyd und E. Shapleigh führten daher 1954 den Begriff Lektin (lat: legere = auswählen) ein. Lektine besitzen mindestens zwei Zuckerbindungsstellen, sonst wäre ihr Anlagerungs-/Präzipitationsvermögen nicht erklärbar[157]. Die Anbindung von Lektinen an Zelloberflächen oder Liganden kann nicht allein von einzelnen Kohlenhydraten erreicht werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Bindung sowohl von Kohlenhydraten als auch über zusätzliche unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgt. Einen großen Einfluss hat die Anordnung der Kohlenhydrate an der Zelloberfläche, die für die Lektine zugänglich sein müssen[158]. Obwohl ihre chemische Charakterisierung noch ungeklärt ist, werden Lektine in den letzten Jahrzehnten in steigendem Umfang in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Sie eignen sich, um bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente (z.B. Membrantypen) zu charakterisieren, Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen, gesun-

de Zellen von Tumorzellen zu unterscheiden, die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu markieren und verschiedene Zelltypen affinitätschromatographisch voneinander zu trennen[159][160].

2.9.2 Lektine und ihre Wechselwirkungen

Wie bereits andeutet, hängt die Anbindung von Lektinen von mehreren Faktoren ab und kann nicht nur ausschließlich über die CRDs erfolgen. Zum einem sind Wasserstoffbrücken durch Wassermoleküle beteiligt, dann koordinative Wechselwirkungen mit divalenten Ionen wie Ca^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen und zusätzlich von Carbonylgruppen, bei denen die benachbarte NH_2-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer Zucker-OH-Gruppe ausbildet. Weiter bilden die Lektine ionische Wechselwirkungen zwischen geladenen und ungeladenen Zuckergruppen und Aminofunktionen der Aminosäuren aus. Hierbei werden Wassermoleküle als Brücke benutzt (Abbildung 26). Weiterhin ist bekannt, dass aromatische Reste wie Tryptophan oder Phenylalanin in den Bindungstaschen nichtpolare Wechselwirkungen (wie nichtaromatische Wechselwirkung, π-π-Stapelwechselwirkungen) zwischen dem unpolaren Bereich in den Kohlenhydraten ausbilden[161][160].

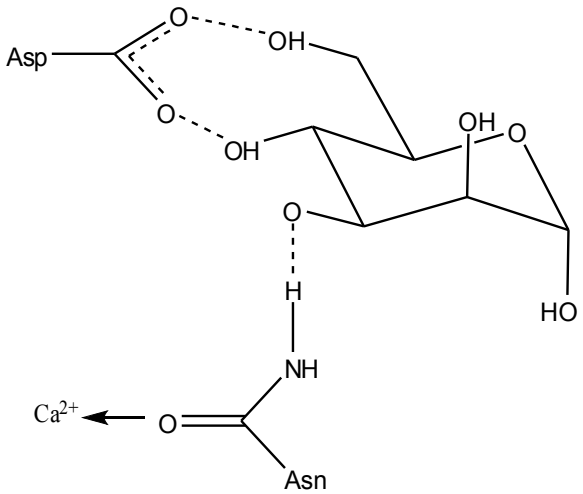


Abb.26: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Mannose und Aminosäuren des Lektins Concanavalin A[159].

Dennoch sind die Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen als schwache Wechselwirkungen einzustufen. Die Bindungsenergie liegt zum Beispiel mit 22 kJ/mol für Concanavalin A ähnlich einer Wasserstoffbrücke mit einer Bindungsenergie von 20 kJ/mol[162].

2.9.3 Auswahl der Lektine und Färbemethode

Die Pflanzenlektine wurden nach ihrer Zuckerspezifität ausgesucht, wobei zwischen Lektinen zu unterscheiden ist, die Monosaccharide oder Oligosaccharide erkennen können[6] . Das Lektin Canavalia ensiformis (Con A) ist ein Legume-Lektin aus der Riesenbohne, welches Mannose- und Glucose-Einheiten erkennt, wobei Mannose-Einheiten besser als Glucose-Einheiten[163]. Des weiteren wurde Phaseolus vulgaris E (PHA-E), ebenfalls ein Legume-Lektin aus der Kidney-Bohne verwendet, welches mit Oligosacchariden wechselwirken kann. Abschließend wurde ein Lektinscreening mit Galanthus nivalis (GNA) durchgeführt, ein Monocot-Lektin aus Schneeglöckchen, welches Mannose-Oligosacchride erkennen kann[164][165]. Diese drei Lektine sind Peroxidase gelabelt und können mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) und Wasserstoffperoxid in einer Färbereaktion sichtbar gemacht werden. Hierbei wird der Farbstoff AEC in einer Oxidation zu einem roten, in Wasser unlöslichen, in Methanol löslichen, Farbstoff umgewandelt (Abbildung 27).

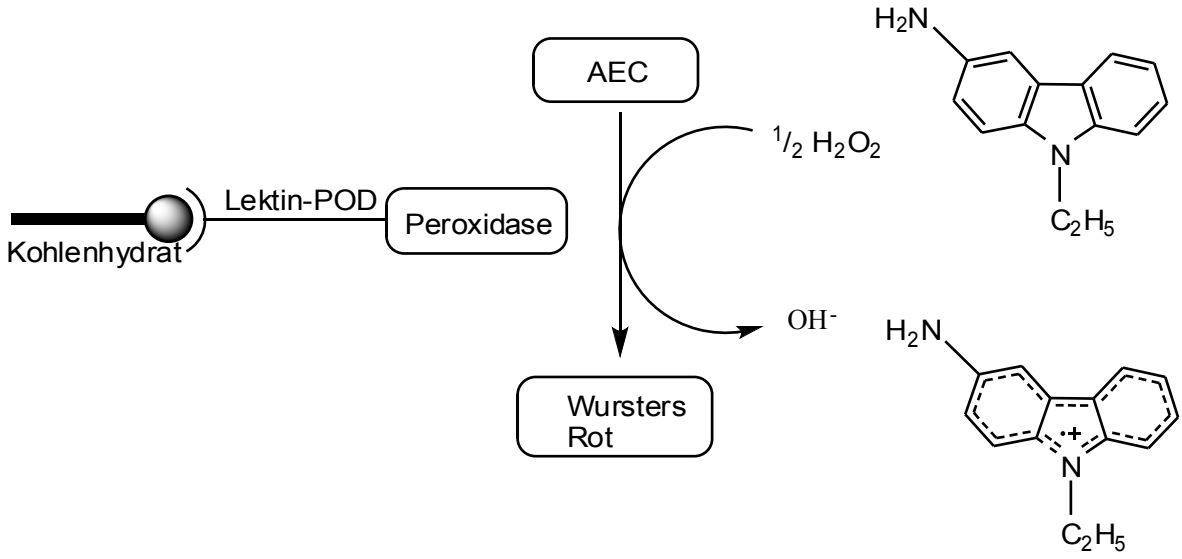


Abb. 27: Farbreaktion mit AEC und Wasserstoffperoxid

Die drei verschiedenen Lektine Con A, PHA-E und GNA wurden mit den verschiedenen Hexapeptiden (**61**), (**64**), (**72**), (**76**) und (**78**) getestet, ob eine Veränderung in der Aminosäurenabfolge des Rückgrates, Unterschiede in der Affinität zwischen Lektin und Glykopeptid ergeben. Die Proben der Hexapeptide wurden in Phosphatbuffer pH 7.5 gelöst, aus diesem Grund wurde als Blindprobe der Phosphatpuffer mitaufgetragen. Außerdem dürfte das Lektin GNA keine Anbindung an alle Hexapeptide zeigen. In keinem dieser Hexapeptide wurde das Kohlenhydrat Mannose verwendet und das Lektin GNA dürfte nur an Oligosaccharide mit Mannose-Einheit anbinden[166][165].

2.9.4 Lektin-Screening auf Nitrocellulose

Um die synthetisierten Hexapeptide (**61**), (**64**), (**72**), (**76**) und (**78**) auf ihre Affinität zu Lektinen zu testen, wurden die entschützenden β-Glykopeptide auf Nitrocellulose aufgetragen. In vielen Publikationen werden Peptide auf Nitrocellulose übertragen, weil es eine hohe Affinität zu Peptiden aufweist. Aus diesem Grund war es wichtig, nach Auftragung wässriger Lösungen der Peptide, die Nitrocelluloseoberfläche mit BSA zu blockieren, weil sonst die Lektinlösung vollständig absorbiert wird. Anschließend wurden die peroxidase-gelabelten Lektine mit AEC angefärbt[167][168][169].

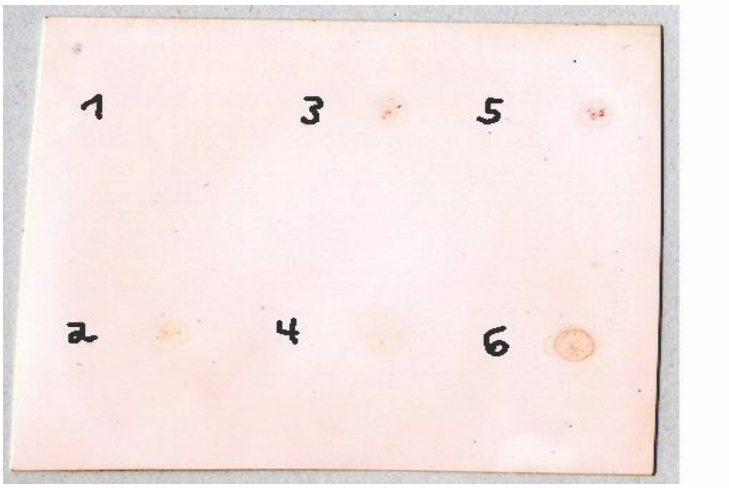


Abb.28: Concanavalin A mit 1: Pufferlösung Phosphatpuffer pH 7.5, 2: Hexapeptid (**72**), 3: Hexapeptid (**61**), 4: Hexapeptid (**64**), Hexapeptid (**76**) 6: Hexapeptid (**79**) mit einer Konzentration: 0.1 mg/ml / Volumen 0.5 µl

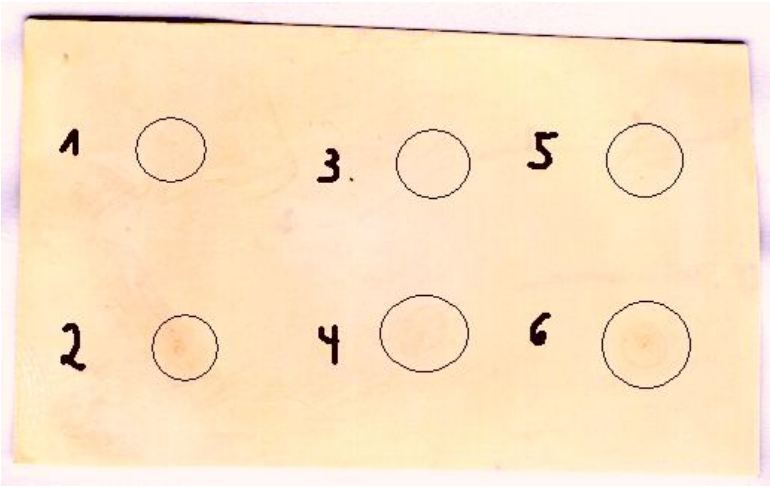


Abb.29: PHE-A mit 1: Pufferlösung Phosphatpuffer pH 7.5, 2: Hexapeptid (**72**), 3: Hexapeptid (**61**), 4: Hexapeptid (**64**), Hexapeptid (**76**) 6: Hexapeptid (**79**) mit einer Konzentration: 0.1 mg/ml / Volumen 0.5 µl

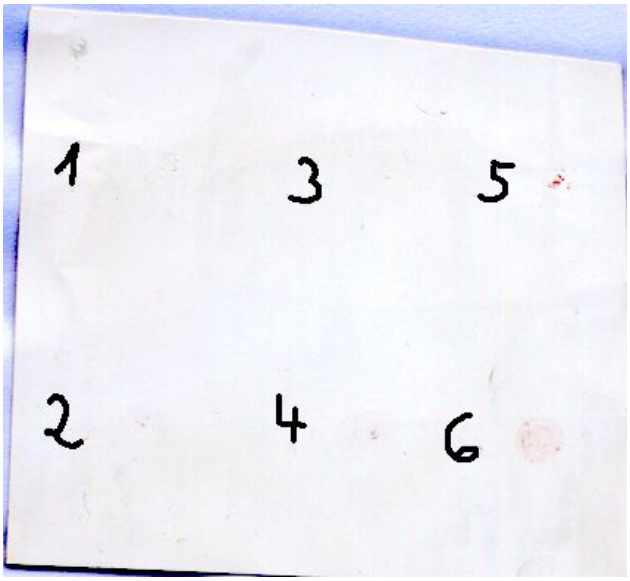


Abb.30: GNA mit 1: Pufferlösung Phosphatpuffer pH 7.5, 2: Hexapeptid (**72**), 3: Hexapeptid (**61**), 4: Hexapeptid (**64**), Hexapeptid (**76**) 6: Hexapeptid (**79**) mit einer Konzentration: 0.1 mg/ml / Volumen 0.5 µl

Auffällig bei allen drei Lektin-Screening-Tests war die Färbung des gemischten Hexapeptides NH_2-(ACPC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH (**79**), welches in allen Fällen die stärkste Anfärbung zeigt und somit die höchste Affinität mit Lektinen aufweist. Selbst bei Lektinen wie PHE-A und GNA, die nur Oligosaccharide oder Mannosebaustein erkennen, war der qualitative Test positiv, wenn auch nur schwache Anfärbungen zu beobachten sind (Abbildung 28, 29 und 30).

Weiter fällt auf, das das Glykopeptid, welches nur Galatosebausteine (**64**) und ein β-Alaninrückgrat enthält, fast gar keine Anfärbung zeigt und somit von Lektinen nicht erkannt wurde. Das Hexapeptid (**72**), das eine geordnete Sekundärstruktur nach NMR-Daten und CD-Spektrum,aufweist, zeigte wie beim Hexapeptid (**64**) und (**76**) eine kaum sichtbare Anbindung an die Lektine. Es müssten weitere Lektine getestet werden, die eine spezifische Anbindung für Galatoseeinheiten besitzen, wie die Lektine *Erythrina corallodendron* (coral tree) (ECorL)[170] oder Soybean (SBA)[171]. Weiter ist interessant, dass der Einbau von ACPC in das Rückgrat (**76**) die Stabilität der Sekundärstruktur nicht erhöht. Es liegt eine flexible Struktur in Lösung vorliegen. Diese Flexibilität erhöhte aber nicht die qualitative Anbindung von Lektinen wie beim Hexapeptid (**79**). Die Anfärbung war wie bei den Hexapeptiden (**61**), (**64**) und (**72**) kaum sichtbar.

Das Hexapeptide NH_2-(ACPC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH (**72**) bietet sich als bester Ligand für Lektine an. Dieses Hexapeptid (**72**), welches nach NMR-Daten und CD-Spektren eine ungeordnete Struktur besitzt, besitzt die beste Anbindung an die Lektine Con A, PHE-A und GNA. Im Fall von GNA imitierte dieses Glykopeptid (**72**) sogar Mannoseeinheiten, sonst wäre eine Anbindung von GNA nicht möglich gewesen[165]. Schlussendlich muss die Struktur NH_2-(ACPC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH (**72**) weiter untersucht werden, es kann aber gesagt werden, dass die hohe Flexibilität des Hexapeptides (**72**) besser in die Bindungstasche der Lektine passt als die starre unflexible Struktur des Hexapeptides (**72**), welches in einer stabilen Sekundärstruktur vorliegt. Eine Möglichkeit wäre das Peptidrückgrat zu verlängern, um eine Faltung des Peptides beobachten zu können, welches die Struktur besser einordnen lässt [56][147]. Weiter müsste die Struktur mittels Molecular Modelling

und zusätzlichen NMR-Methoden ermittelt werden, um eventuelle Besonderheiten aufzudecken, die zur Anbindung der Lektine Con A, PHE-A und GNA führten. Das Gebiet der β-Peptide und ihre Anwendungen in der pharmazeutischen und medizinischen Forschung ist bis heute noch größtenteils unerforscht und wird noch für viele neue Möglichkeiten in der Gestalt und Anwendung interessant bleiben[58][56][55][63].

3. Experimentieller Teil

3.1 Chemikalienliste

Acetonitril puriss (Fluka), β-Alanin (Avocado), 3-Amino-9-ethylcarbazol (Sigma Aldrich), Aminoisobuttersäure (Fluka), 5-Aminopentanol (Fluka), Ammoniumformiat (Fluka), Asparaginsäurederivat (Novabiochem), *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uroniumhexafluorphospat (Fluka),*O*-(*1H*-Benzotriazol-1-yl)-*N*,*N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (Fluka), O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetra-fluoroborat (Fluka), Benzylbromid (Fluka), Bromwasserstoff in Eisessig (33%ige Lösung, Fluka), Chlorameisensäurebenzylester (Fluka), Chlorameisensäurefluorenylmethoxy-carbonylester (Fluka), Chlor-ameisensäureisobutylester (Fluka), Chlorsulfonylisocyanat (Fluka), Celite® 503 (Fluka), Cyclopenten (Fluka), D-Galactose (Fluka), D-Glucose (Fluka), *tert*.-Dibutyldicarbonat (Fluka), Diethylamin (Fluka), *N,N'*-Dicylco-hexylcarbodiimid (Fluka), Diisopropylethylamin (Aldrich), 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (Fluka), 4-Dimethylaminopyridin (Fluka), (-) Ephedrin (Aldrich), 9*H*-Fluorenyl-methoxycarbonylsuccinimid (Fluka), *cis*-Hexahydrophthalsäure-anhydrid (Fluka), 1-Hydroxybenzotriazol (Aldrich), Isobuttersäure (Fluka), Lektine (Sigma Aldrich, EY Laboratories INC.), (*R*)-(+)-Methylbenzylamin (Fluka), (*S*)-(-)-Methylbenzylamin (Fluka), N-Methylmorpholin (Fluka), Molekularsieb 3Å (Roth), Natriumbisulfit-Lösung (32%ig, Fluka), Natriumcyanoborhydrid (Fluka), Natriummethanolat 7N in Methanol (Fluka), 2-Oxocyclopentancarbonsäureethylester (Fluka), Palladium auf Aktivkohle (10%, trocken, Fluka), Pentafluorphenol (Fluka), Phenyliod(III)bis(trifluoroacetat) (Fluka), Polyoxyethylensorbitanmonopalmiat (Fluka), Trifluoressigsäure (Fluka), Tris-(hydroxy-methyl)-aminoethan (Roth).

3.2 Verwendete Geräte

^{1}H- und ^{13}C-Spektren:

Bruker AC 250 (5.9 T; ^{1}H: 250.13 MHz, ^{13}C: 62.86 MHz)
Bruker Avance Ultrashield (9.4 T; ^{1}H: 400.13 MHz, ^{13}C: 100.58 MHz)
Bruker AMX 600 (600 MHz) (Kapillar-NMR)

Interner Standard: Tetramethylsilan (TMS)

Als Lösungsmittel wurde Deuterochloroform verwendet. Falls andere deuterierte Lösungsmittel benutzt wurden, wird dies an der entsprechenden Stelle vermerkt.

Chemische Verschiebungen δ werden in parts per million (ppm) relativ zum internen Standart angegeben.

Die Zuordnungen der Signale erfolgte durch Abgleich mit Vergleichssubstanzen, sowie ^{1}H-^{1}H- COSY und ^{13}C-^{1}H-COSY- Experimente.
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
b: breites Signal

Massenspektroskopie:

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 (2')-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure als Matrix gemessen.

Schmelzpunktbestimmung:

Büchi 510 Melting Point Apparat mit Siliconölbad. Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Drehwertbestimmung:

Perkin-Elmer Polarimeter, Modell 341, Glasküvette (l = 1 dm), Messung bei 20°C.

UV-Spektroskopie:

Shimadzu UV 2102 PC. UV-VIS-Scanning Spekrophotometer. Messung der Absorption der Fmoc-Gruppe bei 300.1 nm.

Analytische Dünnschichtchromatographie:

Polygram SIL G/UV_{254}-Fertigfolien der Firma Macherey-Nagel. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenslöschung und / oder durch Verkohlung nach Besprühen der Plättchen mit einer 5%igen Lösung von Schwefelsäure in Ethanol. In einigen Fällen wurde auch eine 2%ige Lösung von Ninhydrin in Ethanol verwendet.

Präparative Säulenchromatographie:

Glassäulen verschiedener Größe, gepackt mit Kieselgel der Korngröße 0.04-0.063

mm. Die Eluenten werden in den einzelnen Arbeitsschritten angegeben.

HPLC-Chromatographie:

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

Circulardichroismus-Spektroskopie:

JAS-CO J-720 Circulardicchroismus-Spektrophotometer (1 mm Zelle) (Jasco, Japan)

Arbeitsweise:

Alle Lösungsmittel wurden nach literaturbekannten Methoden gereinigt und getrocknet. Alle feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden unter Argon durchgeführt. Lösungen wurde vor Entfernung des Lösungsmittels mit wasserfreiem Natriumsulfat oder mit Magnesiumsulfat getrocknet. Lösungsmittel wurden bei einer Badtemperatur von 40°C im Vakuum entfernt.

3.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Veresterung mit Pentafluorphenol und Dicyclohexylcarbodiimid[111]

Eine Lösung der Carbonsäurekomponente (1.0 mmol) und Pentafluorphenol (1.2 mmol) in 50 ml Essigsäureethylester oder Dimethylformamid wird zunächst mittels Salz/Kochsalz-Mischung auf 0°C gekühlt. Anschließend gibt man in einer Portion *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (1.2 mmol) in 10 ml des zuvor verwendeten Lösungsmittel zu und rührt für 1h bei 0°C, danach bei RT weiter. Nach beendeter Reaktion filtriert man den ausgefallenen *N*-Cyclohexylharnstoff ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der erhaltene Rückstand wird gegebenenfalls chromatographiert oder kristallisiert.

AAV2: Veresterung mit Pentafluorphenol und EDC*HCl [96]

Eine Lösung der Carbonsäurekomponente (1.0 mmol) wird zusammen mit Pentafluorphenol (1.1 mmol) in 100 ml Dichlormethan bei Raumtemperatur und unter Argon gerührt. Anschließend gibt man eine Lösung von EDC (1.1 mmol) in 50 ml Dichlormethan unter Argon dazu und lässt die Mischung 24h bei Raumtemperatur rühren. Dann wird dreimal mit 1 N Salzsäure-Lösung ausgeschüttelt, die wässrigen Phasen dann noch zweimal mit je 50 ml Dichlormethan. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Der aufkonzentrierte Rückstand wird gegebenenfalls chromatographiert oder umkristallisiert.

AAV3: Einführung der Fmoc-Gruppe in Aceton/Wasser und Fmoc-OSu [91]

Eine Lösung der Aminosäurekomponente (1 mmol) in 100 ml Aceton/Wasser (2:1) werden auf 0°C mittels Eis/Kochsalzmischung gekühlt. Dann werden Fmoc-OSu (1mmol) und Natriumhydrogencarbonat (10 mmol) hinzugefügt und bei 0°C für eine Stunde gerührt. Man lässt die Mischung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt über Nacht. Das Aceton wird im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 100 ml Wasser verdünnt und mit 200 ml Diethylether für 1 Stunde bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Die Phasen werden getrennt. Die Etherphase wird danach noch dreimal mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert und die vereinigten Wasserphasen mit 1 N Salzsäurelösung auf pH 2 angesäuert. Dann wird mit dreimal 50 ml Ethylacetat extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand chromatographisch oder kristallisiert.

AAV4: Einführung der Fmoc-Gruppe in THF und Fmoc-OSu [80]

Die Aminosäurekomponente (1 mmol) wird in 15 ml THF bei 0°C gelöst. In die rührende Lösung wird Natriumhydroxid (2 mmol) hinzugefügt, gefolgt von Fmoc-OSu (1 mmol). Hierzu werden dann 7.5 ml Wasser und 7.5 ml THF zugefügt und nach 5 Minuten noch Natriumcarbonat (2 mmol) in 7.5 ml THF. Die Reaktionslösung wird erst 1 h bei 0°C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 1.5 N Salzsäurelösung auf pH 1 angesäuert. Der entstandene Nie-

derschlag wird mit dreimal 50 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen noch dreimal mit 50 ml 1.5 N Salzsäurelösung und dreimal mit 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird chromatographisch aufgereinigt oder kristallisiert.

AAV5: Einführung der Fmoc-Gruppe mit Fmoc-Cl [172] [173][174]

Zu einer 10%igen Natriumcarbonat-Lösung (20 ml) der ungeschützten Aminosäure (1 mmol) werden bei 0°C im Eis/Kochsalz-Bad 1.1 mmol Fmoc-Cl hinzugefügt. Die Mischung wird auf Raumtemperatur aufgetaut und für weitere 2 Stunden bei RT gerührt. Dann wird mit 400 ml Wasser verdünnt und zweimal mit 100 ml Ether gewaschen, um kleinere Mengen von 9-Fluorenylmethanol und Dibenzofulvene zu entfernen. Die wässrige Phase wird dann wieder auf 0°C mittels Eis-Kochsalzbad gekühlt und mit 2N Salzsäurelösung auf pH 2 angesäuert. Es entsteht ein weißerer Niederschlag, der mit dreimal 100 ml Ethylacetat extrahiert wird. Die organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt oder umkristallisiert.

AAV6: Peptidkupplung mit HATU/HBTU/TBTU [107][175]

Zu einer Lösung von 1 mmol Fmoc-β-Aminosäure in 5 ml dest. Dimethylformamid werden bei RT 1 mmol HBTU oder 1 mmol HATU oder 1 mmol TBTU, je nach Methode, 1 mmol Hydroxybenzotriazol und 2 mmol DIPEA zugefügt. Dann wird 1 mmol *tert*.Butyl-β-Aminosäure in 5 ml dest. Dimethylformamid zugefügt und für 30-60 min gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf 100 ml Wasser gegossen. Das Peptid fällt meistens aus und kann abfiltriert werden. Wenn nicht, dann wird dreimal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abzogen und der Rückstand chromatographisch gereinigt.

AAV7: Peptidkupplung mit EDCI/DCC und HOBt [108][122][176][177]

In einer Lösung von einer *N*-terminalen geschützten Aminosäure (1 mmol) in 10 ml DMF werden 1mmol HOBt gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann wird 1 mmol EDC*HCl zur Reaktionsmischung gegeben und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Dann wird für 1 Stunde weitergerührt und anschließend eine Lösung der C-terminal geschützten Aminosäure (1 mmol) mit 0.45 ml *N*-Methylmorpholidin in 5 ml DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird dann für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und auf 100 ml Wasser gegossen. Das Produkt wird mit dreimal mit 50 ml Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

AAV 8:Peptidkupplung mit PyBOP oder BOP [119][178]

Zu einer Lösung von 1 mmol Fmoc-β-Aminosäure in 5 ml dest. Dimethylformamid werden bei RT 1 mmol PyBOP, 1 mmol Hydroxybenzotriazol und 2 mmol DIPEA zugefügt. Dann wird 1 mmol *tert*.Butyl-β-Aminosäure in 5 ml dest. Dimethylformamid zugefügt und für 1-3 h gerührt. Anschließend wird mit 50 ml Chloroform verdünnt und auf 100 ml Wasser gegossen. Die organische Phase wird dreimal mit Wasser gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abzogen und der Rückstand chromatographisch gereinigt.

AAV9: Fmoc-Entschützung mittels Piperidin [172]

Für die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe wird die Fmoc-geschützten Aminosäuren in eine 20%ige oder 5%ige Piperidinlösung in DMF gegeben und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach DC-Kontrolle wird mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wird der Rückstand noch 3-5 mit Toluol koevaporiert und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand kann chromatographisch aufgereinigt.

AAV10: Fmoc-Entschützung mittels Diethylamin [132]

Die Fmoc-geschützte Aminosäure wird zu einer 10%igen Lösung von Diethylamin in Dichlormethan gegeben und bei Raumtemperatur für 2-3h gerührt. Nach DC-Kontrolle wird mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird noch 3-5 mal mit Toluol koevaporiert und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

AAV11: *tert*.Butyl-Entschützung mittels Trifluoressigsäure [112]

Die *tert*.Butyl-geschützte Aminosäure wird zu einer 20%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Chloroform gegeben und für 12-18h bei Raumtemperatur gerührt. Nach DC-Kontrolle wird die Reaktionslösung mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach mehrmaligen Koevaporieren mit Toluol wird im Vakuum getrocknet und gegegenfalls chromatographisch gereinigt.

AAV12: Entschützung der Acetylgruppe mittels Ammoniak in Methanol[179]

Für die Entschützung der Acetylgruppen werden die teilentschützten Glykopeptide zu einer 7N Ammoniaklösung in Methanol gegeben und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach DC-Kontrolle wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Wasser an Biogel säulenchromatographisch aufgereinigt.

AAV 13: Hydrierung der Z-Gruppe mit Palladium auf Aktivkohle[69][93]

Die Z-geschützte Verbindung wird zu einer Ethanollösung mit 10% Palladium auf Aktivkohle in einen Zweihalskolben unter Argonatmosphäre zugegeben. Bei Anwesenheit von Acetylschutzgruppen wird eine katalytische Menge Essigsäure hinzugefügt. Dann wird unter Wasserstoffatmosphäre für 2-5h bei Raumtemperatur hydriert. Nach Beendigung der Z-Entschützung durch DC-Kontrolle wird über Celite abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

3.4 Darstellungen

zu Kapitel 2.3.4.1

N-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure-β-tert-butylester (3)

4.5 g (7.95 mmol) (5-[Benzyloxycarbonylamino]-pentyl-2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid (**1**) wird nach D. Röseling[12] hergestellt und anschließend nach AAV 13 *Z*-entschützt. Dann werden 4.6 g (8 mmol) *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-*tert*-butyl-α-pentafluorphenylester, nach D. Röseling[12] synthetisiert, in Essigsäureethylester gelöst und dann für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. (DC-Kontrolle: Toluol-Aceton 4:1). Nach Reaktionsende konzentriert man die Lösung im Vakuum und reinigt das Rohprodukt chromatographisch auf (PE:EE (2:1).

Ausbeute: 6.8 g (8.2 mmol, 71% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -1.4 (c = 1.0, $CHCl_3$) (Literatur: $[\alpha]_D^{20}$ = -1.1 (c = 1.00, $CHCl_3$)
NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein[12].
FAB-MS für $C_{42}H_{54}N_2O_{15}$ (m/z = 826.9): 827.4 $[M+H]^+$, 849.2 $[M+Na]^+$

N-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure-β-tert-butylester (4)

4.5 g (7.95 mmol) (5-[Benzyloxycarbonylamino]-pentyl-2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactpyranosid (**2**) wird nach D. Röseling[12] hergestellt und anschließend nach AAV 13 *Z*-entschützt. Dann werden 4.6 g (8 mmol) *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-*tert*-butyl-α-pentafluorphenylester, nach D.Röseling[12] synthetisiert, in Essigsäureethylester gelöst und dann für 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. (DC-Kontrolle: Toluol-Aceton 4:1). Nach Reaktionsende konzentriert man die Lösung im Vakuum und reinigt das Rohprodukt chromatographisch auf (PE:EE (2:1).

Ausbeute: 3.6 g (4.4 mmol, 43% der Theorie, 44% der Literatur)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +0.5 (c = 1.0, $CHCl_3$) (Literatur: $[\alpha]_D^{20}$ = +0.6 (c = 1.00, $CHCl_3$)
FAB-MS für $C_{42}H_{54}N_2O_{15}$ (m/z = 826.9): 827.4 $[M+H]^+$, 849.2 $[M+Na]^+$

zu Kapitel 2.3.5.1

Synthese von *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäure (5)

Zu einer Lösung von 100 ml abs. Ethanol werden 6 g (0.26 mol) Natrium in kleinen Stücken in einen 250 ml Zweihalskolben unter Argon eingetragen. Wenn alles Natrium aufgelöst ist, wird 20 g (0.13 mol) *cis*-Hexahydrophthalsäureanhydrid zugegeben und dann für 4h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Ethanol im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 ml dest. Wasser aufgenommen. Die alkalische Lösung wird dreimal mit Diethylether ausgeethert, dann mit Aktivkohle behandelt und über Celite abfiltiert. Das Filtrat wird auf einen pH-Wert zwischen 2 und 1 mit 2 N HCl gebracht. Die *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäure scheidet sich als feiner Niederschlag ab, der aus Wasser kristallisiert wird. Man erhält farblose Kristalle.

Ausbeute: 13.5 g (78.4 mmol, 60% der Theorie)
Schmelzpunkt: 218° C (Literatur: 220 °C)[81]

Enantiomerentrennung der *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäure (6)[80]

In einem 250 ml Rundkolben mit 100 ml Ethanol und (*R*)-1-Phenylethylamin (8,5 g, 35 mmol) wird bei -78°C eine racemische Mischung der *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäure (12 g, 70 mmol) (**5**) in kleinen Portionen zugegeben. Die Mischung wird anschließend 1h bei -78°C gerührt und dann langsam auf Raumtemperatur gebracht. Ein weißer Niederschlag bildet sich, der von der Lösung filtert wird. Dieser Niederschlag wird dreimal in 160 ml Ethanol/Toluol-Mischung (1:1) kristallisiert. Die erhaltenen Kristalle werden in 1N HCl-Lösung gelöst und dreimal mit 50 ml Diethylether ex-

trahiert. Die Lösung wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält weiße Kristalle.

Ausbeute: 1.3 g (7.7 mmol, 11% der Theorie)
Schmelzpunkt: 176°C (Literaturwert: 177°C)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -18.6 (c = 1.0, Aceton) (Literatur: $[\alpha]_D^{20}$ = -18.5 (c = 1.00, Aceton)
NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein[180].

zu Kapitel 2.3.5.2

Darstellung von t*rans*-(-)-Cyclohexandicarbonsäure (6) mit Substilisin[84]

Aus *trans*-(±)-Cylcohexandicarbonsäure (**5**) wird nach J. B. Rogan in Dichlorethan mit Ethanol und Schwefelsäure zum trans-(±)-Cylcohexandicarbonsäurediethylester verestert[85]. Anschließend wird 5.15 g (25 mmol) *trans*-(±)-Cylcohexan-dicarbonsäurediethylester in einer Lösung von 15 ml 0.375 M Tris-Pufferlösung pH 7.5 und 5 ml Dimethylsulfoxid mit 70 mg Substilisin versetzt und zusätzlich noch 3.8 g (35 mmol) Calciumchlorid hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird auf 25°C erwärmt und durch Zugabe von 2M Natriumhydroxid-Lösung bei pH 7.5 gehalten. Nach 6h wird über Celite filtriert, dann zweimal mit Diethylether extrahiert. Das Wasser wird am Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Dichlormethan/MeOH (10:1) gereinigt. Der Monoester wird in Ethanol gelöst und mit 0.6 g (25 mmol) LiOH bei 0°C versetzt und 12h bei 0°C gerührt. Dann wird mit 2N Salzsäure angesäuert auf pH 2 und die Reaktionslösung dreimal mit Diethylester extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittel erhält man weiße Kristalle.

Ausbeute: 0.4 g (2.5 mmol, 14% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -16.2 (c = 1.0, Aceton) (Literatur: $[\alpha]_D^{20}$ = -18.5 (c = 1.00, Aceton)
Schmelzpunkt: 176°C (Literaturwert: 177°C)[180]
NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein[80].

zu Kapitel 2.3.5.3

Darstellung von Fmoc-(1*R*,2*R*)-*trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure (8)[80]

2.2 g (12.8 mmol) *trans*-1,2-Cyclohexandicarbonsäure (**6**) wird in 35 ml Acetylchlorid gegeben und am Rückfluss erhitzt, bis sich die Carbonsäure gelöst hat. Dann wird das überschüssige Acetylchlorid unter Vakuum entfernt. Anschließend wird der weiße Feststoff in Dichlormethan gelöst. Dann wird Ammoniakgas bei Raumtemperatur durch geleitet, bis sich ein weißer Feststoff abscheidet. Das Dichlormethan wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in 100 ml Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst. Es wird 5.5 g (12.8 mmol) PIFA zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur über 18h gerührt. Dann wird mit 140 ml Wasser verdünnt und mit 21 ml konz. HCl angesäuert. Die Lösung wird dreimal mit 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die Etherphase wird noch dreimal mit 10%iger wässrigen Salzsäure gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen im Vakuum zur Trockenen eingeengt. Es wird aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert und man erhält das Hydrochlorid der 2-Aminocyclohexancarbonsäure als weiße Kristalle. Nach AAV 4 werden *trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäurehydrochlorid (**7**) (1,3 g, 7,3 mmol) und 9*H*-Fluorenylmethoxycarbonylsuccinimid (2.5 g, 7.2 mmol) zu *N*-Fmoc-*trans*-2-aminocyclohexancarbonsäure (**8**) umgesetzt. Der Rückstand wird aus Ethylacetat/n-Hexan umkristallisiert. Weiße Kristalle.

Ausbeute: 1,4 g (72% der Theorie)

Literatur: $[\alpha]_D^{20} = -40$ (c = 1.00, Chloroform) (Literatur: $[\alpha]_D^{20} = -42$ (c = 1.00, $CHCl_3$))

Schmelzpunkt: 219°C (Literaturwert 222°C)[181].

zu Kapitel 2.3.5.4

Darstellung von 6-Azabicyclo[3.2.0]heptan-7-on (10)[87]

Zu einer Lösung von 2.5 g (3 ml, 30 mmol) Cyclopenten in 50 ml Dichlormethan bei -78°C werden 2.5 ml (30 mmol) Chlorsulfonylisocyanat über einen Zeitraum von 10 min langsam hinzugetropft. Dann wird für 1h bei -78°C gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionslösung wird für 48 h bei Raumtemperatur weitergerührt, dann langsam auf 50 ml Natriumbisulfit-Lösung gegeben und mit 2N Natronlauge auf pH 10 gebracht. Dann wird die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird am Hochvakuum getrocknet, ein weißer Feststoff bleibt zurück, der säulenchromatographisch aufgereinigt wird (PE/EE 6:4).

Ausbeute: 2.1 g (18.9 mmol, 62% der Theorie)

Schmelzpunkt: 50°C (Literatur: 52-54°C)[87].

Darstellung von *trans*-(±)-Aminocyclopentancarbonsäure (11)[137]

Zu einer Lösung von 2.1 g (18.9 mmol) 6-Azabicyclo[3.2.0]heptan-7-on (**10**) in 50 ml abs. Ethanol werden 0.9 g (36 mmol) hinzugefügt und die Reaktionsmischung wird für 12h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in 18%iger Salzsäure aufgenommen und für weitere 24h am Rückfluss erhitzt. Danach wird die wässrige Salzsäure im Vakuum entfernt und der Rückstand in 30 ml Methanol aufgenommen. Die Lösung wird den unlöslichen Salzen getrennt und das Filtrat zur Trocknen eingeengt und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 3 g (18.9 mmol) quantitativ

Darstellung von *N*-Boc-*trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure (12)[182]

In 300 ml Dioxan/Wasser 2:1-Mischung wird 3 g (18.9 mmol) *trans*-(±)-Aminocyclopentancarbonsäure (**11**) gelöst. Dazu werden K_2CO_3 (26.3 g, 190 mmol) und Boc_2O (4.1 g, 18.9 mmol) 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 $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird aus n-Hexan umkristallisiert und es entstehen farblose Kristalle.

Ausbeute: 2.8 g (12.1 mmol, 64% der Theorie)

NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein[183].

Darstellung von [*N*-(tert-Butyloxycarbonyl)-*trans*-2-aminocyclopentancarbonyl]-(*R*)-(+)-(α)-methylbenzylamin (13)

Zu einer Lösung von 4.8 g (23 mmol) *N*-Boc-*trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure (**12**) in 200 ml trockenem THF werden 2.4 g (23 mmol) N-Methylmorpholin und 3.14 g (23 mmol) Isobutylchloroformiat (ICBF) unter Argon bei -15°C gegeben. Nach 10 min Rühren wird zur Lösung 2.8 g (23 mmol) (*R*)-(+)-α-Methylbenzylamin in 10 ml trockenem THF gegeben. Das Reaktionsgemisch wird noch für eine Stunde bei -15° C gerührt, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 4h gerührt. Dann werden 40 ml Wasser hinzugefügt und die Mischung dreimal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird noch dreimal mit je 75 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Natriumchlorid-Lsg. und Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform/Methanol 19:1)

Diastereomerenmischung: 5.6 g (18.4 mmol, 80% der Theorie)

NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein[86].

Darstellung von (1*S*,2*S*)-2-(*9H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-cyclopentancarbonsäure (16)[86]

5.6 g (18.4 mmol) Diastereomerengemisch (**13**) werden in 40 ml Trifluoressigsäure bei 0°C gelöst und 1h gerührt. Dann wird auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2h gerührt. Die Trifluoressigsäure wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 ml Ethylacetat gelöst, dreimal mit gestättigter Natriumhydrogencarbonatlösung dreimal gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es verbleibt ein gelbes Öl. Das Rohprodukt mit beiden Diasteremeren (**14**) und (**15**) wird durch Säulenchromatographie getrennt (Chloroform/Methanol/Essigsäure (19:1:1). Das Isomere (**15**) wird als erste Fraktion mit einer Ausbeute von 1.9 g (8.2 mmol) isoliert.

1.9 g (8.2 mmol) (**15**) wird anschließend mit 20 ml konz. HCl am Rückfluß für 8 h erhitzt. Dann wird das Wasser entfernt und der Rückstand in 4 ml konz. Ammoniak aufgenommen. Das (*R*)-(+)-(α)-Methylbenzylamin wird durch Extraktion mit dreimal 10 ml Ethylacetat entfernt. Die wässrige Phase wird im Vakuum getrocknet. Zur Isolierung wird das Aminosäurehydrochlorid nach AAV3 Fmoc geschützt und man erhält weiße Kristalle von Fmoc-ACPC (**16**).

Ausbeute: 0.67 g (1.9 mmol, 24 % der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -39 (c = 1.00, Chloroform) (Literatur: $[\alpha]_D^{20}$ = -42 (c = 1.00, $CHCl_3$))

Schmelzpunkt: 220°C (Literaturwert 222°C)[181].

Darstellung des (1*S*,2*S*)-2-[(1',*S*)-Phenylethyl]-aminocyclopentancarbonsäurehydrochlorid (17)

Zu einer Lösung von 2-Oxocyclopentancarbonsäureethylester (11 g, 9.6 ml, 64.7 mmol) in Benzol (100 ml) werden unter Argon 8.0 g (66.1 mmol) (*S*)-(-)-(α)-Methylbenzylamin mit einer katalytischen Menge p-Toluolsulfonsäure am Wasserabscheider für 4-5h zum Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird die organische Phase zweimal mit 50 ml verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen

und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird der Rückstand in 250 ml abs. Ethanol gelöst und unter Argon 50 ml Isobuttersäure zugegeben. Dann wird das Gemisch auf 72°C am Rückfluss erhitzt. Es werden 10.6 g (168.7 mmol) Natriumcyanoborhydrid in 5 Portionen über 6h hinzugegeben. Die Reaktion ist in 6-8 h abgeschlossen. Dann wird mit 100 ml Wasser verdünnt und das Ethanol im Vakuum entfernt. (Vorsicht: HCN-Gas-Bildung möglich). Der Rückstand wird dann mit dreimal 200 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über ein Chromatographiesäule mit Silicalgel filtriert und mit 400 ml Diethylether eluiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in 300 ml Ethylacetat gelöst und mit 19 ml 4N HCl in Dioxan versetzt. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und nach einer Stunde formiert sich ein weißer Niederschlag. Der Feststoff wird isoliert und anschließend aus Ethanol umkristallisiert und dann noch einmal aus Acetonitril.

Ausbeute: 9.4 g (37.7 mmol, 49% der Theorie)

Schmelzpunkt: 238°C (Literaturwert: 240 - 241°C)[90].

Darstellung der (*1S,2S*)-2-[9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino)cyclopentancarbonsäure (16)[90][91]

6.27 g (21 mmol) ((1*S*,2*S*)-2-[(1',*S*)-Phenylethyl]-aminocyclopentancarbonsäurehydrochlorid (**17**) wird in THF/MeOH/H_2O (100 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann werden bei 0°C 4.41 g (105 mmol) LiOH*H_2O hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird für 9h weitergerührt, dann werden (1N, 110 ml) Salzsäure bei 0°C zugegeben und dann das Wasser im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird dann in 400 ml MeOH gelöst, mit 10% Pd-C (2 g) versetzt und mit 6.6 g (105 mmol) Ammoniumformiat für 2-3h am Rückfluss erhitzt. Es wird dann über Celite abfiltriert und das Filtrat zur Trockenen eingeengt. Man erhält das HCl-Salz der (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäure, welches ohne Aufreinigung Fmoc geschützt wird. Dazu wird der weiße Feststoff (21 mmol) in Aceton/Wasser (2:1) gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 17.1 g (210 mmol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Dann wird *9H*-Fluorenylmethoxycarbonylsuccinimid (8.92 g, 26.4 mmol) hinzugegeben und für 1 h Stunde bei 0°C ge-

rührt. Anschließend wird auf Raumtemperatur erwärmt und das Reaktionsgemisch für weitere 18h gerührt.
Anschließend wird mit 100 ml Wasser verdünnt und das Aceton im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit weiteren 300 ml Wasser verdünnt und zusätzlich mit 300 ml Diethylether überschichtet. Diese Mischung wird für 1 Stunde heftig gerührt. Die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird mit 1N HCl angesäuert (pH = 2), dann dreimal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der weiße Feststoff wird aus Dichlormethan/n-Hexan umkristallisiert. Man erhält weiße Kristalle. Chromatographie: Petrolether/Ethylacetat/AcOH (6:3:0.5)

Ausbeute: 4.6 g (13.2 mmol, 63% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -35.6 (c = 1.20, MeOH) (Literatur: $[\alpha]_D^{20}$ = -36.2 (c = 1.21, MeOH))
Schmelzpunkt: 161°C (Literatur: 162-164 °C)[90]
NMR stimmen mit der Literatur überein.
FAB-MS für $C_{21}H_{21}NO_4$ (m/z = 351.1): 352.0 $[M+H]^+$, 473.9 $[M+Na]^+$

zu Kapitel 2.4.6.1

Darstellung von Fmoc-Asp-*OH*-OBn (18) [184]

1.5 g (3 mmol) Fmoc-Asp-*Ot*Bu-OBn, dargestellt nach S. Nakabayash[184], wird mit 3 ml Trifluoressigsäure und 1 ml Anisol *tert*.Butyl-entschützt. Nach 1h wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand chromatographisch aufgereinigt (Chloroform/Methanol 4:1).

Ausbeute: 1.19 g (2.7 mmol, 89% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +11.4 [(c = 1.8, $CHCl_3$), Literatur: $[\alpha]_D^{20}$ = +12 (c = 1.84, $CHCl_3$)
NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein[184].

Darstellung von Fmoc-Asp-OPfp-OBn (19)[111]

Nach AAV1 wird 0.45 g (1mmol) Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) mittels Dicyclohexylcarbodiimid Pentafluorphenol-aktiviert. Nach Kristallisation aus n-Hexan erhält man weiße Kristalle.

Ausbeute: 0.48 g (0.79 mmol, 79% der Theorie)
FAB-MS für $C_{21}H_{21}NO_4$ (m/z = 611.1): 612.3 $[M+H]^+$

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.67 (d, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.49 (d, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.32 (t, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.23 (m, 7H, Fmoc- und Benzylgruppe), 5.73 (s, 2H, -CH_2-Benzyl), 5.13 (s, 1H, C*H*-Asp), 4.71 (m, 2H, -CH_2-Fmoc), 4.33 (m, 1H, CH-Fmoc), 4.15 (m, 1H, -CH_2-Asp), 3.30 (m, 1H, -CH_2-Asp).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 168.1, 165.3, 154.3 (*C*O), 142.1, 139.7, 133.1, 127.1, 127.0, 126.9, 126.2, 125.5, 123.5, 122.9, 118.5 (aromatische C, Fmoc-, Benzyl- und Pentafluorphenol-Gruppe), 66.6 (-*C*H_2-Fmoc), 65.9 (-*C*H_2-Benzyl), 48.8 (-*C*H-Asp), 45.5 (-*C*H-Fmoc), 36.5 (-*C*H_2-Asp-).

zu Kapitel 2.4.6.2

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-β-alanin-pentafluorphenyester (20)**

Nach AAV2 werden *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-β-alanin (2.06 g, 6.62 mmol), dargestellt nach Capino et al.[123], und 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (1.32 g, 6.88 mmol) Pentafluorphenol-aktiviert. Der Rückstand wird an Kieselgel (PE/EE 1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2.92 g (6.1 mmol, 78% der Theorie)
NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein[96].
FAB-MS für $C_{24}H_{16}F_5NO_4$ (m/z = 477.1): 478.1 $[M+H]^+$, 500.1 $[M+Na]^+$

Darstellung von Fmoc-Aib-OPfp (21)[111]

Nach AAV2 werden 1.95 g (6 mmol) Fmoc-Aminoisobuttersäure, dargestellt nach Valle et al.[124], zusammen mit 1.1 g (6 mmol) Pentafluorphenol und 1.4 g DCC Pfp-aktiviert. Nach Aufarbeitung und Kristallisation aus n-Hexan erhält man den aktivierten Baustein Fmoc-Aib-OPfp (**21**).

Ausbeute: 2.2 g (4.5 mmol, 75% der Theorie)
Schmelzpunkt: 132°C (Literatur: 133-135°C)[185].
FAB-MS für $C_{25}H_{18}F_5NO_4$ (m/z = 491.1): 492.0 $[M+H]^+$

zu Kapitel 2.5.1

Darstellung von α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galacto-pyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*-butylester (22)

826 mg (1 mmol) *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert-butylester (**4**) wird nach AAV 10 mit einer 10%igen Lösung von Diethylamin in Dichlormethan bei Raumtemperatur für 3h Fmoc-entschützt. Nach DC-Kontrolle mit PE:EE (1:1) wird mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wird anschließend entfernt. Der Rückstand noch 3-5 mal mit Toluol koevaporiert und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.81 g (1 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (24)

0.81 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert.butylester (**22**) werden zusammen mit 0.52 g (1.1 mmol) Fmoc-β-Ala-OPfp (**20**) in 20 ml Ethylacetat für 12h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das

Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.58 g (0.65 mmol, 65% d. Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +2.1 (c = 1.0, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.69 (d, 2 H, Fmoc), 7.54 (d, 2 H, Fmoc), 7.30 (t, 2 H, Fmoc) , 7.23 (t, 2H, Fmoc), 6.89 (d, 1H, Pentyl-N*H*-Asp-), 6.61 (b, 1H, N*H*-β-Ala-Gruppe), 5.86 (1H, b, NH-β-Ala-Fmoc), 5.31 (m, 1H, H-4, J_{H3-H4} = 3.5 Hz), 5.21 (m, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.96 (m, 2H, NH-C*H*-Asp, H-3), 4.52 (b, 1H, -C*H*-Fmoc), 4.35 (m, 2H, -CH_2-Fmoc), 4.06 (m, 1 H, H-1, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 3.81 (m, 2 H, H-6a und H-6b), 3.42 (m, 3H, H-5 und O-CH_2-), 3.15 (m, 2 H, NH-CH_2-β-Ala), 2.82 (m, 1 H, CH_2-Asp), 2.57 (m, 1 H, -CH_2-Asp-), 2.33 (m, 4H, CH_2-β-Ala, -CH_2-NH), 2.07, 1.98, 1.97, 1.92 (4x s, 12 H, CH_3-Acetyl), 1.43 (m, 2 H, -CH_2-CH_2-NH-), 1.39 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-), 1.36 (s, 9 H, CH_3-*tert*-Butyl), 1.26 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 171.7, 171.2, 170.8, 170.7, 170.6, 156.5 (CO), 144.2, 141.3, 128.1, 127.4, 125.1, 120.8 (Fmoc-Gruppe aromatische C), 101.7 (C-1), 82.1 (C_q-*tert*-Butyl), 71.3 (C-5), 70.2 (C-3), 69.2 (O-*C*H_2-), 67.4 (C-2), 67.1 (-*C*H_2-Fmoc), 66.8 (C-4), 61.3 (C-6), 50.1 (*C*H-Asp), 47.6 (*C*H-Fmoc), 39.8 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 37.3 (*C*H_2-Asp), 36.6 (-NH-CH_2-β-Ala), 36.4 (-*C*H_2-Asp), 36.0 (-CH_2-β-Ala), 29.5 (O-CH_2-*C*H_2-), 29.4 (-*C*H_2-CH_2-NH-), 28.2 (C(*C*H_3)$_3$), 23.5 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 21.6, 21.5, 21.4, 21.2 (CO-*C*H_3).

FAB-MS für $C_{45}H_{59}N_3O_{16}$ (m/z = 897.9): 898.1 $[M+H]^+$, 920.2 $[M+Na]^+$
FT-ICR-MS: $[M+H]^+_{(theor.)}$ = 898.39681, $[M+H]^+_{(gemessen)}$ = 898.38674

Darstellung von NH_2-[β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (26)

0.25 g (0.28 mmol) *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert.butylester (**24**) wird mit einer 10%igen Lösung von Diethylamin in Dichlormethan nach AAV 10 bei Raumtempera-

tur für 3h Fmoc-entschützt. Nach DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2:EtOH (19:1) wird mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wird anschließend entfernt. Der Rückstand noch 3-5 mal mit Toluol koevaporiert und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.21 g (0.28 mmol) quantitativ

Darstellung von Gal-β-Ala-β-Ala (28)

Nach AVV11 werden 0.21 g (0.28 mmol) *N*-β-Alanin-α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert.butylester (**26**) in 20 ml Ethylacetat zusammen mit 0.15 g (0.31 mmol) Fmoc-β-Ala-OPfp (**20**) für 4h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.15 g (0.16 mmol, 56% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -4.5 (c = 0.65, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.69 (d, 2 H, Fmoc), 7.53 (d, 2 H, Fmoc), 7.30 (t, 2 H, Fmoc) , 7.23 (t, 2H, Fmoc), 6.89 (d, 1H, Pentyl-N*H*-Asp-), 6.61 (b, 1H, N*H*-β-Ala-Gruppe), 6.43 (b, 1H, N*H*-β-Ala-Gruppe), 5.82 (1H, b, N*H*-β-Ala-Fmoc), 5.31 (m, 1H, H-4), 5.21 (m, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.93 (m, 1H, H-3, J_{H2-H3} = 10.6 Hz), 4.65 (b, 1H, C*H*-Asp), 4.34 (m, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 8.0 Hz), 4.28 (m, 2H,-CH_2-Fmoc), 4.06 (m, 3 H, H-6a und H-6b, C*H*-Fmoc), 3.81 (m, 2 H, -O-CH_2-, H-5), 3.42 (m, 1 H, -O-CH_2-), 3.38 (m, 4 H, NH-CH_2-β-Ala-), 3.13 (-NH-CH_2-CH_2-), 2.71 (dd, 1 H, CH_2-Asp), 2.55 (dd, 1 H, -CH_2-Asp-), 2.34 (s, 4H, -CH_2-β-Ala-), 2.07, 1.98, 1.97, 1.91 (s, 12 H, CH_3-Acetyl), 1.48 (m, 2 H, -CH_2-CH_2-NH-), 1.40 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-), 1.36 (s, 9 H, CH_3-*tert*-Butyl), 1.26 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 175.9, 171.6, 171.5, 171.3, 170.4, 170.2, 170.1, 169.7, 156.5 (CO), 143.9, 141.2, 127.6, 127.0, 125.1, 119.9 (Fmoc-Gruppe, aromatische C), 101.3 (C-1), 81.9 (C_q-*tert.*Butyl), 70.8 (C-5), 70.6 (C-3), 69.9 (O-*C*H_2-), 68.9 (C-2), 66.9 (-*C*H_2-Fmoc), 61.6 (C-4), 49.9 (*C*H-Asp), 47.6 (*C*H-Fmoc), 39.8 (-*C*H_2-NH-), 37.2 (*C*H_2-Asp), 36.2 (-NH-*C*H_2-β-Ala), 35.9 (-*C*H_2-β-Ala), 35.6 (-*C*H_2-β-Ala), 29.5 (O-CH_2-

CH_2-), 29.4 (-*C*H_2-CH_2-NH-), 28.4 (C(*C*H_3)$_3$), 23.5 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{48}H_{64}N_4O_{17}$ (m/z = 968.4) = 969.3 $[M+H]^+$
FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 991.41587, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 991.41707

Darstellung von α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*-butylester (23)

826 mg (1 mmol) N-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert-butylester (**3**) wird mit einer 10%igen Lösung von Diethylamin in Dichlormethan nach AAV 13 bei Raumtemperatur für 2-3h Fmoc-entschützt. Nach DC-Kontrolle mit (PE:EE (1:1) wird mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wird anschließend entfernt. Der Rückstand wird noch 3-5 mal mit Toluol koevaporiert und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.77 g (1 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (25)

0.77 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl]-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure-β-tert-butylester (**23**) werden in 20 ml Ethylacetat zusammen mit 0.52 g (1.1 mmol) Fmoc-β-Ala-OPfp (**20**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.55 g (0.61 mmol) entspricht 61% d. Theorie
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -5.1 (c = 1.0, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.72 (d, 2 H, Fmoc), 7.55 (d, 2 H, Fmoc), 7.34 (t, 2 H, Fmoc) , 7.27 (t, 2H, Fmoc), 7.03 (d, 1H, Pentyl-N*H*-Asp-), 6.47 (b, 1H, N*H*-β-Ala-Gruppe), 5.71 (1H, b, N*H*-β-Ala-Fmoc), 5.35 (m, 1H, H-3, J_{H2-H3} = 9.6 Hz), 5.15 (m, 1H, H-4, J_{H4-H5} = 9.8 Hz), 4.99 (m, 1H, H-2, J_{H2-H1} = 8.1 Hz), 4.69 (b, 1H, C*H*-Asp),

4.34 (m, 1H, H1, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.16 (m, 3H, -C*H*$_2$-Fmoc, H-6a), 4.06 (m, 2 H, H-6b, -C*H*$_2$-Fmoc), 3.84 (m, 1H,-C*H*-Fmoc), 3.61 (m, 1 H, O-C*H*$_2$-), 3.43 (m, 2H, H-5 und O-C*H*$_2$-*),* 3.17 (m, 2 H, -NH-C*H*$_2$-β-Ala), 2.73 (dd, 1 H, C*H*$_2$-Asp), 2.56 (dd, 1 H, -C*H*$_2$-Asp-), 2.33 (m, 4H, -C*H*$_2$-β-Ala, -C*H*$_2$-NH), 2.11, 2.02, 2.00, 1.95 (s, 12 H, C*H*$_3$-Acetyl), 1.53 (m, 2 H, -C*H*$_2$-CH_2-NH-), 1.44 (m, 2 H, O-CH_2-C*H*$_2$-), 1.39 (s, 9 H, C*H*$_3$-*tert.*-Butyl), 1.29 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 172.1, 171.9, 171.7, 170.8, 170.7, 170.6, 158.7 (CO), 144.4, 141.7, 128.1, 127.5, 125.5, 120.4 (Fmoc-Gruppe aromat.), 100.1 (C-1), 82.3 (C_q-*tert.*Butyl), 72.8 (C-3), 71.7 (C-5), 71.3 (C-2), 69.4 (O-*C*H_2-), 68.2 (C-4), 67.4 (-*C*H_2-Fmoc), 61.6 (C-6), 51.2 (*C*H-Asp), 47.6 (*C*H-Fmoc), 39.8 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 37.7 (-NH-*C*H_2-β-Ala), 36.6 (-*C*H_2-Asp), 36.0(-*C*H_2-β-Ala), 29.5 (O-CH_2-*C*H_2-), 29.4 (-*C*H_2-CH_2-NH-), 28.4 (C(*C*H_3)$_3$), 23.5 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 21.4, 21.2, 21.1, 21.0 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{45}H_{59}N_3O_{16}$ (m/z = 897.9) : 898.1 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+H]^+_{(theor.)}$ = 898.39681, $[M+H]^+_{(gemessen)}$ = 898.38684

Darstellung von NH_2-[β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (27)

0.25 g (0.28 mmol) Fmoc-[β-Ala-(AcGlucBB)]-OtBu (**25**) wird mit einer 10%igen Lösung von Diethylamin in Dichlormethan nach AAV 13 bei Raumtemperatur für 2h Fmoc-entschützt. Nach DC-Kontrolle mit (Dichlormethan/Ethanol (19:1)) wird mit Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wird anschließend entfernt. Der Rückstand noch 3-5 mal mit Toluol koevaporiert und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.19 g (0.28 mmol) quantitativ

Darstellung von Gluc-β-Ala-β-Ala (29)

0.19 g (0.28 mmol) *N*-β-Alanin-α-[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**27**) in 20 ml Ethylacetat zusammen mit

0.15 g (0.31 mmol) Fmoc-β-Ala-OPfp (**20**) für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.15 g (0.17mmol, 56% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -12.5 (c = 0.75, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.73 (d, 2 H, Fmoc), 7.57 (d, 2 H, Fmoc), 7.36 (t, 2 H, Fmoc) , 7.27 (t, 2H, Fmoc), 7.00 (d, 1H, Pentyl-N*H*-Asp-), 6.68 (b, 1H, NH-β-Ala-Gruppe), 6.43 (b, 1H, NH-β-Ala-Gruppe), 5.70 (1H, b, NH-β-Ala-Fmoc), 5.16 (m, 1H, H-3, J_{H2-H3} = 9.6 Hz), 5.05 (m, 1H, H-4, J_{H4-H5} = 9.8 Hz) 4.93 (m, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.68 (b, 1H, C*H*-Asp), 4.41 (m, 1H, H-1,J_{H1-H2} = 8.1 Hz) 4.33 (m, 2H, -CH_2-Fmoc), 4.20 (m, 2H, H-6a,C*H*-Fmoc), 4.08 (m, 1H, H-6b), 3.81 (m, 1H, O-CH_2-), 3.64 (m, 2H, H-5, O-CH_2-), 3.45 (m, 4H, NH-CH_2-β-Ala), 3.16 (m, 2 H, -CH_2-NH), 2.75 (dd, 1 H, CH_2-Asp), 2.57 (dd, 1 H, -CH_2-Asp-), 2.33 (s, 4H, -CH_2-β-Ala), 2.04, 2.01, 1.98, 1.97 (s, 12 H, CH_3-Acetyl), 1.51 (m, 2 H, -CH_2-CH_2-NH-), 1.41 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-), 1.39 (s, 9 H, CH_3-*tert.*Butyl), 1.29 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 171.5, 171.3, 170.7, 170.3, 169.6, 169.4, 161.2, 156.5 (*C*O), 143.9, 143.7, 141.2, 127.6, 127.0, 125.2, 119.9 (Fmoc-Gruppe, aromatische C), 100.8 (C-1), 81.7 (C_q-*tert*-Butyl), 72.7 (C-3), 71.7 (C-5), 71.3 (C-2), 69.9 (O-CH_2-), 68.4 (C-4), 66.7 (-*C*H_2-Fmoc), 61.9 (C-6), 49.4 (*C*H-Asp), 47.2 (*C*H-Fmoc), 39.4 (-*C*H_2-Asp), 37.3 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 37.2 (NH-*C*H_2-β-Ala), 36.2 (NH-*C*H_2-β-Ala), 36.0 (-*C*H_2-β-Ala), 35.7 (-*C*H_2-β-Ala), 29.0 (O-CH_2-*C*H_2-), 28.9(-*C*H_2-CH_2-NH-), 28.1 (C(*C*H_3)$_3$), 23.1 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{48}H_{64}N_4O_{17}$ (m/z = 968.4) = 969.2 $[M+H]^+$,991.2 $[M+H]^+$
FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 991.41587, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 991.41540

Darstellung von 3-Aminopropionsäure-*tert.*butylester (30)

Nach AAV 13 wird eine Lösung von 1.39 g (5 mmol) 3-(Benzyloxycarbonylamino)-propionsäure-tert-butylester, dargestellt nach Takeda et al.[186], und Palladium auf

Aktivkohle (50 mg) unter Wasserstoffatmosphäre *Z*-entschützt. Nach beendeter Reaktion wird der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird ohne weiteres Aufarbeiten umgesetzt.

Ausbeute: 0.79 g (5 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-*tert*.Butylester (31)[79]

Zu einer Lösung von 0.79 g (5 mmol) 3-Aminopropionsäure-*tert*-butylester (**30**) in 25 ml Dichlormethan wird 1.77 g (5 mmol) *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-β-alanin-pentafluorphenyester (**32**) hinzugefügt und für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (DC-Kontrolle: PE-EE 1:1). Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.49 g (3.4 mmol, 68% der Theorie)
Schmelzpunkt: 126°C
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ = 7.69 (d, 2 H, Fmoc), 7.52 (d, 2 H, Fmoc), 7.32 (t, 2 H, Fmoc), 7.24 (t, 2 H, Fmoc), 4.29 (d, 2 H, -C*H*$_2$-Fmoc) 4.14 (m, 1 H, -C*H*-Fmoc), 4.06 (m, 2 H, -NH-CH_2-CH_2-CO-NH-C*H*$_2$-CH_2-), 3.42 (m, 2 H, -NH-C*H*$_2$-CH_2-CO-NH-CH_2-CH_2-), 2.36 (m, 4 H, -NH-CH_2-C*H*$_2$-CO-NH-CH_2-C*H*$_2$-), 1.38 (s, 9 H, C(C*H*$_3$)$_3$).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ = 174.0 (-CH_2-CH_2-*C*O-NH-CH_2-CH_2-), 172.1 (-*C*O-C(CH_3)$_3$), 159.3 (-O-*C*O-NH-CH_2-), 146.7, 144.1, 130.4, 129.8, 127.9, 122.7 (Fmoc, aromatische C), 84.0 (C_q-*tert.*Butyl), 69.5 (Fmoc-*C*H_2-O-), 50.0 (-NH-*C*H_2-CH_2-CO-NH-), 39.8 (-NH-CH_2-CH_2-CO-NH-*C*H_2-), 38.7 (-*C*H-CH_2-CO-), 37.8 (-NH-CH_2-*C*H_2-CO-NH-CH_2-), 37.8 (-CO-NH-CH_2-*C*H_2-CO-), 30.9 (C(*C*H_3)$_3$).

FAB-MS für $C_{25}H_{30}N_2O_5$ (m/z = 438.2): 439.1 $[M+H]^+$, 461.1 $[M+Na]^+$

Darstellung von Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-OH (32)

Nach AAV 11 wird 0.74 g (1.7 mmol) Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-*tert*.Butylester (**31**) mit einer Lösung von 20%igen TFA in DMF *tert*.Butyl-entschützt. Es wird für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mit Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird noch dreimal mit Toluol koevaporiert. Das erhaltene gelbe Öl wird ohne Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 0.65 g (1.7 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-OPfp (33)

Nach AAV 1 werden 0.65 g (1.7 mmol) Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-OH (**32**) und 0.35 mg (1.9 mmol) Pentafluorphenol mit 0.39 g (1.9 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid bei 0°C für 1 Stunden gerührt. DC-Kontrolle: PE-EE (1:1). Nach beendeter Reaktion filtriert man den ausgefallenen *N*-Cyclohexylharnstoff ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der erhaltene Rückstand wird an Kieselgel chromatographisch gereinigt (PE-EE 1:1).

Ausbeute: 0.88 g (1.6 mmol, 94% der Theorie)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ = 7.68 (d, 2 H, Fmoc), 7.51 (d, 2 H, Fmoc), 7.31 (t, 2 H, Fmoc), 7.22 (t, 2 H, Fmoc), 5.99 (b, 1 H, -N*H*-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-), 5.36 (b, 1 H, -NH-CH_2-CH_2-CO-N*H*-CH_2-), 4.30 (d, 2 H, -C*H*$_2$-Fmoc), 4.13 (m, 1 H, -C*H*-Fmoc), 3.57 (d, 2 H, -NH-CH_2-CH_2-CO-NH-C*H*$_2$-CH_2-), 3.43 (d, 2 H, -NH-C*H*$_2$-CH_2-CO-NH-CH_2-CH_2-), 2.87 (t, 2 H, -NH-CH_2-C*H*$_2$-CO-NH-CH_2-CH_2-), 2.36 (m, 2 H, -NH-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-C*H*$_2$-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ = 172.8 (-CH_2-CH_2-*C*O-NH-CH_2-CH_2-), 158.1 (-O-*C*O-NH-CH_2-), 144.4, 144.3, 141.7, 128.1, 127.4, 125.5, 120.3 (Fmoc, aromatische C), 67.1 (Fmoc-*C*H_2-O-), 47.6 (-NH-*C*H_2-CH_2-CO-NH-), 37.3 (-NH-CH_2-CH_2-CO-NH-*C*H_2-), 36.3 (-*C*H-CH_2-CO-), 34.3 (-NH-CH_2-*C*H_2-CO-NH-CH_2-), 33.8 (-CO-NH-CH_2-*C*H_2-CO).

FAB-MS für $C_{27}H_{21}F_5N_2O_5$ (m/z = 548.1): 549.0 $[M+H]^+$, 571.0 $[M+Na]^+$

Darstellung von Gal-β-Ala-β-Ala (28):

a) Pentafluorphenol-Methode:

0.65 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**22**) in 20 ml Dichlormethan wird zusammen mit 0.61 g (1.1 mmol) Fmoc-β-Ala-β-Ala-OPfp (**33**) für 12h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.64 g (0.67 mmol, 67% der Theorie)

b) EDCI/HOBt-Methode

Nach AAV 7 werden 0.65 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**22**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.38 g (1 mmol) Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH (**32**) für 1h bei 0°C gerührt, danach bei Raumtemperatur für weitere 18h gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.11 g (0.12 mmol, 12% der Theorie)

c) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.65 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert.butylester (**22**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.38 g (1 mmol) Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH (**32**) für 5h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH(19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.52 g (0.54 mmol, 54% der Theorie)

c) TBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.65 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert.butylester (**22**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.38 g (1 mmol) Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH (**32**) für 4h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.33 g (0.34 mmol, 34% der Theorie)

c) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.65 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-tert.butylester (**22**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.38 g (1 mmol) Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH (**32**) für 4h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.43 g (0.44 mmol, 44% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -4.5 (c = 0.65, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.69 (d, 2 H, Fmoc), 7.53 (d, 2 H, Fmoc), 7.30 (t, 2 H, Fmoc) , 7.23 (m, 7H, Fmoc/Benzylgruppe), 6.89 (d, 1H, Pentyl-NH-Asp-), 6.61 (b, 1H, N*H*-β-Ala-Gruppe), 6.43 (b, 1H, N*H*-β-Ala-Gruppe), 5.82 (1H, b, N*H*-β-Ala-Fmoc), 5.31 (m, 1H, H-4), 5.21 (m, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.93 (m, 1H, H-3, J_{H2-H3} = 10.6 Hz), 4.65 (b, 1H, CH-Asp), 4.34 (m, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 8.0 Hz), 4.28 (m, 2H,-C*H*$_2$-Fmoc), 4.06 (m, 3 H, H-6a und H-6b, C*H*-Fmoc), 3.81 (m, 2 H, -O-CH_2-, H-5), 3.42 (m, 1 H, -O-CH2-), 3.38 (m, 4 H, NH-CH_2-β-Ala-), 3.13 (-NH-C*H*$_2$-CH_2-), 2.71 (dd, 1 H, CH_2-Asp), 2.55 (dd, 1 H, -CH_2-Asp-), 2.34 (s, 4H, -CH_2-β-Ala-), 2.07, 1.98, 1.97, 1.91 (s, 12 H, CH_3-Acetyl), 1.48 (m, 2 H, -CH_2-CH_2-NH-), 1.40 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-), 1.36 (s, 9 H, CH_3-tert-Butyl), 1.26 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 175.9, 171.6, 171.5, 171.3, 170.4, 170.2, 170.1, 169.7, 156.5 (CO), 143.9, 141.2, 127.6, 127.0, 125.1, 119.9 (Fmoc-Gruppe aromatische C),

101.3 (C-1), 81.9 (C_q-*tert.*Butyl), 70.8 (C-5), 70.6 (C-3), 69.9 (O-*C*H_2-), 68.9 (C-2), 66.9 (-*C*H_2-Fmoc), 61.6 (C-4), 49.9 (*C*H-Asp), 47.6 (*C*H-Fmoc), 39.8 (-*C*H_2-NH-), 37.2 (*C*H_2-Asp), 36.2 (-NH-*C*H_2-β-Ala), 35.9 (-*C*H_2-β-Ala), 35.6 (-*C*H_2-β-Ala), 29.5 (O-CH_2-*C*H_2-), 29.4 (-*C*H_2-CH_2-NH-), 28.4 (C(*C*H_3)$_3$), 23.5 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{48}H_{64}N_4O_{17}$ (m/z = 968.4) = 969.3 $[M+H]^+$
FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 991.41587, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 991.41707

Darstellung von Gluc-β-Ala-β-Ala (29):

0.67 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**23**) in 20 ml Dichlormethan zusammen mit 0.61 g (1.1 mmol) Fmoc-β-Ala-β-Ala OPfp (**33**) für 12h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.55 g (0.57 mmol, 57% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -12.5 (c = 0.75, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.73 (d, 2 H, Fmoc), 7.57 (d, 2 H, Fmoc), 7.36 (t, 2 H, Fmoc) , 7.27 (t, 2H, Fmoc), 7.00 (d, 1H, Pentyl-N*H*-Asp-), 6.68 (b, 1H, NH-β-Ala-Gruppe), 6.43 (b, 1H, NH-β-Ala-Gruppe), 5.70 (1H, b, NH-β-Ala-Fmoc), 5.16 (m, 1H, H-3, J_{H2-H3} = 9.6 Hz), 5.05 (m, 1H, H-4, J_{H4-H5} = 9.8 Hz) 4.93 (m, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.68 (b, 1H, C*H*-Asp), 4.41 (m, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 8.1 Hz) 4.33 (m, 2H, -C*H*$_2$-Fmoc), 4.20 (m, 2H, H-6a,C*H*-Fmoc), 4.08 (m, 1H, H-6b), 3.81 (m, 1H, O-C*H*$_2$-), 3.64 (m, 2H, H-5, O-C*H*$_2$-), 3.45 (m, 4H, NH-C*H*$_2$-β-Ala), 3.16 (m, 2 H, -C*H*$_2$-NH), 2.75 (dd, 1 H, C*H*$_2$-Asp), 2.57 (dd, 1 H, -C*H*$_2$-Asp-), 2.33 (s, 4H, -C*H*$_2$-β-Ala), 2.04, 2.01, 1.98, 1.97 (s, 12 H, C*H*$_3$-Acetyl), 1.51 (m, 2 H, -C*H*$_2$-CH_2-NH-), 1.41 (m, 2 H, O-CH_2-C*H*$_2$-), 1.39 (s, 9 H, C*H*$_3$-*tert.*Butyl), 1.29 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 171.5, 171.3, 170.7, 170.3, 169.6, 169.4, 161.2, 156.5 (*C*O), 143.9, 143.7, 141.2, 127.6, 127.0, 125.2, 119.9 (Fmoc-Gruppe aromatische

C), 100.8 (C-1), 81.7 (C_q-*tert*-Butyl), 72.7 (C-3), 71.7 (C-5), 71.3 (C-2), 69.9 (O-CH_2-), 68.4 (C-4), 66.7 (-CH_2-Fmoc), 61.9 (C-6), 49.4 (*C*H-Asp), 47.2 (*C*H-Fmoc), 39.4 (-CH_2-Asp), 37.3 (-CH_2-NH-Pentyl), 37.2 (NH-CH_2-β-Ala), 36.2 (NH-CH_2-β-Ala), 36.0 (-CH_2-β-Ala), 35.7 (-CH_2-β-Ala), 29.0 (O-CH_2-CH_2-), 28.9(-CH_2-CH_2-NH-), 28.1 (C(CH_3)$_3$), 23.1 (O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{48}H_{64}N_4O_{17}$ (m/z = 968.4) = 969.2 $[M+H]^+$,991.2 $[M+H]^+$
FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 991.41587, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 991.41540

zu Kapitel 2.5.2

Darstellung von NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (34)[184]

1 g (2 mmol) Fmoc-Asp-*Ot*Bu-OBn, dargestellt nach S. Nakabayash et al.[184], werden nach AAV 9 mit 5%iger Piperidinlösung in DMF bei Raumtemperatur 2h gerührt. Mittels DC-Kontrolle ($CHCl_3$:MeOH (4:1)) wird der Verlauf der Entschützung kontrolliert. Dann verdünnt man mit Toluol und koevaporiert 3-5 mal, bis kein Geruch nach Piperidin mehr wahrgenommen werden kann. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.62 g (2 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-(Asp-Asp)-*Ot*Bu (35)

a) EDCI/HOBt-Methode

0.62 g (2 mmol) NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) werden nach AAV 7 in 10 ml DMF zusammen mit 0.89 g (2 mmol) Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) für 1h bei 0°C gerührt, danach bei Raumtemperatur für 18h gerührt. DC-Kontrolle mit Petrolether/Ethylacetat (1:1). Das

Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.48 g (0.68 mmol, 34% der Theorie)

b) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.62 g (2 mmol) NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.89 g (2 mmol) Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Petrolether/Ethylacetat (1:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether/ Ethylacetat (1:1) und danach mittels HPLC mit einem Gradienten (n-Heptan/Ethylacetat – 90:10 zu 60:40) eluiert.

Ausbeute: 0.71 g (1 mmol, 50% der Theorie)

c) TBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.62 g (2 mmol) NH2-Asp-OtBu-OBn (**34**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.89 g (2 mmol) Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit PE/EE (1:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit PE/EE (1:1) und danach mittels HPLC mit einem Gradienten (n-Heptan/Ethylacetat – 90:10 zu 60:40) eluiert.

Ausbeute: 0.44 g (0.62 mmol, 31% der Theorie)

d) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.62 g (2 mmol) NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.89 g (2 mmol) Fmoc-Asp-OH-OBn (**18**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Petrolether/Ethylacetat (1:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (1:1)

und danach mittels HPLC mit einem Gradienten (n-Heptan/Ethylacetat – 90:10 zu 60:40) eluiert.

Ausbeute: 0.59 g (0.84 mmol, 42% der Theorie)

e) Pentafluorphenol-Aktivester-Methode

0.62 g (2 mmol) NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) werden in 20 ml DMF zusammen mit 1.22 g (2 mmol) Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**18**) für 12h bei Raumtemperatur in Ethylacetatgerührt. DC-Kontrolle mit Petrolether/Ethylacetat (1:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.59 g (0.96 mmol, 48% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +15.3 (c = 1.0, Chloroform)
^{1}H-NMR: (DMSO-d_6): δ = 7.78 (d, 2H, Fmoc), 7.63 (d, 2H, Fmoc) 7.34 (m, 14 H, Aromaten von Fmoc- und Bn-Gruppe), 6.69 (d, 1H, -NH-Asp), 6.21(d, 1H, -NH-), 5.21 (m, 4H, -CH_2-Benzyl), 4.84 (m, 1H, C*H*-Asp), 4.82 (m, 1H, C*H*-Asp), 4.41-4.23 (m, 3H, C*H*- und C*H*$_2$-Fmoc), 2.96-2.68 (2dd, 4H, C*H*$_2$-Asp), 1.22 (s, 9H, *tert*.Butyl).
^{13}C-NMR: (DMSO-d_6): δ = 171.5, 170.7, 169.1, 169.0 156.0 (*C*O), 144.3, 141.6, 135.8, 135.5, 130.4, 129.0, 128.7, 128.5, 128.2, 127.9, 127.8, 127.3, 125.4, 125.2, 120.7, 120.3 (14 C, aromat. Fmoc und Benzyl), 82.2 (C_q-*tert*.Butyl), 66.4 (-*C*H_2-Fmoc), 66.3 (-*C*H_2-Benzyl) 66.1 (-*C*H_2-Benzyl), 51.3 (-*C*H-Asp), 49.2 (-*C*H-Asp), 47.2 (-*C*H-Fmoc), 38.1 (-*C*H_2-Asp), 37.6 (-*C*H_2-Asp), 28.4 (9C, *tert*.Butyl)

FAB-MS für $C_{41}H_{42}N_2O_9$ (m/z = 706.29) = 707.2 $[M+H]^+$

Darstellung von Fmoc-(Asp-Asp)-OH (36)

Nach AAV11 wird der 0.70 g (1mmol) Fmoc-(Asp-Asp)-OtBu (**35**) für 2h mit einer 20%igen TFA-Lösung in Dichlormethan *tert*.Butyl-entschützt. Nach Abzug des Lösungsmittel wird der Rückstand 5 mal mit 50 ml Toluol koevaporiert. Wenn kein Ge-

ruch nach Trifluoressigsäure mehr vorhanden ist, wird im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wird ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.68 g (1mmol, quantitativ)

Darstellung von Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (37)

a) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.70 g (1mmol) Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.61 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/ EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.13 g (0.11 mmol,11% der Theorie)

b) EDCI/HOBt-Methode

0.70 g (1mmol) Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**) werden nach AAV 7 in 10 ml DMF zusammen mit 0.62 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 1h bei 0°C gerührt, danach bei Raumtemperatur für weitere 18h. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/ EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/ EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.11 g (0.09 mmol, 9% der Theorie)

c) TBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.70 g (1mmol) Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.62 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**22**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt.

DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/ EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.22 g (0.18 mmol, 18% der Theorie)

d) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.70 g (1mmol) Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.62 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.39 g (0.32 mmol, 32% der Theorie)

e) HATU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.70 g (1mmol) Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.63 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**22**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.34 g (0.84 mmol, 28% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +8.8 (c = 0.5, Chloroform)
1H-NMR: (d_6-DMSO): δ(ppm) = 8.31 (d, 1H, Asp-N*H*-Asp-), 8.15 (d, 1H, Asp-N*H*-Asp), 7.76 (d, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.58 (d, 1H, Asp-N*H*-Fmoc), 7.52 (t, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.23 (t, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.15 (m, 12H, Benzyl-, Fmoc-Gruppe), 5.09 (m, 1H, H-3, J_{H2-H3} = 10.6 Hz), 4.99 (m, 1H, H-4, J_{H3-H4} = 3.53 Hz), 4.90 (m, 5H,-CH_2-Benzyl,-C*H*-Asp), 4.76 (m, 1H, H-2, J_{H2-H3} = 9.5 Hz), 4.48 (m, 2H, -CH_2-Fmoc), 4.38 (m, 2H, H-1, C*H*-Asp), 4.10 (m, 2H, H-6a, C*H*-Asp), 4.02 (m, 2H, H-6b, C*H*-Fmoc), 3.87

(m, 2H, H-5, -O-C*H*$_2$-), 3.52 (m, 1H, -O-C*H*$_2$-), 2.87 (m, 2H,-C*H*$_2$-NH-Pentyl), 2.56 (m, 2H, C*H*$_2$-Asp), 2.43 (m, 2H, C*H*$_2$-Asp), 2.21 (m, 2H, C*H*$_2$-Asp), 1.92, 1.84, 1.80, 1.73, (s, 12H, Acetyl), 1.27 (m, 2H,O-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 1.17 (m, 11H, C(CH3)$_3$, O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-NH-), 1.07 (m, 2H, O-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH).

^{13}C-NMR: (d$_6$-DMSO): δ(ppm) = 171.7, 171.5, 170.3, 170.1, 169.9, 169.7, 169.5, 169.3, 169.0, 162.6, 156.2 (*C*O), 144.3, 143.2, 141.4, 138.1, 135.2, 128.7, 128.3, 128.0, 127.9, 127.6, 127.4, 127.0, 125.6, 120.5 (Fmoc, Benzyl, aromat.), 100.2 (C-1), 80.9 (C$_q$), 70.6 (C-5), 70.1(C-3), 69.3 (-O-*C*H$_2$-), 69.0 (C-2), 67.7(C-4), 66.3(-*C*H$_2$-Benzyl), 66.2(-*C*H$_2$-Benzyl), 64.0(-*C*H$_2$-Fmoc), 61.5(C-6), 50.9 (*C*H-Asp), 49.8 (*C*H-Asp), 49.6 (*C*H-Asp), 46.9 (CH-Fmoc), 38.9 (-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 38.6 (-C*H*$_2$-Asp), 37.2 (-C*H*$_2$-Asp), 36.9 (-C*H*$_2$-Asp), 31.1(O-CH$_2$-*C*H$_2$-), 28.9 (-*C*H$_2$-CH$_2$-NH-), 27.9 (*tert.*Butyl), 23.1 (O-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (Acetylgruppen).

FAB-MS für $C_{64}H_{76}N_4O_{21}$ (m/z = 1236.5): 1237.2 $[M+H]^+$

Maldi-TOF für $C_{64}H_{76}N_4O_{21}$ (m/z = 1236.5): = 1259.58 $[M+Na]^+$

Darstellung von Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (38)

HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.70 g (1mmol) Fmoc-(Asp-Asp)-OH (**36**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.63 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**23**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH(19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.38 g (0.31 mmol, 31% der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +3.1 (c = 0.5, Chloroform)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.68 (d, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.52 (d, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.32 (m, 14H, Fmoc-, Benzylgruppen), 6.97 (d, 1H, Pentyl-NH-Asp-), 6.81 (d, 1H, Asp-NH-Asp-), 6.64 (d, 1H, Asp-NH-Asp-), 6.25 (d, 1H, Asp-NH-Fmoc), 5.31 (m, 1H,

H-3), 5.13 (m, 6H,-C*H*$_2$-Benzyl, H-4, H-2), 4.64 (m, 1H, C*H*-Asp), 4.77 (m, 1H, C*H*-Asp), 4.65 (m, 2H,--C*H*$_2$-Fmoc), 4.36 (m, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.08 (m, 4H, H-6a, H-6b, C*H*-Fmoc, H-5), 3.81 (m, 2H, -O-C*H*$_2$-), 3.12 (m, 2H,-C*H*$_2$-NH-Pentyl), 2.73-2.39 (m, 6H,-CH$_2$-Asp), 2.06, 1.98, 1.97, 1.91 (s, 12H, Acetyl), 1.50 (m 2H, O-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 1.36 (m, 11H, C(CH3)$_3$), O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-NH-), 1.25 (m, 2H, O-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 170.2. 169.3, 169.1, 168.9, 168.6, 168.5, 155.1 (CO), 142.8, 142.7, 140.2, 134.3, 134.1, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2, 127.0, 126.6, 126.0, 124.2, 124.1, 118.9 (Fmoc, Benzylgruppen, aromat.), 100.2 (C-1), 80.9 (C_q, *tert*.Butyl), 69.8 (C-3), 69.5 (C-5), 68.8 (C-2), 67.9 (-O-*C*H$_2$-), 66.5 (C-4), 66.4 (-*C*H$_2$-Fmoc), 66.2 (-*C*H$_2$-Benzyl), 65.9 (-*C*H$_2$-Benzyl), 60.2 (C-6), 49.9 (*C*H-Asp), 48.3 (*C*H-Asp), 48.2 (*C*H-Asp), 46.0 (CH-Fmoc), 38.5 (-C*H*$_2$-Asp), 36.6 (-C*H*$_2$-Asp-), 36.5 (-C*H*$_2$-Asp), 36.1 (*C*H$_2$-NH-Pentyl), 28.0 (O-CH$_2$-*C*H$_2$-), 27.9(-*C*H$_2$-CH$_2$-NH-), 27.0(*tert.*Butyl), 22.0 (O-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 19.7, 19.6, 19.6, 19.5 (Acetyl-gruppen).

FAB-MS für $C_{64}H_{76}N_4O_{21}$ (m/z = 1236.5): 1237.5 $[M+H]^+$, 1259.5 $[M+Na]^+$
Maldi-TOF für $C_{64}H_{76}N_4O_{21}$ (m/z = 1236.5): 1259.57 [M+Na]+

Zu Kapitel 2.5.3

Darstellung von Fmoc-[Asp-(AcGalBB)]-OtBu (39)

0.63 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) in 10 ml Ethylacetat werden zusammen mit 0.67 g (1.1 mmol) Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**19**) für 12h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Petrolether/Ethylacetat (1:2). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.60 g (0.58 mmol, 58% der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -2.8 (c = 0.75, Chloroform)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.70 (d, 2 H,Fmoc), 7.52 (d, 2 H, Fmoc), 7.32 (t, 2 H, Fmoc), 7.22 (m, 7H, Fmoc-/Benzylgruppe), 6.91 (d, 1H, Pentyl-N*H*-Asp-), 6.62 (b, 1H, NH-Gruppe), 5.98 (d, 1H, -N*H*-Asp-Fmoc), 5.14 (m, 3H, H-4, -CH_2-Benzyl), 5.00 (t, 1H, H-2, J_{H2-H3} = 9.5 Hz), 4.89 (m, 1H, H-3, J_{H3-H4} = 7.9 Hz), 4.60 (b, 2H, CH_2-Fmoc), 4.38 (m, 2H, H-1, C*H*-Fmoc), 4.16 (m, 3H, C*H*-Asp, H-6a und H-6b), 4.03 (m, 1 H, C*H*-Asp), 3.76 (m, 1 H, O-CH_2-), 3.39 (m, 1 H, O-CH_2-), 3.12 (m, 2 H, -CH_2-NH-Pentyl), 2.75 (m, 3 H, CH_2-Asp), 2.43 (m, 1 H, -CH_2-Asp-), 2.01, 1.99, 1.96, 1.93 (4x s, 12H, CH_3-Acetyl), 1.46 (m, 2 H, O-CH_2-CH_2-CH_2-), 1.37 (s, 9H, CH_3-*tert.*Butyl), 1.29 (m, 4H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 171.1, 170.8, 170.3, 169.9, 169.8, 164.5 (CO), 144.2, 144.1, 141.7, 137.8, 135.7, 128.9, 128.8, 128.6, 128.1, 127.5, 125.6, 120.4 (Fmoc-Gruppe Benzyl, aromat.), 101.1 (C-1), 82.2 (C_q-*tert.*Butyl), 73.2 (C-5), 72.1 (C-3), 71.7 (O-*C*H_2-), 68.9 (C-2), 67.5 (-*C*H_2-Benzyl-), 67.4 (*C*H_2-Fmoc), 61.7 (C-4), 60.7 (C-6), 49.6 (*C*H-Asp), 47.5 (*C*H-Fmoc), 39.8 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 38.3 (*C*H_2-Asp), 37.9 (*C*H_2-Asp), 29.5 (O-CH_2-*C*H_2-), 29.3 (-*C*H_2-CH_2-NH-), 28.4 (C(*C*H_3)$_3$), 23.5 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 21.4, 21.2, 21.1, 21.0 (CO-*C*H_3).

FT-ICR-MS: $[M+H]^+_{(theor.)}$ = 898.38533, $[M+H]^+_{(gemessen)}$ = 898.38684

Darstellung von NH_2-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (40)

0.52 g (0.5 mmol) Fmoc-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**39**) werden nach AAV 9 mit 5%iger Piperidinlösung in DMF bei Raumtemperatur 2h Fmoc-entschützt. Mittels DC-Kontrolle ($CHCl_3$:MeOH (4:1)) wird der Verlauf der Entschützung kontrolliert. Dann verdünnt man mit Toluol und koevaporiert 3-5 mal, bis kein Geruch nach Piperdin mehr wahrgenommen werden kann. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.45 g (0.5 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (37)

0.45 g (0.5 mmol) NH_2-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**39**) werden in 10 ml Ethylacetat zusammen mit 0.34 g (0.55 mmol) Fmoc-Asp-OPfp-OBn (**19**) für 12h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.25 g (0.2 mmol, 40% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +8.8 (c = 0.5, Chloroform)
^{1}H-NMR: (d_6-DMSO): δ(ppm) = 8.31 (d, 1H, Asp-NH-Asp-), 8.15 (d, 1H, Asp-NH-Asp), 7.76 (d, 2H, Fmoc), 7.58 (d, 1H, Asp-NH-Fmoc), 7.52 (t, 2H, Fmoc), 7.23 (t, 2H, Fmoc), 7.15 (m, 12H, Benzyl, Fmoc), 5.09 (m, 1H, H-3, J_{H2-H3} = 10.6 Hz), 4.99 (m, 1H, H-4, J_{H3-H4} = 3.53 Hz), 4.90 (m, 5H,-C*H*$_2$-Benzyl,CH-Asp), 4.76 (d, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.48 (m, 2H, -C*H*$_2$-Fmoc), 4.38 (m, 2H, H-1, C*H*-Asp), 4.10 (m, 2H, H-6a, CH-Asp), 4.02 (m, 2H, H-6b, C*H*-Fmoc), 3.87 (m, 2H, H-5, -O-CH_2-), 3.52 (m, 1H, -O-CH_2-), 2.87 (m, 2H,-C*H*$_2$-NH-Pentyl), 2.56 (m, 2H, C*H*$_2$-Asp), 2.43 (m, 2H, C*H*$_2$-Asp), 2.21 (m, 2H, C*H*$_2$-Asp), 1.92, 1.84, 1.80, 1.73, (s, 12H, Acetyl), 1.27 (m, 2H,O-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.17 (m, 11H, $C(CH_3)_3$, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-NH-), 1.07 (m, 2H, O-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: (d_6-DMSO): δ(ppm) = 171.7, 171.5, 170.3, 170.1, 169.9, 169.7, 169.5, 169.3, 169.0, 162.6, 156.2 (*C*O), 144.3, 143.2, 141.4, 138.1, 135.2, 128.7, 128.3, 128.0, 127.9, 127.6, 127.4, 127.0, 125.6, 120.5 (Fmoc, Benzyl, aromat.), 100.2 (C-1), 80.9 (C_q), 70.6 (C-5), 70.1(C-3), 69.3 (-O-*C*H_2-), 69.0 (C-2), 67.7(C-4), 66.3(-*C*H_2-Benzyl), 66.2(-*C*H_2-Benzyl), 64.0(-*C*H_2-Fmoc), 61.5(C-6), 50.9 (*C*H-Asp), 49.8 (*C*H-Asp), 49.6 (*C*H-Asp), 46.9 (CH-Fmoc), 38.9 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 38.6 (-C*H*$_2$-Asp), 37.2 (-C*H*$_2$-Asp), 36.9 (-C*H*$_2$-Asp), 31.1(O-CH_2-*C*H_2-), 28.9 (-*C*H_2-CH_2-NH-), 27.9 (*tert.*Butyl), 23.1 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (Acetylgruppen).

FAB-MS für $C_{64}H_{76}N_4O_{21}$ (m/z = 1236.5): 1237.2 $[M+H]^+$

Maldi-TOF für $C_{64}H_{76}N_4O_{21}$ (m/z = 1236.5): = 1259.58 $[M+Na]^+$

zu Kapitel 2.5.4

Darstellung von Fmoc-(Aib-Asp)-*Ot*Bu (41)

0.29 g (1mmol) NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) werden in 10 ml Ethylacetat zusammen mit 0.50 g (1 mmol) Fmoc-Aib-OPfp (**21**) für 12h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Petrolether/Ethylacetat (1:2). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (1:2) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.38 g (0.67 mmol, 67% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +10.2 (c = 0.75, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.69 (d, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.51 (d, 2H, Fmoc-Gruppe), 7.33 (t, 2 H, Fmoc-Gruppe), 7.26 (m, 7H, Fmoc- und Benzylgruppe), 6.93 (b, 1H, N*H*-CO-), 5.10 (m, 2H, -C*H*$_2$-Benzyl), 4.29 (m, 2H,-C*H*$_2$-Fmoc), 4.14 (m, 1H, C*H*-Asp), 3.09 (m, 1H, CH-Fmoc), 2.89 (m, 1H, CH_2-Asp), 2.76 (m, 1H, CH_2-Gruppe-Asp), 1.45 (m, 6H, $(CH_3)_2$-Aib), 1.28 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 172.3, 168.9, 167.4 (CO), 142.2, 139.6, 133.5, 126.9, 126.7, 126.6, 125.9, 125.4, 123.4, 118.3 (Fmoc-, Benzyl-Gruppe), 80.1 (C_q *tert*.Butyl), 65.7(-*C*H_2-Benzyl), 64.9 (-*C*H_2-Fmoc), 55.1 (C_q, Aib), 47.4 (-*C*H-Fmoc), 45.3 (-*C*H-Asp), 35.4 (-*C*H_2-Asp), 26.2 ($C(CH_3)_3$), 23.8 (-CH_3-Aib), 20.7 (-CH_3-Aib).

FAB-MS für $C_{33}H_{38}N_2O_7$ (m/z = 586.3) = 587.1 $[M+H]^+$

Darstellung von Fmoc-(Aib-Asp)-OH (42)

Nach AAV 11 werden 0.59 g (1mmol) Fmoc-(Aib-Asp)-*Ot*Bu (**41**) in 10%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstands mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.54 g (1mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (43)

a) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.54 g (1mmol) Fmoc-(Aib-Asp)-OH (**42**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.63 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.51 g (0.46 mmol,46% der Theorie)

b) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.54 g (1mmol) Fmoc-(Aib-Asp)-OH (**42**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.63 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.69 g (0.62 mmol, 62% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +7.5 (c = 0.75, Chloroform)
1H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.73 (d, 2H, Fmoc), 7.55 (d, 2H, Fmoc), 7.36 (t, 2H, Fmoc), 7.29 (m, 7H, Fmoc-, Benzylgruppe), 6.95 (b, 1H, -NH-Asp-), 6.73 (t, 1H, -NH-Fmoc), 5.34 (m, 2H, H-4, J_{H3-H4} = 3.3 Hz ,-CH-Asp), 5.13 (m, 3H, H-2, -CH_2-Benzyl, H-3), 4.97 (m, 2H, H-3, -CH-Asp), 4.76 (b, 1H, -CH-Fmoc), 4.61 (m, 1H, H1, J_{H1-H2} = 7.8 Hz), 4.29 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.07 (m, 3H, CH_2-Fmoc, H-5), 3.76 (m, 2H, -O-CH_2-), 3.04 (m, 2H, -CH_2-NH-Pentyl), 2.74 (m, 3H, -CH_2-Asp), 2.43 (m, 1H, -CH_2-Asp) 2.06, 1.98, 1.96, 1.91 (s, 12H, Acetyl), 1.40 (m, 8H, Aib-CH_3, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.34 (s, 11H, $C(CH_3)_3$, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-),1.20 (m 2H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 171.3, 170.7, 170.3, 169.9, 169.7, 169.4, 169.3 156.8, 154.9 (CO), 143.3, 140.9, 134.8, 128.4, 127.9, 127.4, 126.7, 124.7, 122.9, 120.6. 119.6 (Fmoc und Benzyl, aromat.) 100.7 (C-1), 81.4 (C_q *tert*.Butyl), 70.6 (C-5), 70.2 (C-3), 69.5 (-O-*C*H_2-), 68.6 (C-2), 67.2 (*C*H_2-Fmoc), 67.0 (*C*H_2-Benzyl), 66.7 (C-4), 61.2 (C-6), 56.4 (C_q Aib), 49.4 (*C*H-Asp), 49.1 (*C*H-Asp), 46.7 (*C*H-Fmoc), 39.2 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 37.2 (*C*H_2-Asp), 36.5 (*C*H_2-Asp), 28.9 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 28.8 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 27.0 ($C(CH_3)_3$), 25.3 (*C*H_3-Aib), 25.0 (*C*H_3-Aib), 22.7 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.4. 20.3, 20.3. 20.2 (Acetyl)

FAB-MS für $C_{57}H_{72}N_4O_{19}$ (m/z = 1116.5) = 1117.2 $[M+H]^+$, 1139.0 $[M+Na]^+$

FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 1139.46830, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 1139.46778

Darstellung von Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (44)

PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.54 g (1mmol) Fmoc-(Aib-Asp)-OH (**42**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.61 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**23**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.64 g (0.57 mmol, 57% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -1.5 (c = 0.75, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.74 (d, 2H, Fmoc), 7.55 (d, 2H, Fmoc), 7.36 (t, 2H, Fmoc), 7.31 (m, 7H, Fmoc- und Benzylgruppe), 6.94 (b, 1H, -N*H*-Asp), 6.72 (t, 1H, -N*H*-Aib-Fmoc), 5.18 (m, 3H, H-3, -C*H*$_2$-Benzyl), 5.05 (m, 1H, H-4, H-2 J_{H2-H3} = 9.6 Hz), 4.89 (m, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 8.0 Hz), 4.76 (m, 1H, -C*H*-Asp), 4.61 (m, 1H,-C*H*-Asp), 4.33 (m, 2H, -C*H*$_2$-Fmoc), 4.20 (m, 1H,-C*H*-Fmoc), 4.07 (m, 2H, H-6a und H-6b), 3.79 (m, 1H, H-5), 3.63 (m, 1H -O-C*H*$_2$-), 3.39 (m, 1H, -O-C*H*$_2$-), 3.35 (m, 1H,-C*H*$_2$-

NH-Pentyl), 2.79 (m, 3H, -C*H*$_2$-Asp), 3.04 (m, 1H, -C*H*$_2$-Asp), 2.05, 2.03, 1.98, 1.96 (s, 12H, Acetyl), 1.48 (m, 8H, Aib-C*H*$_3$ O-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 1.37 (s, 11H, C(CH$_3$)$_3$, O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-NH-, 1.31 (m, 2H,O-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-).
^{13}C-NMR: (CDCl3): δ(ppm) = 173.8, 170.9, 170.4, 170.3, 169.9, 169.6, 169.4, 169.0 (CO), 143.5, 143.3, 140.9, 134.8, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 126.7, 124.7, 124.7, 119.6 (Fmoc und Benzyl) 100.4 (C-1), 81.3 (C$_q$ *tert*.Butyl), 72.4 (C-3), 71.4 (C-5), 70.9 (C-2), 69.4(-O-*C*H$_2$-), 68.1 (C-4), 67.2 (*C*H$_2$-Benzyl), 66.4 (*C*H$_2$-Fmoc), 61.6 (C-6), 56.4 (C$_q$ Aib), 49.3 (*C*H-Asp), 49.1 (*C*H-Asp), 46.8 (*C*H-Fmoc), 39.4 (-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 37.2 (*C*H$_2$-Asp), 36.5 (*C*H$_2$-Asp), 28.6 (O-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 28.6 (O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-NH-), 27.7 (C(CH3)$_3$), 25.1(CH$_3$-Aib), 22.6 (O-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 20.4. 20.3, 20.3. 20.2 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{57}H_{72}N_4O_{19}$ (m/z = 1116.5) = 1117.5 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 1139.46830, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 1139.46657

zu Kapitel 2.5.5

Darstellung von Fmoc-(ACHC-Asp)-*Ot*Bu (45)

a) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.29 g (1mmol) NH$_2$-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.37 g (1 mmol) Fmoc-ACHC-OH (**8**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.36 g (0.57 mmol, 57% der Theorie)

b) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.29 g (1mmol) NH$_2$-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.37 g (1 mmol) Fmoc-ACHC-OH (**8**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt.

DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH(19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.34 g (0.54 mmol, 54% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -12.3 (c = 1.0, Chloroform)
1H-NMR ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.71 (d, 2H, Fmoc), 7.54 (d, 2H, Fmoc), 7.37 (t, 2 H, Fmoc), 7.27 (m, 7H, Fmoc- und Benzylgruppe), 7.66 (b, 1H, Asp-NH-ACHC), 5.13 (m, 2H, -CH_2-Benzyl), 4.82 (m, 2H,CH_2-Fmoc), 4.29 (m, 3H, CH-Asp, CH-Fmoc, ACHC-CH-NH), 3.57 (b, 1H, ACHC-CH-CO), 2.87 (dd, 1H, -CH_2-Asp), 2.60 (dd, 1H, -CH_2-Asp), 2.01 (m, 2H, -CH2-ACHC), 1.69 (m, 3H, -CH2-ACHC), 1.31 (m, 13H, $C(CH_3)_3$, CH_2-ACHC).
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ(ppm) = 173.5, 170.6, 170.1, 155.6 (*C*O), 144.0, 141.2, 135.2, 128.4, 128.3, 128.1, 127.6, 127.5, 126.9, 124.9, 124.2, 119.8 (Fmoc-, Benzyl-Gruppe), 78.7 (C_q *tert.*Butyl), 67.2 (*C*H_2-Benzyl), 66.5 (*C*H_2-Fmoc), 52.1 (CH-Asp), 51.9 (ACHC-*C*H-NH-), 48.4 (*C*H-Fmoc), 47.0 (ACHC-*C*H-CO), 37.3 (-*C*H_2-Asp), 32.4 (-*C*H_2-ACHC), 28.5 (-*C*H_2-ACHC), 27.8 ($C(CH_3)_3$), 24.6 (-*C*H_2-ACHC), 24.5 (-*C*H_2-ACHC).

FAB-MS für $C_{37}H_{42}N_2O_7$ (m/z = 626.3): 627.1$[M+H]^+$

Darstellung von Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (46)

Nach AAV 11 werden 0.63 g (1mmol) Fmoc-(ACHC-Asp)-O*t*Bu (**45**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstand mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.59 g (1mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (47)

a) HATU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.59 g (1mmol) Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.63 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.64 g (0.56 mmol, 56% der Theorie)

b) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.59 g (1mmol) Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.62 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.74 g (0.64 mmol, 64% der Theorie)

c) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.59 g (1mmol) Fmoc-(ACHC-Asp)-OH (**46**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.61 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.64 g (0.55 mmol, 55% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -14.4 (c = 0.5, Chloroform)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 8.00 (b, 1H, Asp-N*H*-ACHC-), 7.73 (d, 2H, Fmoc), 7.56(d, 2H, Fmoc), 7.34 (m, 9H, Fmoc- und Benzylgruppe), 6.82 (b, 1H, Asp-N*H*-Asp), 6.43 (b, 1H, -NH-Fmoc), 5.41 (m, 1H, H4, J_{H3-H4} = 3.1 Hz), 5.16 (m, 3H, -CH_2-Benzyl, H2), 5.06 (m, 1H, H-3, J_{H3-H4} = 3.1 Hz), 4.80 (b, 1H, -C*H*-Asp), 4.48 (m, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 7.3 Hz), 4.28 (m, 4H, -CH_2-Fmoc, H-6a und H-6b), 4.15 (d, 2H, H-5, -C*H*-Fmoc), 3.90 (m, 1H, ACHC-C*H*-NH-), 3.60 (m, 2H, -O-CH_2-), 3.50 (m, 1H, ACHC-C*H*-CO-), 3.30 (m, 2H,-CH_2-NH-Pentyl), 2.67 (m, 2H, -CH_2-Asp), 2.40 (m, 2H, -CH_2-Asp), 2.10, 2.06, 2.04, 2.02 (s, 12H, Acetyl) 1.72 (m, 4H, -CH_2-ACHC,O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-) 1.57 (m, 4H, -CH_2-ACHC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.32 (s, 11H, *tert*.Butyl, -CH_2-ACHC), 1.25 (m, 4H, -CH_2-ACHC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 173.5, 171.4, 170.8, 170.7, 170.3, 169.4 (*C*O), 144.2, 143.9, 141.4, 128.5, 128.3, 127.7. 127.2, 127.0, 125.2, 120.0 (Fmoc- und Benzylgruppe, aromat.) 100.8 (C-1), 81.9 (C_q *tert*.Butyl), 72.9 (C-5), 71.8 (C-3), 71.5 (-O-*C*H_2-), 69.8 (C-2), 68.6 (-*C*H_2-Fmoc), 67.3 (-*C*H_2-Benzyl), 65.1 (C-4), 62.1 (C-6), 51.8 (-ACHC-*C*H-NH), 50.0 (-*C*H-Asp), 49.1(-*C*H-Asp), 47.2 (-*C*H-Fmoc), 45.2 (ACHC-*C*H-CO) 39.6(-*C*H_2-NH-Pentyl), 37.4 (-*C*H_2-Asp) 37.3 (-*C*H_2-Asp), 30.8 (ACHC-*C*H_2-), 30.7 (O-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 28.9 (O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-*C*H_2-NH-), 28.0 (C(*C*H_3)$_3$), , 25.1 (-*C*H_2-ACHC), 23.1 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.8, 20.7, 20.6 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{60}H_{76}N_4O_{19}$ (m/z = 1156.5): 1157.4 $[M+H]^+$, 1179.4 $[M+Na]^+$
FT-ICR-MS: $[M+Na]^+$(theor.) = 1179.49960, $[M+Na]^+$(gemessen) = 1179.49971

zu Kapitel 2.5.6

Darstellung von Fmoc-(ACPC-Asp)-*Ot*Bu (48)

a) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.29 g (1 mmol) NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.35 g (1 mmol) Fmoc-ACPC-OH (**16**) für 2h bei Raumtemperatur

gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.38 g (0.62 mmol, 62% der Theorie)

b) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.29 g (1mmol) NH_2-Asp-OtBu-OBn (**34**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.35 g (1 mmol) Fmoc-ACPC-OH (**16**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.40 g (0.65 mmol, 65% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +2.7 (c = 1.0, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.72 (d, 2H, Fmoc), 7.52 (d, 2H, Fmoc), 7.35 (t, 2 H, Fmoc), 7.27 (m, 7H, Fmoc- und Benzylgruppe), 6.64 (b, 1H, Asp-N*H*-ACPC), 5.10 (m, 2H, -C*H*$_2$-Benzyl), 4.82 (m, 1H, *C*H-Asp), 4.29 (m, 2H, CH_2-Fmoc), 3.45 (m, 1H, ACHC-C*H*-NH), 3.34 (m, 1H, ACHC-C*H*-CO), 2.86 (d, 1H, -C*H*$_2$-Asp), 2.60 (d, 1H, -C*H*$_2$-Asp), 1.67 (m, 2H, -C*H*$_2$-ACPC) 1.46 (m, 2H, -C*H*$_2$-ACPC), 1.31 (s, 9H, C(C*H*$_3$)$_3$), 1.24 (m, 2H, -C*H*$_2$-ACPC).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 172.7, 169.6, 168.1, 154.6 (CO), 142.9, 139.7, 134.8, 127.3, 126.9, 126.7, 126.5, 126.3, 126.0, 124.2, 119.1 (Fmoc-, Benzyl-Gruppe), 79.4 (C_q *tert*.Butyl), 65.1 (-*C*H_2-Benzyl), 64.2 (-*C*H_2-Fmoc), 54.3 (-ACHC-*C*H-NH), 48.9 (-*C*H-Asp), 47.8 (-*C*H-Fmoc), 45.7 (-ACHC-*C*H-CO), 36.0 (-*C*H_2-Asp), 31.8 (-ACHC-*C*H_2-), 29.7 (-ACHC-*C*H_2-), 26.6 (C(CH_3)$_3$), 22.3 (-ACHC-*C*H_2-).

FAB-MS für $C_{36}H_{40}N_2O_7$ (m/z = 612.3): 613.2 $[M+H]^+$, 635.2 $[M+Na]^+$

Darstellung von Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (49)

Nach AAV 11 werden 0.61 g (1mmol) Fmoc-(ACPC-Asp)-O*t*Bu (**48**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2 h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstands mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.55 g (1mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (50)

a) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.55 g (1mmol) Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.62 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.71 g (0.62 mmol, 62% der Theorie)

b) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.55 g (1mmol) Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.61 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**22**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.69 g (0.60 mmol, 60% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +8.7$ (c = 0.5, Chloroform)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.73 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (b, 1H, Asp-N*H*-ACPC-), 7.55 (d, 2H, Fmoc), 7.27 (m, 9H, Fmoc- und Benzylgruppe), 7.04 (b, 1H, Asp-N*H*-Asp), 6.84 (b, 1H, -NH-Fmoc), 5.33 (m, 1H, H-4, J_{H3-H4} = 3.2 Hz), 5.15 (m, 3H, -C*H*$_2$-Benzyl, H-2, J_{H2-H3} = 10.1 Hz), 4.97 (m, 2H, -CH-Fmoc, H-3), 4.89(m, 1H, -C*H*-Asp), 4.65 (b, 1H, -C*H*-Asp), 4.37 (m, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 7.7 Hz), 4.11 (m, 4H, H-6a und H-6b, -C*H*$_2$-Fmoc)), 3.97 (m, 1H, H-5), 3.82 (m, 2H, ACPC-C*H*-NH-), 3.60 (m, 1H, ACPC-C*H*-CO-), 3.50 (m, 2H, -O-C*H*$_2$-), 2.78 (m, 4H,-C*H*$_2$-NH-Pentyl, -C*H*$_2$-Asp), 2.46 (m, 1H, -C*H*$_2$-Asp), 2.13, 2.04, 2.02, 2.00 (s, 12H, Acetyl) 1.78 (m, 4H, -C*H*$_2$-ACPC,O-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-) 1.66 (m, 2H, -C*H*$_2$-ACPC), 1.51 (m, 2H, O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-NH-), 1.38 (s, 11H, *tert*.Butyl, -C*H*$_2$-ACPC), 1.24 (m, 4H, -C*H*$_2$-ACPC, O-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 173.5, 171.4, 171.1, 170.4, 170.3, 170.2, 169.7, 169.5, 156.5 (*C*O), 143.9, 141.4, 135.4, 128.5, 128.4, 128.3, 127.7. 127.1, 125.1, 125.0, 120.0 (Fmoc- und Benzylgruppe, aromat.) 101.3 (C-1), 81.7 (C$_q$ *tert*.Butyl), 70.9 (C-5), 70.7 (C-3), 69.8 (-O-*C*H$_2$-), 69.0 (C-2), 67.4 (-*C*H$_2$-Fmoc), 67.1 (-*C*H$_2$-Benzyl), 66.8 (C-4), 61.3 (C-6), 57.8 (-ACPC-*C*H-NH), 54.5 (ACPC-*C*H-CO), 49.7 (-*C*H-Asp), 49.4 (-*C*H-Asp), 47.3 (-*C*H-Fmoc), 39.6(-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 38.2 (-*C*H$_2$-Asp) 36.7 (-*C*H$_2$-Asp), 32.9 (ACHC-*C*H$_2$-), 29.1 (O-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 28.06 (C(*C*H$_3$)$_3$), 27.4 (O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-NH-), 23.8 (-*C*H$_2$-ACHC), 23.1 (O-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 20.8, 20.7, 20.6 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{59}H_{74}N_4O_{19}$ (m/z = 1142.5): = 1143.1 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 1165.48395, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 1165.48237

Darstellung von Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (51)

a) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 0.55 g (1mmol) Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.62 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**23**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und

das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.65 g (0.57 mmol, 57% der Theorie)

b) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.55 g (1mmol) Fmoc-(ACPC-Asp)-OH (**49**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.61 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**23**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.56 g (0.49 mmol, 49% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +3.1 (c = 0.5, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 8.00 (b, 1H, Asp-N*H*-ACPC-), 7.73 (d, 2H, Fmoc), 7.59 (d, 2H, Fmoc), 7.35 (m, 9H, Fmoc- und Benzylgruppe), 6.82 (b, 1H, Asp-N*H*-Asp), 6.43 (b, 1H, -NH-Fmoc), 5.19 (m, 3H, -CH_2-Benzyl, H-4, J_{H3-H4} = 9.3 Hz), 5.03 (m, 2H,-CH-Asp, H-3, J_{H3-H4} = 9.3 Hz), 4.94 (m, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.60 (m, 1H, -C*H*-Asp), 4.41 (m, 1H, H1, J_{H1-H2} = 8.1 Hz), 4.26 (m, 3H, H-6a und H-6b, -CH_2-Fmoc), 3.97 (m, 2H, -CH_2-Fmoc, H-5), 3.82 (m, 1H, ACPC-C*H*-NH-), 3.60 (m, 2H, ACPC-C*H*-CO-, -O-CH_2-), 3.50 (m, 1H, -O-CH_2-), 3.20 (m, 2H, -CH_2-NH-Pentyl), 2.67 (m, 2H, -CH_2-Asp), 2.40 (m, 1H, -CH_2-Asp), 2.30 (m, 1H, -CH_2-Asp), 2.04, 2.00, 1.98, 1.96 (s, 12H, Acetyl) 1.78 (m, 4H, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-) 1.51 (m, 4H, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.38 (s, 9H, *tert*.Butyl), 1.24 (m, 6H, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 173.8, 171.4, 171.1, 170.6, 170.3, 170.2, 169.7, 169.4, 156.5 (*C*O), 143.9, 141.4, 135.4, 128.5, 128.4, 128.3, 127.7. 127.1, 125.1, 125.0, 120.0 (Fmoc- und Benzylgruppe, aromat.) 100.8 (C-1), 81.7 (C_q *tert*.Butyl), 72.9 (C-3), 71.8 (C-5), 71.4 (C-2), 69.8 (-O-*C*H_2-), 68.6 (C-4), 67.4 (-*C*H_2-Fmoc), 66.8 (-*C*H_2-Benzyl), 62.0 (C-6), 57.1 (-ACPC-*C*H-NH), 52.5 (ACPC-*C*H-CO), 49.7 (-*C*H-Asp),

49.4 (-*C*H-Asp), 47.3 (-*C*H-Fmoc), 39.6(-*C*H_2-NH-Pentyl), 38.2 (-*C*H_2-Asp) 36.9 (-*C*H_2-Asp), 32.9 (ACHC-*C*H_2-), 29.1 (O-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 28.06 (C(*C*H_3)$_3$), 27.4 (O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-*C*H_2-NH-), 23.8 (-*C*H_2-ACHC), 23.1 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.8, 20.7, 20.6 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{59}H_{74}N_4O_{19}$ (m/z = 1142.5) = 1143.3 $[M+H]^{+,}$ 1164.9 $[M+Na]^+$

FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 1165.48395, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 1165.48529

zu Kapitel 2.5.7

Darstellung von Fmoc-(ACPC-β-Ala)-*Ot*Bu (52)

PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.29 g (1mmol) β-Alanin-*tert*.Butylester (**30**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.35 g (1 mmol) Fmoc-ACPC-OH (**16**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.28 g (0.59 mmol, 59% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +13.3 (c = 0.5, Dichlormethan)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.81 (d, 2H, Fmoc), 7.59 (d, 2H, Fmoc), 7.35 (t, 2H, Fmoc), 7.33 (m, 3H, Fmoc-Gruppe, -N*H*-CO-ACPC), 6.96 (d, 1H, -N*H*-CO-Fmoc), 4.15 (m, 3H, -C*H*$_2$- und -C*H*-Fmoc), 3.39 (m, 2H,-NH-C*H*$_2$-β-Ala), 3.12 (m, 1H, -NH-C*H*-ACPC), 2.27 (m, 1H, -CO-C*H*-ACPC), 1.78 (m, 2H, -C*H*$_2$-CO-β-Ala), 1.57 (m, 2H, -C*H*$_2$-ACPC), 1.31 (m, 2H, ACPC-C*H*$_2$-), 1.28 (s, 9H, C(CH_3)$_3$), 1.13 (m, 2H, ACPC-C*H*$_2$-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 174.8, 172.6, 154.6, (CO), 143.4, 140.1, 126.9, 126.4, 124.7, 124.5, 119.5 (Fmoc-Gruppe, aromat.), 79.4 (C_q *tert*.Butyl), 64.9 (-*C*H_2-Fmoc), 50.5 (-ACPC-*CH*-NH), 48.1 (*C*H-Fmoc), 46.4 (-ACPC-*C*H-CO), 34.3 (-NH-*C*H_2-β-Ala),

31.9 (-*C*H_2-CO-β-Ala), 28.7 (-ACPC-*C*H_2-), 27.3 (C(*C*H_3)$_3$), 24.3 (-ACPC-*C*H_2-), 23.9 (-ACPC-*C*H_2-).

FAB-MS für $C_{36}H_{40}N_2O_7$ (m/z = 478.2) = 479.2 $[M+H]^+$

Darstellung von Fmoc-(ACPC-β-Ala)-OH (53)

Nach AAV 11 werden 0.48 g (1mmol) Fmoc-(ACPC-β-Ala)-OtBu (**52**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstand mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Ausbeute: 0.43 g (1mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[ACPC-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (54)

PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 0.43 g (1mmol) Fmoc-(ACPC-β-Ala)-OH (**53**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.61 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert.*butylester (**23**) für 3h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Dichlormethan/Ethanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.56 g (0.48 mmol, 48% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +6.3 (c = 0.75, Chloroform)
^{1}H-NMR: (d_6-DMSO): δ(ppm) = 8.16 (d, 1H, Asp-N*H*-β-Ala), 7.87 (d, 2H, Fmoc), 7.83 (m, 1H, Pentyl-N*H*-Asp), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.31 (t, 2H, Fmoc), 7.22 (m, 3H, Fmoc, -β-Ala-N*H*-ACPC), 5.26 (m, 1H, H-4, J_{H3-H4} = 9.4 Hz, 4.89 (t, 1H, H-2, J_{H1-H2} = 8.1 Hz),

4.74 (d, 2H, -C*H*$_2$-Benzyl), 4.57 (m, 1H, -C*H*-Asp), 4.28 (m, 2H, -*CH*$_2$-Fmoc), 4.18 (m, 2H, H-1, CH-Fmoc), 3.96 (m, 2H, H-6a und H-6b, $J_{H6a-H6b}$ = 12.2 Hz), 3.70 (m, 1H, H-5), 3.43 (m, 1H, -O-C*H*$_2$-), 3.21 (m, 4H,-O-C*H*$_2$-, ACPC-C*H*-NH-, NH-C*H*$_2$-CH$_2$-), 3.03 (m, 2H, -C*H*$_2$-NH-Pentyl), 2.61 (m, 1H, -C*H*$_2$-Asp), 2.40 (m, 1H, -C*H*$_2$-Asp), 2.26 (m, 4H, -CH$_2$-C*H*$_2$-β-Ala, -C*H*$_2$-ACPC), 2.01, 1.99, 1.98, 1.93, (4s, 12H, Acetyl) 1.46 (m, 4H, -C*H*$_2$-ACPC, O-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 1.36 (s, 13H, C(CH$_3$)$_3$),-C*H*$_2$-ACPC, O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-NH-) 1.23 (m, 2H, -C*H*$_2$-ACPC, -O-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-)

^{13}C-NMR: (d$_6$-DMSO): δ(ppm) = 170.7, 170.5, 170.4, 169.9, 169.8, 169.4, 156.5 (CO), 144.2, 141.1, 127.9, 127.4, 125.5, 120.5 (Aromat-Fmoc), 100.3 (C-1), 80.7 (C$_q$ *tert*.Butyl), 72.4 (C-3), 71.3 (C-5), 70.9 (C-2), 69.3 (-O-*C*H$_2$-), 68.6 (-*C*H$_2$-Benzyl), 67.9 (*C*H$_2$-Fmoc), 65.7 (C-4) 62.1 (C-6), 57.3 (ACPC-*C*H-NH), 49.7 (-CH-Asp), 47.0 (-CH-Fmoc), 38.9 (ACPC-*C*H-CO), 38.4 (-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 38.1 (-*CH*$_2$-Asp), 37.4 (-*C*H$_2$-ACPC), 36.6 (O-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 35.9 (-NH-*C*H$_2$-β-Ala), 35.5 (-*C*H$_2$-β-Ala), 29.4 (-*C*H$_2$-ACPC), 28.9 (O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-NH-), 27.9 (C(*C*H$_3$)$_3$), 22.8 (O-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 20.8, 20.7, 20.6 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{51}H_{68}N_4O_{17}$ (m/z = 1008.4) = 1009.4 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 1031.44717, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 1031.44532

Darstellung von Fmoc-(β-Ala-Asp)-O*t*Bu (55)

0.62 g (2 mmol) NH$_2$-Asp-O*t*Bu-OBn (**34**) werden mit 0.95 g (2 mmol) Fmoc-β-Alanin-OPfp (**20**) für 12h in 10 ml Ethylacetat bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Petrolether/Ethylacetat (1:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Petrolether/Ethylacetat (1:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.70 g (1.22 mmol, 61% der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +0.9 (c = 0.75, Chloroform)

^{1}H-NMR: (CDCl$_3$): δ(ppm) = 7.73 (d, 2H, Fmoc), 7.55 (d, 2H, Fmoc), 7.34 (t, 2H, Fmoc), 7.29 (m, 7H, Fmoc- und Benzylgruppe), 6.57 (d, 1H, Asp-N*H*-β-Ala), 5.58 (b,

1H, -N*H*-Fmoc), 5.17 (m, 2H, -CH_2-Benzyl), 4.85 (m, 1H, -C*H*-Asp), 4.33 (m, 2H, -CH_2-Fmoc), 4.17 (m, 1H, C*H*-Fmoc), 3.47 (m, 2H,-CH_2-NH-β-Ala), 2.90 (m, 1H,-CH_2-Asp), 2.69 (m, 1H, -CH_2-Asp), 2.93 (m, 2H, -CH_2-β-Ala), 1.35 (s, 9H, C(CH_3)$_3$).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 170.6, 170.1, 160.2, 156.7 (CO), 147.5, 143.9, 141.2, 135.1, 132.0, 128.6, 128.4, 128.2, 127.0, 125.1, 124.3, 119.9 (C, Fmoc- und Benzylgruppe, aromat.), 82.1 (C_q *tert*.Butyl), 67.6 (*C*H_2-Benzyl), 66.7 (*C*H_2-Fmoc), 48.7 (*C*H-Fmoc), 47.2 (*C*H-Asp), 37.2 (-*C*H_2-NH-β-Ala), 35.9 (-*C*H_2-Asp), 33.3 (-*C*H_2-β-Ala), 27.9 (C(*C*H_3)$_3$).

FAB-MS für $C_{33}H_{36}N_2O_7$ (m/z = 572.3): 573.1 $[M+H]^+$, 595.0 $[M+Na]^+$

Darstellung von Fmoc-(β-Ala-Asp)-OH (56)

Nach AAV 11 wird 0.57 g (1 mmol) Fmoc-(β-Ala-Asp)-O*t*Bu (**55**) wird in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird mit Toluol verdünnt und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird noch dreimal mit 10 ml Toluol koevaporiert. Der Rückstand wird ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Ausbeute: 0.52 g (1mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[β-Ala-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (57)

Nach AAV 6 werden 0.52 g (1mmol) Fmoc-(β-Ala-Asp)-OH (**56**) in 10 ml DMF zusammen mit 0.61 g (1 mmol) α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*.butylester (**23**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit CH_2Cl_2/EtOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Dichlormethan/Ethanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 0.69 g (0.63 mmol, 63% der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -3.9$ (c = 0.50, Chloroform)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.73 (d, 2H, Fmoc), 7.57 (d, 2H, Fmoc), 7.25 (m, 9H, Fmoc- und Benzylgruppe), 7.01 (d, 1H, -N*H*-CO-Asp), 6.81 (d, 1H, Asp-N*H*-Asp), 6.73 (d, 1H, -N*H*-CO-β-Ala), 5.65 (b, 1H, -N*H*-Fmoc), 5.10 (m, 3H, H-3, -CH_2-Benzyl), 5.02 (m, 1H, H-4, J_{H4-H5} = 9.8 Hz), 4.90 (m, 2H, H-2,-C*H*-Asp), 4.58 (m, 1H, -C*H*-Asp), 4.38 (d, 1H, H-1, J_{H1-H2} = 8.0 Hz), 4.28 (d, 2H, -CH_2-Fmoc), 4.16 (m, 2H, H-6a und H-6b, $J_{H6a-H6b}$ = 12.3 Hz, J_{H6a-H5} = 4.8 Hz), 4.06 (m, 1H,-C*H*-Fmoc), 3.76 (m, 1H, H-5) 3. 81 (m, 1H, O-CH_2-) 3.40 (m, 3H, O-CH_2-, -CH_2-CH_2-β-Ala), 3.12 (m, 2H, -CH_2-NH-Pentyl), 2.73 (m, 2H, -CH_2-Asp), 2.41 (m, 2H, -CH_2-Asp), 2.03, 2.00, 1.98, 1.96 (s, 12H, Acetyl), 1.47 (m, 2H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.36 (s, 11H, $C(CH_3)_3$, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.24 (m, 2H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 171.3, 170.7, 170.6, 170.3, 169.9, 169.6. 169.5, 169.4, 156.1 (CO), 143.9. 141.2, 135.1, 128.6, 128.5, 128.3, 127.6, 127.0, 125.2, 119.5 (C, Fmoc und Benzylgruppe, aromat.), 100.7 (C-1), 81.8 (C_q *tert*.Butyl), 72.4 (C-5), 71.7 (C-3), 71.3 (-*C*H_2-Benzyl), 68.8 (O-*C*H_2-), 67.5 (C-2), 66.7 (-*C*H_2-Fmoc), 65.8 (C-4), 61.9 (C-6), 49.2 (-CH-Asp), 47.2 (-*C*H-Fmoc), 39.4 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 37.7 (-*C*H_2-Asp), 37.2 (-*C*H_2-Asp), 37.0 (-*C*H_2-NH-β-Ala), 36.9(-*C*H_2-β-Ala), 30.7 (O-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 28.5 (O-CH_2-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 27.9 ($C(CH_3)_3$), 23.0 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{56}H_{70}N_4O_{19}$ (m/z = 1102.5) =1124.8 $[M+Na]^+$

FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 1125.4526, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 1125.4516

zu Kapitel 2.6.1

Darstellung von Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-OH (58)

Nach AAV 11 werden 50 mg (0.05 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**29**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach

Koevaporierung des Rückstands mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Ausbeute: 45 mg (0.05 mmol) quantitativ

Darstellung von NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (59)

50 mg (0.05 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**28**) werden nach AAV 9 mit 5%iger Piperidinlösung in DMF bei Raumtemperatur 2h gerührt. Mittels DC-Kontrolle ($CHCl_3$:MeOH (4:1)) wird der Verlauf der Entschützung kontrolliert. Dann verdünnt man mit Toluol und koevaporiert 3-5 mal mit Toluol. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 40 mg (0.05 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (60)

a) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 45 mg (0.05 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-OH (**58**) in 10 ml DMF zusammen mit 40 mg (0.05 mmol) NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (**59**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit $CHCl_3$/MeOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit $CHCl_3$/MeOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 46 mg (0.03 mmol, 56% der Theorie)

b) TBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 45 mg (0.05 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-OH (**58**) in 10 ml DMF zusammen mit 40 mg (0.05 mmol) NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (**59**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Chloroform/Methanol

(19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Chloroform/Methanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 18 mg (0.01 mmol, 22% der Theorie)

c) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 45 mg (0.05 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-OH (**58**) in 10 ml DMF zusammen mit 40 mg (0.05 mmol) NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (**59**) für 2h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Chloroform/Methanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Chloroform/Methanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 49 mg (0.03 mmol, 61% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +1.7 (c = 0.5, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.92 (m, 1H, Asp-NH-β-Ala), 7.73 (m, 1H, Asp-NH-β-Ala), 7.54 (d, 2H, Fmoc), 7.40 (d, 2H, Fmoc), 7.17 (t, 2H, Fmoc), 7.08 (t, 2H, Fmoc), 5.91 (m, 1H, -N*H*-Fmoc), 5.17 (s, 2H, -C*H*-Asp), 4.93 (m, 2H, H-3 Gal und H-3 Gluc, J_{H2-H3} = 9.6 Hz), 4.83 (m, 3H, H-4 Gal und H-4 Gluc, H-2 Gal), 4.72 (m, 1H, H-2 Gluc, J_{H2-H3} = 9.6 Hz), 4.47 (m, 2H, C*H*$_2$-Fmoc), 4.28 (m, 1H, H-1 Gluc, J_{H1-H2} = 7.8 Hz), 4.02 (m, 4H, H-1 Gal, H-6a und H-6b Gal und Gluc, -C*H*-Fmoc), 3.94 (m, 4H, H-6a und H-6b Gal und Gluc, H-5 Gluc und Gal), 3.75 (m, 2H,-O-C*H*$_2$-), 3.66 (m, 2H, -O-C*H*$_2$-), 3.24 (m, 8H, NH-C*H*$_2$-CH_2-β-Ala), 2.97 (m, 4H, -C*H*$_2$-NH-Pentyl), 2.39 (m, 2H, -C*H*$_2$-Asp, -C*H*$_2$-β-Ala), 2.21 (m, 6H, C*H*$_2$-Asp, -C*H*$_2$-β-Ala), 1.94, 1.90, 1.87, 1.85, 1.83, 1.82, 1.81, 1.79, 1.75, (s, 24H, Acetyl), 1.34 (m, 6H, O-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-, -CH_2-C*H*$_2$-β-Ala, O-CH_2-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-NH-), 1.19 (s, 9H, C(C*H*$_3$)$_3$), 1.11 (m, 6H, -CH_2-C*H*$_2$-β-Ala, O-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 170.7, 170.4, 170.3, 170.2, 169.5, 165.5, 164.5, 164.3 (CO), 145.1, 143.5, 127.4, 126.8, 124.1, 119.6 (Fmoc-aromat), 100.8 (C-1-Galatose), 100.3 (C-1-Glucose), 81.4 (C_q *tert*.Butyl), 74.2 (C-5-Galac), 72.6 (C-3-Gluc), 71.3(C-3-Galac), 71.1(C-5-Gluc), 70.7 (C-2-Galac), 70.2 (C-2-Gluc), 69.6 (-O-C*H*$_2$-Pentyl), 68.7 (C-4-Galac), 68.1(C-4-Gluc), 62.0 (C-6-Galac), 61.7(C-6-Gluc),

60.9 (-*C*H_2-Fmoc), 50.2 (*C*H-Asp), 48.7 (*C*H-Asp), 46.8 (*C*H-Fmoc), 39.1 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 35.6, 35.5, 35.4 35.4 (β-Ala-*C*H_2-CO), 32.8, 32.7, 32.0, 31.5 (NH-*C*H_2-β-Ala), 28.7 (O-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 28.5 (O-CH_2-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 27.4 (C(*C*H_3)$_3$), 22.7(O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 21.9, 21.2, 20.3, 20.2, 20.1, 20.1, 20.3 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{77}H_{108}N_8O_{31}$ (m/z = 1640.7) = 1641.5 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+2Na]^{++}_{(theor.)}$ = 843.34525, $[M+2Na]^{++}_{(gemessen)}$ = 843.34425

Darstellung von Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OH (62)

Nach AAV 11 werden 30 mg (0.03mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**28**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstand mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Ausbeute: 20 mg (0.03 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (63)

HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 20 mg (0.03 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OH (**62**) in 10 ml DMF zusammen mit 25 mg (0.03 mmol) NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (**59**) für 1h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Chloroform/Methanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Chloroform/Methanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 18 mg (0.03 mmol, 43% der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +4.2 (c = 0.75, Chloroform)

FAB-MS für $C_{77}H_{108}N_8O_{31}$ (m/z = 1640.7) = 1641.6 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+2Na]^{++}_{(theor.)}$ = 843.34525, $[M+2Na]^{++}_{(gemessen)}$ = 843.34522

Darstellung von NH_2-(β-Ala-β-Ala-GlucBB-β-Ala-β-Ala-GalBB)-OH (64)

Nach AAV 11 werden 30 mg (0.018 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (**63**) mit einer 20%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Chloroform gegeben und für 6h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach mehrmaligen Koevaporieren mit Toluol wird im Vakuum getrocknet. Für die Entschützung der Acetylgruppe werden die teilentschützten Glykopeptidbaustein zu einer 7N Ammoniaklösung in Methanol (10 ml) gegeben und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (AAV 12). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen, dann zweimal mit 5 ml Diethylether extrahiert und die Wasserphase an Biogel säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung erhält man weiße Flocken.

Ausbeute: 13 mg (0.013 mmol, 71% der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -2.7 (c = 0.15, Wasser)

^{1}H-NMR: (H_2O/D_2O 9:1): δ(ppm) = 8.29 (m, 1H, Asp-N*H*-β-Ala), 7.96 (m, 3H, Asp-N*H*-β-Ala, Asp-N*H*-β-Ala), 7.60 (m, 2H, β-Ala-N*H*-β-Ala), 6.87 (m, 2H, -N*H*-Pentyl), 4.52 (m, 1H, H-4 Gal), 4.40 (m, 1H, H-3 Gluc), 4.25 (m, 1H, -C*H*-Asp), 3.94 (m, 1H, -C*H*-Asp), 3.79 (m, 4H, H-4 Gluc, H-2 Gal, H-2 Gluc, H-3 Gal), 3.65 (m, 6H, H-1, H-6a und H-6b von Gal, Gluc) 3.54 (m, 6H, -CH_2-β-Ala), 3.48 (s, 6H, -CH_2-β-Ala, OH-Gruppen), 3.37-3.21 (m, 8H, H-5, Gluc und Gal, OH-Gruppen) , 3.12 (m, 4H, -O-CH_2-Pentyl), 2.77 (m, 4H, -CH_2-Asp), 2.58-2.53 (m, 8H, -NH-CH_2-β-Ala), 2.38 (m, 4H, -CH_2-NH-Pentyl), 1.49 (m, 4H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.37 (m, 4H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.21 (m, 4H, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).

^{13}C-NMR: (H_2O/D_2O 9:1): δ(ppm) = 174.6, 173.9, 172.9, 167.0, 153.3 (*C*O), 101.5 (C-1 Gal), 100.1 (C-1 Gluc), 78.2 (C-5), 75.9 (C-3), 73.7 (C-2), 71.6 (-O-*C*H_2-), 69.5 (C-4), 61.8 (C-6), 54.3 (-*C*H-Asp), 52.1-*C*H-Asp), 44.2 (-*C*H_2-Asp), 44.1 (-*C*H_2-Asp), 40.1 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 36.8 (-*C*H_2-CO-β-Ala), 36.6 (-*C*H_2-CO-β-Ala), 35.6 (-*C*H_2-CO-β-

Ala), 35.5(-*C*H_2-CO-β-Ala) , 32.9 (-NH-*C*H_2-β-Ala-), 30.8(-NH-*C*H_2-β-Ala-), 30.6 (-NH-*C*H_2-β-Ala-), 29.1(-NH-*C*H_2-β-Ala-), 28.8 (O-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 27.9 (O-CH_2-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 23.1 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-).

FAB-MS für $C_{42}H_{74}N_8O_{21}$ (m/z = 1026.5) =1049.8 $[M+Na]^+$
FT-ICR-MS: $[M+H]^+_{(theor.)}$ = 1027.5041, $[M+H]^+_{(gemessen)}$ = 1027.5070

Darstellung von NH_2-(β-Ala-β-Ala-GalBB-β-Ala-β-Ala-GalBB)-OH (64)

Nach AAV 11 werden 15 mg (0.009 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OtBu (**63**) mit einer 20%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Chloroform gegeben und für 6h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach mehrmaligen Koevaporieren mit Toluol wird im Vakuum getrocknet. Für die Entschützung der Acetylgruppe werden die teilentschützten Glykopeptidbaustein zu einer 7N Ammoniaklösung in Methanol (10 ml) gegeben und für mindestens 24h bei Raumtemperatur gerührt (AAV 12). Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen, dann zweimal mit 5 ml Diethylether extrahiert und die Wasserphase an Biogel säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung erhält man weiße Flocken.

Ausbeute: 6 mg (0.006 mmol, 67% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -3.9 (c = 0.15, Wasser)
FAB-MS für $C_{42}H_{74}N_8O_{21}$ (m/z = 1026.5) =1049.9 $[M+Na]^+$
Maldi-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 1049.504, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 1049.491

zu Kapitel 2.6.2

Darstellung von Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-OH (65)

Nach AAV 11 werden 50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**38**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-ent-

schützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstands mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 40 mg (0.04 mmol) quantitativ

Darstellung von NH_2-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (66)

50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**37**) werden nach AAV 9 mit 5%iger Piperidinlösung in DMF bei Raumtemperatur 2h gerührt. Mittels DC-Kontrolle ($CHCl_3$:MeOH (4:1)) wird der Verlauf der Entschützung kontrolliert. Dann verdünnt man mit Toluol und koevaporiert 3-5 mal mit Toluol. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 45 mg (0.04 mmol) quantitativ

zu Kapitel 2.6.3

Darstellung von Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*O*H (67)

Nach AAV 11 werden 50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**44**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstand mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 45 mg (0.04 mmol) quantitativ

Darstellung von NH_2-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (68)

50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**43**) werden nach AAV 9 mit 5%iger Piperidinlösung in DMF bei Raumtemperatur 2h gerührt. Mittels DC-Kontrolle ($CHCl_3$:MeOH (4:1)) wird der Verlauf der Entschützung kontrolliert. Dann verdünnt man mit Toluol und koevaporiert 3-5 mal, bis kein Geruch nach Piperdin mehr wahrgenommen werden kann. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 47 mg (0.04 mmol) quantitativ

zu Kapitel 2.6.4

Darstellung von NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (69)

50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) werden nach AAV 9 mit 5%iger Piperidinlösung in DMF bei RT 2h gerührt. Mittels DC-Kontrolle ($CHCl_3$:MeOH (4:1)) wird der Verlauf der Entschützung kontrolliert. Dann verdünnt man mit Toluol und koevaporiert 3-5 mal, bis kein Geruch nach Piperdin mehr wahrgenommen werden kann. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und weiterverwendet.

Ausbeute: 42 mg (0.04 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OH (70)

Nach AAV 11 werden 50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**47**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei RT *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstands mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und weiterverwendet.

Ausbeute: 44 mg (0.04 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (71)

a) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 44 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OH (**70**) in 10 ml DMF zusammen mit 42 mg (0.04 mmol) NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**69**) für 2h bei RT gerührt. DC-Kontrolle mit $CHCl_3$/MeOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit $CHCl_3$/MeOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 25 mg (0.012 mmol, 31% der Theorie)

b) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 44 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OH (**70**) in 10 ml DMF zusammen mit 42 mg (0.04 mmol) NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**69**) für 2h bei RT gerührt. DC-Kontrolle mit $CHCl_3$/MeOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit $CHCl_3$/MeOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 49 mg (0.024 mmol, 59% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -15.2 (c = 0.25, Dichlormethan)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.72 (d, 2H, Fmoc), 7.56 (d, 2H, Fmoc), 7.34 (m, 14H, Fmoc-, Benzylgruppen), 7.12 (b, 1H, Asp-N*H*-Asp), 6.80 (b, 1H, Asp-N*H*-ACHC), 6.60 (b, 1H, Asp-N*H*-ACHC), 6.04 (s, 1H, -N*H*-Fmoc), 5.40 (s, 2H, H-4), 5.11 (m, 4H, H-2, H-3), 4.96 (m, 4H, -*CH*-Asp) 4.41 (m, 2H, H-1), 4.17 (m, 2H, -CH_2-Fmoc), 4.07 (m, 5H, H-6a und H-6b, -C*H*-Fmoc), 3.84 (m, 4H, H-5, ACHC-C*H*-NH), 3.57 (m, 2H, -O-CH_2-), 3.33 (m, 4H, -O-CH_2-, -CH_2-NH-Pentyl), 3.12 (m, 4H, -CH_2-Pentyl, ACHC-C*H*-CO), 2.84 (m, 4H, -CH_2-Asp), 2.62 (m, 4H, -CH_2-Asp), 2.13, 2.10, 2.00, 1.94, 1.79, 1.71 (m, 24H, Acetylgruppen), 1.78 (m, 6H, -CH_2-ACHC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.69 (m, 4H, -CH_2-ACHC), 1.52 (m, 12H, -CH_2-ACHC, O-CH_2-CH_2-CH_2-

C*H*$_2$-CH$_2$-NH-), 1.32 (s, 9H, tert.Butyl), 1.30 (m, 6H, -CH$_2$-ACHC, O-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 181.9, 181.7, 179.2, 178.6, 173.3, 173.1, 170.2, 168.9, 154.1 (*C*O), 141.25, 139.5, 137.8, 129.3, 128.5, 128.3, 128.1, 127.8, 126.3, 125.1, 124.4 (Fmoc-Gruppe, Benzylgruppen) 100.1 (C-1) 89.8 (C_q *tert*.Butyl), 71.3 (C-5), 70.5 (C-3), 70.0 (-O-*C*H$_2$-), 69.6 (-CH$_2$-Fmoc), 68.8 (-*C*H$_2$-Benzyl), 68.6 (-*C*H$_2$-Benzyl), 68.4 (C-2), 67.2 (C-4), 62.0 (C-6), 58.6 (ACHC-*C*H-NH), 57.2 (ACHC-*C*H-NH), 53.8 (-*C*H-Asp), 53.3 (-*C*H-Asp), 52.1 (-*C*H-Asp), 50.0 (-*C*H-Asp), 44.2 (ACHC-*C*H-CO), 43.9 (ACHC-*C*H-CO), 39.8 (-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 38.1 (-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 36.1 (-*C*H$_2$-Asp), 33.5 (-*C*H$_2$-Asp), 33.1 (-*C*H$_2$-Asp), 32.7 (-*C*H$_2$-Asp), 32.4 (-*C*H$_2$-ACHC), 31.5 (-*C*H$_2$-ACHC), 30.1(-*C*H$_2$-ACHC), 29.8 (-*C*H$_2$-ACHC), 29.5(-*C*H$_2$-ACHC), 29.4 (O-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 28.9 (O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-NH-), 27.9 (C(CH$_3$)$_3$), 27.6 (-*C*H$_2$-ACHC), 24.2(-*C*H$_2$-ACHC), 23.0 (O-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 20.5, 19.1, 19.9, 19.1 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{101}H_{132}N_8O_{35}$ (m/z = 2016.9): 2017.9 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+Na]^+_{(theor.)}$ = 2017.90978, $[M+Na]^+_{(gemessen)}$ = 2017.91603

Darstellung von NH$_2$-(ACHC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH (72)

Nach AAV 11 werden 30 mg (0.015 mmol) Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**71**) mit einer 20%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Chloroform gegeben und für 6h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach mehrmaligem Koevaporieren mit Toluol wird im Vakuum getrocknet. Für die Entschützung der Acetylgruppe werden die teilentschützten Glykopeptidbaustein zu einer 7N Ammoniaklösung in Methanol (10 ml) gegeben und für mindestens 24h bei RT gerührt (AAV 12). Das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen, dann zweimal mit 5 ml Diethylether extrahiert und die Wasserphase an Biogel säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung erhält man weiße Flocken.

Ausbeute: 13 mg (0.011 mmol, 72% der Theorie)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -41.0 (c = 0.15, Wasser)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 8.55 (m, 1H, Asp-*NH*-Asp), 8.34 (m, 1H, Asp-*NH*-Asp), 8.31 (m, 1*H*, Asp-N*H*-ACHC), 8.10 (Asp-N*H*-ACHC), 8.00 (m, 1H, ACHC-N*H*-Asp), 7.63 (d, 1H, -CH_2-N*H*-Pentyl), 7.51 (d, 1H, -CH_2-N*H*-Pentyl), 6.89 (m, 1H, -NH_2-Amid), 6.80 (m, 1H, -NH_2-Amid), 4.55 (m, 4H, -C*H*-Asp), 4.48 (m, 2H, H-4), 3.96 (m, 7H, OH-Gruppen, -ACHC-C*H*-NH-) 3.61 (m, 6H, OH-Gruppen, O-CH_2-Pentyl, H-2), 3.59 (m, 8H, H-3, H-6a und H-6b, -ACHC-C*H*-NH), 3.32 (m, 4H, H-1, H-5), 2.58 (m, 12H, -CH_2-Asp, -CH_2-NH-Pentyl), 2.27 (s, 2H, ACHC-NH_2), 1.93 (m, 2H, -CH_2-ACHC), 1.82 (m, 6H, -CH_2-ACHC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.67 (m, 4H, -CH_2-ACHC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-) 1.46 (m, 16H, -CH_2-ACHC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 175.1, 174.1, 172.3, 168.9, 154.0 (*C*O), 102.9 (C-1), 75.0 (C-2), 74.9 (C-3), 72.3 (C-5), 69.4 (C-4), 68.9 (O-*C*H_2-Pentyl), 68.8 (O-*C*H_2-Pentyl), 69.9 (C-6), 51.4 (-*C*H-Asp), 50.1 (-*C*H-Asp), 49.8 (ACHC-C*H*-NH-), 48.9 (ACPC-*C*H-NH_2), 48.4 (ACHC-*C*H-CO), 46.63 (ACPC-*C*H-CO), 38.4 (Pentyl-*C*H_2-NH-), 36.1 (-*C*H_2-Asp), 35.9 (-*C*H_2-Asp), 30.9 (-*C*H_2-Asp) , 30.8 (-*C*H_2-Asp), 29.4 (-*C*H_2-ACHC), 29.0 (-*C*H_2-ACHC), 28.9(-*C*H_2-ACHC), 28.8(-*C*H_2-ACHC), 28.7(-*C*H_2-ACHC), 28.6 (-*C*H_2-ACHC), 27.5 (O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 27.2 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 23.8 (-*C*H_2-ACHC), 23.4 (-*C*H_2-ACHC), 22.6 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-).

Long-Range-NOE-Signale:

6. Aminosäure ACHC	**5. Aminosäure Asp**	**4. Aminosäure Asp**	**3. Aminosäure ACHC**	**2. Aminosäure Asp**	**1. Aminosäure Asp**
-	8.00 -NH-	8.34 -NH-	8.10 -NH-	8.31 -NH-	8.55 -NH-
4.60 -CH-	4.55 -CH-Asp-	- -CH-Asp-	4.62 -CH-	4.55 -CH-Asp-	- -CH-Asp-
2.62 -CH_2-	2.58 -CH_2-Asp-	2.43 -CH_2-Asp-	2.77 -CH_2-	2.59 -CH_2-Asp-	2.53 -CH_2-Asp-
- CH-NH-CH_2-	1.37 CH-NH-CH_2-	1.32 CH-NH-CH_2-	- CH-NH-CH_2-	1.30 CH-NH-CH_2-	- CH-NH-CH_2-

Short-Range-NOE-Kupplungen:

7.80 (m, 1H, -N*H*-Pentyl-Asp) → 7.05 (m,1H, -NH_2-Amid) und zu 6.95 (m,1H, -NH_2-Amid

7.78 (m, 1H, -N*H*-Pentyl-Asp) → 7.05 (m,1H, -NH_2-Amid) und zu 6.95 (m,1H, -NH_2-Amid

FAB-MS für $C_{52}H_{88}N_{10}O_{23}$ (m/z = 1220.6): 1221.5 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+H+Na]^+_{(theor.)}$ = 622.299987, $[M+H+Na]^+_{(gemessen)}$ = 622.299950

zu Kapitel 2.6.5

Darstellung von Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-OH (74)

Nach AAV 11 werden 50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu (**51**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstands mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Ausbeute: 40 mg (0.04 mmol) quantitativ

Darstellung von NH_2-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (73)

50 g (0.04 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) werden nach AAV 9 mit 5%iger Piperidinlösung in DMF bei Raumtemperatur 2h gerührt. Mittels DC-Kontrolle ($CHCl_3$:MeOH (4:1)) wird der Verlauf der Entschützung kontrolliert. Dann verdünnt man mit Toluol und koevaporiert 3-5 mal, bis kein Geruch nach Piperdin mehr wahr-

genommen werden kann. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 35 mg (0.04 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (75)

a) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 40 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-OH (**74**) in 10 ml DMF zusammen mit 35 mg (0.04 mmol) NH_2-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**73**) für 1h bei RT gerührt. DC-Kontrolle mit $CHCl_3$/MeOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit $CHCl_3$/MeOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 26 mg (0.013 mmol, 33% der Theorie)

b) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 40 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-OH (**74**) in 10 ml DMF zusammen mit 35 mg (0.04 mmol) NH_2-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**73**) für 1.5h bei RT gerührt. DC-Kontrolle mit $CHCl_3$/MeOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit $CHCl_3$/MeOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 43 mg (0.022 mmol, 54% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +19.2 (c = 0.12, Dichlormethan)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.72 (d, 2H, Fmoc), 7.56 (d, 2H, Fmoc), 7.34 (m, 14H, Fmoc-Gruppe, Benzylgruppen), 7.12 (b, 1H, Asp-N*H*-Asp), 6.80 (b, 1H, Asp-N*H*-ACPC), 6.60 (b, 1H, Asp-N*H*-ACPC), 6.04 (s, 1H, -N*H*-Fmoc), 5.40 (m, 2H, H-4 Gluc

und Gal), 5.18 (m, 4H, -C*H*$_2$-Benzyl), 5.11 (m, 4H, H-2 Gal und Gluc, H-3 Gal und Gluc), 4.97 (m, 2H, -*CH*-Asp) 4.41 (m, 2H, H-1 Gluc und Gal, -*CH*-Asp), 4.07 (m, 7H, -C*H*$_2$-Fmoc, H-6a und H-6b, -C*H*-Fmoc), 3.83 (m, 4H, H-5, ACPC-C*H*-NH), 3.46 (m, 2H, -O-C*H*$_2$-), 3.33 (m, 4H, -O-C*H*$_2$-, -C*H*$_2$-NH-Pentyl), 3.12 (m, 4H, -C*H*$_2$-Pentyl, ACPC-C*H*-CO), 2.97 (m, 4H, -C*H*$_2$-Asp), 2.83 (m, 4H, -C*H*$_2$-Asp), 2.09, 2.05, 2.00, 1.98, 1.95, 1.93 (m, 24H, Acetylgruppen), 1.69 (m, 6H, -C*H*$_2$-ACPC, O-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 1.63 (m, 2H, -C*H*$_2$-ACPC), 1.44(m, 10H, -C*H*$_2$-ACPC, O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-NH-), 1.32 (s, 9H, *tert*.Butyl), 1.27 (m, 6H, -C*H*$_2$-ACPC, O-CH$_2$-CH$_2$-C*H*$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-).

^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 172.8, 172.6, 172.4, 172.1, 171.6, 169.3, 164.7, 161.0, 158.8 (CO), 148.8, 145.9, 143.7, 140.1, 137.9, 130.9, 130.7, 130.3, 129.2, 129.1, 128.8, 127.6, 127.2, 123.1, 121.7 (Fmoc- und Benzylgruppen, aromatisch), 103.4 (C-1-Gal), 100.2 (C-1-Glu), 83.0 (C_q *tert*.Butyl), 74.8 (C-3-Glu), 73.8 (C-5-Gal), 73.5 (C-5-Glu), 73.1 (C-3-Gal), 72.7 (C-2-Glu), 72.3 (C-2-Gal), 71.9 (C-4-Glu), 71.0 (C-4-Gal), 69.6 (-O-*C*H$_2$-), 69.2 (-O-*C*H$_2$-), 65.2 (CH$_2$-Fmoc--), 64.1 (-CH$_2$-Benzyl), 63.4 (CH$_2$-Benzyl), 59.1 (C-6-Glu), 57.0 (C-6-Gal) , 54.0 (-ACPC-*C*H-NH), 52.7 (-ACPC-*C*H-NH), 52.4 (-*C*H-Asp), 51.9 (-*C*H-Asp), 49.2 (-*C*H-Asp), 46.9 (-*C*H-Asp), 42.0 (ACPC-C*H*-CO), 41.7 (ACPC-C*H*-CO), 38.6 (-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 37.5 (-*C*H$_2$-NH-Pentyl), 35.2 (-*C*H$_2$-Asp), 33.6 (-*C*H$_2$-Asp), 33.1(-*C*H$_2$-Asp), 31.1 (-*C*H$_2$-Asp), 30.6 (-CH$_2$-ACPC), 30.1 (-*C*H$_2$-ACPC), 29.6 (O-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 29.4 (O-CH$_2$-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-NH-), 28.3 (C(*C*H$_3$)$_3$), 26.7 (-*C*H$_2$-ACPC), 26.1 (-*C*H$_2$-ACPC), 25.3 (-*C*H$_2$-ACPC), 25.1 (O-CH$_2$-CH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$-CH$_2$-NH-), 22.9, 22.9, 22.8, 22.7, 22.6 (Acetyl).

FT-ICR-MS: $[M+2Na]^{++}_{(theor.)}$ = 1017.41332, $[M+2Na]^{++}_{(gemessen)}$ = 1017.41851

FT-ICR-MS: $[M(-2OAc)+H+Na]^{++}_{(theor.)}$ = 963.39506,

$[M(-2OAc)+H+Na]^{++}_{(gemessen)}$ = 963.38794

Darstellung von NH_2-(ACPC-Asp-GlucBB-ACPC-Asp-GalBB)-OH (76)

Nach AAV 11 werden 30 mg (0.015 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**75**) mit einer 20%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Chloroform gegeben und für 6h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach mehrmaligem Koevaporieren mit Toluol wird im Vakuum getrocknet. Für die Entschützung der Acetylgruppe werden die teilentschützten Glykopeptidbaustein zu einer 7N Ammoniaklösung in Methanol (10 ml) gegeben und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (AAV 12). Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen, dann zweimal mit 5 ml Diethylether extrahiert und die Wasserphase an Biogel säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung erhält man weiße Flocken.

Ausbeute: 2 mg (0.009 mmol, 12% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +51.2 (c = 0.15, Wasser)
^{1}H-NMR: (D_20/H_20/AcOH (9:1:0.5)): δ(ppm) = 8.02 (m, 1H, Asp-*NH*-Asp), 7.64 (m, 1H, Asp-*NH*-Asp), 7.51 (m, 1*H*, Asp-N*H*-ACPC), 7.34 (m, 1H, Asp-N*H*-ACPC),7.32 (m, 1H, ACPC-N*H*-Asp), 7.51 (d, 1H, -CH_2-N*H*-Pentyl), 4.68 (m, 2H, -C*H*-Asp), 4.36 (d, 1H, H-1-Galac), 4.27 (m, 2H, H-1, -C*H*-Asp), 3.88 (m, 3H, -C*H*-Asp, H-4), 3.72 (m, 3H, H-6a und H-6b, -ACPC-C*H*-NH-) 3.58 (m, 4H, H-6a und H-6b, H-5), 3.46 (m, 2H, -ACPC-C*H*-NH, H-3), 3.46 (m, 9H, O-CH_2-Pentyl, H-2, OH-Gruppen), 3.16 (m, 7H, Pentyl-CH_2-NH-, OH-Gruppen), 2.89-2.64 (m, 10H, OH-Gruppen, -CH_2-Asp), 2.22 (m, 1H, -ACPC-C*H*-), 2.00 (m, 3H, -ACPC-C*H*-, ACPC-NH_2), 1.82 (m, 6H, -CH_2-ACPC), 1.64 (m, 6H, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.55 (m, 4H, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-) 1.49-1.33 (m, 12H, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR:(D_20/H_20/AcOH (9:1:0.5)): δ(ppm) = 174.2, 168.8, 165.7, 165.1, 164.5, 160.4, 155.3 (*C*O), 101.6 (C-1 Galac), 100.6 (C-1 Gluc), 78.1 (C-2 Galac), 76.6 (C-2 Gluc), 75.4 (C-3), 70.9 (C-5), 69.5 (C-4), 67.8 (O-*C*H_2-Pentyl), 67.4 (O-*C*H_2-Pentyl), 64.2 (C-6 Galac), 62.6 (C-6 Gluc), 50.9 (-*C*H-Asp), 50.8 (-*C*H-Asp), 50.5 (– C*H*-Asp), 47.2 (ACPC-C*H*-NH-), 46.7 (ACPC-*C*H-NH_2), 45.7 (ACPC-*C*H-CO), 40.2 (Pentyl-*C*H_2-NH-), 38.4 (-*C*H_2-Asp), 38.1 (-*C*H_2-Asp), 36.1 (-*C*H_2-Asp), 30.2 (-*C*H_2-ACPC),

29.5 (-*C*H_2-ACPC), 29.1 (-*C*H_2-ACPC), 27.4 (-*C*H_2-ACPC), 27.0 (-*C*H_2-ACPC), 22.7 (O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 21.8 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 20.8 (-*C*H_2-ACPC), 20.6 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-).

FAB-MS für $C_{50}H_{84}N_{19}O_{23}$ (m/z = 1192.6) = 1193.0 $[M+H]^+$, 1214.2 $[M+Na]^+$

FT-ICR-MS: $[M+2Na]^{++}_{(theor.)}$ = 619.2746, $[M+2Na]^{++}_{(gemessen)}$ = 619.27532

zu Kapitel 2.6.6

Darstellung von Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OH (77)

Nach AAV 11 werden 50 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**50**) in 20%iger TFA-Lösung in Dichlormethan für 2h bei Raumtemperatur *tert*.Butyl-entschützt. Dann wird mit 10 ml Toluol verdünnt und das Lösungsmittel entfernt. Nach Koevaporierung des Rückstands mit 5 mal 10 ml Toluol wird im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.

Ausbeute: 40 mg (0.04 mmol) quantitativ

Darstellung von Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (78)

a) PyBOP/HOBt-Methode

Nach AAV 8 werden 40 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OH (**77**) in 10 ml DMF zusammen mit 35 mg (0.04 mmol) NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**73**) für 1h bei Raumtemperatur gerührt. DC-Kontrolle mit Chloroform/Methanol (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit Chloroform/Methanol (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 25 mg (0.013 mmol, 32% der Theorie)

b) HBTU/HOBt-Methode

Nach AAV 6 werden 40 mg (0.04 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OH (**77**) in 10 ml DMF zusammen mit 35 mg (0.04 mmol) NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**73**) für 1 h bei RT gerührt. DC-Kontrolle mit $CHCl_3$/MeOH (19:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch mit $CHCl_3$/MeOH (19:1) aufgereinigt.

Ausbeute: 38 mg (0.019 mmol, 47% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -9.2 (c = 0.1, Chloroform)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 7.96 (b, 1H, Asp-NH-Asp), 7.78 (d, 2H, Fmoc), 7.55 (d, 2H, Fmoc), 7.28 (m, 14H, Fmoc, 2 Benzylgr.), 5.33 (s, 2H, -C*H*$_2$-Benzyl), 5.14 (m, 4H, H-4, -C*H*$_2$-Benzylgr.), 4.96 (m, 4H, H-2, -C*H*-Asp), 4.39 (m, 4H, H-3, C*H*-Asp), 4.28 (m, 2H, H-1), 4.07 (m 6H, -C*H*$_2$-Fmoc-, H-6a und H-6b), 3.84 (m, 4H, H-5, -ACPC-C*H*-NH, ACHC-C*H*-NH-), 3.59 (b, 1H, -C*H*-Fmoc) 3.41 (m, 4H, -O-C*H*$_2$-), 3.25 (m, 4H, -O-C*H*$_2$-, ACPC-C*H*-CO, ACHC-C*H*-CO), 2.83 (m, 4H, -CH_2-Asp), 2.49 (m, 4H, -CH_2-Asp), 2.08, 2.03, 1.99, 1.94, 1.93 (s, 24H, Acetyl), 1.86 (m, 3H, -C*H*$_2$-NH-Pentyl), 1.76 (m, 4H, -C*H*$_2$-ACHC, O-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.46 (m, 12H,-C*H*$_2$-ACHC, -C*H*$_2$-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-NH-), 1.36 (s, 11H, C(CH_3)$_3$, -C*H*$_2$-ACHC) 1.23 (m, 8H,-C*H*$_2$-ACPC, O-CH_2-CH_2-C*H*$_2$-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 175.4, 174.7, 172.7, 171.7, 169.9, 169.7, 169.6, 155.5 (CO), 149.8, 140.7, 128.9, 128.0, 127.6, 127.2, 126.5, 124.6, 124.4, 123.7, 121.0 (Fmoc und Benzylgr.), 100.7 (C-1), 84.0 (C_q *tert*.Butyl), 70.3 (C-5), 69.9 (C-3), 69.4 (O-*C*H_2-), 68.3 (C-2), 67.6 (-*C*H_2-Benzyl), 66.5 (-*C*H_2-Fmoc), 65.5 (C-4), 60.6 (C-6), 53.9 (ACPC-*C*H-NH), 51.8 (ACHC-*C*H-NH), 49.9 (-*C*H-Asp), 48.5 (-*C*H-Asp), 47.7 (-*C*H-Fmoc), 45.9 (ACPC-*C*H-CO), 42.0 (ACHC-*C*H-CO), 39.3 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 38.8 (-*C*H_2-NH-Pentyl), 38.3 (-*C*H_2-Asp), 38.0(-*C*H_2-Asp), 36.4(-*C*H_2-Asp), 36.2 (-*C*H_2-Asp), 35.4(-*C*H_2-ACHC), 28.7(-*C*H_2-ACPC), 28.4 (-*C*H_2-ACPC),
27.9 (O-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 27.6 (O-CH_2-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 27.4 (C(CH_3)$_3$), 26.8 (O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 24.4(-*C*H_2-ACHC), 24.2(-*C*H_2-ACHC), 23.8 (-*C*H_2-ACPC), 22.6, 22.4, 21.4, 20.1, 20.0 (Acetyl).

FAB-MS für $C_{100}H_{130}N_8O_{35}$ (m/z = 2002.9) = 2004.1 $[M+H]^+$

FT-ICR-MS: $[M+2H]^{++}_{(theor.)}$ = 1002.43921, $[M+2H]^{++}_{(gemessen)}$ = 1002.43534

Darstellung von NH_2-(ACPC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH (79)

Nach AAV 11 werden 30 mg (0.015 mmol) Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu (**78**) mit einer 20%igen Lösung von Trifluoressigsäure in Chloroform gegeben und für 6h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach mehrmaligem Koevaporieren mit Toluol wird im Vakuum getrocknet. Für die Entschützung der Acetylgruppe werden die teilentschützten Glykopeptidbausteine zu einer 7N Ammoniaklösung in Methanol (10 ml) gegeben und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (AAV 12). Das Lösungsmittel wird danach im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen, dann zweimal mit 5 ml Diethylether extrahiert und die Wasserphase an Biogel säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung erhält man weiße Flocken.

Ausbeute: 12 mg (0.01 mmol, 65% der Theorie)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +5.9 (c = 0.13, Wasser)
^{1}H-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 8.43 (m, 1H, Asp-N*H*-Asp-), 8.32 (m, 1H, Asp-N*H*-Asp-), 8.27 (m, 1H, Asp-N*H*-ACHC-), 8.11 (m, 1H, ACHC-N*H*-Asp), 7.94 (m, 1H, Asp-N*H*-ACPC), 7.80 (m, 1H, -N*H*-Pentyl-Asp), 7.78 (m, 1H, -N*H*-Pentyl-Asp), 7.05 (m,1H, -NH_2-Amid), 6.95 (m,1H, -NH_2-Amid), 5.82 (m, 1H, C*H*-Asp), 4.59-4.40 (m, 4H, H-4, -C*H*-Asp), 4.34 (m, 2H, H-1), 4.12 (m, 2H, H-2, -C*H*-Asp), 3.82 (m, 4H, H-2, -C*H*-Asp), 3.66-3.54 (m, 16H, -OH-Gruppen, H-6a und H-6b, -ACPC-C*H*-CO, -ACHC-C*H*-CO) 3.39 (m, 6H, -O-CH_2-, H-5), 3.09 (m, 6H,-CH_2-NH-Pentyl,-ACPC-C*H*-NH, -ACHC-C*H*-NH) 2.66-2.40 (m, 8H, -CH_2-Asp), 1.93 (m, 4H, -CH_2-ACHC, -CH_2-ACPC, -ACPC-NH_2), 1.64 (m, 6H, -CH_2-ACHC, -CH_2-ACPC), 1.52 (m, 6H,-CH_2-ACHC, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.41 (m, 6H, -CH_2-ACHC, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 1.24 (m, 6H, -CH_2-ACHC, -CH_2-ACPC, O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-).
^{13}C-NMR: ($CDCl_3$): δ(ppm) = 174.5, 173.9, 170.9, 170.7, 169.2, 169.1, 167.9, 167.0, 165.6, 164.6 (*C*O), 101.8 (C-1), 76.7 (C-5), 76.2 (C-3), 73.7 (O-*C*H_2-), 71.6 (O-*C*H_2-),

, 68.7(C-4), 61.6 (C-6), 56.3 (*C*H-Asp), 54.9 (*C*H-Asp), 54.0 (ACPC-*C*H-NH), 51.9 (ACHC-*C*H-NH), 51.3 (*C*H-Asp), 43.6(ACPC-*C*H-CO), 41.5 (ACHC-*C*H-CO), 40.9(-*C*H_2-NH-Pentyl), 39.9 (-*C*H_2-Asp), 37.9 (-CH_2-Asp), 37.4 (-CH_2-Asp), 33.8 (-CH_2-ACHC), 32.6 (-CH_2-ACPC), 31.4 (-CH_2-ACHC), 29.1 (O-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-), 28.3 (O-CH_2-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-NH-), 27.9 (-CH_2-ACPC), 24.2 (-CH_2-ACHC), 23.1(O-CH_2-CH_2-*C*H_2-CH_2-CH_2-NH-), 20.8 (-CH_2-ACPC).

Long-Range-NOE-Signale:

6. Aminosäure ACPC	**5. Aminosäure Asp**	**4. Aminosäure Asp**	**3. Aminosäure ACHC**	**2. Aminosäure Asp**	**1. Aminosäure Asp**
-	7.94 -NH-	8.32 -NH-	8.11 -NH-	8.27 -NH-	8.43 -NH-
-	-	2.48 -CH_2-Asp-	-	2.54 -CH_2-Asp-	2.6 -CH_2-Asp-

Short-Range-NOE-Kupplungen:

7.80 (m, 1H, -N*H*-Pentyl-Asp) → 7.05 (m,1H, -NH_2-Amid) und zu 6.95 (m,1H, -NH_2-Amid

7.78 (m, 1H, -N*H*-Pentyl-Asp) → 7.05 (m,1H, -NH_2-Amid) und zu 6.95 (m,1H, -NH_2-Amid

Maldi-TOF für C51H87N11O22 (m/z = 1205.6): 1228.60 [M+Na]+, berechnet 1228.59 [M+Na]+

zu Kapitel 2.9.4

Lektin-Screening

Puffer-Lösungen:

Stammlösungen 1 M:

A: Spülpuffer TBS pH 7.5:

121.14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan auf 1 L destilliertem H_2O, mit 1 N HCl auf pH 7.5 eingestellt

B: Spülpuffer TBS /Tween

121.14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan auf 1L destilliertes H_2O, 2,5 g Tween 20 auf 1 L destilliertem H_2O, mit 1 N HCl auf pH 7.5 eingestellt

Gebrauchspuffer 20 mM:

2 %ige Lösungen der Stammlösungen in destilliertem H_2O

Färbepuffer:

A: Acetatpuffer: pH 5.0:

4.10 g NaOAc in 900 mL destilliertem H_2O,mit konz. HCl auf pH 5.0 eingestellt

B: TBS-Puffer: pH 9.5

2.42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan auf 1 L destilliertem H_2O, mit 1N NaOH auf pH 9.5 eingestellt

dann wird: 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.

Lektinlösungen:

Die Standardkonzentration der Lektinlösungen 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 Lektin 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.

Lectintest mit POD – labeled Lectinen / AEC- Farbreaktion

Mit den entschützten Glykopeptiden (**61**) (**63**) (**72**) (**76**) und (**79**) werden Stammlösungen von je 1 mmol/l hergestellt in Wasser. Auf eine Nitrocellulosemembran werden jeweils 0.5 µl der Lösung aufgetragen und trocknen gelassen. Die Membran wurde 3 × 5 min mit TBS-Puffer gespült und anschließend mit TBS-Tween-Puffer 1x 5 min 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 und 1x 5 min mit TBS-Tween-Puffer gespült. Dann wird die Membran für 1 h mit der Lektinlösung POD- labeled inkubiert, die Lösung wird wiederverwendet. Die Membran wird 3 × 5 min mit 25 ml TBS- Puffer gespült und 1x 5 min mit TBS-Tween-Puffer gespült.

Für die Färbungsreaktion wird die Membran 15 min mit 50 ml frisch hergestellter H_2O_2 / AEC / Acetatpuffer – Färbelösung geschwenkt. Nach 15 min wird abgebrochen und mit dest. Wasser gespült. Die Membran wird getrocknet und eingescannt.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die aus unserer Arbeitsgruppe entwickelten Glykopeptidbausteinen (**3**) und (**4**) verwendet, mit dem Aufbau aus einer Kohlenhydrat-Einheit, einer Spacer-Einheit und einer Aminosäuren-Einheit, die miteinander verbunden sind. Diese Glykopeptidbausteine wurden für die Imitierung von Glykomimetika benutzt. Hierfür werden sie zuerst zu Tripeptidbausteine verknüpft, die wiederum zu längeren Peptidketten nach dem Baukastenprinzip zu Hexapeptide gekuppelt werden. Diese Tripeptidbausteine wurden nach der Schutzgrupppenstrategie Fmoc/*tert*.Butyl dargestellt. Die Asparaginsäure in den Glykopeptidbausteinen (**3**) und (**4**) fungiert hierfür wie eine β-Aminosäuren und wurde über die β-Carboxylfunktion als β-Peptid verknüpft. Weiter wurden alicyclische β-Aminosäuren in das Rückgrat der Tripeptide eingebaut, um bekannte Strukturen der β-Peptide wie Helices, β-Faltblätter oder Turns darzustellen. Die Darstellung der Tripeptide (**28**) und (**29**) hat mit dem Einbau des Dipeptidbausteines Fmoc-β-Ala-β-Ala-OH nach der PyBOP/HOBt-Methode mit einer Ausbeute von 67% begonnen. Dann wurden die beiden Tripeptide (**58**) und (**59**) mit der HBTU/HOBt-Methode zum Hexapeptid (**60**) in einer Ausbeute von 61% dargestellt. Anschließend wurde das Hexapeptid (**60**) vollständig zum Hexapeptid (**61**) t mit einer Ausbeute von 71% entschütz (Abbildung 30).

Weiter wurden die beiden alicyclischen β-Aminosäuren ACHC und ACPC eingebaut, die stabile Sekundärstrukturen wie Helices durch ihren Einbau erzwingen. Die beiden β-Aminosäuren wurden nach bekannten Methoden in einer Ausbeute von 53% für ACHC und von 63% für ACPC hergestellt. Hieraus wurde als erstes das Fmoc-(ACHC-Asp)-OH mit dem Glykobaustein (**22**) zum Tripeptid (**47**) verknüpft nach der HBTU/HOBt-Methode mit einer Ausbeute von 64%. Anschließend wurden die Tripeptide (**69**) und (**70**) mit den endständigen β-Aminosäuren ACHC zum Hexapeptid (**71**) nach der HBTU/HOBt-Methode in einer Ausbeute von 59% erhalten. Nach vollständiger Entschützung hat man das Hexapeptid (**72**) mit einer Ausbeute von 72% erhalten (Abbildung 31).

Auf gleiche Weise wurde das Hexapeptid (**75**) aus den Tripeptiden (**73**) und (**74**) mit der HBTU/HOBt-Methode in einer Ausbeute von 54% und das Hexapeptid (**78**) mit den Tripeptiden (**73**) und (**77**) in einer Ausbeute von 47% hergestellt (Abbildung 32).

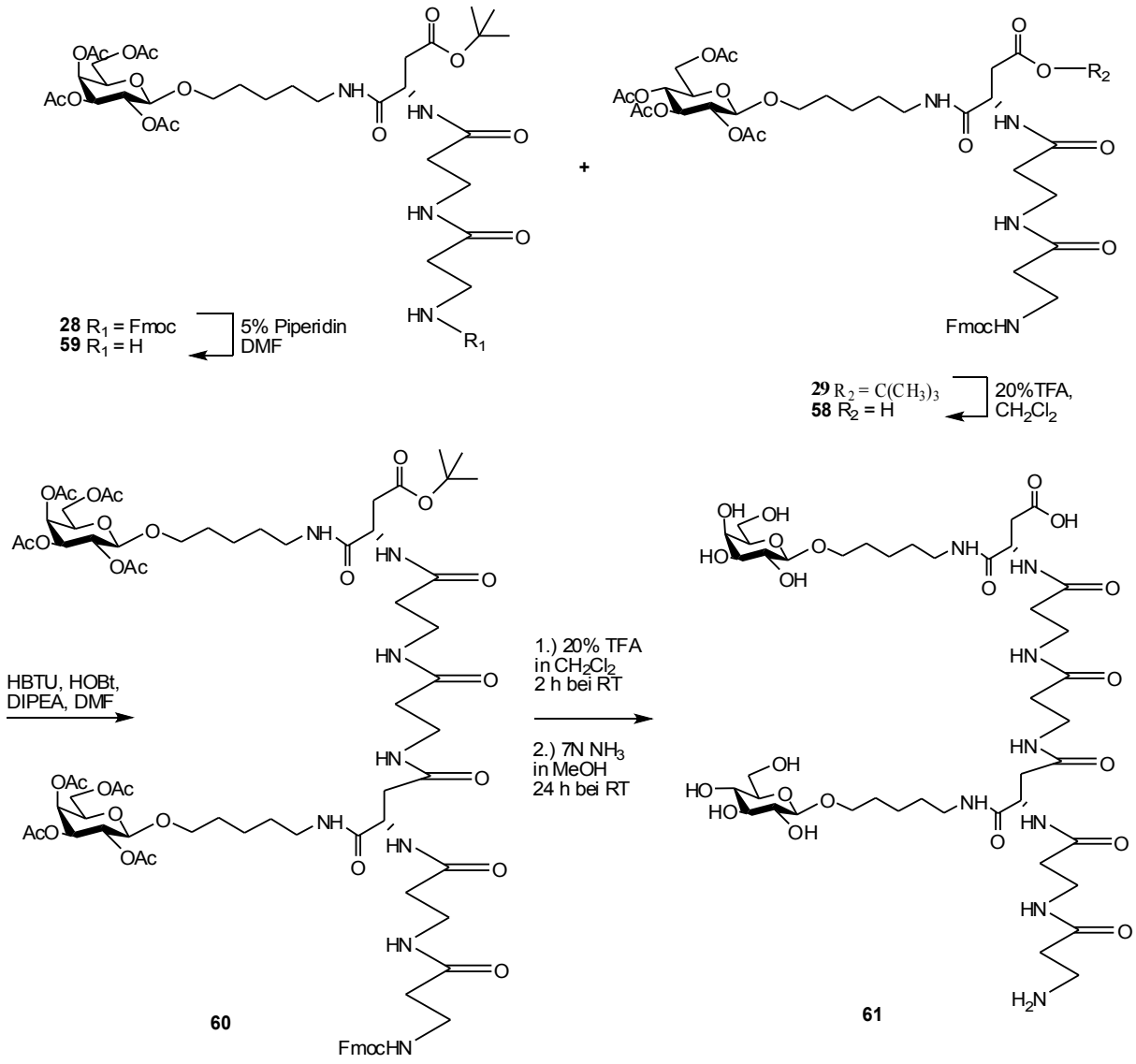


Abb.30: Darstellung des Hexapeptide (**61**)

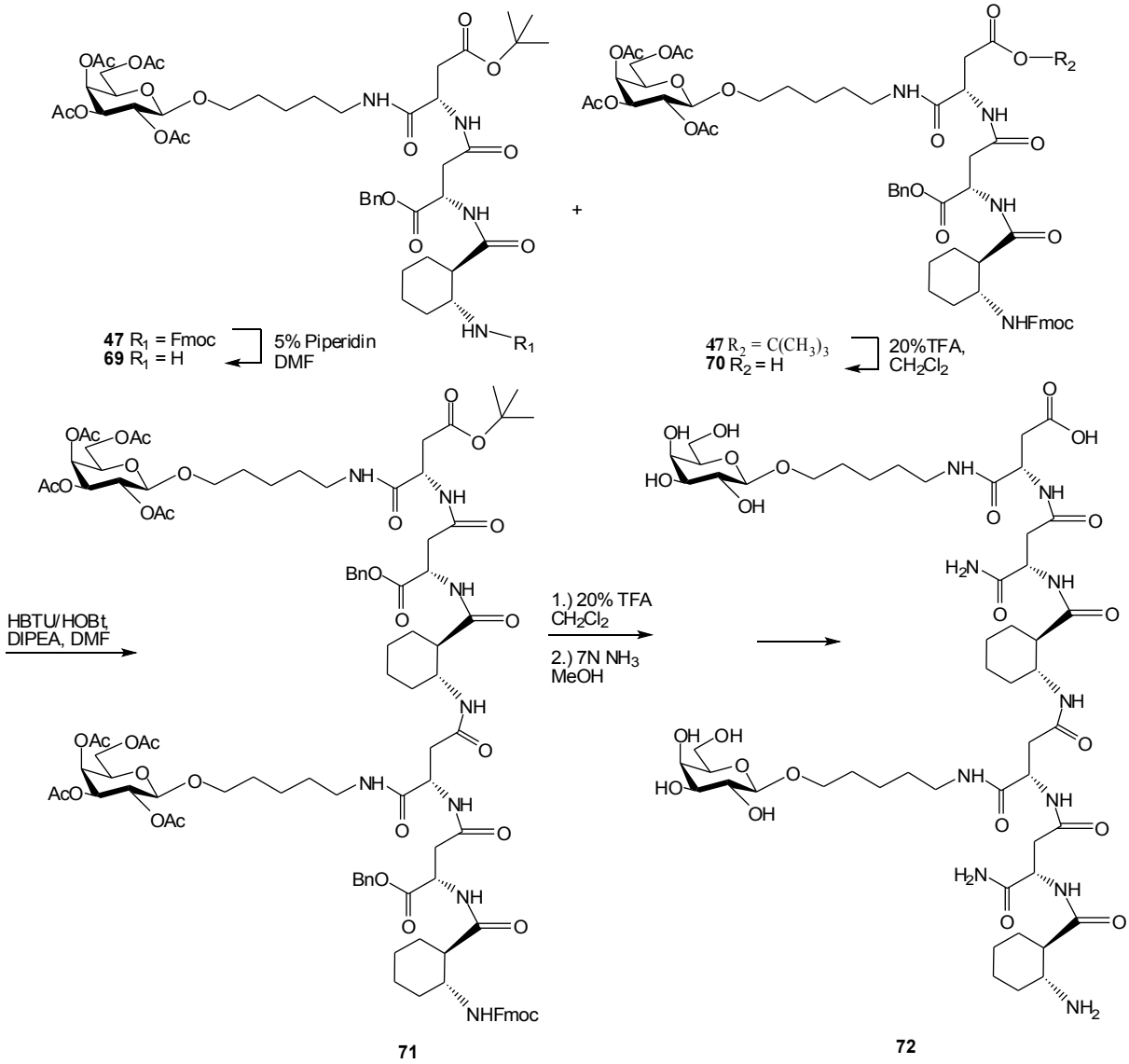
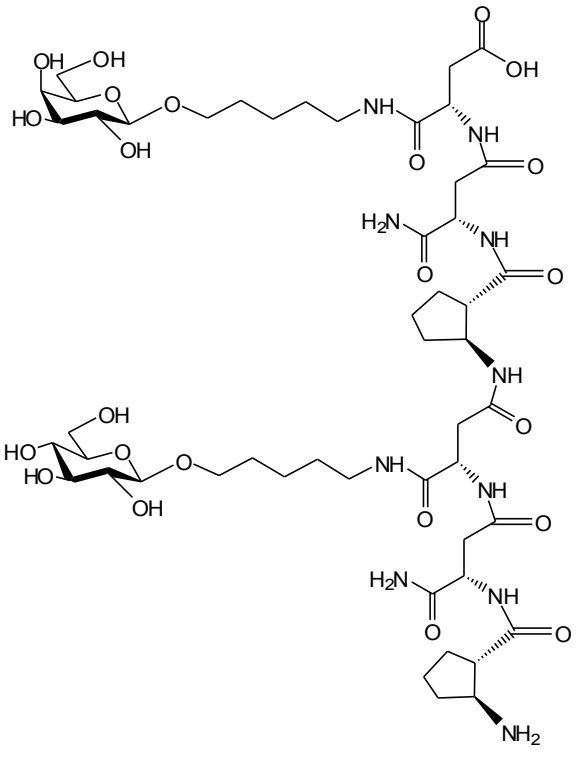


Abb. 31: Darstellung des Hexapeptides **(72)**

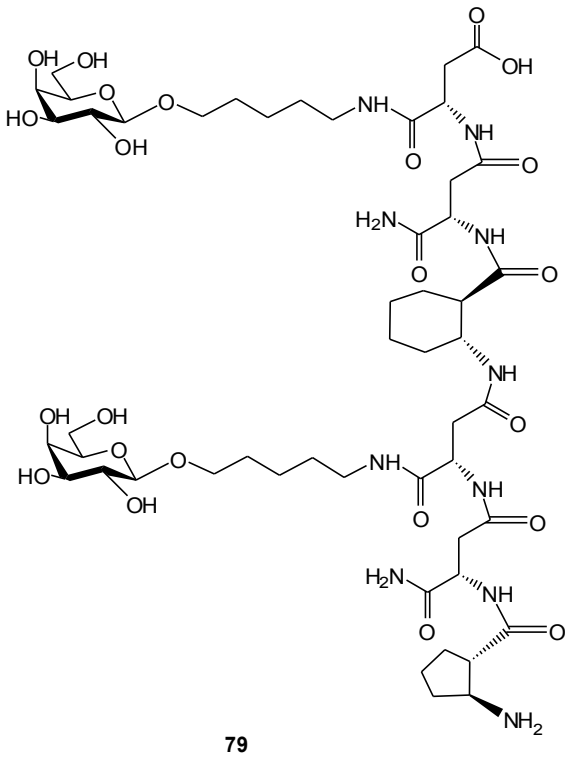
Die Strukturaufklärung der Hexapeptiden (**61**) (**72**) (**76**) und (**79**) erfolgte durch Auswertung der NOESY- und TOSCY-Spektren und die Betrachtung der chemischen Verschiebung bei den Hexapeptiden (**61**) (**72**) und (**79**), die auf eine offenkettige Struktur hinweist. Dagegen zeigte das Hexapeptid (**72**) Kupplung über den Raum, die eine stabile Sekundärstruktur in Form einer α-Helix bekräftigen. Die Auswertung der CD-Spektren hat diese Aussage der Hexapeptiden (**61**) (**72**) (**76**) und (**79**) gefestigt. Die Kurvenverläufe der Hexapeptiden (**76**) und (**79**) im Phosphatpuffer pH 7.5

zeigen eine Random Coil Struktur. Dagegen weist der Kurvenverlauf des Hexapeptides (**72**) auf eine stabile Sekundärstruktur hin, die der α-Helix.

Zum Abschluss wurden die erhaltenen Hexapeptide (**61**) (**72**) (**76**) und (**79**) auf Nitrocellulose gespottet und einem Lektinscreening unterworfen. Mit den Lektinen Con A, PHE-A und GNA wurde untersucht, ob eine Änderung im Peptidrückgrat eine Auswirkung auf die Affinität von Lektinen an die Glykopeptiden (**61**) (**72**) (**76**) und (**79**) zur Folge hat. Die Lektine waren alle peroxidase-gelabelt und konnten mit AEC angefärbt werden. Auffällig war hierbei die qualitative Anbindung aller drei Lektine an das Hexapeptid (**79**), welches keine stabile Sekundärstruktur besitzt. Die starre Struktur des Hexapeptides (**72**) ergab nur im Fall von Con A eine sichtbare Färbung durch AEC, ebenfalls das Hexapeptid (**76**), welches noch eine sichtbare Verfärbung mit Con A und GNA erhält. Die anderen offenkettigen Hexapeptide (**61**) und (**76**) zeigten qualitativ geringe Anbindung. Somit wurde die flexible Struktur (**79**) mit dem Einbau von ACPC und ACHC für die Imitation von Glykomimetika bevorzugt.



76



79

Abb.32: Hexapeptide (**76**) und (**79**)

5. Anhang

5.1 Bezifferung der Verbindungen

1 [5-(Benzyloxycarbonylamino)-pentyl]-2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-β-D-gluco-pyranosid

2 [5-(Benzyloxycarbonylamino)-pentyl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galacto-pyranosid

3 *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*-butylester

4 *N*-α-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*-butylester

5 *trans*-(±)-Cylcohexandicarbonsäure

6 *trans*-(-)-Cyclohexandicarbonsäure

7 (1*R*,2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäurehydrochlorid

8 (1*R*,2*R*)-2-(*9H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-cyclohexancarbonsäure

9 (1*S*,2*S*)-Aminocyclopentancarbonsäurehydrochlorid

10 6-Azabicyclo[3.2.0]heptan-7-on

11 *trans*-(±)-Aminocyclopentancarbonsäure

12 *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*trans*-2-Aminocyclopentancarbonsäure

13 [*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*trans*-2-aminocyclopentancarbonyl]-(*R*)-(+)-α-methylbenzylamin

14 *trans*-(1*R*,2*R*)-2-Aminocyclopentancarbonyl)-(*R*)-(+)-α-methylbenzylamin

15 *trans*-(1*S*,2*S*)-2-Aminocyclopentancarbonyl)-(*R*)-(+)-α-methylbenzylamin

16 (1*S*,2*S*)-2-(*9H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-cyclopentancarbonsäure

17 Ethyl-(1*S*,2*S*)-2-[(1'*S*)-Phenylethyl]-aminocyclopentancarbonsäurehydrochlorid

18 Fmoc-Asp-OH-OBn

19 Fmoc-Asp-OPfp-OBn

20 Fmoc-β-Ala-OPfp

21 Fmoc-Aib-OPfp

22 α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparagin-säure-β-*tert*-butylester

23 α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparagin-säure-β-*tert*-butylester

24 Fmoc-[β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

25 Fmoc-[β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu

26 NH_2-[β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

27 NH_2-[β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu

28 Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

29 Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu

30 β-Alanin-*tert*.Butylester

31 Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-*tert*.Butylester

32 Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-OH

33 Fmoc-β-Alanyl-β-Alanin-OPfp

34 NH_2-Asp-O*t*Bu-OBn

35 Fmoc-(Asp-Asp)-*Ot*Bu

36 Fmoc-(Asp-Asp)-*O*H

37 Fmoc-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

38 Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu

39 Fmoc-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

40 NH_2-[Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

41 Fmoc-(Aib-Asp)-*Ot*Bu

42 Fmoc-(Aib-Asp)-OH

43 Fmoc-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

44 Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu

45 Fmoc-(ACHC-Asp)-*Ot*Bu

46 Fmoc-(ACHC-Asp)-OH

47 Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

48 Fmoc-(ACPC-Asp)-*Ot*Bu

49 Fmoc-(ACPC-Asp)-OH

50 Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

51 Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu

52 Fmoc-(ACPC-β-Ala)-*Ot*Bu

53 Fmoc-(ACPC-β-Ala)-OH

54 Fmoc-[ACPC-β-Ala-(AcGlucBB)]-*Ot*Bu

55 Fmoc-(β-Ala-Asp)-O*t*Bu

56 Fmoc-(β-Ala-Asp)-OH

57 Fmoc-[β-Ala-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

58 Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)]-OH

59 NH_2-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

60 Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGlucBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

61 NH_2-(β-Ala-β-Ala-GlucBB-β-Ala-β-Ala-GalBB)-OH

62 Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-OH

63 Fmoc-[β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)-β-Ala-β-Ala-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

64 NH_2-(β-Ala-β-Ala-GalB-β-Ala-β-Ala-GalBB)-OH

65 Fmoc-[Asp-Asp-(AcGlucBB)]-OH

66 NH_2-[Asp-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

67 Fmoc-[Aib-Asp-(AcGlucBB)]-*O*H

68 NH_2-[Aib-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

69 NH_2-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

70 Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)]-OH

71 Fmoc-[ACHC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

72 NH_2-(ACHC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH

73 NH_2-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

74 Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)]-OH

75 Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGlucBB)-ACPC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

76 NH_2-(ACPC-Asp-GlucBB-ACPC-Asp-GalBB)-OH

77 Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)]-OH

78 Fmoc-[ACPC-Asp-(AcGalBB)-ACHC-Asp-(AcGalBB)]-*Ot*Bu

79 NH_2-(ACPC-Asp-GalBB-ACHC-Asp-GalBB)-OH

5.2 Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Å	Ångström
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
Ac_2O	Essigsäureanhydrid
AcGalBB	α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure
AcGlucBB	α-[(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure
ACHC	(1*R*, 2*R*)-Aminocyclohexancarbonsäure
ACPC	(1*S*, 2*S*)-Aminocyclohexancarbonsäure
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Ala	L-Alanin
Aib	Aminoisobuttersäure
Asp	Asparaginsäure
Bn	Benzyl
BnBr	Benzylbromid
Boc	*tert*.Butyl
Boc_2O	Di-*tert*-butyldicarbonat
BOP	Tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
COSY	Correlated Spectroscopy
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CSI	Chlorosulfonylisocyanat
d	Duplett
DC	Dünnschichtschromatographie
DCC	*N,N'*-Dicylcohexylcarbodiimid

DCM	Dichlormethan
dd	Duplett von Duplett
DEPT	distorsionless enhanced by polarization transfer
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDCl	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EE	Essigsäureethylester
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
Et_2O	Diethylether
FAB	Fast Atom Bombardment
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-Cl	Chlorameisensäurefluorenylmethoxycarbonylester
Fmoc-OSu	9*H*-Fluorenylmethoxycarbonylsuccinimid
GalBB	α-[(5-Aminopentyl]-β-D-galactopyranosyl)-L-asparaginsäure
GlucBB	α-[(5-Aminopentyl]--β-D-glucopyranosyl)-L-asparaginsäure
Gly	L-Glycin
gef.	gefunden
gem.	gemessen
ges.	gesättigt
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HATU	*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorphospat
HBTU	*O*-(*1H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz

i	Bezifferung der Aminosäure vom N-Terminus aus
J	Kopplungskonstante
konz.	Konzentriert
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
M	molar
m	Multiplett
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption – Time of Flight
MeOH	Methanol
min	Minuten
N	Normalität
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OAc	Acetyl
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle (10%)
PE	Petrolether 60/90
Pfp	Pentafluorphenol, Pentafluorphenyl
PIFA	Phenyliod(III)bis(trifluoroacetat)
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytri(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluor-phosphat
q	quartär
quant.	quantitativ
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
Ser	L-Serin
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
TBS	Tris Buffer Saline

TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N′,N′*-tetramethyluroniumtetra-fluorborat
*t*Bu	*tert*.Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time of Flight
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonopalmiat
Z	Benzyloxycarbonyl

6. Literaturverzeichnis

1 S. Roseman, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *45*, 41527-41542.

2 R. A. Laine, *Glycobiology*, **1994**, *4*, 759-767.

3 S. André, H. Kaltner, J. Kopitz, H.-C. Siebert, *Biospektrum*, **2006**, *7*, 706-709.

4 H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem*, **2004**, *1*, 740-764.

5 P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science*, **2001**, *291*, 2370-2376.

6 H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637-674.

7 J. S. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 882-911, *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.*, **2000**, *39*,.836-863.

8 P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.*, **1999**, *111*, 2446-2471, *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1999**, *38*, 2300-2324.

9 N. Aboitiz, M. Vila-Perelló, P. Groves, J. L. Asensio, D. Andreu, Fr. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 1245-1255.

10 E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C. H. Wong, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 833-866.

11 P. H. Seeberger, W.-Ch. Haase, *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4349-4393.

12 D. Röseling, *Disseration*, **2001**, 30ff.

13 C. Schips, *Dissertation*, **2005**, 132-134.

14 J. Hörzer, *Dissertation*, **2007**, 76-77.

15 T. Ziegler, D. Röseling, L. R. Subramanian,*Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 911-914.

16 S. E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angew. Chem.*, **1996**, *35*, 1230-1233, *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.,* **1996***, 35*, 1230–1232.

17 A. Varki, *Glykobiology*, **1993**, *2*, 97-130.

18 N. Jenkins, R. B. Parekh, D. C. James, *Nature Biotechnol.*, **1996**, *14*, 975-981.

19 C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science*, **2001**, *291*, 2357-2369.

20 M. A. Brun, M. D. Disney, *ChemBioChem.*, **2006**, *7*, 421-424.

21 R. J. Pieters, *ChemBioChem*., **2006**, *7*, 721-728.

22 I. Shin, S. Park, M.-R. Lee, *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 2894-2901.

23 H. Paulsen, *Angew. Chem.*, **1982**, 94, 184-201, *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.*, **1982**, *21*, 155-172.

24 H. M. I. Osborne, *Carbohydrates: Best synthetic Methods*, **1996**, *Academic Press: England*, 1-427.

25 S. H. Khan, R. A. O'Neil, *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*, **1996**, *Harwood Acacdemic Amsterdam*, 125ff.

26 G. J. Booms, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 1095-1121.

27 E. Attolio, A. J. Fairbanks, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 3061-3064.

28 A. Helenius. M. Aebi, *Sciene*, **2001**, *291*, 2364-2369.

29 R. A. Dwek, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 683-720.

30 R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, *54*, 631-664.

31 http://www.chem.ucalgary.ca/research/groups/ccling/research.htm.

32 H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *218*, 1-27.

33 F.-T.Liu, G. A. Rabinovich, *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *4*, 20-41.

34 G. A. Rabinovich, M. A. Toscano, J. M. Ilarregui, N. Rubinstein, *Glycoconjugate J.*, **2002**, *19*, 565-573.

35 T. K. Lindhorst, *Topics Curr. Chem.*, **2002**, *218*, 201-235.

36 M. K. Tong, G. Papandreou, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 6137-6139.

37 T. K. Lindhorst, *Spektrum der Wissenschaft*, **2000**, *3*, 16-18.

38 R. Ferritto, P. Vogel, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 3517-3518.

39 E. F. Fuchs, J. Lehmann, *Carbohydr. Res.*, **1976**, *49*, 267-273.

40 F. Schweizer, *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 240-264, *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.*, **2002**, *41*, 230-253.

41 S. A. W. Gruner, V. Traffault, G. Voll, E. Locardi, M. Stöckle, H. Kessler, *Chem. Eur. J*, **2002**, *8*, 4365-4376.

42 T. F. J. Lampe, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 1761-1764.

43 M. K. Christensen, M. Meldal, K. Bock, H. Cordes, S. Mouritsen. H. Elsner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1994**, 1299-1310.

44 C. Böttcher, K. Burger, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 4223-4226.

45 J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7995-8001.

46 C. Schips, T. Ziegler, *J. Carbohydr. Chem.*, **2005**, *24*, 773-788.

47 G. P. Zaloga, P. R. Roberts, K. W. Black, M. Lin, G. Zapata-Sudo, R. T. Sudo, T. E. Nelson, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **1997**, *272*, 62-468.

48 St. G. Davies, O. Ichibara, I. Lenoir, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 1411-1415.

49 X. W. Zuang, Y. L. Yap, *J. Molecular Structure*, **2004**, *677*, 73-76.

50 L. Pauling, R. Corey, *Proc. N. A. S.*, **1951**, *37*, 235-240.

51 Y. D. Wu, J. Q. Lin, Y. L. Zhao, *Helv. Chim Acta*, **2002**, *85*, 3144-3160.

52 R. P. Cheng, S. H. Gellmann, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.,* **2001**, *101*, 3219-3232.

53 T. Hintermann, D. Seebach, *Chimia*, **1997**, *50*, 244-247.

54 D. Seebach, S. Abele, J. Schreiber, B. Martinoni, A. K. Nussbaum, H. Schild, H. Schulz, H. Hennecke, R. Woessner, F. Bitsch, *Chimia*, **1998**, *52*, 734-739.

55 T. L. Raguse, E. A. Porter, B. Weisblum, S. H. Gellmann, *J. Am. Chem.Soc.*, **2002**, *124*, 12774-12785.

56 R. P. Cheng, S. H. Gellmann, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 3219-3232.

57 K. A. Bode, J. Applequist, *Macromolecules*, **1997**, *30*, 2144-2150.

58 D. Seebach, J. L. Matthews, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1997**, 2015-2022.

59 T. Hintermann, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta*, **1998**, *81*, 983-1002

60 M. Kondo, M. Kimura, K. I. Sato, H. Horimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, *60*, 1391-1397.

61 G. R. Marshall, E. E. Hodgkin, D. A. Langs, G. D. Smith, J. Zabrocki, M. T. Leplawy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 487-491.

62 D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellmann , *Nature*, **1997**, *387*, 381-384.

63 D. H. Appella, L. A. Christanson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 13071-13072.

64 R. Roy, Fr. D. Tropper, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 1058-1060.

65 U. K. Saha, R. Roy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2571-2573.

66 S. I. Nishimura, K. B. Lee, K. Matsuoka, Y. C. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *199*, 249-254.

67 A. Banerjee, P. Balaram, *Curr. Science*, **1997**, *73*, 1067-1077.

68 M. L. Wolfrom, A. Thompson, *Methods Carbohydr. Chem.*, **1963**, *2*, 211.

69 R. Roy. U.K. Saha, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1996**, 201-202.

70 A.Sasaki, N. Murahashi, H. Yamada, A. Morikawa, *Biol. Pharm. Bul.*, **1995**, *18*, 740-746.

71 K. -I. Oyama, T. Kondo, *Synlett*, **1999**, *10*, 1627-1629.

72 K. Toshima, *Carbohydr. Res.*, **2006**, *341*, 1282-1297.

73 R. R. Schmidt, *Angew. Chem.*, **1986**, *98*, 213-236, *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.*, **1986**, *25*, 212-235.

74 T. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1503-1531.

75 G. Wulff, G. Röhle, W. Krüger, *Chem. Ber.*, **2006**, *105*, 1097 - 1110.

76 K. Toshima, H. Nagai, S. Matsumura, *Synlett*, **1999**, *9*, 1420-1422.

77 W. Königs, E. Knoerr, *Ber. Dtsch. Gesell. Chem.*, **1901**, *6*, 957-982.

78 B. Helferich, K. Weis, *Chem. Ber.*, **1956**, *89*, 314-321.

79 R. Daiber, *Diplomarbeit*, **2003**, 18ff.

80 A. Berkessel, K. Glaubitz, J. Lex, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**,2948-2952.

81 H. Koch, J. Kotlan, *Monatsh. Chem.*, **1966**, *97*, 1648-1659.

82 B. Ch. Wallfisch, *Dissertation*, **2000**, 111-118.

83 L. T. Canerva, P. Csomòs, O.Sundholm, G. Bernáth, F. Fülöp, *Tetrahedron Assymmetry*, **1996**, *7*, 1705-1716.

84 F. Björkling, J. Boutelje, St. Gutenbeck, K. Hult, T. Norin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1985**, *21*, 16-19.

85 J. B. Rogan, *J. Org. Chem.*, **1962**, *27*, 3910-3912.

86 T. Yamazaki, Y.-F. Zhu, A. Probstl, R. K. Chadha, M. Goodman, *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 6644-6655.

87 L. Santana, E. Uriarte, E. Quezada, L. Valencia, *Synthesis*, **2004**, *15*, 2517-2522.

88 P.Csomós, G. Bernáth. F. Fülöp, *Monatsh.für Chemie*, **2002**, *133*, 1077-1084.

89 D. Xu, K. Prasad, O. Repic, Th. J. Blacklock, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *9*, 1445-1451.

90 P. R. LePlae, N. Umezawa, H.-S. Lee, S. H. Gellmann, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 5629-5632.

91 M. Schinnerl, J. K.Murray, J.M. Langenhan, S. H. Gellmann, *Eur. J. Org.Chem.*, **2003**, 721-726.

92 K. H. Altmann, M. Mutter, *Chem. Unserer Zeit*, **1993**, *6*, 274-286.

93 M. Bergmann, L. Zervas, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1932**, *65*, 1192-1201.

94 R. H. Sifferd, V. DuVigneaud, *J. Biol. Chem.*, **1935**, *108*, 753-761.

95 B. Ben-Ishai, A. Berger , *J. Org. Chem.,* **1952***, 17*, 1564-1570.

96 P. Watts, Ch. Wiles, S. J. Wiles, E. Pombo-Villar, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 5427-5439.

97 M. Bodanszky. N. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 685-689.

98 M. Bodanzsky, M. A. Ondetti, S. D. Levine, N. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, *89*, 6753-6757.

99 Th. Curtius, R. Wüstenfeld, *J. Prakt. Ch.*, **1902**, *70*, 73-88.

100 Th. Curtius, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1902**, *35*, 3226-3228.

101 Th. Wieland, H. Bernhard, *Liebig Ann. Chem.*, **1951**, *572*, 190-194.

102 R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta*, **1951**, *34*, 874 - 879.

103 J. R. Vaughan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 3547-3547.

104 B. Castro, J. R. Dormoy, *Tetrahedron Lett.*, **1972**, *13*, 4747-4750.

105 B. Castro, J. R. Dormoy, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *14*, 3243-3246.

106 V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *19*, 1269-1272.

107 R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 1927-1930.

108 J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 1067-1068.

109 I. Weisz, J. Roboz, G. Bekesi, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 563–566.

110 L. A. Rozov, P. W. Rafalko, S. M. Evans, L. Brockunier, K. Ramig, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 1319–1325.

111 L. Kisfaludy, I. Schön, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, 325-327.

112 L. Kisfaludy, I. Schön, *Synthesis*, **1986**, *4*, 303-305.

113 P. Li, J. C. Xu, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 721-724.

114 A. G. Jackson, G. W. Kenner, G. A. Moore, R. Ramage, W. D. Thorpe, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, *17*, 3627–3630.

115 J. R. Vaughan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 3547.

116 M. Herrmann, J. Ehrler, H. Ayser, A. Rindlisbacher, G. Höfle, *Eur. J. Org.*, **1999**, 3381–3392.

117 G. W. Anderson, R. Paul, *J. Am Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 4423.

118 S. Kato, T. Morie, N. Yoshida, *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, *43*, 699–702.

119 B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* , **1975**, *16*, 1219-1222.

120 G. W. Anderson, J. E. Zimmermann, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* , **1964**, *86*, 1839-1840.

121 W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, *103*, 788 - 798.

122 D. L. Boger, S. Miyazaki, S. Heon Kim, J. H. Wu, S. L. Castle, O. Loiseleur, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 10004-10011.

123 L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *37*, 3404-3409.

124 G. Valle, G. M. Bonora, C. Toniolo, *Can. J. Chem.*, **1984**, *62*, 2661–2666.

125 A. L. Carpino, P. Henklein, B. Foxman, I. Abdelmoty, B. Costisella, V. Wray, T. Domke, A. El-Faham, C. Mügge, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 5245-5247.

126 F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 9678-9683.

127 S. Arttamangkul, B. Arbogast, D. Barofsky, J. V. Aldrich, *Lett. Pept. Sci.*, **1996**, *3*, 357-370.

128 M. Bodanszky, J. Martinez, *Synthesis*, **1981**, *5*, 333-356.

129 Y. Yang, W. V. Sweeney, K. Schneider, S. Thörnqvist, B. T. Chait, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 9689-9692.

130 M. Bodanszky, G. F. Sigler, A. Bodanszky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 2352-2357.

131 M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, D. Hosaka, T. Inazu, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **2003**, 972-973.

132 M. Schelhass, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2192–2219, *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.*, **1996**, *35*, 2056-2083.

133 M. Goodman, W. McGahren, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 3028-3029.

134 D. S. Kemp, S. W. Wang, G. Busby, G. Hugel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 1043-1055.

135 R. J. Houben, D. Jin, D. W. Stafford, P. Proost, R. H. M. Ebberink, C. Vermeer, B. A. M. Soute, *Biochem. J.*, **1999**, *341*, 265-269.

136 Sh.D. Bryant, R. Guerrini, S. Salavdori, Cl. Bianchi, R. Tomatis, M. Attila, L. H. Lazarus, *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2579-2587.

137 F. Fülöp, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 2181-2204.

138 M. Bodanszky, S. S. Deshmane, J. Martinez, *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 1622-1625.

139 F. Lottspeich, H. Zorbas, *Spektrum Akad. Verlag*, *Heidelberg-Berlin*, **1998**, *Bioanalytik,* 40ff.

140 K. Wüthrich, *John Wiley & Sons, NewYork*, **1986**, *NMR of proteins and nucleic acids*, 166ff.

141 N. E. Shepherd, H. N. Hoang, Giovanni Abbenante, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2974-2983.

142 A. Nakamura, O. Jardetzky, *Biochemistry*, **1968**, *7*, 1226-1230.

143 D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry*, **1991**, *222*, 311-333.

144 F. Avbelj, D. Kocjan, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **2004**, *101*, 17394-17397.

145 J. Appelquist, *J. Chem. Phys.*, **1979**, *71*, 4332-4338.

146 R. Winter, F. Noll, *Teubner Verlag, Stuttgart*, **1998**, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, 276-296.

147 D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 2043-2066.

148 T. L. Raguse, J. R. Lai, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 5592 - 5593.

149 J. J. Barchi, X. Huang, D. H. Appella, L. A. Christianson, S. R. Durell, S. H. Gellmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2711-2718..

150 D. Seebach, K. Gademann, J. V. Schreiber, J. L. Matthews, T. Hintermann, B. Jaun, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 2033-2038.

151 J. Applequist, *Biopolymers*, **1982**, *21*, 779-795.

152 N. E. Shepherd, H. N. Hoang, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 2974-2983.

153 P. Wallimann, R. J. Kennedy, D. S. Kemp, *Angew. Chem.*, **1999**, *111*, 1377-1379.

154 D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, D. R. Powell, X. Huang, J. J. Barchi, S. H. Gellmann, *Nature*, **1997**, *387*, 381-384.

155 S. B. Y. Shin, K. Kirshenbaum, *Organic Letters*, **2007**, *9*, 5003-5006.

156 P. J. Mohler, J. A. Hoffman, J. Q. Davis, K. M. Abdi, Ch.-R. Kim, S. K. Jones, L. H. Davis, K. F. Roberts, V. Bennett, *J. Bio. Chem.*, **2004**, *279*, 25798–25804.

157 W. C. Boyd, E. Slapleigh, *Science*, **1954**, *119*, 419-427.

158 B. Hanßke, Ch. Thiel, T. Lübke, M. Hasilik, S. Höning, V. Peters, P. H. Heidemann, G. F. Hoffmann, E. G. Berger, K. Figura, Ch. Körner, *J. Clinical Inv.*, **2002**, *109*, 725-733.

159 W. I. Weis, K. Drickamer, *Ann. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, 441-473.

160 J. E. Gestwicki, Ch. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14922-14933.

161 W. I. Weis, *Ann. Rev. Biochem.*, **1996**, *65*, 441-473.

162 B. A. Williams, M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 22907-22911.

163 J. H. Naismith, R. A. Field, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 972-976.

164 R. Kaifu, T. Osawa, *Carbohdr. Res.*, **1976**, *52*, 179-185.

165 E. J. M. Van Damme, A. K. Allen, W. J. Peumans, *FEBS Letters*, **1987**, *215*, 140-144.

166 G. Hester, H. Kaku, I. J. Goldstein, Ch. Schubert Wright, *Nature Struct. Biol.*, **1995**, *2*, 472-479.

167 I. Shin, S. Park, M. Lee, *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 2894–2901.

168 D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, Ch. Deng, A. Wang, *Nat. Biotech.*, **2002**, *20*, 275-281.

169 Sh. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. Chai, *Nat. Biotechn.*, **2002**, *20*, 1011-1017.

170 B. Shaanan, H. Lis, N. Sharon, *Science*, **1991**, *254*, 862-866.

171 A. Dessen, D. Gupta, S. Sabesan, C. F. Brewer, J. C. Sacchettini, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4933-4942.

172 L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 5748-5749.

173 C. Narasimhan, C. S. Lai, J. Joseph, *Bioorg. Chem.*, **1995**, *24*, 50-58.

174 J. D. Bain, D. A. Wacker, E. E. Kuo, A. R. Chamberlin, *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 2389-2400.

175 L. A. Carpino, A. El-Faham, Charles A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 201-203.

176 P. McAdam, J. H. Sherritt, *Aust. J. Chem.*, **1993**, *46*, 959-967.

177 J. C. Sheehan, P. J. Cruickshank, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 2492-2493.

178 J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 205-208.

179 K. Sadalapure , Th. K. Lindhorst, *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 2066-2069, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **2000,** *39,* 2010-2013.

180 A. Werner, H. E. Conrad, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1899**, *32*, 3046-3055.

181 M. Marastoni, R. Guerrini, G. Balboni, S. Salvadori, G. Fantin, M.Fogagnolo, L. H. Lazarus, R. Tomatis, *Arzneim.-Forsch.*, **1999**, *49*, 6-12.

182 D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellmann , *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 6206-6212.

183 D. F. Mierke, G. Noßner, P. W. Schiller, M. Goodmann, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, *35*, 35-45.

184 S. Nakabayashi, C.D. Warren, R. W. Jeanloz, *Carbohydrate Research,* **1988**, 279-289.

185 V. V. Suresh Babu, H. N. Gopi, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 1049-1050.

186 K. Takeda, A. Akiyama, H. Nakamura, S. Takizawa, Y. Mizuno, H. Takayanagi, Y. Harigaya, *Synthesis*, **1994**, *10*, 1063-1066.

Meine akademischen Lehrer waren:
K. Albert, D. Christen, H. Eckstein, H.-J. Egelhaaf, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. Mayer, H.-J. Mayer, U. Nagel, H. Oberhammer, C. Ochsenfeld, D. Oelkrug, H. Pauschmann, H. Pommer, G. Reinhardt, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, G. Staudt, J. Strähle, U. Weimar, K.-P. Zeller, Th. Ziegler.

Lebenslauf:

Name:	Ralf Daiber	
Geburtsort:	Göppingen	
Familienstand:	ledig	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Eltern:	Rosemarie Daiber, geb. Lietzmann	
	Werner Daiber	
Schulen:	1982-1985	Grundschule Rechberghausen
	1985-1986	Grund-und Hauptschule Zell. u. A.
	1986-1988	Grund-und Hauptschule Hattenhofen
	1988-1990	Grund-und Hauptschule Zell. u. A.
	1990-1991	Grund-und Hauptschule Ursenwang Hauptschulabschluss
	1991-1993	Wirtschaftsschule Göppingen Fachschulreife
	1993-1996	Wirtschaftsgymnasium Göppingen Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	1996-1997	Zivildienstleistender an der Klinik am Eichert
Studium:	10/1997- 09/1999	Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
	27.09.1999	Vordiplom
	04.09.2003	Diplom und Diplomarbeit mit dem Thema: „*Untersuchungen zur Glykopeptidsynthese: β-Aminosäurerückgrat*“
	01.10.2003	Doktorarbeit mit dem Titel: „*Glykopeptidmimetika: Synthesen und Strukturen von glykosylierten Hexa-β-peptiden*“, Institut für organische Chemie II, Prof. Dr. Thomas Ziegler