

**Kombinatorische SPOT-Synthese neuer *S*-Glycopeptide
als Oligosaccharidmimikry zur Untersuchung von
Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Carsten Schips

| | |
|-----------------------------|---------------------------|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 22. September 2005 |
| Dekan: | Professor Dr. S. Laufer |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. Th. Ziegler |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. M. E. Maier |

Meiner Frau Jasmin und meinen Eltern in
Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Mein herzlicher Dank gilt:

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

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

Den Herren Dr. G. Lemanski und Dr. L. R. Subramanian sowie allen Kollegen und Mitarbeitern in Tübingen für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Frau A. Just für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn G. Nicholson für die Durchführung der GC-MS Messungen.

Herrn H. Bartholomä und H. Maier für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren.

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

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|------------------|
| 1 | BEZIFFERUNG DER VERBINDUNGEN | <u>1</u> |
| 2 | ABKÜRZUNGEN | <u>6</u> |
| 3 | EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG | <u>10</u> |
| 4 | OLIGOSACCHARIDE AUF ZELLMEMBRANEN | <u>13</u> |
| 4.1 | Vorkommen und Funktion | 13 |
| 4.2 | Synthese von Oligosacchariden | 15 |
| 4.3 | Oligosaccharidmimetika | 20 |
| 5 | SYNTHESEKONZEPT DER S-GLYCOPEPTIDE | <u>25</u> |
| 5.1 | Besonderheiten von S-Glycosiden | 25 |
| 5.2 | Vergleich Oligosaccharide und S-Glycopeptide | 25 |
| 5.3 | Aufbau der S-Glycopeptide aus S-Glycopeptid-Bausteinen | 29 |
| 6 | SYNTHESE DER S-GLYCOPEPTIDE | <u>34</u> |
| 6.1 | Synthese der S-Glycopeptid-Bausteine | 34 |
| 6.1.1 | Bausteine mit n-Pentyl-Spacer | 36 |
| 6.1.2 | Bausteine mit Aminosäure-Spacer | 49 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.1.3 | Bausteine mit Aromat-Spacer | 55 |
| 6.1.4 | Bausteine mit 1,2,3-Triazol-Spacer | 58 |
| 6.1.5 | Aktivierung der <i>S</i> -Glycopeptid-Bausteine | 63 |
| 6.2 | Synthese der <i>S</i>-Glycopeptide auf Zellulosemembranen | 65 |
| 6.2.1 | Festphasensynthesen | 65 |
| 6.2.2 | Verwendung der SPOT-Synthese | 69 |
| 6.2.3 | Derivatisierung der Zellulosemembranen | 71 |
| 6.2.4 | Auswahl eines geeigneten Linkers | 75 |
| 6.2.5 | Auswahl der Peptidaktivierung am Aminosäurerückgrat | 84 |
| 6.2.6 | Durchführung der SPOT-Synthesen | 88 |
| 6.2.7 | Aufbau kombinatorischer <i>S</i> -Glycopeptid-Bibliotheken | 91 |
| 6.2.8 | Analytik und weitere Verwendung der <i>S</i> -Glycopeptide | 100 |
| 7 | SCREENING DER <i>S</i>-GLYCOPEPTID-BIBLIOTHEKEN | 106 |
| 7.1 | Lectine als kohlenhydraterkennende Proteine | 106 |
| 7.1.1 | Vorkommen und Funktion | 107 |
| 7.1.2 | Strukturelle Basis der Kohlenhydraterkennung | 110 |
| 7.1.3 | Multivalente Wechselwirkungen | 113 |
| 7.2 | Auswahl der Lectine | 120 |
| 7.3 | Auswahl der Färbemethode | 122 |
| 7.4 | Durchführung des Lectin-Screenings | 130 |
| 7.5 | Ergebnisse des Lectins-Screenings | 132 |
| 8 | EXPERIMENTELLER TEIL | 140 |
| 8.1 | Allgemeines | 140 |
| 8.2 | Umsetzungen | 143 |
| 8.3 | <i>S</i>-Glycopeptid-Bausteine | 147 |
| 8.3.1 | Zu Kapitel 6.1.1 | 147 |

| | | |
|------------|----------------------------------|------------|
| 8.3.2 | Zu Kapitel 6.1.2..... | 166 |
| 8.3.3 | Zu Kapitel 6.1.3..... | 175 |
| 8.3.4 | Zu Kapitel 6.1.4..... | 178 |
| 8.3.5 | Zu Kapitel 6.1.5..... | 184 |
| 8.4 | SPOT-Synthese..... | 196 |
| 8.4.1 | Zu Kapitel 6.2.3..... | 196 |
| 8.4.2 | Zu Kapitel 6.2.4..... | 198 |
| 8.4.3 | Zu Kapitel 6.2.5..... | 200 |
| 8.4.4 | Zu Kapitel 6.2.6..... | 200 |
| 8.4.5 | Zu Kapitel 6.2.8..... | 207 |
| 8.5 | Lectin-Screening..... | 208 |
| 8.5.1 | Zu Kapitel 7.3..... | 208 |
| 8.5.2 | Zu Kapitel 7.4..... | 209 |
| 8.5.3 | Zu Kapitel 7.5..... | 212 |
| 9 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 214 |
| 10 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 218 |

1 BEZIFFERUNG DER VERBINDUNGEN

- 1 1,5-Diiodpentan
- 2 1,4-Diiodbutan
- 3 5-Brom-1-nitrilpentan
- 4 5-Mercaptopentansäure
- 5 Tetrahydrothiopyran-2-imin
- 6 *N*-Benzyloxycarbonyl-5-amionpentanol
- 7 *N*-Benzyloxycarbonyl-5-amionpentan-*p*-toluolsulfonsäure
- 8 *N*-Benzyloxycarbonyl-5-amionpentanxantogenat
- 9 *N*-Benzyloxycarbonyl-5-amion-1-mercaptopentan
- 10 2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosid
- 11 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid
- 12 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyltrichloracetimidat
- 13 *N*-Benzyloxycarbonyl-(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 14 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranose
- 15 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranose
- 16a 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylxantogenat
- 16b 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylthioacetamidhydrobromid
- 16c 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosylthiuroniumhydrobromid
- 17 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose
- 18 5-Iod-1-nitrilpentan
- 19 {[5-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl)pentyl]}-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 20 (5-Iodpentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 21 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-5-aminopentanol
- 22 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-5-aminopentylidid
- 23 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 24 (5-Nitrilpentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 25 (5-Brompentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 26 (5-Azidopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 27 (5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 28 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 29 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 30 2-Acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose
- 31 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-rhamnopyranose
- 32 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-fucopyranose
- 33 2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose
- 34 2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose

- 35 2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose
- 36 2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose
- 37 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 38 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 39 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 40 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-rhamnopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 41 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 42 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 43 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 44 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 45 *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-valinol
- 46 1-Hydroxy-3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-butansäure-*tert*-butylester
- 47 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl)-L-asparaginsäure- β -*tert*-butyl ester
- 48 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglycinyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 49 Fluorenylmethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid
- 50 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -L-phenylglycinol
- 51 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin
- 52 *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- α -(L- α -phenylglycinyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid
- 53 (L- α -Phenylglycinyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid
- 54 *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- α -L-phenylglycinol
- 55 *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- α -D-phenylglycinol
- 56 *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl- α -D-phenylalaninol
- 57 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglycinyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 58 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglycinyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 59 4-[4-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-2-Methoxy-5-Nitrophenoxy]-buttersäure

- 60 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*D*- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 61 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylalaniny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 62 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaniny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 63 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaniny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 64 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaniny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-galactopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 65 2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranosid
- 66 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranosylbromid
- 67 (4-Nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosid
- 68 (4-Aminophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosid
- 69 4-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylaminomethyl)benzylalkohol
- 70 [4-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylaminomethyl)-benzyl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosid
- 71 (4-Aminobenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosid
- 72 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(4-aminobenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester
- 73 1-Methylsulfonyl-3-(*N*-fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-butansäure-*tert*-butylester
- 74 1-Azido-3-(*N*-fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-butansäure-*tert*-butylester
- 75 {4-[(2,4-Dimethoxy-phenyl)-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-methyl]-phenoxy}-essigsäure
- 76 Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosid
- 77 Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-galactopyranosid
- 78 Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosid
- 79 Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-fucopyranosid
- 80 Propargyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosyl)
- 81 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester
- 82 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- β -*D*-galactopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester
- 83 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester
- 84 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-methyl-1-thio- β -*D*-fucopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester
- 85 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-[2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosyl]]-butansäure-*tert*-butylester
- 86 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 87 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester

- 88 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 89 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 90 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-rahmnopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 91 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 92 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 93 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 94 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 95 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglyciny)l]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 96 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglyciny)l]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 97 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglyciny)l]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 98 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylalaniny)l]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 99 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -valaniny)l]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 100 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -valaniny)l]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 101 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -valaniny)l]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 102 *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(4-Aminobenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester
- 103 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester
- 104 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester
- 105 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester
- 106 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-methyl-1-thio- β -D-fucopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester
- 107 3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-[(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl)]]-butansäure-pentafluorphenolester

- 108** *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -glycin- β -pentafluorphenolester
- 109** *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -glycinamid
- 110** *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglycinyll)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure
- 111** *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(D- α -phenylglycinyll)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester

2 ABKÜRZUNGEN

| | |
|--------------------|--|
| A | Aceton |
| AAV | Allgemeine Arbeitsvorschriften |
| abs. | absolut |
| Ac | Acetylgruppe |
| Ac ₂ O | Essigsäureanhydrid |
| ACN | Acetonitril |
| ADDP | Azo-dicarbonsäure-dipiperidid |
| AEC | 3-Amino-9-ethylcarbazol |
| AIBN | 2,2'-Azobisisobutyronitril |
| Akz. | Akzeptor |
| äq | Äquivalente |
| Ar | Aromat |
| Asp | L-Asparaginsäure |
| AV | Allgemeine Synthesevorschrift |
| BCIP | Bromchlorindolylphosphatylphosphat |
| Ber. | Berechnet |
| Bn | Benzyl |
| Boc | tert.-Butoxycarbonyl |
| Boc ₂ O | Di-tert.-butyldicarbonat |
| BPB | Bromphenolblau |
| BSA | Bovin Serum Albumin |
| Bz | Benzoyl |
| bzw. | beziehungsweise |
| Cell | Cellobiose |
| CHCA | α-Cyano-4-hydroxycimtsäure |
| CN | 4-Chlor-1-naphtol |
| COSY | correlated spectroscopy |
| d | Tage |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en |
| DC | Dünnschichtchromatogramm bzw. Dünnschichtchromatographie |

| | |
|-------------------|--|
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCH | Dicyclohexylharnstoff |
| DCM | Dichlormethan |
| dd | Doppelt destilliert |
| DEAD | Azodicabonsäurediethylester |
| DEPT | Distorsionsless enhancement by polarization transfer |
| DHB | 2,5-Dihydroxybenzoesäure |
| DIAD | Azodicabonsäurediisopropylester |
| DIC | N,N'-Diisopropylcarbodiimid |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMAP | 4-Dimethylaminopyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| E | Essigsäureethylester |
| EA | Elementaranalyse |
| ESI | Electronic spray ionisation |
| Et | Ethyl |
| Et ₂ O | Diethylether |
| Ether | Diethylether |
| EtOH | Ethanol |
| FAB | Fast atom bombardement |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe |
| FmocCl | 9-Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid |
| Gal | Galactose |
| gef. | Gefunden |
| gem. | gemessen |
| ges. | gesättigt |
| Glc | Glucose |
| GlcNAc | 2-N-Acetylglucosamin |
| h | Stunden |
| HABH | 2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoessäure |
| Hac | Essigsäure |
| HATU | N-[(Dimethylamino)(1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl)methylen]-N-methylmethanaminiumhexafluorophosphat-N-oxid |

| | |
|-------------------|--|
| HBTU | <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylene]- <i>N</i> -methylmethanaminiumhexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid |
| HOAt | 1-Hydroxy-7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol |
| HOBt | 1,2,3-Benzotriazol-1-ol |
| HODhbt | 3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4-(3 <i>H</i>)-one |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IR | Infrarotspektrum |
| kat. | Katalytisch |
| kon. | Konzentration |
| Lac | Lactose |
| Lit. | Literatur |
| LM | Lösungsmittel |
| Lsg. | Lösung |
| Lys | L-Lysin |
| MALDI | Matrix induzierte Laserdesorption |
| Me | Methyl |
| Me ₃ P | Trimethylphosphin |
| MeOH | Methanol |
| min. | Minuten |
| MMP | <i>N</i> -Methylmorpholin |
| MS | Massenspektrum |
| MW | Mikrowellenstrahlung |
| NME | <i>N</i> -Ethylmorpholin |
| NBT | Nitrotetrazoliumblau |
| NMI | <i>N</i> -Methylimidazol |
| NMP | <i>N</i> -Methylpyrolidon |
| NMR | Kernresonanzspektrum |
| org. | organisch |
| P | Petrolether (40-60 °C) |
| Pd/C | Palladium auf Aktivkohle |
| PEG | Polyethylenglycol |
| perac | peracetylierte Verbindung |
| Pfp | Pentafluorphenol |
| Ph ₃ P | Triphenylphosphin |
| Pmc | 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-yl-sulfonyl |

| | |
|-----------------|---|
| PNA | Peptid Nuklein Säure |
| Pyr | Pyridin |
| quant. | quantitativ |
| RIFS | Interferensreflexionsspektroskopie |
| RT | Raumtemperatur |
| Smp. | Schmelzpunkt |
| SPPS | Solid Phase Peptide Synthese |
| SPR | Plasmonenresonanzspektroskopie |
| T | Toluol |
| TBAHS | Tetrabutylamoniumhydrogensulfat |
| TBAS | Tetrabutylamoniumsulfat |
| TBS | Tris Buffer Saline |
| ^t Bu | Tertiär-butyl-Schutzgruppe |
| tert. | tertiär |
| TFA | Triflouressigsäure |
| TFFH | Tetramethylfluoroformamidiniumhexafluorphosphat |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Tmb | Trimethoxybenzoyl |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| TMS | Tetramethylsilan |
| TOF | Time of Flight |
| Trt | Triphenylmethyl |
| Tween | Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat |
| Z | Benyloxycarbonyl |

3 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Kohlenhydrate sind neben Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren für nahezu alle lebenden Organismen von fundamentaler Bedeutung. Der Begriff "Kohlenhydrate" umfasst Monosaccharide, Oligosaccharide, Polysaccharide und ihre Derivate, die durch Reduktion, Oxidation oder Substitution entstehen. Dabei ist ihre Funktion als Gerüst- und Stützsubstanz sowie als Energiespeicher gut untersucht.

Kohlenhydrate besitzen unter den Naturstoffen die meisten Stereozentren auf kleinstem Raum und können neben linearen Strukturen stark verzweigte Oligomere aufbauen. Theoretische Berechnungen zeigen, dass mit 4 unterschiedlichen Hexosen bereits 34560 Oligosaccharide über glycosidische Bindungen synthetisiert werden können^[1]. Ein Vergleich mit der DNA (4 Bausteine) und den Proteinen (20 Bausteine) ergibt 4096 und 6.4×10^7 mögliche "Wörter", wohingegen mit Kohlenhydraten eine Variation größer als 1.05×10^{12} möglich ist^[2]. Diese strukturelle Vielfalt ermöglicht Oligosacchariden eine Informationskodierung auf kleinstem Raum^[3], was sich in der strukturellen Diversität von posttranslational modifizierten Proteinen widerspiegelt, die durch Glycosylierung mit Oligosacchariden ganz neue strukturelle Eigenschaften bekommen^[4]. Dabei können die OH-Gruppen der Oligosaccharide mit Sulfat-, Phosphat-, Acetyl- oder Methylgruppen substituiert sein, wodurch eine enorme Vielfalt an unterschiedlichsten Glycokonjugaten entstehen. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Oligosaccharide in Form von Glycoproteinen auf der äußeren Zellmembran^[5] Informationen für molekulare Erkennungsprozesse kodieren und unerlässlich für die zelluläre Erkennung des Immunsystems sind^[6]. Um diese Informationen zu dekodieren finden spezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Lectine)^[7] und den Oligosacchariden auf der Zellmembranoberfläche statt, die andere biochemische Prozesse einleiten. Es wurde gezeigt, dass Krebszellen eine veränderte extrazelluläre Kohlenhydratstruktur aufweisen und sich dadurch von gesunden Zellen unterscheiden^[8]. Des Weiteren nutzen fremde Pathogene wie Viren und Bakterien diese Zell-Adhäsion, um die Wirtszelle zu infizieren^[9]. Deshalb ist eine Entschlüsselung der Informationskodierung von großer wissenschaftlicher Bedeutung und von großem medizinischem Interesse^[10]. Leider sind diese Erkennungsprozesse auf ihrer molekularen Ebene nicht vollständig untersucht und die grundlegenden Zusammenhänge von Kohlenhydratstruktur und Informationskodierung sind noch nicht vollständig verstanden.

Die Ursache dafür sind die meist heterogenen Strukturen einzelner Glycoproteine, die auf Grund ihres vielfältigen Vorkommens und ihrer geringen Menge nur mit großem Aufwand in ausreichender Reinheit aus dem biologischen Material isoliert werden können. Des Weiteren ist es schwierig, trotz moderner analytischer Methoden die genaue Konformation der Oligosaccharide aufzuklären. Zwar können massenspektroskopische Methoden zur Sequenzierung der Zuckerabfolge verwendet werden, dabei ergibt sich aber kein Bild von der dreidimensionalen Erkennungsstruktur der Oligosaccharide, die über unterschiedliche räumliche Anordnungen der OH-Gruppen miteinander verknüpft sind. Da sich Glycoproteine nur schwer kristallisieren lassen, können in den meisten Fällen keine Röntgenstrukturen angefertigt werden.

Damit bleibt nur die NMR-Spektroskopie zur vollständigen Strukturaufklärung übrig, die allerdings reines Probenmaterial in ausreichender Menge benötigt. Problematisch ist auch das Bereitstellen von "intakten" Glycoproteinen, die bei der Isolation des Probenmaterials ihre Kohlenhydratstruktur verändern können. Somit ist es unerlässlich, synthetische Glycoconjugate für wissenschaftliche Untersuchungen bereitzustellen. Eine biotechnologische Synthese über Nukleinsäuren kann dabei nicht durchgeführt werden, weil die Proteine in Form von Glycosyltransferasen selbst am Aufbau der Oligosaccharide beteiligt sind und bis heute nur ein Bruchteil dieser Enzyme bekannt sind.

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass synthetisch hergestellte Oligosaccharide und Glykokonjugate sehr gut für biologische Untersuchungen geeignet sind und sich daraus die "Glycobiochemie" als neues, interdisziplinäres Forschungsgebiet entstanden ist. Neben der Untersuchung von Struktur-Eigenschaftsbeziehungen von Kohlenhydraten und Proteinen ist es wichtig, genügend Probenmaterial in reiner Form bereitzustellen. Dazu werden genau definierte Kohlenhydratstrukturen benötigt, die in ausreichender Menge vollsynthetisch im Labor hergestellt werden. Leider existiert trotz großer Anstrengungen bis heute noch keine automatisierte Festphasensynthese, um unterschiedliche Oligosaccharide vollsynthetisch herstellen zu können^[11]. Der Grund dafür ist, dass eine selektive Verknüpfung der Monosaccharide unter Berücksichtigung der Stereochemie nur mit unterschiedlichen Aktivierungsmethoden und über komplexe Schutzgruppenmanipulationen möglich ist, so dass keine einheitliche Reaktionsführung als Grundlage für eine Automatisierung dienen kann. Die momentanen Oligosaccharidsynthesen werden deshalb klassisch auf nasschemischem Weg und teilweise an der Festenphase im Forschungslabor durchgeführt. Aufgrund der vielen Optimierungsschritte und komplizierten NMR-Auswertungen während einer Oligosaccharidsynthese, ist ein großer Zeit- und Arbeitsaufwand mit dem Bereitstellen von Probenmaterial verbunden und erschwert damit die Aufklärung der verschlüsselten "Kohlenhydrat-Information". Zur Lösung des Problems könnten neue Oligosaccharidmimetika beitragen, die über eine einfache Synthesestrategie genügend Probenmaterial für biologische Untersuchungen bereitstellen.

In dieser Arbeit sollen neue Mimetika entwickelt werden, die kleine Oligosaccharidstrukturen aus 4 bis 6 Monosacchariden imitieren können und enzymatisch nicht abbaubar sind. Dazu wird mit einem neuen Synthesekonzept^[12] aus wenigen Bausteinen eine große Anzahl unterschiedlichster Oligosaccharidmimetikryse hergestellt und die Oligosaccharide über Zuckerreste die mit einem Peptidrückgrat verknüpft sind imitiert (**Schema 1**). Dabei entfällt die Synthese von glycosidischen Bindungen. Das Mimetikum selber ist aus Glycopeptid-Bausteinen aufgebaut und ermöglicht einen blockweisen Aufbau des neuen Glycopeptids. Durch das Konzept findet eine wesentliche Vereinfachung bei der Bereitstellung von neuem Probenmaterial statt:

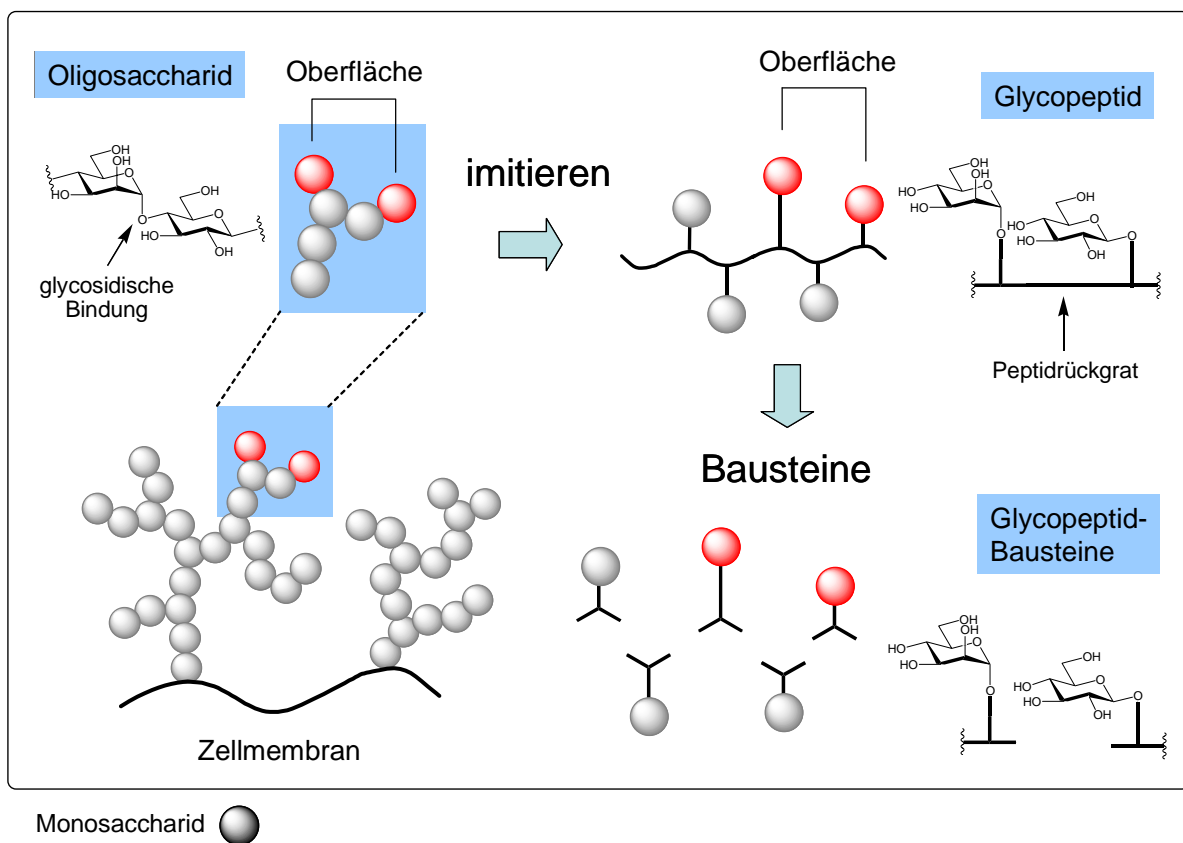
- Komplexe Oligosaccharidsynthesen über glycosidische Bindungen entfallen
- Die Synthese der Glycopeptide erfolgt über quantitative Peptidreaktionen
- Glycosylierungen beschränken sich auf einfache Bausteinsynthesen
- Eine große Variationsmöglichkeit der Glycopeptide über die Bausteine

- Aus wenigen Bausteinen können viele Glycopeptide hergestellt werden
- Das Konzept ist gut auf die Festphase übertragbar und automatisierbar

Ziel der Arbeit soll es sein, die oben genannten Eigenschaften in einer neuen Festphasensynthese-strategie umzusetzen. Dazu wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Synthese neuer *S*-Glycopeptid-Bausteine
2. Synthese der *S*-Glycopeptide auf Zellulosemembranen (SPOT-Synthese)
3. Automatisierung der SPOT-Synthese am Roboter
4. Erzeugen kombinatorischer *S*-Glycopeptid-Bibliotheken
5. Überprüfung der imitierenden Eigenschaften über ein Screening mit Lectinen

Schema 1: Imitieren von Oligosaccharidstrukturen über Glycopeptide

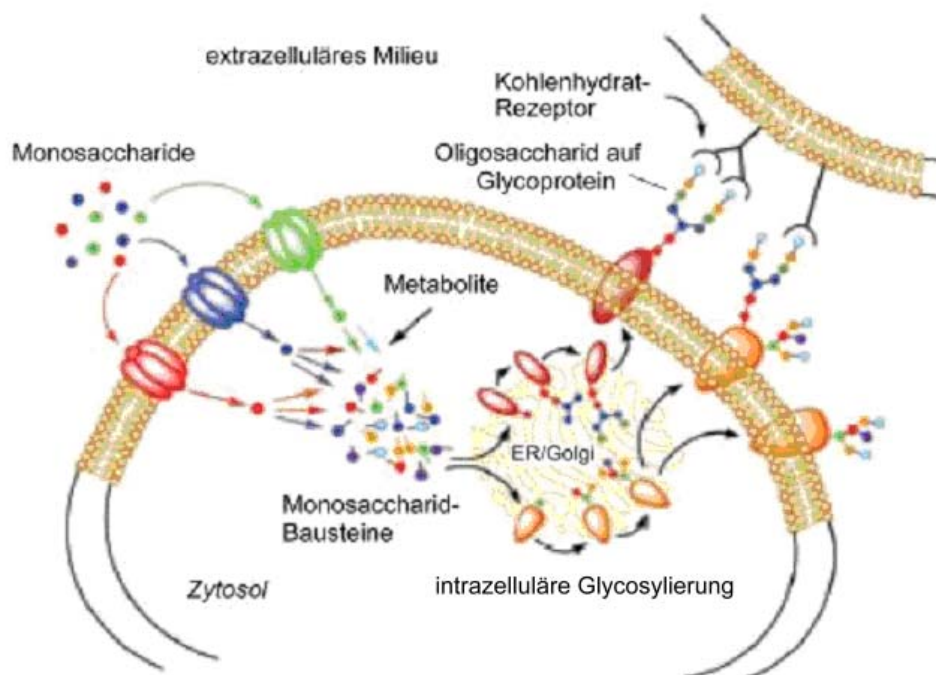


4 OLIGOSACCHARIDE AUF ZELLMEMBRANEN

4.1 Vorkommen und Funktion

Oligosaccharide kommen auf Zellmembranoberflächen in Form von Glykokonjugaten als Glycoproteine oder Glycolipide vor. Ihre intrazelluläre Biosynthese erfolgt im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgiapparat (Golgi) der Zelle (**Schema 2**).

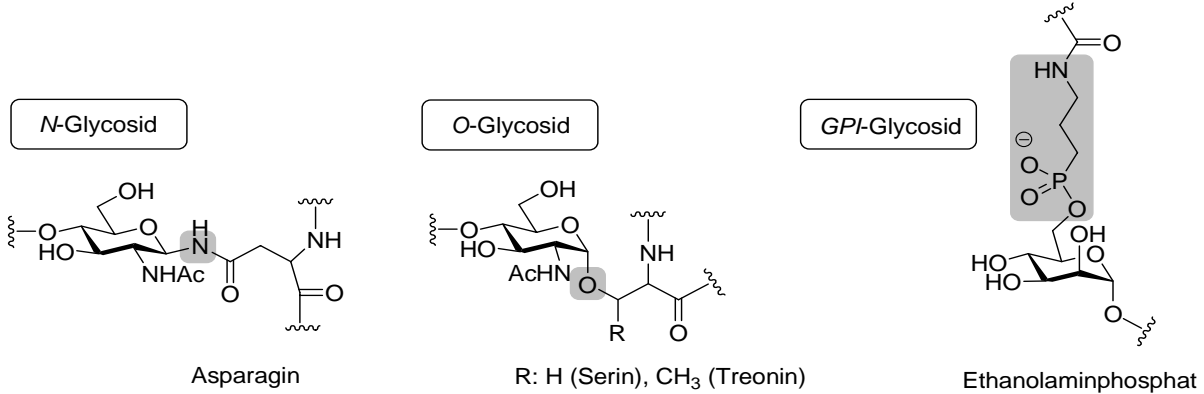
Schema 2: Biosynthese und Funktion von Oligosacchariden^[13]



Dazu werden exogene Monosaccharide von der Zelle aufgenommen und in aktivierte Metabolite (Nucleosiddiphosphat-Zucker) umgewandelt. Diese "Monosaccharid-Bausteine" werden anschließend an Proteine oder Lipide intrazellulär glycosyliert (ER/Golgi) und schrittweise zu Oligosaccharidstrukturen und Glykokonjugaten aufgebaut. Dabei handelt es sich um einen hoch komplexen Vorgang, an dem eine große Zahl von spezifischen Glycosyl-Transferasen und Glycosidasen beteiligt sind. Für jede Verknüpfungsart ist dabei nur eine spezielle Glycosyl-Transferasengruppe verantwortlich (z. B. β 1,4 Gal-T1). Die Regioselektivität der Glycosylierung und die Konstitution der Oligosaccharide ist hierbei das Ergebnis einer sensitiven Regulierung von Enzymkaskaden, die nur zum Teil verstanden sind^[14]. Dabei werden mit den Aminosäuren des Proteins *N*- oder *O*-glycosidische Bindungen geknüpft. Bei den *N*-Glycoproteinen^[15] findet die Verknüpfung über die Seitenkette von Asparaginsäure und bei den *O*-Glycoproteinen^[16] über die Seitenkette von Serin oder Threonin statt. *O*-Glycosidische Verknüpfungen über Tyrosin, Hydroxiprolin und Hydroxylysin oder die Bil-

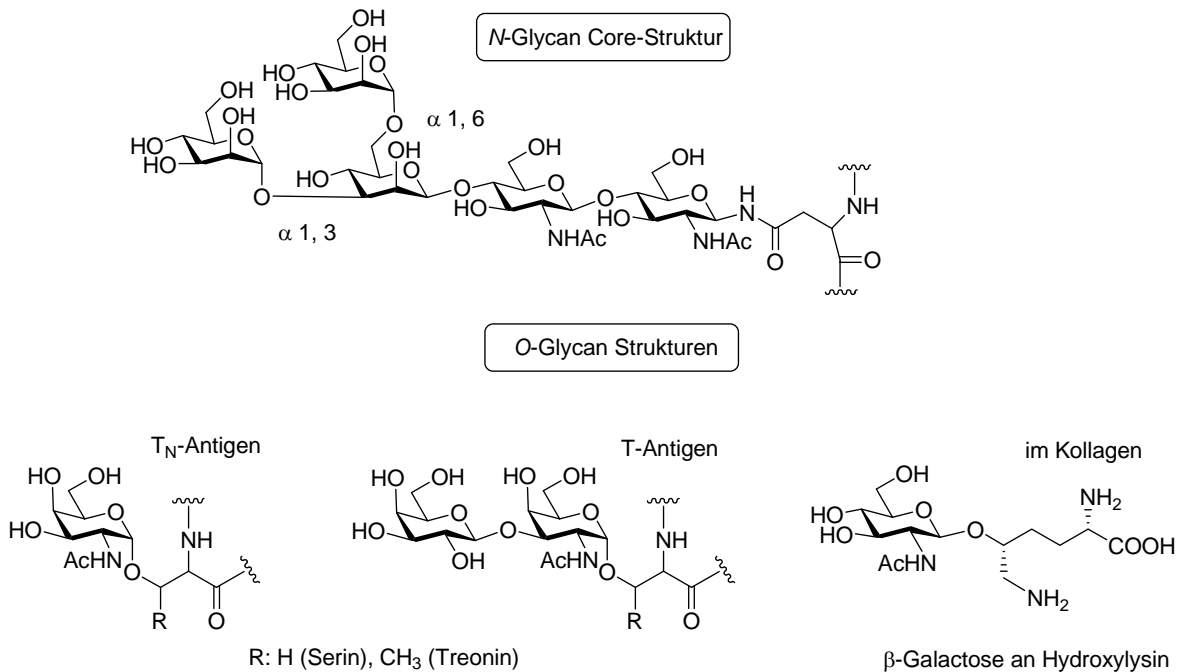
dung von *S*-Glycosiden über Cystein sind selten. Eine andere Gruppe bilden die GPI-Anker die über Ethanolaminphosphat verknüpft sind^[17] (**Schema 3**).

Schema 3: Die häufigsten Verknüpfungen von Oligosacchariden mit Proteinen



Vergleicht man die *N*-Glycoside mit den *O*-Glycosiden, so erkennt man, dass die *N*-Glycoside einfacher aufgebaut sind und immer ein Core-Pentasaccharid^[18] beinhalten, das aus zwei terminalen α -Mannoseeinheiten besteht, die an eine dritte Mannoseeinheit über α 1,6 und α 1,3 verknüpft sind. Die dritte Mannoseeinheit ist schließlich β 1,4 mit zwei GlcNAc-Moleküle verknüpft. An den terminalen Mannosen können nun weitere Verzweigungen stattfinden, die man in high Mannose-, Complex- oder Hybrid-Typ unterteilt^[19]. Bei den *O*-Glycosiden gibt es eine deutlich größere strukturelle Vielfalt, deren Oligosaccharidstrukturen noch nicht vollständig untersucht sind. Eine kleine Auswahl an wichtigen Glycokonjugaten ist in **Schema 4** wiedergegeben.

Schema 4: Auswahl einiger Glycokonjugatstrukturen



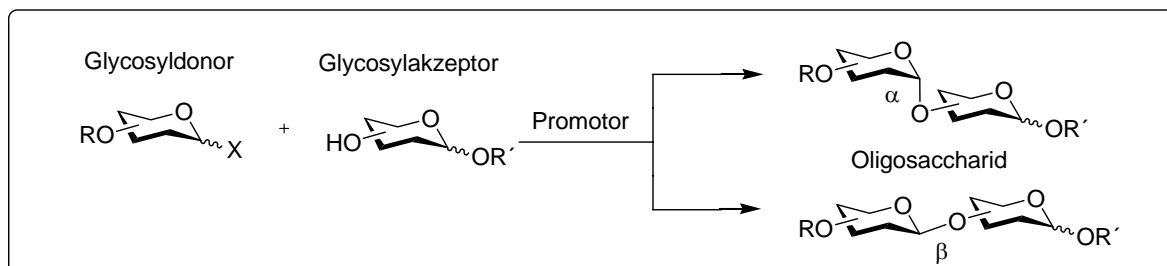
Eine genaue Charakterisierung der Oligosaccharidstrukturen auf Glycoproteine wird durch die Mikroheterogenität erschwert, bei der im Golgiapparat weitere Modifikationen der Zucker-OH-Gruppen wie Substitution mit Sulfat-, Phosphat-, Acetyl- oder Methylgruppen stattfinden. Nach dieser Biosynthese werden die Glycoproteine zur Zellmembranoberfläche transportiert, wo der Proteinteil in der Lipiddoppelschicht eingebettet wird und die Oligosaccharide von der Zellmembran als "baumartige" Strukturen absteigen, die auch als Antennen bezeichnet werden. Die Gesamtheit dieser komplexen Oligosaccharidstrukturen auf der Zelloberfläche wird als Glycocalix bezeichnet, an die nun andere Zellen, Proteine oder Hormone über kohlenhydrat-spezifische Rezeptoren anbinden und so wichtige biologische Funktionen wie die Unterscheidung zwischen "Eigen" und "Fremd" erfüllen. Darüber hinaus findet man Glycoproteine in Schleimsekreten und Körperflüssigkeiten, wodurch sie das Eindringen von Pathogenen verhindern. Nahezu sämtliche Plasmaproteine sind glycosyliert, wobei die Funktion der Oligosaccharide noch nicht vollständig geklärt ist. Es hat sich gezeigt, dass die Kohlenhydrate auf der Proteinoberfläche einen proteolytischen Abbau verhindern und die Konformation der Proteine durch ihre hydrophilen Eigenschaften stabilisieren können. Ferner können Glycoproteine stimulierend auf die Blutgerinnung wirken, wobei maßgeblich sulfonierte Oligosaccharide beteiligt sind, die als Heparine bezeichnet werden.

4.2 Synthese von Oligosacchariden

Die Synthese von definierten dreidimensionalen Oligosaccharidstrukturen stellt eine große Herausforderung für die organische Synthese dar^{[20],[21],[22],[23]}. Ursache dafür sind die vielen OH-Gruppen der Kohlenhydrate, die sich in ihrer Reaktivität teilweise nur geringfügig unterscheiden und einen selektiven Aufbau von glycosidischen Bindungen erschweren. Des Weiteren können bei der Knüpfung von glycosidischen Bindungen α - oder β -Regioisomere am anomeren Zentrum der Glycoside entstehen. Ein definierter Aufbau von Oligosacchariden benötigt viele Schutzgruppenmanipulationen, kombiniert mit einer Synthesestrategie. Paulsen^[24] kommentierte diesen Sachverhalt 1982 treffend mit den Worten: "Jede Oligosaccharidsynthese stellt ein eigenständiges Problem dar. Um dieses zu lösen muss systematisch geforscht werden und ständig neue Überlegungen getroffen werden. Es gibt keine universellen Reaktionsbedingungen bei der Oligosaccharidsynthese". Schwierigkeiten bereitet auch die Synthese größerer Oligosaccharideinheiten durch sterische Effekte^[25] und Änderung der elektronischen Bedingungen^[26], so dass eine stereoselektive Verknüpfung zu einer Herausforderung wird. Nichts desto trotz stehen heute eine Vielzahl von Aktivierungs- und Synthesemethoden zur Verfügung^{[27],[28]}. Um eine glycosidische Bindung zwischen zwei Kohlenhydraten aufzubauen, benötigt man zuerst geeignete Schutzgruppen (R) die eine regioselektive Knüpfung zwischen zwei Zucker-OH-Gruppen ermöglichen. Dazu haben sich vor allem Ester, Ether und Acetale bewährt. Je nach zu schützender OH-Gruppe können dazu mehrere Schritte notwendig sein. Anschließend wird die anomere funktionelle Gruppe des Kohlenhydrats in eine Austrittsgruppe (X) umgewandelt und stellt für die freie OH-Gruppe des anderen Kohlenhydrats einen Glycosyldonor dar. Durch Zugabe eines Promotors wird der Glycosyldonor aktiviert und die freie OH-Gruppe des Glycosylakzeptors substituiert die Aus-

cosyldonor aktiviert und die freie OH-Gruppe des Glycosylakzeptors substituiert die Austrittsgruppe (X) unter Ausbildung einer glycosidischen Bindung. Dabei kann eine α - oder β -glycosidische Bindung aufgebaut werden (**Schema 5**).

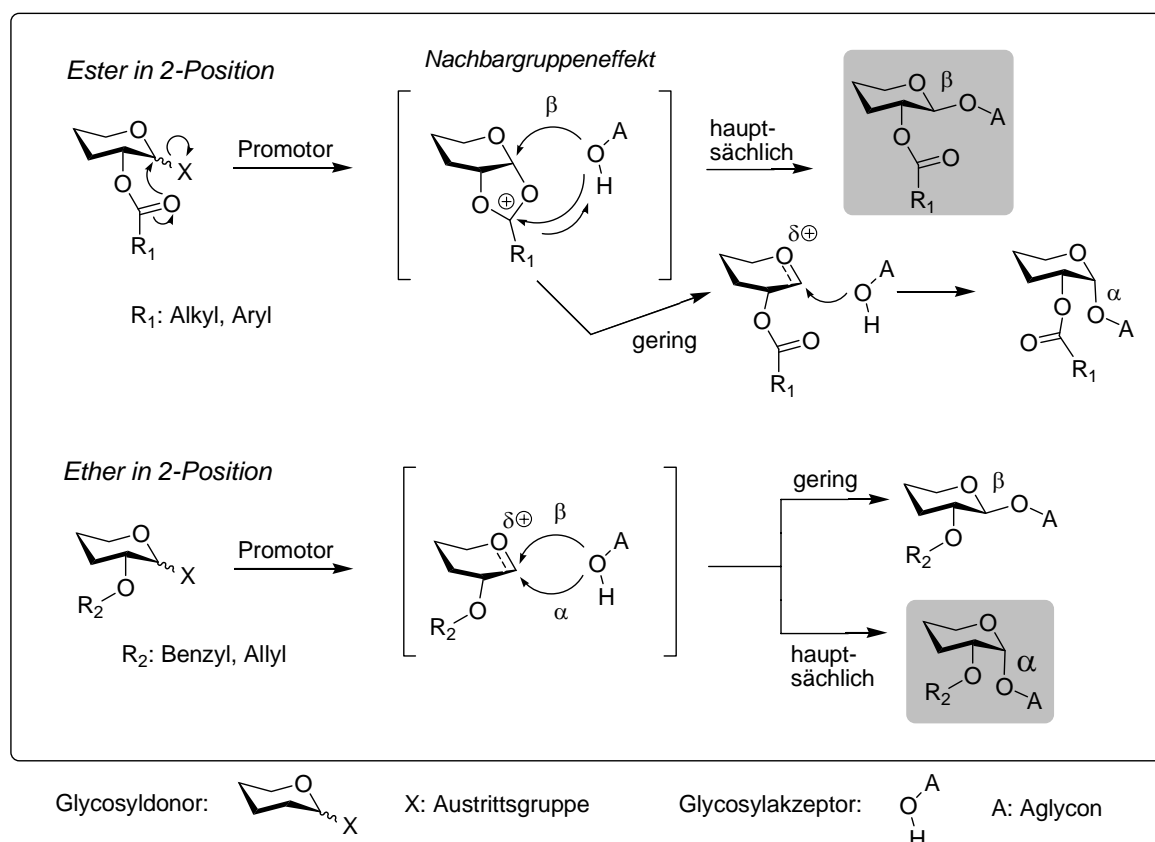
Schema 5: Aufbau von Oligosacchariden über glycosidische Bindungen



X: Austrittsgruppe R, R': Schutzgruppe

Auf das α / β -anomere Verhältnis haben die Schutzgruppen (R), die Aktivierungsmethode, das Lösemittel und die Reaktionsbedingungen einen großen Einfluss. Es hat sich gezeigt, dass bei Verwendung von Estern als Schutzgruppe in 2-Position hauptsächlich das β -anomere Produkt (Mannose \rightarrow α) gebildet wird (**Schema 6**).

Schema 6: Allgemeiner Verlauf bei der Bildung glycosidischer Bindungen^[29]



Erklären lässt sich dieser Sachverhalt durch den "Nachbargruppeneffekt", bei dem die Carbonylgruppe des Esters in 2-Position am anomeren Zentrum eine Oxonium-Zwischenstufe bildet, der einen nucleophilen Angriff der OH-Gruppe von der Unterseite erschwert und hauptsächlich eine β -glycosidische Bindung geknüpft wird (Mannose umgekehrt). Dabei nimmt die Tendenz zur Bildung von Oxonium-Zwischenstufen von Acetyl über Benzoyl nach Pivaloyl ab. Die Bildung von α -glycosidischen Bindungen werden dagegen von Ethern in 2-Position begünstigt, da keine Nachbargruppenbeteiligung stattfindet. Allerdings ist das α/β -anomere Verhältnis stark vom Glycosyldonor (Austrittsgruppe X) und den Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Promotor, Temperatur) abhängig, da meist kein eindeutiger Reaktionsverlauf nach S_N1 oder S_N2 stattfindet und bei jeder neuen Glycosylierung optimiert werden muss (anomerer Effekt)^[30]. Ein besonderes Problem stellt die Synthese von β -Mannosiden dar, bei der die Ausbildung der α -Konfiguration durch ungünstige sterische und elektronische Wechselwirkungen, sowie durch den anomeren Effekt stark begünstigt ist^{[31],[32]}. Lösungsansätze um die Mannose in die β -Konformation zu zwingen sind intramolekulare Glycosylierungen^[33] oder die Verwendung vorverbrückter Zucker^[34]. Des Weiteren können in 2-Desoxy-2-acetamido-glycopyranosiden die N-Acetylgruppen in 2-Position mit dem anomeren Zentrum stabile 1,2-Oxazoline bilden, die eine α -glycosidische Bindung unmöglich machen. Um ein genaues Trimmen der einzelnen Glycosylierungen zu ermöglichen, kann auf eine Vielzahl von Glycosyldonoren und Promotoren zurückgegriffen werden. Dabei sind Trichloracetimidate^[35], Thioglycoside^[36], Glycosylbromide^[37] und n-Pentylglycoside^[38] die am häufigsten verwendeten Glycosyldonoren, die unter Zuhilfenahme von geeigneten Promotoren stereoselektive Verknüpfungen ermöglichen.

Tabelle 1: Auswahl verschiedener Glycosyldonoren und Promotoren^[1]

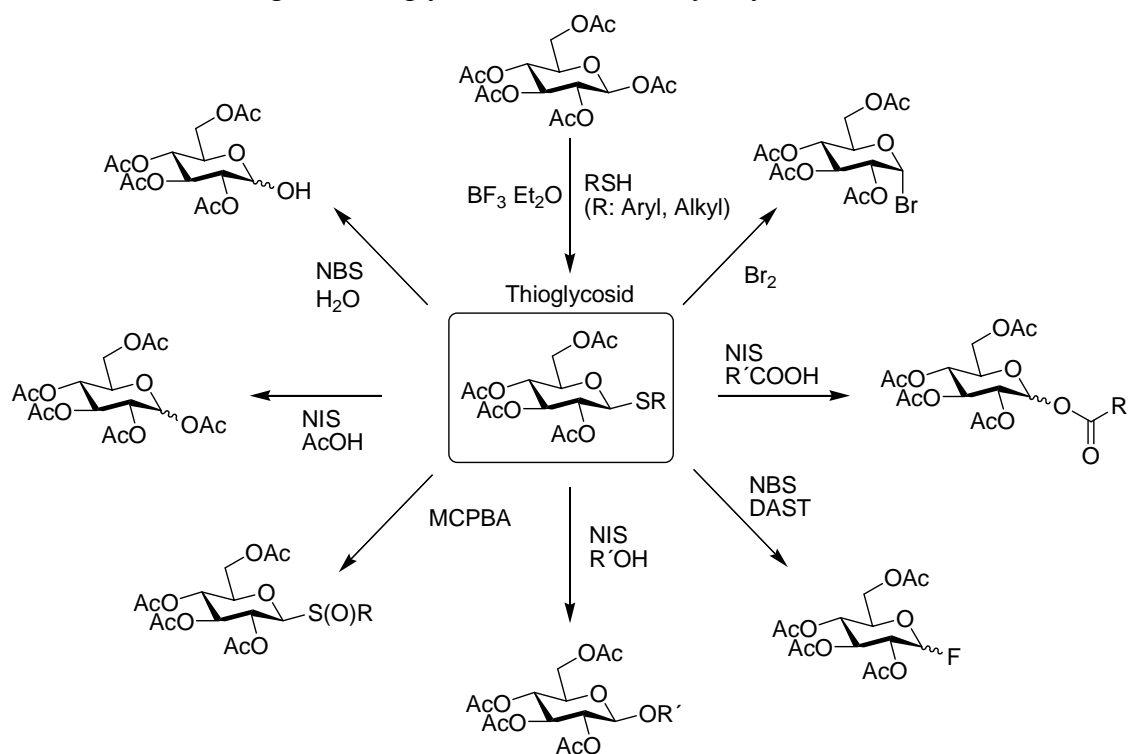
| Austrittsgruppe X am Glycosyldonor | Promotor | Eigenschaften |
|---|---|--|
| OAc | BF ₃ Et ₂ O, SnCl ₄ , TMSOTf | nicht für komplexe Oligosaccharidsynthesen |
| Br | AgCO ₃ , AgOTf, Hg(CN) ₂ | häufiger verwendet |
| Cl | AgOTf, Hg(CN) ₂ | stabiler als Glycosylbromide |
| F | SnCl ₂ -AgOTf | Kann mit Thioglycosiden kombiniert werden |
| OC(NH)CCl ₃ | BF ₃ Et ₂ O, TMSOTf | milde Reaktionsbedingungen |
| SR (R: Aryl, Alkyl) | TfOH-NIS, DMTST, IDCP | vielseitig verwendbar auch als Akzeptor |
| O(CH ₂) ₃ CH=CH ₂ | NIS/TESOTf | vielseitig verwendbar auch als Akzeptor |
| Oxazoline | p-TsOH, TMSOTf | β -2-Acetamidoglycosiden |

Dabei unterscheiden sich die einzelnen Glycosyldonoren in ihrer Stabilität und Reaktivität. Bei der Synthese von Oligosacchariden haben sich die Trichloracetimidate, Thioglycoside

und die n-Pentylglycoside als Glycosyldonoren aufgrund ihrer vielseitigen Verwendbarkeit und milden Reaktionsbedingungen durchgesetzt.

Thioglycoside sind dabei oft die Glycosyldonoren der Wahl, speziell bei der Glycosylierung von Aminozuckern. Sie sind gegenüber vielen Reaktionsbedingungen beständig und leicht aus dem peracetylierten Zuckern mit Thiophenol oder Thioethanol herzustellen. Eine weitere Möglichkeit ist die Reaktion von Thioharnstoff mit Glycosylbromiden zu den Thiuroniumsalzen, die durch Hydrolyse zu den 1-Thioglycosen umgesetzt werden können. Durch Alkylieren der Mercaptogruppe kommt man zu den Thioglycosyldonoren. Im Gegensatz zu den Glycosylbromiden und Glycosyltrichloracetimidaten überstehen Thioglycoside Deacetylierungsbedingungen, und eine Umschützung von Acetylgruppen zu Benzylgruppen ist möglich. Durch die Zugabe von thiophilen Promotoren können eine ganze Reihe an neuen Glycosyldonoren erzeugt werden (**Schema 7**). Thioglycoside lassen sich mit einer Reihe von Promotoren aktivieren, wobei Iodoniumionen aus *N*-Iodsuccinimid (NIS) oder Dicollidinperchlorat (ICDP) häufig verwendet werden. Des Weiteren lassen sich Thioglycoside mit Methyltriflat oder DMTST [Dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflat] gut alkylieren und damit aktivieren^{[39],[40]}.

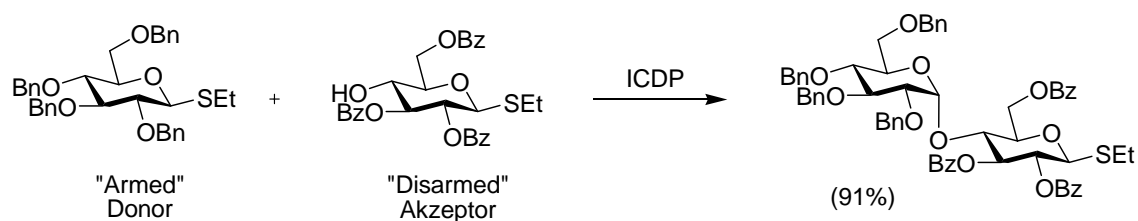
Schema 7: Überführung der Thioglycoside in andere Glycosyldonoren^[1]



Neben der Glycosylierungsmethode spielt die Glycosylierungsstrategie eine entscheidende Rolle bei der Synthese von Oligosacchariden^[41]. So ist es oft sinnvoll, neben einem schrittweisen Aufbau von Oligosacchariden eine Blocksynthese durchzuführen, da sterische und elektronische Verhältnisse häufig dabei besser zu kontrollieren sind und der Synthesauf-

wand reduziert wird. Eine weitere oft angewendete Strategie ist das "Armed"- und "Disarmed"-Konzept, bei der die Reaktivität des anomeren Zentrums von den Schutzgruppen beeinflusst wird. Es hat sich gezeigt, dass Benzoylschutzgruppen (Ester) die Reaktivität des anomeren Zentrums herabsetzen während Benzylschutzgruppen (Ether) zu erhöhter Reaktivität führen. So lässt sich ein Thioglycosid mit Benzylethern (Armed) in Gegenwart mit einem zweiten Thioglycosid das benzoyliert (Disarmed) ist selektiv glycosylieren, so dass nur ein Disaccharid entsteht (**Schema 8**).

Schema 8: Glycosylierungsstrategie über "Armed"- und "Disarmed"-Konzept^[1]



Als weitere Möglichkeit stehen enzymatische Glycosylierungen^{[42],[43]} zur Verfügung, mit denen ohne Schutzgruppenmanipulationen regio- und stereoselektive Knüpfungen möglich sind, die allerdings andere begrenzende Faktoren, dass Arbeiten mit Co-Faktoren, eine wässrige Aufarbeitung und meist eine lange Reaktionsdauer bei geringer Umsatzrate mit sich bringen. Trotzdem stellt die enzymatische Synthese bei schwierigen stereoselektiven Verhältnissen eine Alternative dar. Da die säulenchromatographische Reinigung nach einer Oligosaccharidsynthese zeitaufwendig ist, hat sich in den letzten Jahren die Verwendung von Festphasensynthesen^[44] immer mehr etabliert und gerade bei größeren Moleküle kann dies zu einer erheblichen Zeitersparnis führen. Dazu wurde in den letzten Jahren eine Reihe an neuen Ankern (Linkern) und Festphasenstrategien entwickelt, die allerdings noch am Anfang stehen. Weiterführende Überlegungen gehen in die Richtung einer Automatisierung^[45] der Oligosaccharidsynthese. Da es keine einheitliche stereoselektive Knüpfungsreaktion für Oligosaccharide gibt, wird dieses Unterfangen auch in Zukunft schwierig bleiben und beschränkt sich momentan auf repetitiv verknüpfte Oligosaccharideinheiten. Trotz der vielen Glycosyldonoren und dem besseren Verständnis der Regio- und Stereoselektivität bei der Knüpfung von glycosidischen Bindungen, wird die Oligosaccharidsynthese auch in Zukunft eine Herausforderung bleiben. So kann eine neue Oligosaccharidsynthese mit 3-5 Zuckern mehrere Monate bis Jahre intensive Forschungsarbeit bedeuten, je nach Komplexität der aufzubauenen Verknüpfungen.

4.3 Oligosaccharidmimetika

Die Anwendung der Oligosaccharide zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen und als in vivo Therapeutika hat eine Reihe von Nachteilen^[46]:

- Zeitaufwendige und komplexe Oligosaccharidsynthesen
- Kohlenhydrate werden von Glycosidasen schnell abgebaut
- Schlechte Bioverfügbarkeit aufgrund der Hydrophilie
- Meist nur eine intravenöse Verabreichung möglich
- Oft geringe inhibierende Eigenschaften

Deshalb haben sich in den letzten Jahren "Oligosaccharidmimetika" etabliert, die Oligosaccharidsstrukturen imitieren und einfacher zu synthetisieren sind. Dabei werden je nach Einsatzgebiet gewisse Anforderungen an die Mimetika gestellt^{[47],[48]}:

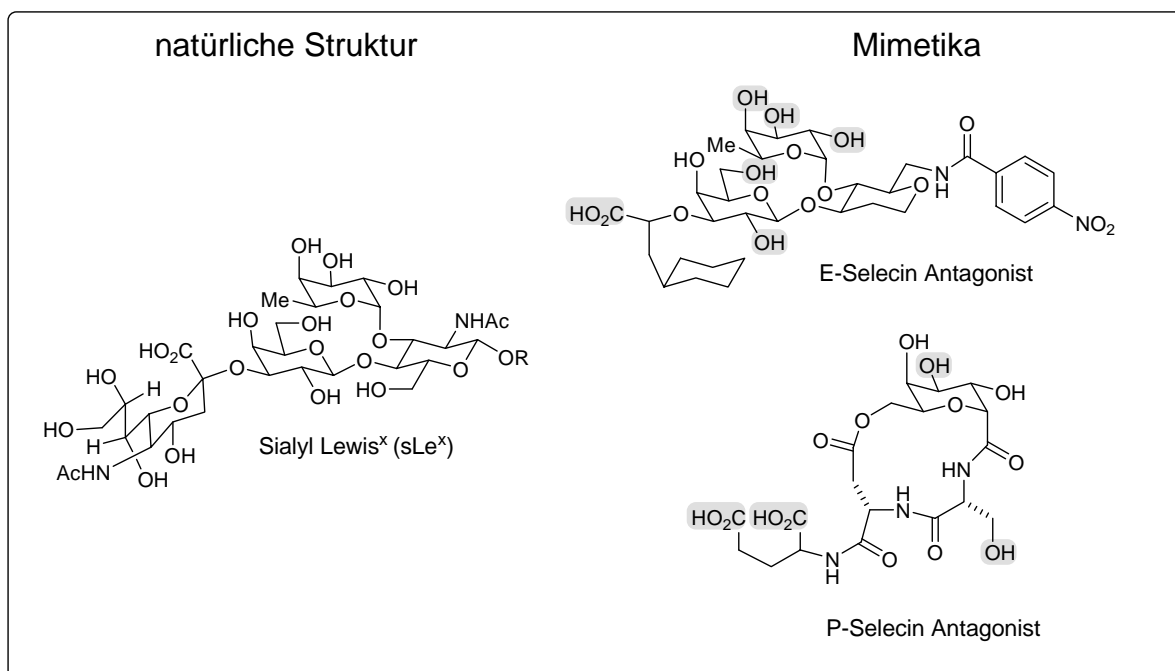
- Erhöhte Affinität gegenüber den natürlichen Oligosaccharidstrukturen
- Erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau (Metabolisierung)
- Vereinfachte Struktur verbunden mit leichterer Zugänglichkeit
- Verbesserte pharmakologische Eigenschaften (Implikation, Bioverfügbarkeit)

Oligosaccharidmimetika eröffnen somit eine neue Möglichkeit, Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen, um Kohlenhydrat vermittelte Interaktionen und Signaltransduktionen aufzuklären. Voraussetzung ist eine möglichst einfache Synthese mit breiter Variation der Grundstruktur, um eine gute Nachahmung der natürlichen Oligosaccharide effizient zu ermöglichen. Diese Werkzeuge werden dringend benötigt, um ein schnelleres Vorankommen von kohlenhydratbasierenden Therapeutika zu ermöglichen. Es hat sich gezeigt, dass zwischen dem Mimetikum und dem „natürlichen Vorbild“ nicht notwendigerweise eine große strukturelle Ähnlichkeit bestehen muss, vielmehr reicht eine enge Funktionsverwandtschaft aus, um die gleiche oder sogar erhöhte biologische Wirkung zu erreichen^[49]. Als sehr effizient haben sich kombinatorisch hergestellte Substanzbibliotheken neuer Glycomimetika erwiesen, da viele Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen noch nicht untersucht sind und ein rationales Design nicht möglich ist. Derzeit lassen sich Oligosaccharidmimetika in zwei Gruppen einteilen, wobei ein fließender Übergang beider Gruppen stattfindet:

- A. Mimetika für Lectine-Rezeptoren
- B. Mimetika die Enzyme der Oligosaccharidbiosynthese inhibieren

Dabei ist die Gruppe **A.** direkt an der Intervention von biologischen Prozessen beteiligt, wobei die Gruppe **B.** hauptsächlich zur Untersuchung der Oligosaccharidbiosynthese dient, die hier nicht näher besprochen werden soll^[50]. Ein gut untersuchtes Beispiel stellt das Tetrasaccharid Sialyl Lewis^x dar, das die Adhäsion zwischen Immunzellen mit Sialyl Lewis^x Oberflächenstruktur^{[51],[52],[53]} an Selectinen (Lectin-Rezeptor) bewirkt. Die Selectine unterteilen sich in die drei Untergruppen E-, P- und L-Selectine (Kapitel 7.1.1), wobei durch Rezeptor-Ligand-Untersuchungen ein genaues Bild von der Struktur dieser Rezeptoren gewonnen wurde. So hat sich gezeigt, dass E- und L-Selectine alle drei OH-Gruppen der Fucose und die 2- und 6-OH-Gruppe der Galactose, sowie die Carboxylgruppe der Neuraminsäure zur Erkennung benötigen. Für P-Selectine ergibt sich ein ähnliches Bild, nur dass die 2- und 4-OH-Gruppe nicht zur Erkennung beiträgt^[54]. Aus diesen Überlegungen heraus wurden vereinfachte Strukturen entwickelt, die eine vergleichbare Anordnung der Erkennungsstrukturen besitzen. Die natürliche Struktur von Sialyl Lewis^x mit den zugehörigen Antagonisten ist in **Schema 9** wiedergegeben.

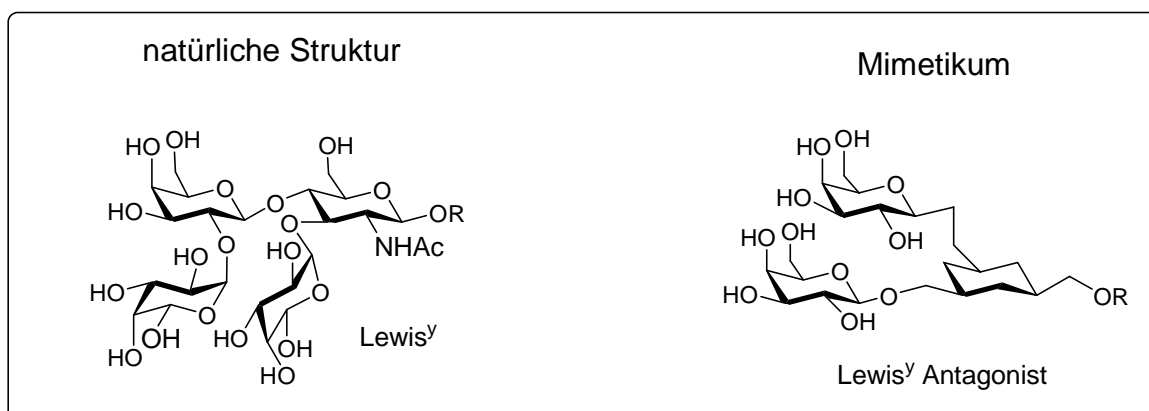
Schema 9: Sialyl Lewis^x und synthetisch hergestellte Antagonisten^[13]



Untersuchungen der Mimetika zeigten, dass der E-Selectin-Antagonist eine 50 mal höhere Äffinität^[55] und der makrozyklische P-Selectin-Antagonist sogar eine dramatische Verstärkung von 10^3 Einheiten^[56] aufweist. Durch die vereinfachte Synthese konnte die teure und schwer zu handhabende Neuraminsäure durch einfache Carboxylfunktionen ersetzt werden. Weiter kann die bei einer Oligosaccharidsynthese oft Schwierigkeit bereitende NAc-Funktion in GlcNAc weggelassen werden und die Zucker können über ein makrozyklisches Peptid imitiert werden. Das Beispiel zeigt, wie effektiv Glycomimetika als künstliche Inhibitoren wirken können und wie eine Synthese mit völlig anderen Strukturen bei ähnlichen Funktiona-

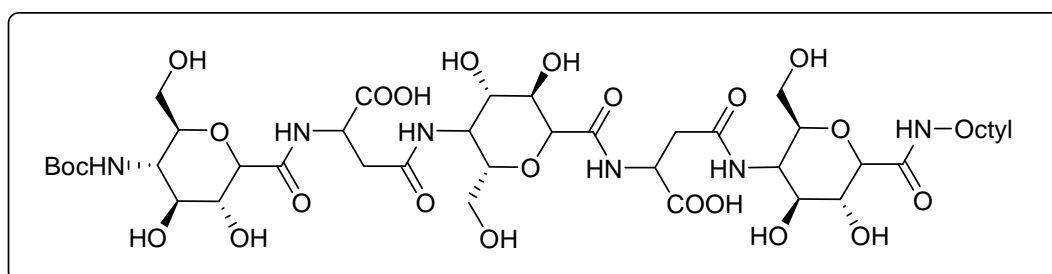
litäten zu einer deutlich höheren Affinität führt. Eine weitere Verstärkung der Affinität konnte durch den Aufbau von multivalenten Architekturen erreicht werden. So konnte Roy et al.^[57] mit wasserlöslichen Copolymeracrylamiden aus 3'-sulfo-Lewis^x-(Glc) Monomeren den bis heute stärksten Inhibitor für L- und E-Selectine herstellen (Kap. 7.1.3). Eine andere Arbeitsgruppe^[58] veröffentlichte ein Mimetikum für das Tumor-Antigen Lewis^y^[59], das die Adhäsion von Fibronectin an Mauskarzinome (B16F10 Line) zu 80% inhibiert (**Schema 10**). Zur Darstellung des Mimetikums wurden verschiedene bekannte molekular-dynamische Berechnungen durchgeführt, um die optimale Ligandgeometrie vorherzusagen.

Schema 10: Mimetikum für das Tumor Antigen Lewis^y^[58]

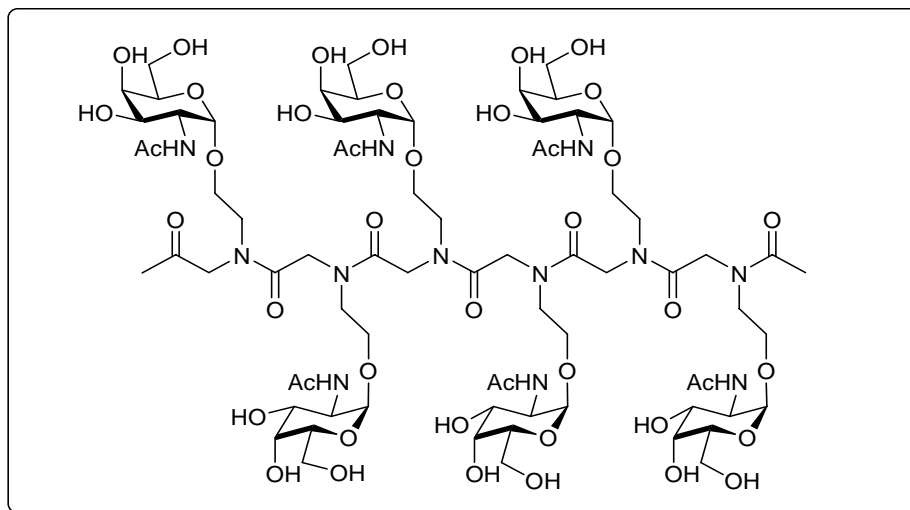


Die Verknüpfung einzelner Glycoside über Aminosäuren^[60] (SAAs Sugar Amino Acids) ist ein weiterer viel versprechender Ansatz für therapeutische Glycokonjugate. So konnte Ichikawa et al.^[61] mit einem synthetisch hergestellten, enzymatisch nicht abbaubaren Glycokonjugat aus abwechselnden β -Aminosäuren- und Zuckereinheiten, in einem in vitro Assay mit metastierenden Tumorzellen eine Zelladhäsion an gesunden Zellen verhindern ($IC_{50} = 10 \mu M$) (**Schema 11**).

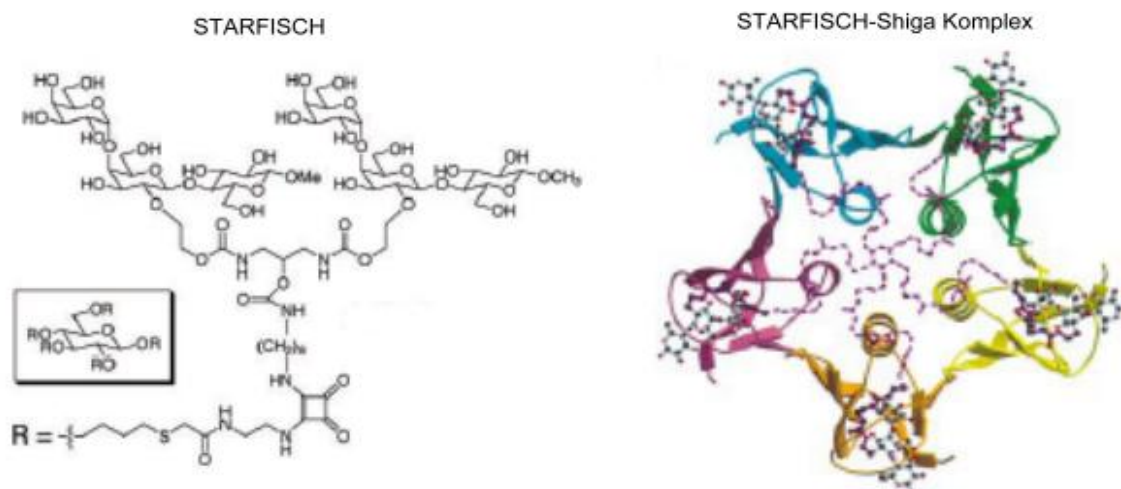
Schema 11: Glycokonjugat aus Zuckern und Aminosäuren^[61]



Auch peptidähnliche, enzymatisch nicht abbaubare Peptidoide wurden als Rückgrat-Strukturen für einzelne Zucker verwendet. Diese Glycopeptidoide besitzen eine größere Flexibilität der Zucker und besitzen eine bessere Bioverfügbarkeit. Roy et al.^[62] stellte dazu ein lineares Glycopeptidoid mit O-verknüpften Tn Antigenen her (**Schema 12**).

Schema 12: Glycopeptidoid mit Tn Antigenen ^[62]

Ein weiteres Beispiel für einen multivalenten Inhibitor ist ein von Bundel et al.^[63] entwickeltes Mimetikum, welches an einen Shiga ähnlichen Rezeptor von Escherichia Coli bindet. Das Shiga und Cholera Toxin ist für den Verlust von Millionen von Lebern pro Jahr verantwortlich^[64] und bindet über ein homopentameren Lectin-Rezeptor^{[65],[66]} an die Zellmembran. Ein Inhibieren des Vorgangs könnte für therapeutische Zwecke genutzt werden. Bisher erzeugte niedrigmolekulare Substanzen zeigten allerdings zu geringe inhibierende Eigenschaften^[67]. Das neu hergestellte Mimetikum (STARFISCH) dagegen zeigte bei in vitro Untersuchungen eine 1-10 Millionen stärkere inhibierende Eigenschaft im Vergleich zu den univalenten Liganden und stellt den stärksten bisher berichteten Inhibitor für Shiga ähnliche Toxine I und II dar. Eine Röntgenstruktur des STARFISCH-Shiga-Komplex^[68] zeigt, dass eine multiple Anbindung der Trisaccharideinheiten für die stark inhibierende Wirkung verantwortlich ist (**Schema 13**).

Schema 13: Multivalentes Mimetikum (STARFISCH) des Shiga ähnlichen Toxins^[63]

Die aufgeführten Beispiele zeigen, wie effektiv und wichtig es ist, neue Mimetika auf der Basis von Kohlenhydraten zu entwickeln, um effektive Inhibitoren zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen bereitzustellen. Ein wichtiger Weg um diesen Fragestellungen gerecht zu werden, sind neue Synthesekonzepte, die auf möglichst einfache Weise eine große Variation ihrer Grundstruktur zulassen und durch Kombination von Zuckern mit peptidischen Verknüpfungen einen leichten Zugang ermöglichen. Um *in vitro* / *in vivo* Experimente zu ermöglichen, sollten alle Teile des Mimetikums stabil gegen enzymatischen Abbau sein (Glycosidasen, Peptidasen, Proteasen). Mit diesen Werkzeugen sollte es möglich sein, neue Lectin-Rezeptoren aufzuspüren. Dazu müssen etablierte Methoden wie die Festphasensynthese und kombinatorische Ansätze mit einbezogen werden. Über multivalente Mimetika ist ein neuer Weg zur Therapie von vielen bis jetzt unheilbaren Krankheiten denkbar (Krebs, AIDS, Autoimmunerkrankungen).

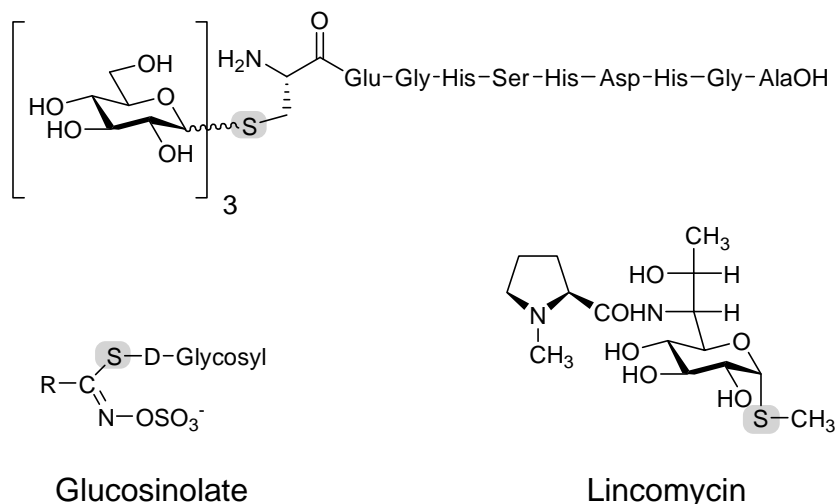
5 SYNTHESKONZEPT DER S-GLYCOPEPTIDE

In den folgenden Kapiteln soll ausführlich auf das Synthesekonzept der neu dargestellten S-Glycopeptide eingegangen werden. Dabei wird hauptsächlich die Synthesestrategie vorgestellt, Einzelheiten zu den Synthesen werden im Kapitel 6 ausführlich besprochen.

5.1 Besonderheiten von S-Glycosiden

Die Verknüpfung von Glycosiden mit Peptiden zu Glycopeptiden am anomeren Zentrum der Glycoside wird in der Natur hauptsächlich von *N*- und *O*-Atomen gebildet^{[69],[70],[71]}. Die zum Sauerstoff analogen S-Glycopeptide kommen dagegen sehr selten vor und wurden bisher in Antibiotika der Spezies *Streptomyces*^[72] (Lincomycin), auf der Membran von Erythrocyten^[73] als trimeres Glucosederivat von Cystein (genaue Verknüpfung der Glucoseeinheiten bisher noch nicht geklärt) und in Glucosinolaten gefunden^[74] (**Schema 14**). Dabei ist Myrosinase die einzig natürlich vorkommende S-Glucosidase^[75].

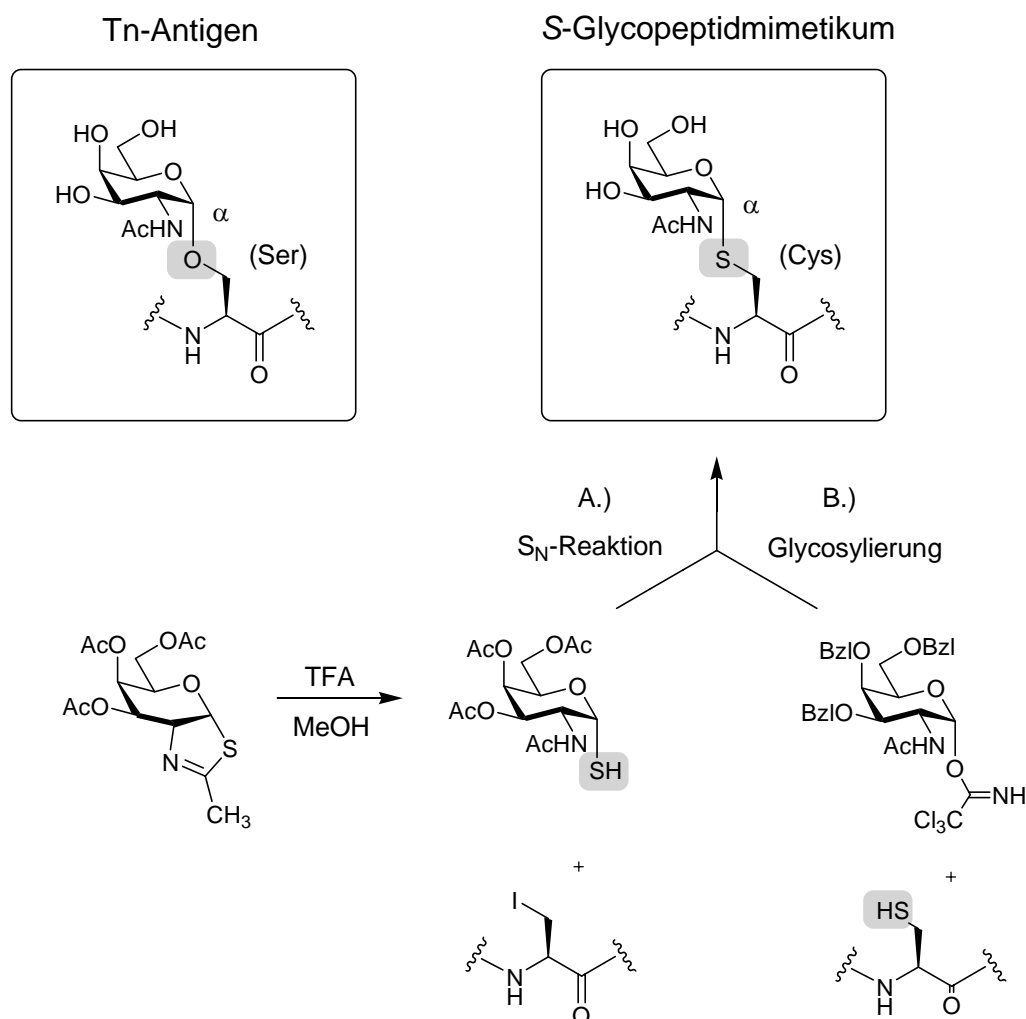
Schema 14: in der Natur vorkommende Thioglycoside



1-Thioglycoside sind gegen enzymatischen Abbau^[76] beständig und werden als kompetitive Glycosidaseinhibitoren^{[77],[78]} für mechanistische Untersuchungen verwendet. Daneben führt der Schwefel zu einer höheren Stabilität gegen saure Hydrolyse^[79], verbunden mit einer geringeren Basizität aber einer stärkeren Nukleophilie als der Sauerstoff. Mercaptane von 1-Thiopyranosen anomersieren viel langsamer als die Sauerstoff analogen Pyranosen. Die Vielfalt der organischen Schwefelchemie spiegelt sich in ihrer Anwendung als Glycosyldonor wieder, bei der unterschiedlichste Promotoren aus Thioglycosiden eine große Anzahl von neuen Donoren erzeugen^[80]. So ist es möglich, aus stabilen Thioglycosiden während einer Oligosaccharidsynthese neue reaktive Donoren (Kapitel 4.2, **Schema 7**) bereitzustellen. Der

Schwefel kann dabei als Nucleophil, Elektrophil oder als Radikal fungieren und zusätzlich unterschiedliche Oxidationsstufen annehmen. Diese Vorteile machen Thioglycoside zu einem sehr variablen Werkzeug um Oligosaccharide herzustellen. Des Weiteren stellen sie eine wichtige Gruppe an Oligosaccharidmimetika dar^[81]. Im Gegensatz zu *C*-Glycosiden sind sie einfacher herzustellen und das interglycosidische Schwefelatom ist in der Lage, als Wasserstoff-Akzeptor zu wirken, was bei der Kohlenhydraterkennung der analogen *O*-Substraten eine wichtige Rolle spielen kann. Noch wichtiger bei einer Kohlenhydrat-Proteinwechselwirkung ist die gesamte Konformation des Oligosaccharids. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, wie gut die unnatürlichen Thiooligosaccharide in wässriger Lösung, ihre natürlichen Oligosaccharide repräsentieren^[82]. Dies wurde über NMR-Studien, molekulare Berechnungen und über Kristallstrukturanalyse an 4-Thiomaltose^{[83],[84]} 4-Thiogalabiose^[85], α -L-3-thioFuc(1 \rightarrow 3)GlcNAc^[86], α,α -Thiotrehalose^[87] und Thiogangliosiden^[88] gezeigt. Dabei stellte sich heraus, dass die *S*-Glycosideinheit flexibler ist und mehr Konformationen als ihre analoge *O*-Glycosideinheit annehmen kann. Das führt in Lösung zu einem besseren "Fit" der Thioglycoside an das kohlenhydraterkennende Zentrum des Proteins. Die Röntgenstruktur von Methyl-4-thio- α -maltose^[89] zeigt, dass die C-S Bindung im Vergleich zur C-O Bindung nur um 0.4 Å länger ist.

All diese Bedingungen machen Thiooligosaccharide und Thioglycopeptide zu idealen Werkzeugen, um die in der Natur sehr wichtigen Kohlenhydrat-Proteinwechselwirkungen^{[90],[91]} zu untersuchen und neue synthetische Vakzine^{[92],[93]} in Form einer "Glycotherapy" zu entwickeln. Als Beispiel ist das Tn-Antigen^{[94],[95]} zu nennen, bei dem es sich um ein Tumor assoziierendes Antigen handelt, das verstärkt bei Krebszellen der Lunge^[96], des Dickdarms^[97], der Bauchspeicheldrüse^[98] und der Brust^[99] vorkommt. Es entsteht durch eine Veränderung des glycosylierten Zellmembranproteins MUC4^[100], bei dem die schrittweise Verlängerung der Glycankette durch Glycosyltransferasen unvollständig ist und das Tn-Antigen in die Ketten eingebaut wird^[101]. Das Tn-Antigen ist relativ einfach aufgebaut und besteht aus einer GalNAc-Einheit die α -glycosidisch mit Serin verknüpft ist. Aus Konjugaten dieses Tumor assoziierenden Antigens erhofft man sich in der Zukunft neue Impfstoffe^{[102],[103]} gegen Krebs. Dazu wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen ein *S*-Mimetikum^{[104],[105],[106],[107]} des Tn-Antigens hergestellt (**Schema 15**). Die Gruppe Kessler verwendete dazu ein L-Cystein Derivat das mit GalNAc glycosyliert wurde (Weg B.)). Um überwiegend das α -Anomer zu bekommen, wurden Benzylschutzgruppen (kein Nachbargruppeneffekt) und die Trichloracetimidatmethode bei tiefen Temperaturen verwendet (Kapitel 4.2, **Schema 6**). Dabei wurde nach Abspalten der Schutzgruppen das *S*-Glycopeptidmimetika lediglich mit Ausbeuten von 30% erhalten. Einen anderen Weg beschreibt die Arbeitsgruppe Knapp, die über das Thiazolin das 1-Thioglycopyranose von GalNAc herstellte und im Abschluss über eine nucleophile Substitution eines iodierten Cysteinderivats das *S*-Tn-Antigen in Ausbeuten von 87% erhielt (Weg A.).

Schema 15: Tumor assoziierendes Tn-Antigen und *S*-Glycopeptidmimetikum

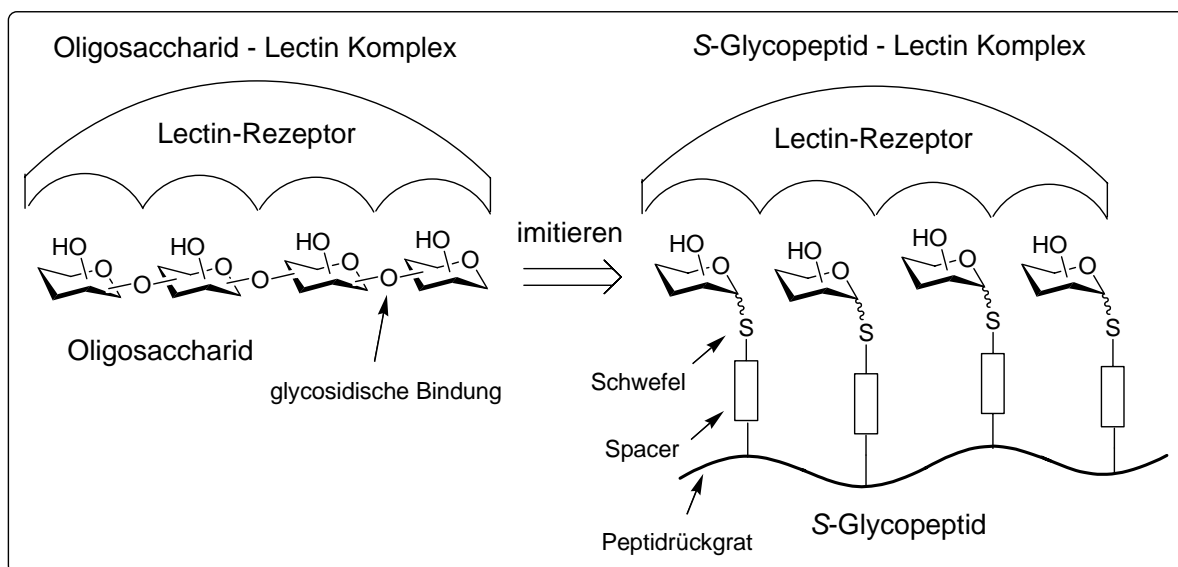
Somit konnte über den Syntheseweg der 1-Thioglycose die spätere α -anomere Konformation des Thioglycopeptids vorherbestimmt werden, und eine größere Flexibilität bei der Suche des Reaktionspartners wurde möglich. Diese beiden Verfahrenswege wurden in dieser Arbeit bei der Synthese von *S*-Glycopeptid-Bausteinen mit *n*-Pentyl-Spacer weiter auf ihre Anwendbarkeit untersucht (Kapitel 6.1.1).

5.2 Vergleich Oligosaccharide und *S*-Glycopeptide

In der Vergangenheit wurden Glycopeptidpolymere von den Gruppen Roy^{[108],[109],[110]} und Lee^[111] als sehr erfolgreiche Oligosaccharidmimikry eingesetzt (Kapitel 7.3). Dabei wurden meist große Polymerketten^{[112],[113]} (größer 200 kDa) mit zuckerderivatisierten Polyacrylamiden über radikalische Polymerisation aufgebaut. Die Zucker wurden dazu über einen Spacer mit Acrylamid verknüpft, um die Flexibilität der vom Rückgrat abstehenden Zuckerreste zu erhalten und sie sterisch für kohlenhydratbindende Proteine zugänglich zu machen (Kapitel

7.1.3, **Schema 102**). Mit dem Verfahren ist es nur schwer möglich, Glycopeptidpolymere mit einer eindeutigen Kettenlänge und damit definierten Struktur herzustellen. Auch lassen sich die Zucker am Polymerrückgrat nicht beliebig innerhalb des Glycopeptidpolymers variieren, was allerdings sehr wichtig ist, da für die Kohlenhydraterkennung meist nur 1 bis 6 Zucker notwendig sind. Für eine spezifische Wechselwirkungen der Glycoside mit den kohlenhydraterkennenden Proteinen (Kapitel 7.1), benötigt man kleine maßgeschneiderte Glycopeptide, die nach dem “Schlüssel-Schloss-Prinzip“ mit dem Protein-Rezeptor (Lectin) wechselwirken. Die Verwendung großer Polymere führt dagegen nur zur Erhöhung der Affinität in Form von multipler Anbindung der Lectin-Rezeptoren an viele “Kohlenhydrate“ des Polymers (Multivalente Wechselwirkungen Kap. 7.1.3). Ziel des hier vorgestellten Synthesekonzepts ist es deshalb möglichst einfach und selektiv *S*-Glycopeptide mit einer großen Vielfalt an Zuckern aufzubauen, die maximal 4-6 Zuckerreste tragen^{[114],[115]}. Dabei werden komplizierte Oligosaccharidsynthesen vermieden und die *S*-Glycopeptide über etablierte Peptidkupplungsreaktionen aufgebaut. In **Schema 16** ist die Idee des neuen Konzepts vereinfacht dargestellt.

Schema 16: *S*-Glycopeptide als Oligosaccharidmimikry



Die *S*-Glycopeptide sollen dabei die Oligosaccharide imitieren, wobei die Zucker über einen Spacer an das Peptidrückgrat gebunden sind und eine Synthese von Oligosacchariden über glycosidische Bindungen vermieden wird. Für ein erfolgreiches Oligosaccharidmimikry müssen folgende Punkte beachtet werden:

- Die räumliche Anordnung der Zucker im *S*-Glycopeptid sollte der Anordnung im Oligosaccharid entsprechen
- Die Zucker des *S*-Glycopeptids müssen gut zugänglich für kohlenhydrat bindende Proteine sein
- Die *S*-Glycopeptide müssen sich gut von Wasser solvatisieren lassen

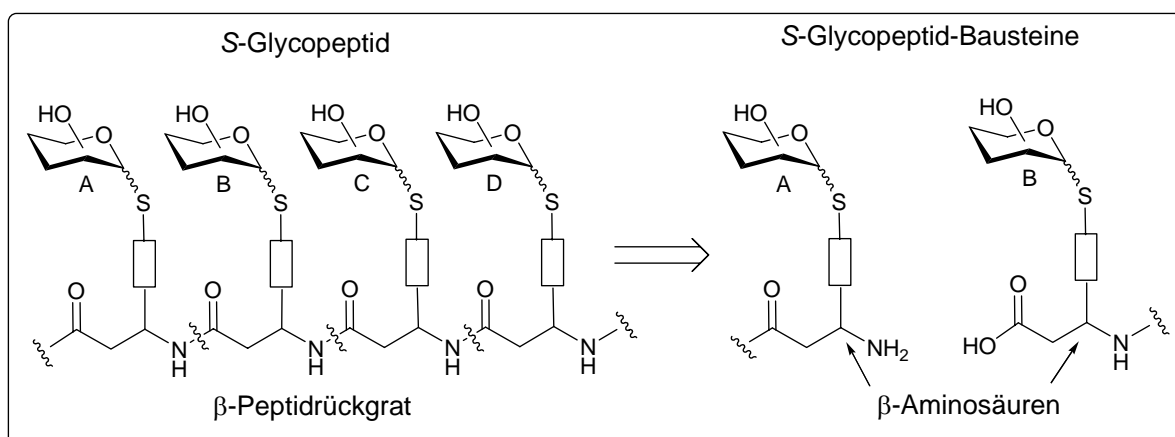
- Die Zucker am *S*-Glycopeptide sollten flexibel genug sein, um sich in einer Protein-Bindungstasche orientieren zu können
- Das Peptidrückgrat und die Spacer müssen die Zuckerreste möglichst gleichmäßig mit definierter Struktur ausrichten

Diese Kriterien sollen bei den folgenden Überlegungen zum Aufbau der *S*-Glycopeptide berücksichtigt werden.

5.3 Aufbau der *S*-Glycopeptide aus *S*-Glycopeptid-Bausteinen

Ein wesentlicher Vorteil des neuen Synthesekonzepts ist der Aufbau der *S*-Glycopeptide aus *S*-Glycopeptid-Bausteinen (**Schema 17**). Dadurch kann im Vorfeld eine große Anzahl an verschiedenen Bausteinen mit unterschiedlichen Zuckern (A, B, C, D) in hoher Reinheit und ausreichender Menge für die Synthese der *S*-Glycopeptide bereitgestellt werden.

Schema 17: Aufbau des *S*-Glycopeptids aus *S*-Glycopeptid-Bausteinen



Die Synthese der *S*-Glycopeptide erfolgt dabei über nahezu quantitative Peptidknüpfungsreaktionen zwischen den β -Aminosäuren der einzelnen *S*-Glycopeptid-Bausteine (**Schema 18**). Für eine Peptidsynthese müssen die Bausteine folgendermaßen vorliegen:

- Die N-terminale Aminofunktion der β -Aminosäuren ist mit einer temporären Fmoc-Gruppe geschützt
- Die Alkohol-Funktionen am Zucker sind mittels Acetylgruppen geschützt
- Die Säurefunktion des zu koppelnden *S*-Glycopeptid-Bausteins (B) wird für die Peptidknüpfung aktiviert (z. B. Pentafluorphenol)

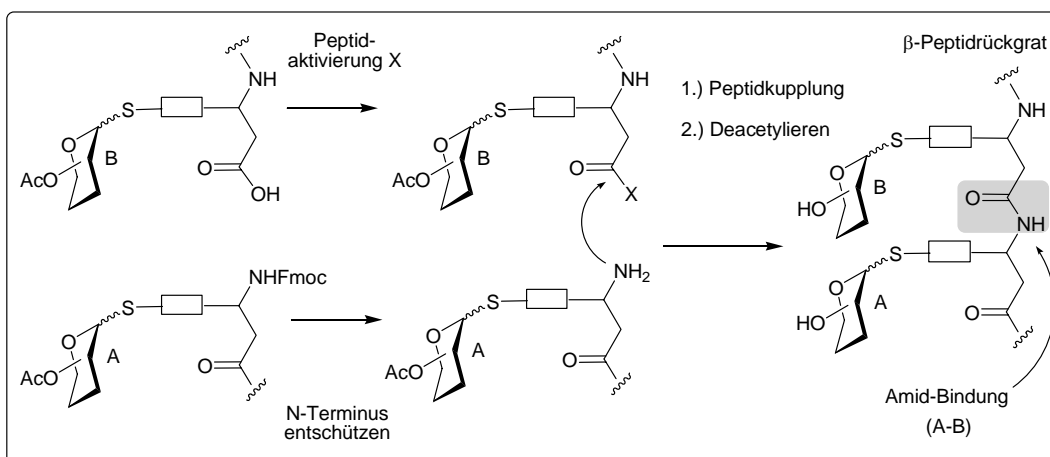
Für die Synthese des *S*-Glycopeptids wird nun beim Baustein (A) die Fmoc-Schutzgruppe (20% Piperidin) unter mild basischen Bedingungen entfernt, wobei die Acetyl-Schutzgruppen

am Zucker nicht abgespalten werden. Beim zusammengeben der beiden Bausteine (A, B) findet bei Raumtemperatur innerhalb kurzer Zeit (20 min) eine selektive Kupplung unter Ausbildung einer neuen Amid-Bindung (A-B) statt (**Schema 18**). Bei mehrfachem Wiederholen wird das S-Glycopeptid (A-B-C-D, **Schema 17**) über ein β -Peptidrückgrat stufenweise aufgebaut. Im letzten Schritt werden unter stark basischen Bedingungen (NH_3 in MeOH) die Acetylgruppen der Zucker vollständig entfernt, ohne dass die Amid-Bindungen des Rückgrats gespalten werden. Durch die Verwendung einer Fmoc-Strategie kann die Synthese der S-Glycopeptide sehr gut an der festen Phase automatisiert werden und aus wenigen Bausteinen über eine kombinatorische Synthese eine große Anzahl neuer S-Glycopeptide erzeugt werden. Die Verwendung von β -Aminosäuren anstatt der natürlich vorkommenden α -Aminosäuren zum Aufbau eines β -Peptidrückgrats hat dabei mehrere Vorteile:

- β -Peptide lassen sich nicht von Peptidasen und Proteasen abbauen
- Oligomere β -Peptide bilden mit wenigen β -Aminosäuren über intramolekulare Wasserstoffbrücken eine stabile Helix (mehr als 6 β -Aminosäuren)
- β -Aminosäuren neigen bei der Peptidaktivierung nicht zur Racemisierung

Da auch Glycosidasen die S-glycosidische Bindung der Zucker nicht spalten können, sind die hergestellten S-Glycopeptide gegen enzymatischen Abbau beständig und können in vivo eingesetzt werden. Bei genauer Kenntnis der Sekundärstruktur des β -Peptidrückgrats^{[116],[117]} kann die räumliche Ausrichtung der Zucker annähernd vorhergesagt werden und eine bessere Modellierung der S-Glycopeptide auf einen Protein-Rezeptor wird möglich. Eine Racemisierung von β -Aminosäuren bei der Peptidaktivierung kann nicht wie bei α -Aminosäuren über eine intramolekulare Zyklisierung zum Oxazol-5(4H) stattfinden (Kapitel 6.2.5, **Schema 86**) und somit können nicht racemisierungssichere Aktivierungsmethoden (z. B. Säurechloride) verwendet werden.

Schema 18: Synthese der S-Glycopeptide über S-Glycopeptid-Bausteine



Die *S*-Glycopeptid-Bausteine lassen sich in einen Zuckerteil, Spacerteil und eine trifunktionelle Aminosäure unterteilen (**Schema 20**). Dabei besteht der Zuckerteil aus 1-Thioglycosiden und kann ein Monosaccharid, Disaccharid oder ein Desoxyzucker sein. Die Spacer bestehen aus Aminoalkoholen die aliphatisch, aromatisch, heterozyklisch oder aus einer Aminosäure bestehen können. Durch die Variation der Spacer im *S*-Glycopeptid-Baustein können die Zucker im späteren *S*-Glycopeptid an die räumlichen Bedürfnisse des Lectin-Rezeptors angepasst werden. Da sich der Spacer sehr nahe am Zucker befindet, kann dieser selbst an der molekularen Erkennung beteiligt sein. Daraus ergeben sich folgende Überlegungen:

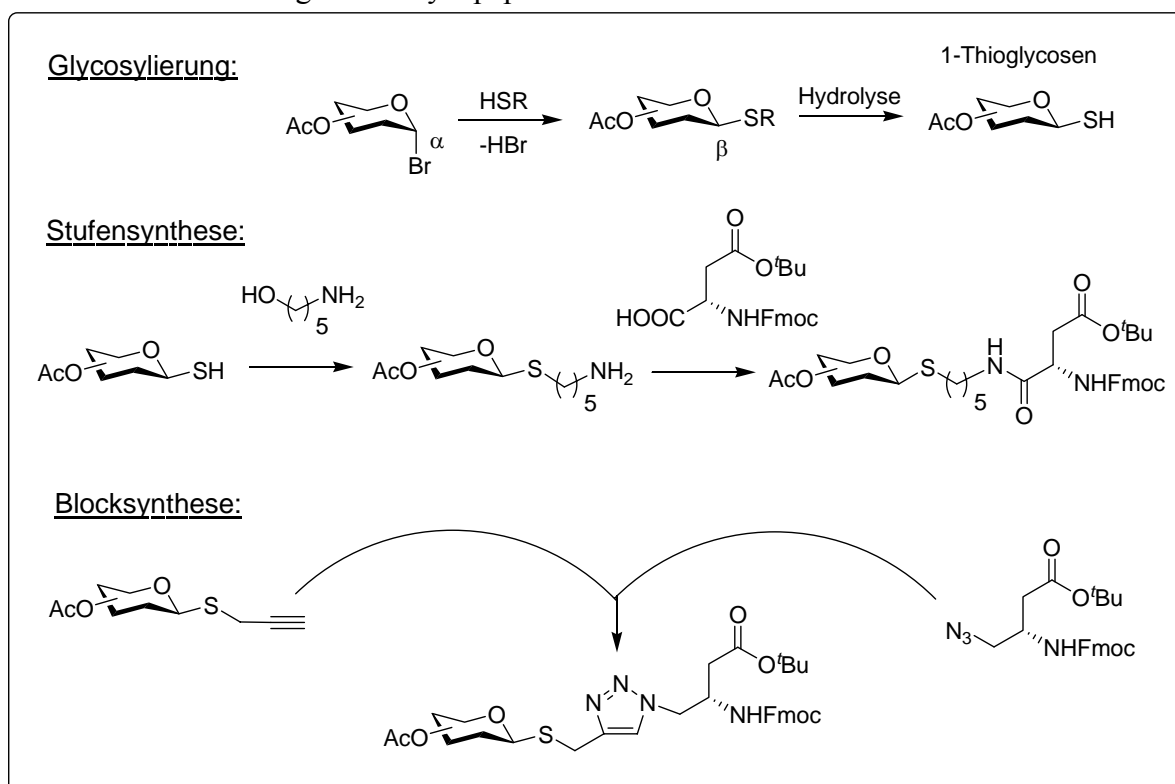
- Die Länge und Art des Spacer beeinflusst die Flexibilität der Zucker
- Wechselwirkungen der Spacer untereinander oder mit dem Rückgrat können die Position einzelner Zucker innerhalb des Glycopeptids beeinflussen
- Der Spacer kann mit polaren oder aromatischen Aminosäuren in der Kohlenhydratbindungstasche wechselwirken
- Die Spacer können die Hydrophilie des gesamten Glycopeptids verändern

Bei kettenförmigen aliphatischen Spacern muss ein Kompromiss zwischen der Flexibilität und ihrem Abstand zum Peptidrückgrat berücksichtigt werden. Dabei sollte die Kettenlänge nicht größer als 8 C-Atome sein, da eine zu große Flexibilität des Spacers eine Wechselwirkung der Zucker mit dem Rückgratpeptid begünstigt, was zu einem "Abknicken" der aliphatischen Spacerkette in Richtung des Peptidrückgrats führen kann. Bei Kettenlängen unter 4 C-Atomen besteht die Gefahr, dass einzelne Zucker durch eine sterische Hinderung des Peptidrückgrats nicht vom Lectin erkannt werden können. Somit stellen aliphatische Spacer mit 5 C-Atomen (*n*-Pentyl-Spacer) einen guten Kompromiss dar und sollen in dieser Arbeit verwendet werden. Aromatische Spacer können über π - π -Wechselwirkungen untereinander zu einer Stabilisierung der Konformation des Glycopeptids führen (aromatische Stapel Effekte). Außerdem können sie mit aromatischen Aminosäuren in der Kohlenhydratbindungstasche des Lectins wechselwirken und zu einer Verstärkung der Bindungsaffinität führen (Vororientierung der Zucker in der Bindungstasche). Bei heterozyklischen Spacern mit mehreren Stickstoffatomen im aromatischen Ring (1,2,3-Triazol-Spacer) können zusätzlich polare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Stickstoffatomen des Spacers und polaren Aminosäuren in der Kohlenhydratbindungstasche auftreten. Durch die Verwendung von Spacern auf Aminosäurebasis lassen sich über die Aminosäureseitenkette sehr unterschiedliche funktionelle Gruppen einführen. Dadurch ist eine sehr große Variation der *S*-Glycopeptid-Bausteine über den Spacerteil möglich, um eine optimale Erkennung der Zucker von Lectinen zu ermöglichen.

Bei der Synthese von *S*-Glycopeptid-Bausteinen hat sich herausgestellt, dass eine direkte Glycosylierung des Zuckerteils mit dem *n*-Pentyl-Spacer zu unbefriedigenden Ausbeuten führte (Kapitel 6.1.1). Eine Transformation des acetylierten Glycosylbromids über organische Schwefelverbindungen in das 1-Thioglycosid bildete ein vorteilhaftes Ausgangsprodukt zum

Aufbau der S-Glycopeptide (**Schema 19**). Durch die Nachbargruppenbeteiligung der Acetylgruppen wurden ausschließlich β -1-Thioglycosen erhalten (Mannose $\rightarrow \alpha$), wodurch die anomere Konfiguration des Zuckerrests für die folgenden Synthesen festgelegt war. Das Schwefelatom der Mercaptogruppe ist nukleophiler als ein Sauerstoffatom und lässt sich leicht mit Elektrophilen umsetzen. Außerdem bildet der Schwefel leicht Radikale die sich für eine Weiterreaktion z. B. mit Alkenen nutzen lassen. Bei der Darstellung der S-Glycopeptid-Bausteine wurden zwei unterschiedliche Synthesestrategien verfolgt.

Schema 19: Darstellung der S-Glycopeptid-Bausteine



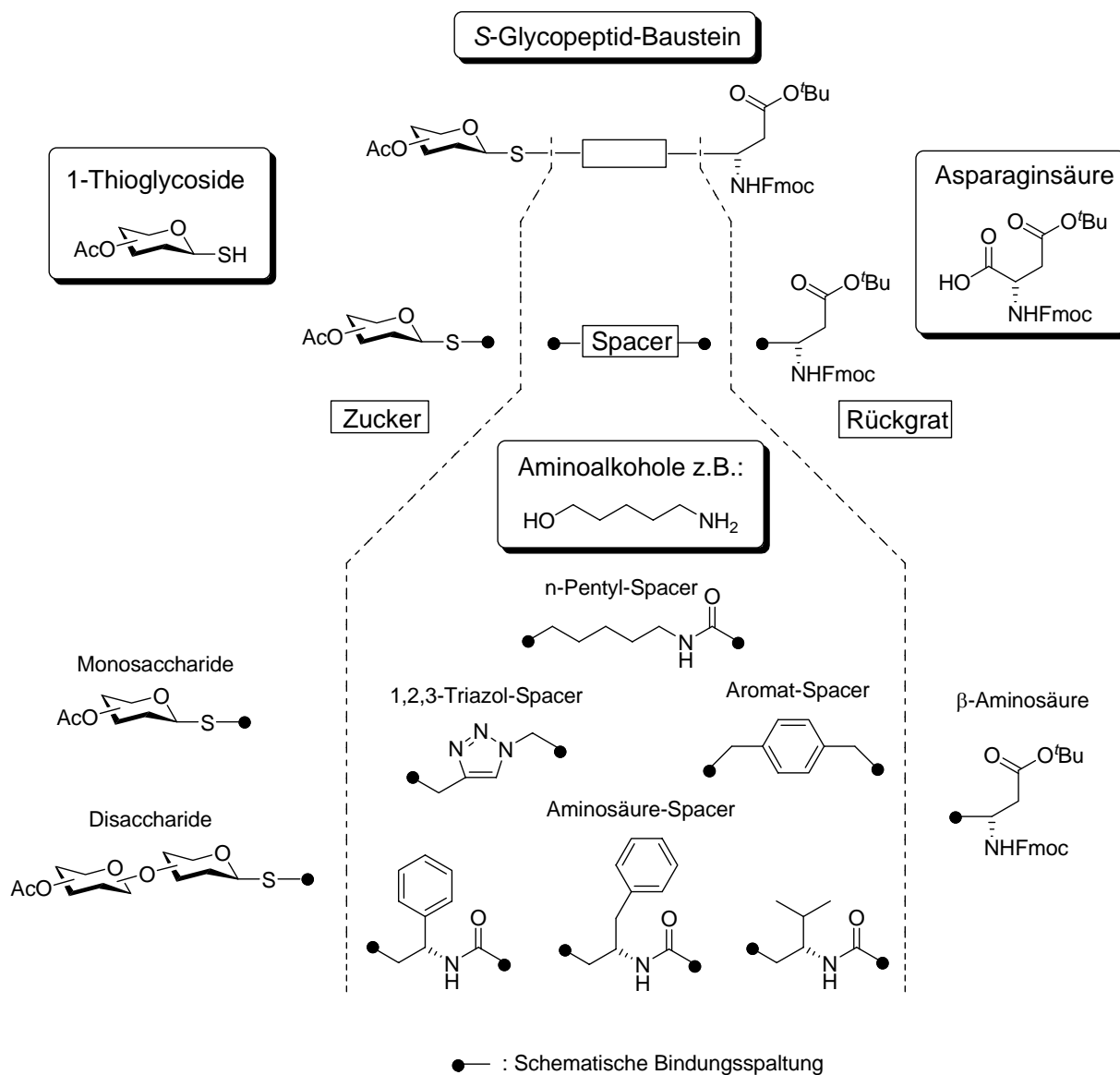
R: Alkyl, Aryl

Zum Einen lassen sich die Bausteine ausgehend von 1-Thioglycosen über eine mehrstufige Synthese aufbauen oder in einem Syntheseschritt über eine Blocksynthese herstellen. Mit dem Blocksyntheseverfahren können auch größere Fragmente gut zusammengefügt werden. Der optimale Syntheseweg zur Darstellung der S-Glycopeptid-Bausteine sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- Der Syntheseweg muss eine Vielzahl an Variationen von Zuckern und Spacern ermöglichen
- Der Zeitaufwand zur Darstellung der Bausteine muss sich in Grenzen halten
- Die Gesamtausbeute an S-Glycopeptid-Bausteinen sollte möglichst hoch sein
- Nach der Synthese müssen diastereomerenreine Verbindungen vorliegen

In der vorliegenden Arbeit wurde viel Wert auf einen allgemein anwendbaren Syntheseweg unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Punkte gelegt, mit dem Ziel, genügend Bausteine in hoher Reinheit für eine kombinatorische Festphasensynthese bereitzustellen.

Schema 20: Aufbau der dargestellten S-Glycopeptid-Bausteine

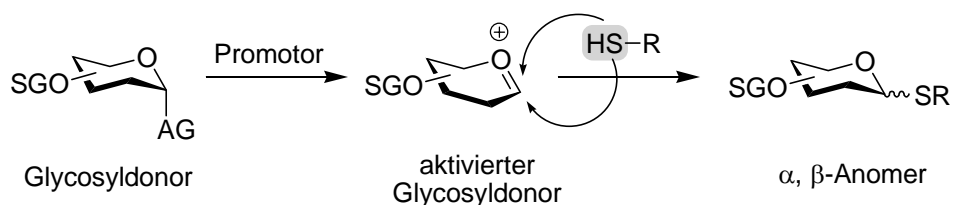


6 SYNTHESE DER S-GLYCOPEPTIDE

6.1 Synthese der S-Glycopeptid-Bausteine

In der Literatur sind zur Synthese der Thioglycopeptide zwei unterschiedliche Möglichkeiten beschrieben. Zum Einen die der O-Glycosilierung analogen Verfahrensweise, bei der eine Abgangsgruppe am anomeren Zentrum des Glycosids (Glycosyldonor) durch ein Mercaptan substituiert wird. Dazu wird meistens eine Lewisäure als Promotor (z.B. $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$, SnCl_4) benötigt, die ein Austreten der Abgangsgruppe erleichtert (**Schema 21**). Häufig verwendete Glycosyldonoren^{[118],[119]} besitzen am anomeren Zentrum als Abgangsgruppe eine Acetyl-^[120], Bromid-^[121] oder Imidatfunktion^[122]. Vorteil dieser Verfahrensweise ist, dass über ein Mercaptan viele unterschiedliche Glycoside zum Thioglycosid umgesetzt werden können. Um das Verfahren für die Synthese der S-Glycopeptid-Bausteine zu verwenden, müssen allerdings entsprechende Mercaptan-Spacer synthetisiert werden. Das bedeutet, dass man für jeden neuen Spacer ein entsprechendes Thiol benötigt. Weiter ist anzumerken, dass die Stereoselektivität zwischen α - und β -Anomer ($\text{S}_{\text{N}}1$ oder $\text{S}_{\text{N}}2$ -Typ) stark von den Schutzgruppen am Zucker und den Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Temperatur, Promotor, Donoren) abhängt.

Schema 21: Darstellung der S-Glycopeptide durch Glycosylierung mit Mercaptanen

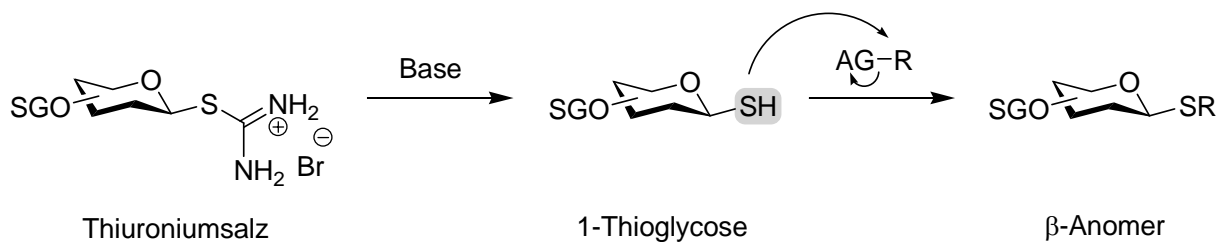


(R: Spacer, AG: Abgangsgruppe, SG: Schutzgruppe)

Bei dem anderen Verfahren wird das 1-Thioglycosid über eine meist mehrstufige Synthese hergestellt, indem an das anomere Zentrum des Zuckers meist eine thiolische Vorstufe eingeführt wird. Mit dem anomeren Thiol am Zucker kann in einer Folgereaktion der Spacer über eine Substitution der Abgangsgruppe (AG) eingeführt werden (**Schema 22**). Als 1-Thioglycosidvorstufen werden meist Xanthogenate^[123], Thiuroniumsalze^[124] oder Thiocyanate^[125] aus den Glycosylbromiden hergestellt, die basisch in die 1-Thioglycosen überführt werden. Diese Verfahrensweise hat gleich mehrere Vorteile. Die anomere Konfiguration (α , β) am Glycosid kann vor der Reaktion mit dem Spacer über die 1-Thioglycosen festgelegt werden. Bei der Folgereaktion können unterschiedliche Reaktionstypen (S_{N} -, Radikalische), Reaktionsbedingungen (Lösungsmittel, Temperatur) verwendet werden und die Vielfalt der organischen Schwefelchemie genutzt werden. Durch die Auswahl einer geeigneten Reaktion (z.B. Mitsunobu-Reaktion) können sehr viele Spacer über leicht zugängliche Verbindungen

(z.B. Aminoalkohole) eingesetzt werden. Damit wird eine größere Variation an *S*-Glycopeptid-Bausteinen möglich. Voraussetzung für diesen Syntheseweg sind geeignete Verfahren zur Herstellung der 1-Thioglycosen.

Schema 22: Darstellung der *S*-Glycopeptide durch Reaktion über 1-Thioglycosen

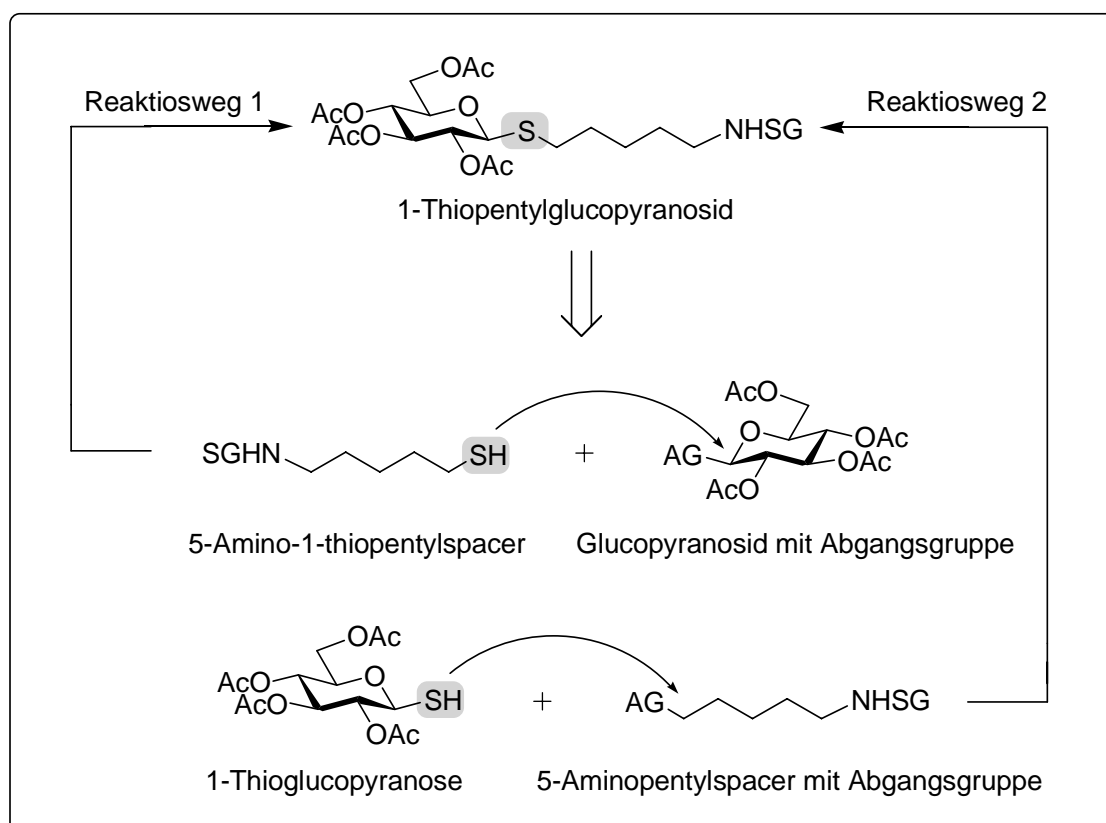


(R: Spacer, AG: Abgangsgruppe, SG: Schutzgruppe)

6.1.1 Bausteine mit n-Pentyl-Spacer

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, sind zwei Reaktionswege zur Einführung der Spacer denkbar. Dabei muss die Umsetzung zwischen dem n-Pentylspacer und dem Glycosid zum 1-Thiopentylglycosid in guten Ausbeuten erfolgen, um im zweiten Schritt bei der Knüpfung mit Asparaginsäure eine bestmögliche Gesamtausbeute zu erhalten. Um den besten Syntheseweg auszuwählen, wurden verschiedene Reaktionen mit unterschiedlichen Spacern am Beispiel von Glucose untersucht. Bei der Retrosynthese des 1-Thiopentylglycosids ergeben sich zunächst zwei Reaktionswege (**Schema 23**). Beim **Reaktionsweg 1** wird ein 5-Amino-1-thiopentylspacer mit der Glucose glycosyliert. Dabei muss der Substituent an 1-Position des Glucosids als Abgangsgruppe austreten. **Reaktionsweg 2** zeigt den umgekehrten Weg, indem der Schwefel der 1-Thioglucopyranose die Abgangsgruppe des 5-Aminopentylspacers nukleophil substituiert.

Schema 23: Retrosynthese des 1-Thiopentylglucopyranosids

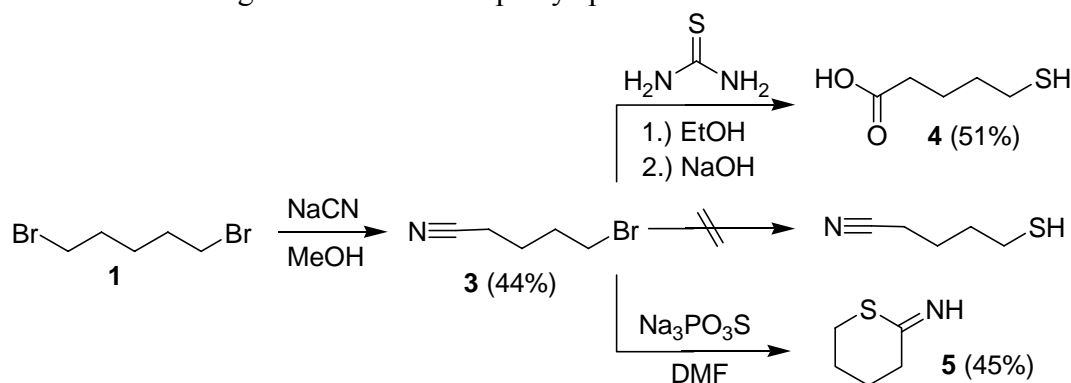


(AG: Abgangsgruppe, SG: Schutzgruppe)

Zunächst sollte die Synthesestrategie über den 5-Amino-1-thiopentylspacer mit verschiedenen Glucosederivaten (**Reaktionswegs 1**) untersucht werden. Für die Synthese des neuen Spacers musste eine Thiolgruppe am Pentylspacer eingeführt werden, der an seinem anderen Ende eine geschützte Aminfunktion enthält. Als erstes Zielmolekül wurde Verbindung **3** mit

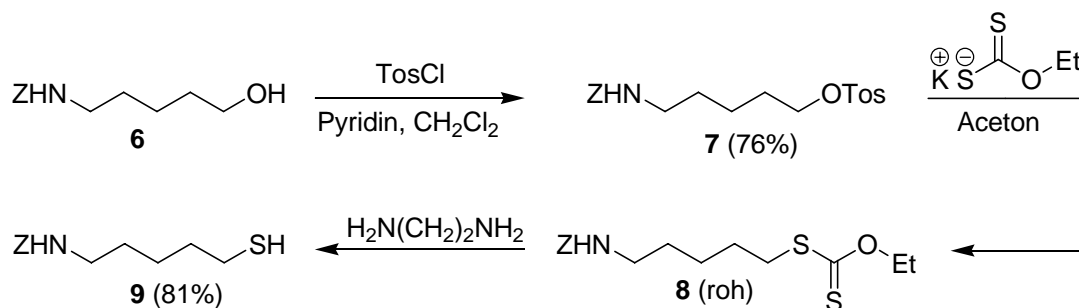
einem Nitril als versteckte Aminfunktion dargestellt (**Schema 24**). Aus dem Dibrompentan erhielt man über eine Kolbe-Nitrilsynthese das Bromvaleronitril^[126] **3** in mittelmäßiger Ausbeute (44%). Ausgehend von Verbindung **3** wurde nun versucht, die Thiofunktion über eine Substitution von Brom am Pentylspacer einzuführen. Bei der Reaktion von Thioharnstoff zum Thiuroniumsalz mit anschließender Hydrolyse durch Natronlauge konnte nur das 5-Mercaptovaleriansäure **4** (51%) isoliert werden. Während der Bildung des Thiols wurde auch die Nitrilfunktion über das Säureamid zur Säure hydrolysiert. Auch bei kürzeren Reaktionszeiten entstand ausschließlich Verbindung **4**. Somit wurde über Natriumthiophosphat^[127] versucht, die Thiofunktion einzuführen. Dabei bildete sich die zyklisierte Verbindung **5** (45%). Somit konnte mit keinen der beiden Synthesen das gewünschte 5-Nitril-1-thiopentylspacer dargestellt werden.

Schema 24: Darstellung des 5-Nitril-1-thiopentylspacers



Da die Synthese über das Nitril in beiden Fällen fehlschlug, wurde als Ausgangsprodukt Z-Aminopentanol^[128] **6** verwendet (**Schema 25**). Um die Thiolgruppe einzuführen, wurde die Alkoholgruppe tosyliert^[129] und das gebildete Tosylat **7** (76%) in das Xanthogenat^[130] **8** überführt. Durch anschließende Hydrolyse mit Ethylendiamin konnte der gewünschte 5-Amino-1-thiopentylspacer **9** in sehr guter Ausbeute (81%) erhalten werden.

Schema 25: Darstellung des 5-Amino-1-thiopentylspacers **9**



Die Einführung des 5-Amino-1-thiopentylspacer **9** wurde an verschiedenen acetylierten Glucosyldonoren untersucht (**Tabelle 2**). Die dabei durchgeführten Versuche zeigen, dass die Umsetzungen mit dem Thiol keine praktikablen Ausbeuten lieferten. Die beste Ausbeute

(34%) wurde mit der Reaktion von Pentaacetylglucose in Dichlormethan mit Zinntetrachlorid^[131] oder BF₃-etherat^{[132],[133]} als Promotor erhalten. Die Bromide und Imidate als Abgangsgruppen am Glucosid führten zu nicht isolierbaren Zersetzungsprodukten. Der hergestellte 5-Amino-1-thiopentylspacer **9** war somit für die Synthese des 1-Thiopentylglucopyranosids **13** nicht verwendbar.

Schema 25: Darstellung des 1-Thiopentylglucopyranosids **13** über den Thiopentylspacer **9**

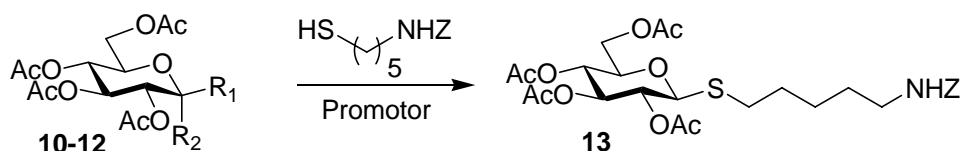


Tabelle 2: Glycosylierung mit Z-Aminopentanthiol **9**

| Edukt | Substituenten | | LM | Promotor | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|----------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------|-----------|----------|
| | R ₁ | R ₂ | | | | | |
| 10 | OAc | H | CH ₂ Cl ₂ | InCl ₃ ; | 24 h; 0°C→RT | *kein | — |
| 10 | OAc | H | CH ₂ Cl ₂ | BF ₃ Et ₂ O | 12 h; 0°C→RT | 13 | 31% |
| 10 | OAc | H | CH ₂ Cl ₂ | SnCl ₄ | 10 h; 0°C→RT | 13 | 34% |
| 10 | OAc | H | CH ₃ CN | SnCl ₄ | 10 h; 0°C→RT | *kein | — |
| 11 | H | Br | CH ₂ Cl ₂ | InCl ₃ ; | 12 h; -20°C→RT | Zersetz. | — |
| 11 | H | Br | CH ₂ Cl ₂ | BF ₃ Et ₂ O | 12 h; -20°C→RT | Zersetz. | — |
| 12 | H | Imidat | CH ₂ Cl ₂ | BF ₃ Et ₂ O | 12 h; -20°C→RT | Zersetz. | — |
| 12 | H | Imidat | CH ₂ Cl ₂ | BF ₃ Et ₂ O | 12 h; -78°C→RT | Zersetz. | — |

(*kein Umsatz auf DC)

Im Hinblick auf die nicht zufriedenstellenden Ausbeuten beim **Reaktionsweg 1** wurde der **Reaktionsweg 2** weiterverfolgt (**Schema 23**). Um die 1-Thioglucopyranose **17** herzustellen, musste eine Auswahl unterschiedlicher Darstellungsmethoden untersucht werden. Dazu wurde vom Tetraacetylglucopyranosylbromid^[134] **11** ausgegangen und mit verschiedenen organischen Schwefelnukleophilen umgesetzt (**Schema 26**). Durch anschließende Hydrolyse wurde die Thiolfunktion am Glucosid freigesetzt. Es stellte sich dabei heraus, dass die beim Thiolspace verwendete Reaktion über Kaliumxanthogenat hier nicht anwendbar ist (**Schema 25**). Bei der Aminolyse mit absolutem Ethylendiamin unter Argonathmosphäre trat nach 10 min Reaktionszeit eine heftige Reaktion ein, bei der sich die Lösung grün färbte. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte anschließend mehrere Spots. Daraufhin wurde eine neue Methode untersucht, in der Thioacetamid^[135] als Schmelze mit Verbindung **11** bei 120°C in 5 Minuten vollständig umgesetzt wurde. Die darauf folgende Alkohololyse mit Methanol zeigte laut Dünnschichtchromatogramm vollständigen Umsatz zu Produkt **17**. Um die gelbe Verunreinigung zu beseitigen, musste eine mehrmalige Säulenchromatographie durchgeführt werden, bei der nur 51% reines Produkt **17** übrig blieben. Als dritte Möglichkeit wurde das Thiou-

roniumsalsz^{[136],[137],[138],[139]} **16c** aus Verbindung **11** über Thioharnstoff in siedendem Aceton in sehr guten Ausbeuten (93%) erhalten.

Schema 26: Darstellung der 1-Thioglucopyranose **17**

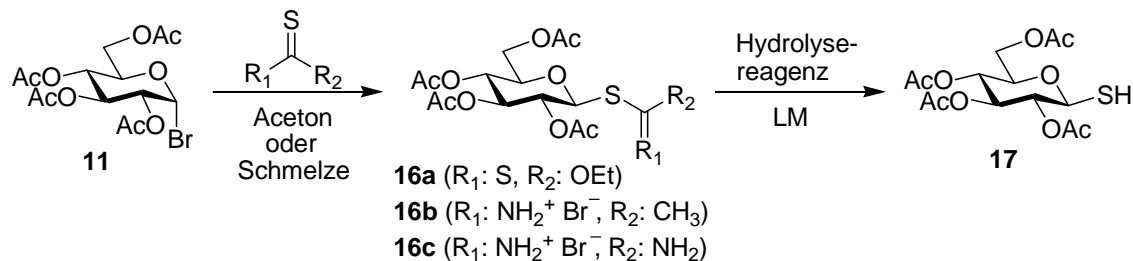


Tabelle 3: Darstellung der 1-Thioglucosen **17**

| Edukt | S=C(R ₁)R ₂ | | Zeit; Temp. | Zwischen- produkt | Hydrolyse- reagenz | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|---|-----------------|-----------------|------------------------|---|-----------------|-----------|----------|
| | R ₁ | R ₂ | | | | | | |
| 11 | S | OEt | 58°C; 5 h | 16a (91%) | Ethylen- diamin | 30°C; 10 min | *kein | — |
| 11 | NH ₂ ⁺ Br ⁻ | CH ₃ | 120°C; 5 min | 16b (quant.) | MeOH | RT; 10 min | 17 | 51% |
| 11 | NH ₂ ⁺ Br ⁻ | NH ₂ | 58°C; 5 h | 16c (93%) | K ₂ CO ₃ DCM/H ₂ O | 60°C; 10 h | *kein | — |
| 11 | NH ₂ ⁺ Br ⁻ | NH ₂ | 58°C; 5 h | 16c (93%) | KHSO ₄ / K ₂ S ₂ O ₇ DCM/H ₂ O | 60°C; 3 h | 17 | 85% |
| 11 | NH ₂ ⁺ Br ⁻ | NH ₂ | 58°C; 5 h | 16c (93%) | K ₂ S ₂ O ₅ DCM/H ₂ O | 60°C; 2 h | 17 | 90% |

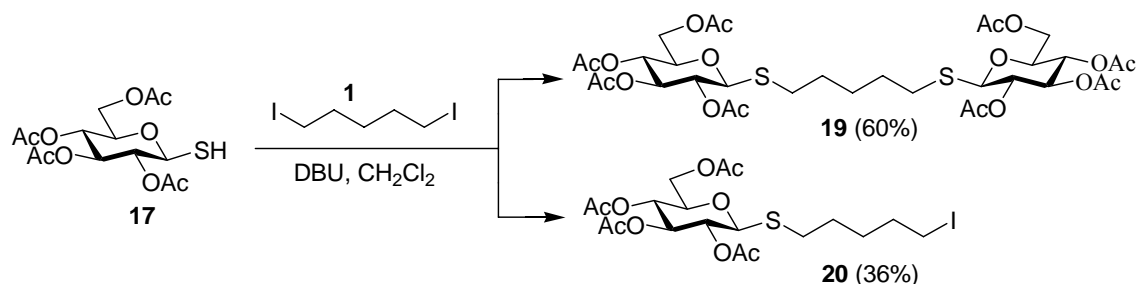
(* kein Umsatz auf DC)

Für die Hydrolyse gab die Literatur drei verschiedene anorganische Salze an. In einer Zweiphasenreaktion aus Dichlormethan-Wasser bei 60°C wurde versucht, Verbindung **16c** mit verschiedenen Basen zum Thiol **17** zu hydrolysieren. Die beste Ausbeute (90%) an Verbindung **17** ergab sich bei der Verwendung von Kaliumpyrosulfit^[140]. Eine Mischung aus Kaliumhydrogensulfat und Kaliumdisulfat ergab ebenfalls gute Ausbeuten (85%), allerdings bei längeren Reaktionszeiten. Keine Hydrolyse konnte bei Verwendung von Kaliumkarbonat festgestellt werden.

Um nach **Reaktionsweg 2 (Schema 23)** das gewünschte 1-Thiopentylglucopyranosid zu erhalten, wurde die 1-Thioglucopyranose **17** mit einfach herzustellendem 1,5-Diodpentan^[141] **18** in Dichlormethan mit DBU als Base umgesetzt. Dabei sollte das weiche Iod eine gute Ab-

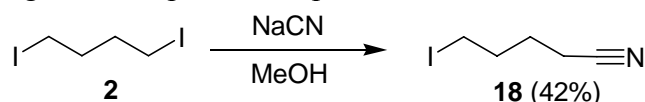
gangsgruppe für die nukleophile Substitution mit Schwefel sein. Um eine Disubstitution des 1,5-Diiodpentanlinkers **1** zu vermeiden, wurde Verbindung **1** in wenig Dichlormethan mit DBU vorgelegt und dazu eine verdünnte Lösung von Verbindung **17** in Dichlormethan langsam innerhalb einer Stunde zugetropft. Es stellte sich heraus, dass nur 36% des gewünschten 5-Iodpentyl-1-thioglucopyranosids **20** entstanden und zu 60% die disubstituierte Verbindung **19** erhalten wurde, obwohl die Stoffmengenverhältnisse von Verbindung **17** zu Verbindung **1** gleich gewählt wurden.

Schema 27: Darstellung des 1-Thiopentylglucopyranosids **20** mit Diiodpentanspacer **18**



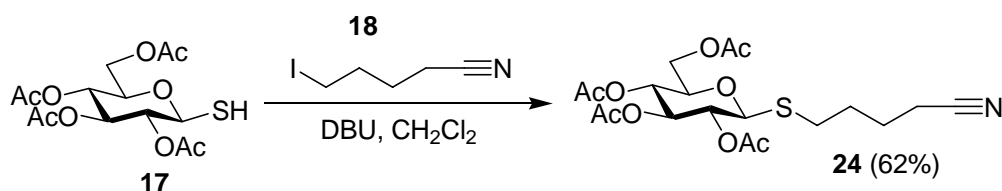
Um eine Disubstitution des 1,5-Diiodpentan **1** zu vermeiden, wurde 1,4-Diiodbutan **2** über eine Kolbe-Nitril-Synthese zu Verbindung **18** umgesetzt, dadurch wurde die Aminfunktion in Form eines Nitrils maskiert (**Schema 28**).

Schema 28: Darstellung des 5-Iodpentannitrilspacers **18**

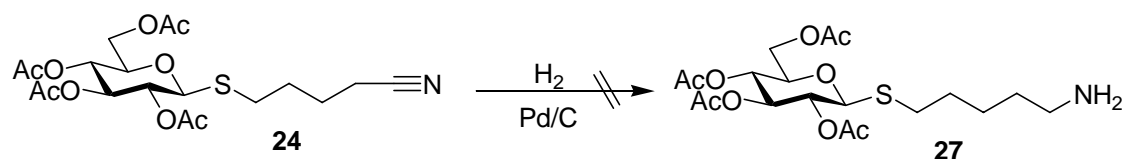


Zu Einführung des 5-Iod-1-nitrilpentan **18** in die 1-Thioglucopyranose **17** wurde Verbindung **17**, **18** in Methylchlorid vorgelegt und mit DBU als Base versetzt. Dabei zeigte sich, dass alleiniges Rühren bei Raumtemperatur nicht ausreicht und für den vollständigen Umsatz 24 h unter Sieden erhitzt werden musste. Danach konnte man in guten Ausbeuten (62%) der Verbindung **24** isolieren (**Schema 29**).

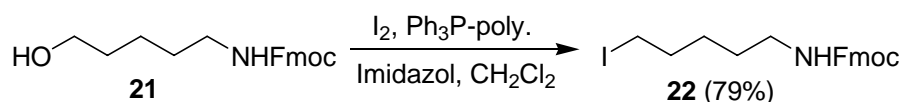
Schema 29: Darstellung des 1-Thiopentylglucopyranosids **24** mit 5-Iodpentannitril **18**



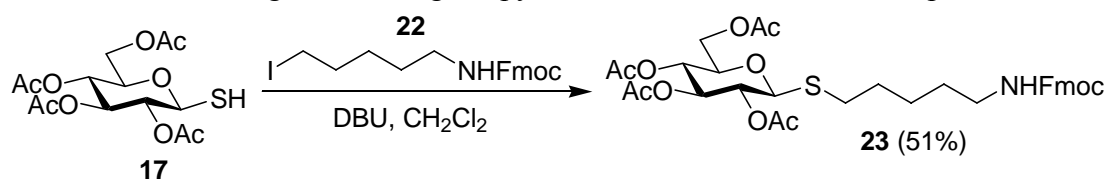
Leider zeigte sich, dass es nicht möglich war die Nitrilfunktion mit Wasserstoff und Paladiumkohle zum Amin zu reduzieren. Auf der Dünnschichtplatte waren nach 10 h nur Edukt und kein Produkt zu erkennen (**Schema 30**).

Schema 30: Reduktion der Nitrilfunktion des 1-Thiopentylglucopyranosids **24**

Da sich Iod sehr gut durch Schwefel substituieren ließ, wurde ein weiterer Spacer **22** hergestellt, der eine geschützte Aminfunktion und Iod als Abgangsgruppe enthielt. Dazu wurde von Fmoc-aminopentanol **21** ausgegangen und die Alkoholfunktion durch Iod ausgetauscht. Das gelang durch die Verwendung von polymergebundenem Triphenylphosphin^[142] mit Iod und Imidazol als Base (**Schema 31**). Dabei wurde Verbindung **22** in sehr guten Ausbeuten (79%) mit guter Reinheit des Rohprodukts erhalten. Die Verwendung von freiem Triphenylphosphin führte dagegen zu unreinem Produkt **22**, das sich nur schwer über Säulenchromatographie reinigen ließ.

Schema 31: Darstellung des 5-Amino-pentanioididspacers **22**

Die anschließende Umsetzung des Aminopentyljodidspacers **22** mit Verbindung **17**, gelang am besten in siedendem Dichlormethan und DBU als Base (**Schema 32**). Nach einer Reaktionszeit von 24 h konnte das Produkt **23** mit einer Ausbeute von 51% isoliert werden. Bei der Verwendung von DMF und Acetonitril als Lösungsmittel konnte kein Produkt **23** auf dem Dünnschichtchromatogramm detektiert werden. Ein Austausch von DBU gegen DIPEA als Base führte zu längeren Reaktionszeiten mit gleichen Ausbeuten (**Tabelle 4**).

Schema 32: Darstellung des 1-Thioglycopyranosids **23** mit 5-Fmoc-aminopentanioidid **22****Tabelle 4:** Glycosylierung mit 5-Fmoc-aminopentanioidid **22**

| Edukt | LM | Base | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|---------------------------------|-------|-------------|-----------|----------|
| 17 | DMF | DBU | 24 h; 44°C | kein | — |
| 17 | CH ₃ CN | DBU | 24 h; 44°C | kein | — |
| 17 | CH ₂ Cl ₂ | DIPEA | 24 h; 44°C | 23 | 50% |
| 17 | CH ₂ Cl ₂ | DBU | 24 h; 44°C | 23 | 51% |

Als weitere Darstellungsmethode wurde eine radikalische Addition der Mercaptogruppe^[143] der 1-Thioglucopyranose **17** an die Doppelbindung von 5-Brompenten durchgeführt (**Schema 33**). Dazu wurde Verbindung **17** und 5-Brompenten in Ethanol bzw. Acetonitril gelöst und mit einer Photolampe bei 254 nm bestrahlt. In keinem der Fälle konnte mittels Dünnschichtchromatogramm ein Umsatz der Edukte festgestellt werden. Um die Erzeugung von Radikalen am Schwefelatom sicher zu stellen, wurde zu den Lösungen AIBN zugegeben und auf 80°C erhitzt. Nach kurzen Reaktionszeiten von 15 bis 30 min konnten deutliche neue Spots auf der Dünnschichtplatte detektiert werden. Nach der Säulenchromatographie wurde das Produkt **25** in Ausbeuten von 12% bis 35% erhalten. Als weitere Variante wurde die 1-Thioglucopyranose **17** bei 120°C geschmolzen, dazu AIBN und anschließend 5-Brompenten zugegeben. Die Dünnschichtplatte zeigte nach bereits 5 min einen quantitativen Umsatz. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung wurde Verbindung **25** in sehr guten Ausbeuten (95%) erhalten und ermöglichte die Einführung des Pentylspacers in kurzer Zeit mit sehr guten Ausbeuten (**Tabelle 5**).

Schema 33: Darstellung des 1-Thiopentylglucopyranosids **25** über 5-Brompenten

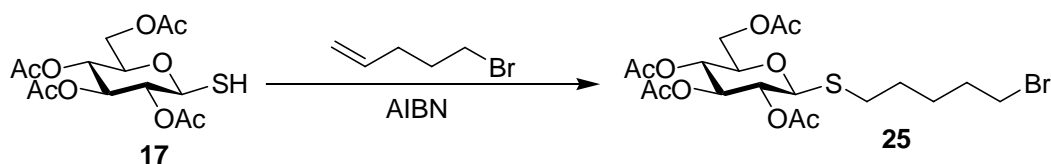


Tabelle 5: Radikalische Glycosilierung mit 5-Brompenten

| Edukt | LM | Initiator | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|--------------------|-----------|--------------|-----------|----------|
| 17 | EtOH | Fotolampe | 30 min; 80°C | kein | — |
| 17 | CH ₃ CN | Fotolampe | 2 h; 20°C | kein | — |
| 17 | EtOH | AIBN | 30 min; 80°C | 25 | 12% |
| 17 | CH ₃ CN | AIBN | 15 min; 80°C | 25 | 35% |
| 17 | Schmelze | AIBN | 5 min; 120°C | 25 | 95% |

Um später die Asparaginsäure **28** über eine Amidbindung mit dem Pentylspacer des 1-Thioglycosids **20** und **25** zu koppeln, wurde das Halogenid (I, Br) in Verbindung **20** und **25** gegen Azid nukleophil substituiert (**Schema 34**) und zum Amin reduziert (**Schema 35**). Hierzu wurden drei unterschiedliche Synthesemethoden untersucht. Bei der ersten Methode wurde Verbindung **25** mit Natriumazid in DMF^[144] bei 80°C gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 8 h konnte Verbindung **26** mit mittelmäßiger Ausbeute (53%) über Säulenchromatographie isoliert werden. Eine ähnliche Ausbeute (56%) ergab die Umsetzung mit Verbindung **20**. Als weitere Variante wurde als Lösungsmittel ein Gemisch von Aceton/Wasser^[145] im Verhältnis 1:1 gewählt, in dem sich die Edukte **20** und **25** und Natriumazid gut lösten und anders als mit DMF, die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt wurde. Dabei ergab der Iodidlinker gute Ausbeuten (79%) nach einer Reaktionszeit von 5 h. Beim Bromidlinker verlängerte sich die Reaktionszeit um 3 h und die Ausbeute (68%) war etwas schlechter. Als

dritte Synthesemethode wurde eine Phasentransferreaktion^[146] (PTC) mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS), Natriumhydrogencarbonat, Natriumazid und Verbindung **20**, **25** in einem Dichlormethan/Wassergemisch durchgeführt. Dabei waren die Reaktionszeiten mit 18 h deutlich länger als bei der Methode mit dem Aceton/Wassergemisch. Von Vorteil war dagegen die leichte Aufarbeitung des Dichlormethan/Wassergemisches, bei der das Produkt **26** in guter Reinheit erhalten wurde. Eine anschließende Reinigung über Säulenchromatographie ergab sehr gute Ausbeuten von 86% bis 89% an Verbindung **26** und lieferte somit die besten Ergebnisse.

Schema 34: Darstellung des 5-Azido-pentylthioglucoisids **26**

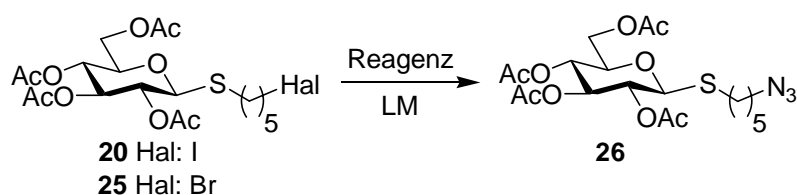
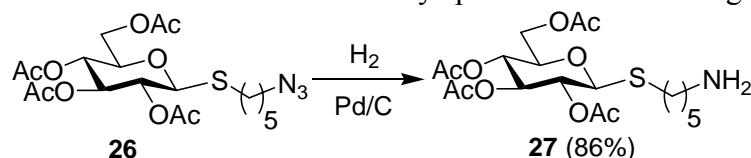


Tabelle 6: Einführung von Azid in den Pentylspacer von Verbindung **20** und **25**

| Edukt | LM | Reagenz | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|---|--|-------------|-----------|----------|
| 20 | DMF | NaN ₃ | 8 h; 80°C | 26 | 53% |
| 25 | DMF | NaN ₃ | 8 h; 80°C | 26 | 56% |
| 20 | Aceton/H ₂ O | NaN ₃ | 5 h; RT | 26 | 79% |
| 25 | Aceton/H ₂ O | NaN ₃ | 8 h; RT | 26 | 68% |
| 20 | CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O | NaN ₃ /TBAHS/ NaHCO ₃ | 18 h; RT | 26 | 86% |
| 25 | CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O | NaN ₃ /TBAHS/ NaHCO ₃ | 18 h; RT | 26 | 89% |

Um später die Asparaginsäure **28** mit dem Pentylspacer zu koppeln, wurde Verbindung **26** in Methanol gelöst und die Azidfunktion mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle zum Amin reduziert, so dass Verbindung **27** in sehr guten Ausbeuten (86%) erhalten wurde.

Schema 35: Reduktion der Azidfunktion am Pentylspacer von Verbindung **26**



Als letzte Darstellungsmethode zur Einführung des n-Pentylspacers wurde die 1-Thioglucoopyranose **17** unter Mitsunobu-Bedingungen^[147] mit dem Fmoc geschützten Aminoalkohol **21** zu Verbindung **23** umgesetzt (**Schema 36**). Dabei wurden verschiedene Mitsunobu-Reagenzien (**Tabelle 7**) verwendet, die sich in ihrer Reaktivität unterschieden. Allgemein lässt sich sagen, dass von Triphenylphosphin (Ph₃P) über Tributylphosphin (Bu₃P) nach Tri-

methylphosphin (Me_3P) die Reaktivität des Phosphors^[148] zunimmt und bei den Azoverbindungen von Diazodicarbonsäurediethylester (DEAD) über Diazodicarbonsäurediisopropylester nach Azodicarbonsäuredipiperidid^{[149],[150],[151]} (ADDP) der pK_b -Wert zunimmt und das Thiol besser deprotoniert^[152] wird. Deshalb wurden verschiedene Reagenzienkombinationen von Phosphin/Azoverbindung auf Ihre Anwendbarkeit untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass mit der klassischen Reagenzienkombination DEAD/ Ph_3P keine Reaktion auf der Dünnschichtplatte detektiert werden konnte und keine Umsetzung mit der 1-Thioglycose **17** stattfand. Bei der Verwendung von DEAD/ Bu_3P dagegen konnte Verbindung **23** detektiert und mit schlechten Ausbeuten (13%) isoliert werden. Das Ersetzen von Ph_3P durch Bu_3P zeigt somit eine deutliche Zunahme der Reaktivität, so dass im Folgenden nur noch Alkylphosphine eingesetzt wurden. Ein weiterer Vorteil der Alkylphosphine war, dass sie sich bei der wässrigen Aufarbeitung leicht entfernen ließen und bei der Säulenchromatographie keine störende Coelution^[153] stattfand. Eine weitere Steigerung der Ausbeute wurde mit dem Reagenziensystem DIAD/ Bu_3P (22%) und DIAD/ Me_3P (27%) erreicht. Die besten Ausbeuten ergaben sich mit ADDP/ Bu_3P (28%) und ADDP/ Me_3P (38%), wobei die Verwendung von Trimethylphosphin (Me_3P) am besten geeignet war, da bei der wässrigen Aufarbeitung Me_3P leicht zu entfernen war und die kürzeste Reaktionszeit (1,5 h) mit der besten Ausbeute (38%) hatte.

Schema 36: Darstellung des 1-Thioglucopyranosids **23** unter Mitsunobu-Bedingungen

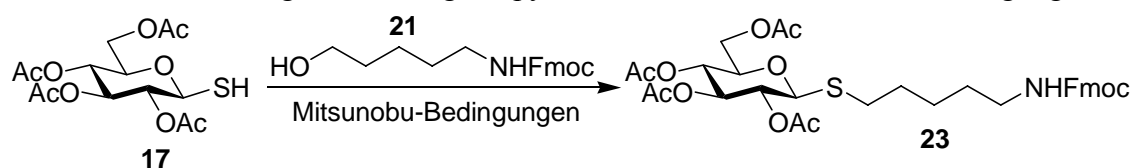


Tabelle 7: Umsetzung mit 5-Fmoc-aminopentanol **28** über Mitsunobureaktion

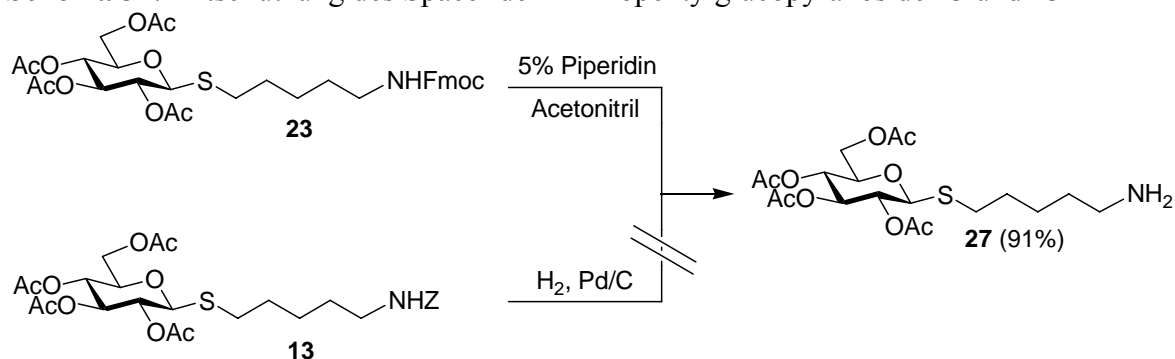
| Edukt | LM | Reagenzien | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|-----|-----------------------------|--|-----------|----------|
| 17 | THF | DEAD; Ph_3P | 2,5 h; RT | kein | — |
| 17 | THF | DEAD; Bu_3P | 2,5 h; RT | 23 | 13% |
| 17 | THF | DIAD; Bu_3P | 2,5 h; $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ | 23 | 22% |
| 17 | THF | DIAD; Me_3P | 2,5 h; $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ | 23 | 27% |
| 17 | THF | ADDP; Bu_3P | 2,5 h; $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ | 23 | 28% |
| 17 | THF | ADDP; Me_3P | 1,5 h; $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ | 23 | 38% |

Weiterer Vorteil bei der Verwendung des Reagenzsystem ADDP/ Me_3P ist, dass die Bildung des Azophosphoniumsalz leicht durch eine Entfärbung^[154] der Reaktionslösung detektiert werden kann, was die Voraussetzung für eine Aktivierung des Alkohols im Folgeschritt zum Oxaphosphoniumsalz^[155] ist. Zuletzt reagiert der nucleophile Schwefel mit dem Oxaphosphoniumsalz unter einer $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion^{[156],[157]} zum Thioether, wobei die treibende Kraft die Bildung der Phosphor-Sauerstoffbindung im Trimethylphosphinoxid ist. Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen kann eine große Zahl unterschiedlicher Schutzgruppen bei der

Synthese verwendet werden und die Aminoalkohole können direkt, ohne aufwendige Spacer-synthesen eingesetzt werden.

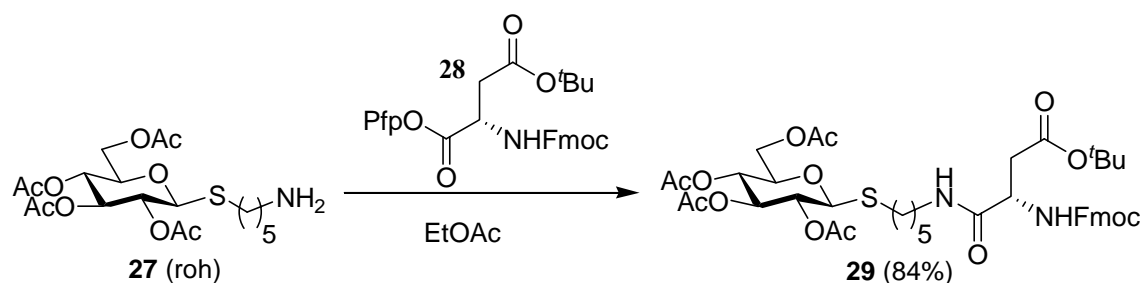
Um die hergestellten 1-Thiopentylglucopyranoside **13** und **23** mit der Asparaginsäure **28** zu verknüpfen, müssen die Aminoschutzgruppen am Pentylspacer entfernt werden. Dazu wurde Verbindung **23** mit 5% Piperidin in Acetonitril versetzt und man erhielt das freie Amin am Pentyllinker in sehr guten Ausbeuten (91%), ohne dass eine Abspaltung der Acetylgruppen am Zucker stattfand. Dagegen ließ sich die Benzyloxycarbonylgruppe von Verbindung **13** nicht hydrogenolytisch unter Zuhilfenahme von Palladium auf Aktivkohle abspalten, da der Schwefel im Spacer den Katalysator vergiftete. Weitere Versuche mit Wasserstoff/Lindlarkatalysator, BF₃-Etherat/Dimethylsulfid schlugen fehl, so dass es nicht möglich, war die Benzyloxycarbonylgruppe selektiv abzuspalten. Somit sollten nur Schutzgruppen bei Thioglycosiden verwendet werden, die unter mild basischen Bedingungen (Fmoc-Gruppe) oder sauren Bedingungen (Boc-Gruppe) abzuspalten sind.

Schema 37: Entschützung des Spacer der 1-Thiopentylglucopyranoside **13** und **23**



Die nun freie Aminfunktion konnte mit der mit Pentafluorphenol aktivierten Asparaginsäure^[112] **28** in guten Ausbeuten (84%) zum *S*-Glycopeptid-Baustein **29** unter Ausbildung einer Amidbindung umgesetzt werden.

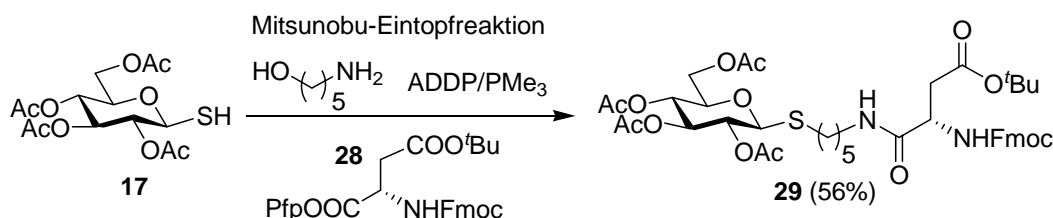
Schema 38: Darstellung des *S*-Glycopeptid-Bausteins **29** mit n-Pentylspacer



Da für die Synthese des *S*-Glycopeptid-Bausteins **29** in allen bisherigen Fällen mehrere Stufen notwendig waren, wurde eine neue Mitsunobu-Variante auf Ihre Anwendbarkeit untersucht. Dabei war die Idee, das 1-Thioglycopyranose **17** mit dem ungeschützten 5-Aminopentanol und der Asparaginsäure **28** in einer Eintopfreaktion unter Mitsunobu-

Bedingungen (ADDP/ PMe_3) zu Verbindung **29** umzusetzen. Dazu wurde zuerst aus PMe_3 und ADDP mit der 1-Thioglucopyranose **17** das Azaphosphoniumsalz gebildet und anschließend das ungeschützte 5-Aminopentanol zugegeben. Nach 20 min gab man direkt zu der Reaktionslösung die aktivierte Asparaginsäure **28**. Die Detektion über Dünnschichtchromatographie zeigte nach 3 h ein vollständiges Verschwinden von Edukt **17** an, mit der Bildung eines neuen UV-aktiven, verkohlbaren Flecks. Die Aufarbeitung und anschließende Säulenchromatographie ergab eine Ausbeute von 56% des gewünschten *S*-Glucoseptid-Bausteins **29**. Im Vergleich zu der dreistufigen Mitsunobu-Reaktion mit dem geschützten Fmoc-aminopentanol **21** ergab sich eine Gesamtausbeute von nur 27% von Verbindung **29**. Nur die vierstufige Synthese über die radikalische Addition der 1-Thioglucopyranose **17** an 5-Brompenten ergab eine annähernd gleiche Ausbeute von 57%. Somit war die neu entwickelte Mitsunobu-Eintopfreaktion die am besten geeignete Synthesemethode mit dem geringsten Zeitaufwand und einer guten Gesamtausbeute. Aus diesem Grund wurden weitere 1-Thioglucopyranosen (**Tabelle 7**) mit der Mitsunobu-Eintopfreaktion umgesetzt. Dabei erhielt man bei den Monosacchariden gute Ausbeuten (56%-42%), bis sehr gute Ausbeuten (56%-91%) bei den Disacchariden. Lediglich die Desoxyglycosid **39**, **40** lieferten Ausbeuten um die 20%. Die 1-Thioglucopyranosen **14**, **15**, **30-36** wurden analog der 1-Thioglucose **17** (**Schema 39**) über das Thiuroniumsalz der acetylierten Glycosylbromide in guten Ausbeuten (70%-90%) hergestellt.

Schema 39: Darstellung des *S*-Glucoseptid-Bausteins über Mitsunobu-Eintopfreaktion



Zum Schluss sind im **Schema 40** noch einmal die wichtigsten Reaktionswege zur Darstellung des *S*-Glucoseptid-Bausteins **29** als Übersicht zusammengefaßt.

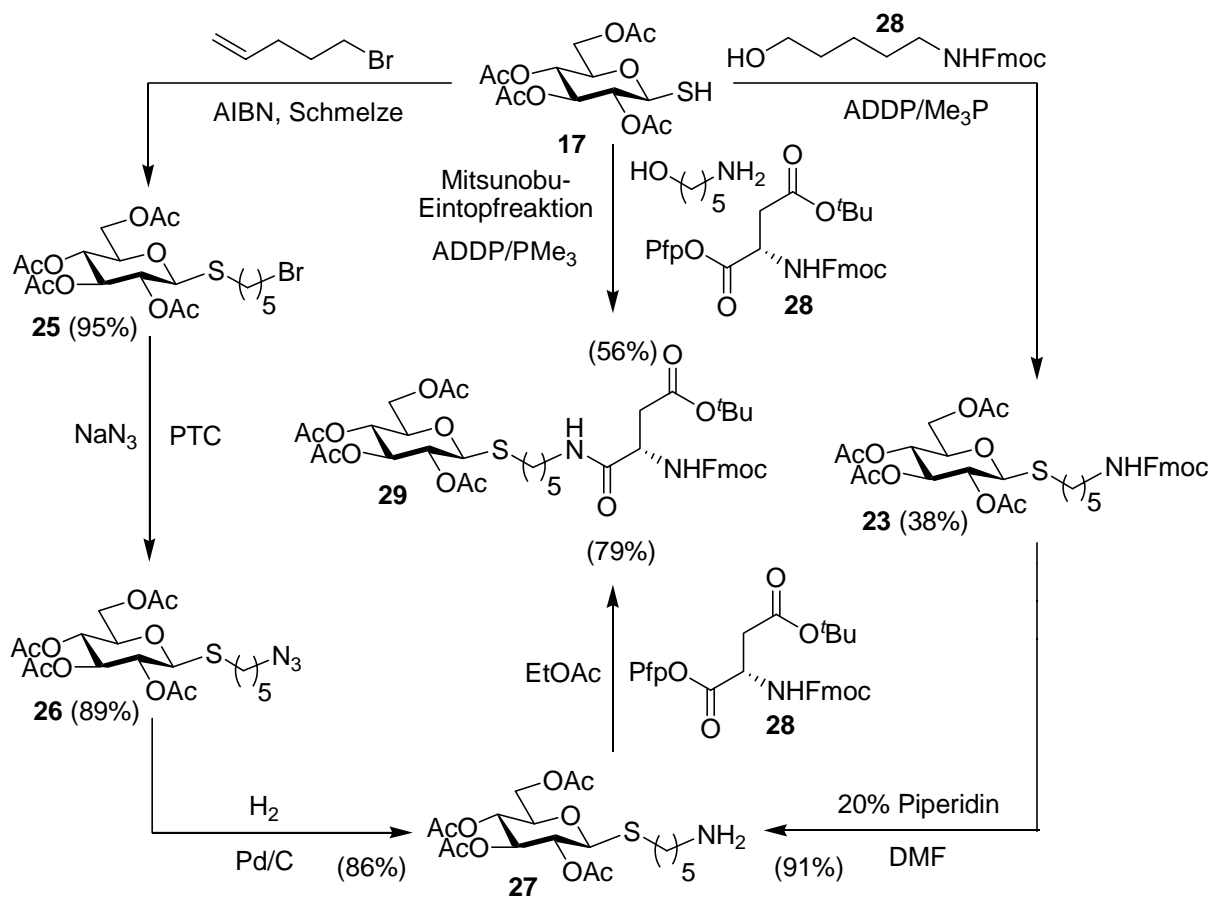
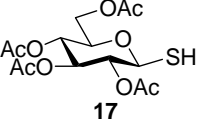
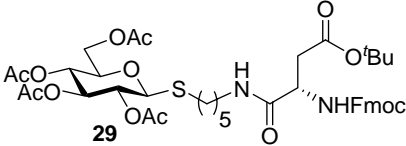
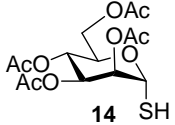
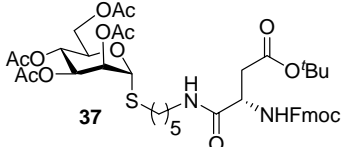
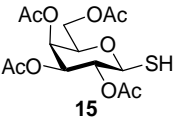
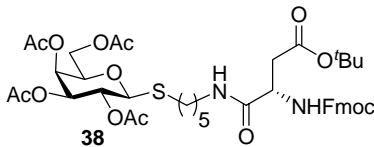
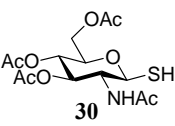
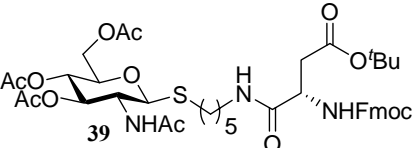
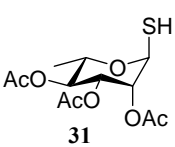
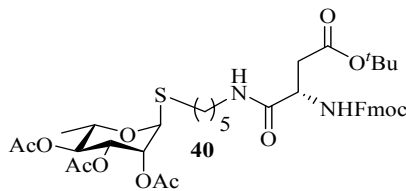
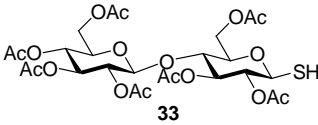
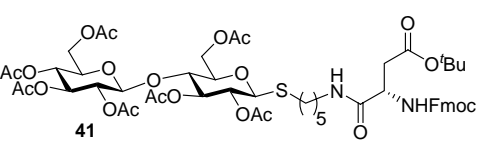
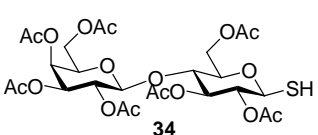
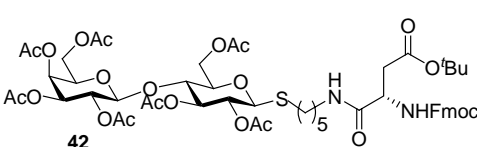
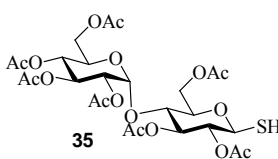
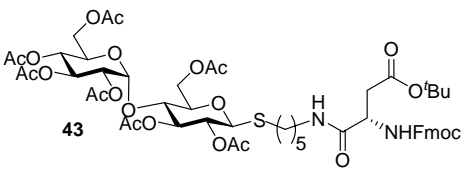
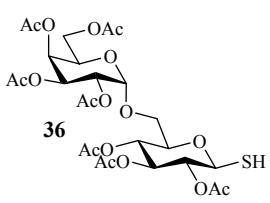
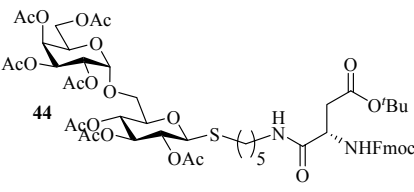
Schema 40: Darstellungsvarianten des S-Glycopeptid-Bausteins **29** mit n-Pentylspacer

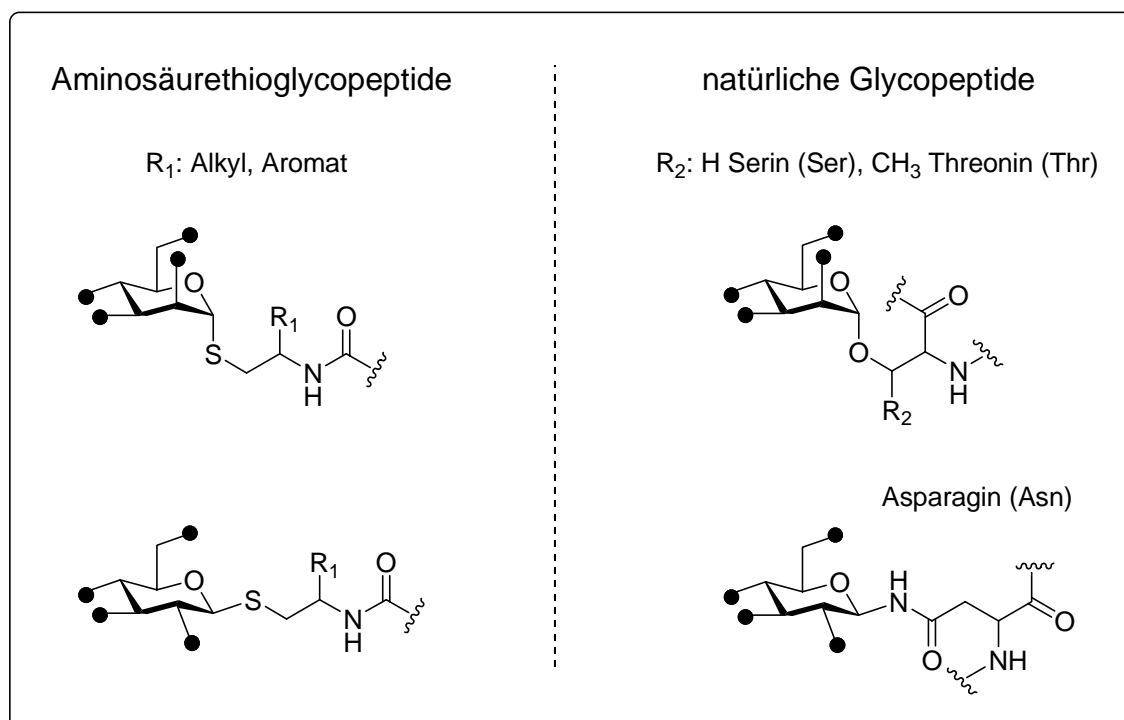
Tabelle 8: Ausbeuten der Mitsunobu-Eintopfreaktion mit n-Pentylspacer

| 1-Thioglycopyranosen (Edukt) | S-Glycopeptid-Bausteine (Produkt) | Ausbeute |
|---|--|----------|
|  17 |  29 | 56% |
|  14 |  37 | 42% |
|  15 |  38 | 45% |
|  30 |  39 | 22% |
|  31 |  40 | 20% |
|  33 |  41 | 91% |
|  34 |  42 | 89% |
|  35 |  43 | 61% |
|  36 |  44 | 56% |

6.1.2 Bausteine mit Aminosäure-Spacer

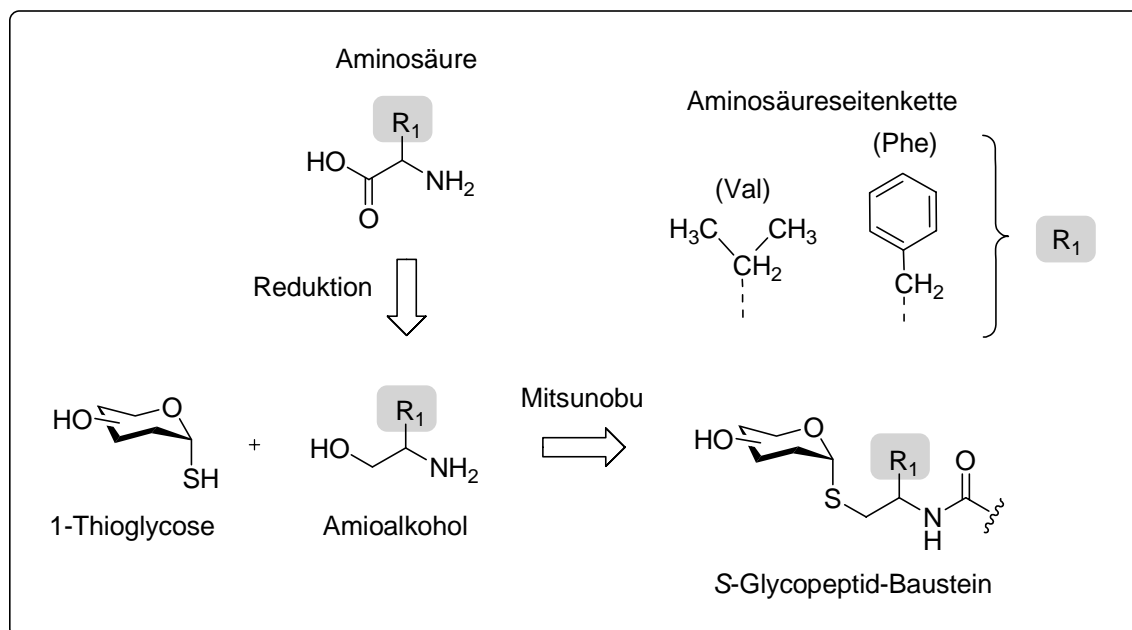
Die Verknüpfung zwischen Zucker und Peptid in den natürlich vorkommenden Glycopeptiden wird durch verschiedene Aminosäuren^[158] wie Serin, Threonin und Asparagin realisiert. Daneben sind weitere natürliche Aminosäuren^[159] (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro) vorwiegend mit alkyliischen Seitenketten und unnatürliche Aminosäuren^[67] (4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxylysin, Histidinoalanin) gefunden worden. Es ist anzunehmen, dass noch eine größere Anzahl von Aminosäuren an dieser Verknüpfung beteiligt sind. Aufgrund der geringen Mengen und des heterogenen Charakters der einzelnen Glycopeptide^[160] ist es schwierig, diese Funktion genauer zu untersuchen. Deshalb ist es in der Zukunft wichtig synthetische Glycopeptide mit genau definierter Struktur hinsichtlich dieser Fragestellungen eingehender zu untersuchen. Um diesen Überlegungen Rechnung zu tragen wurde versucht, eine Synthesestrategie mit einer möglichst großen Variationsvielfalt des Spacers zu entwickeln, um in späteren Untersuchungen auch den Einfluss des Spacers bei der molekularen Erkennung zu berücksichtigen. Im **Schema 41** ist ein direkter Vergleich der 1-Thioglycopeptide mit den natürlich vorkommenden Glycopeptiden veranschaulicht. Dabei kann der Rest R_1 am Spacer der Aminosäuren (Seitenkettenfunktion) beliebig variiert werden.

Schema 41: Vergleich Aminosäurethioglycopeptide mit den natürlichen Glycopeptiden

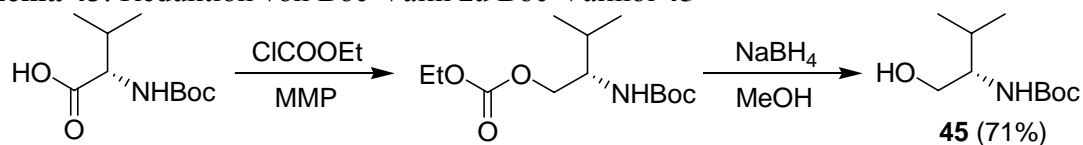


●— : Positionen weiterer Saccharidbausteine

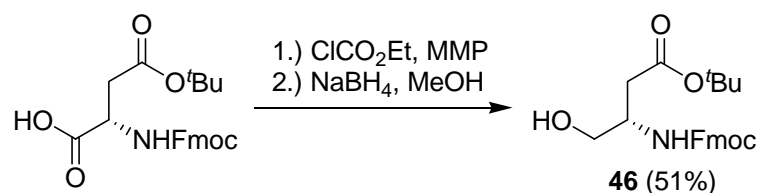
Um diese Variation bei den S-Glycopeptiden zu realisieren, eignete sich die zuvor verwendete Mitsunobu-Reaktion besonders gut, da man direkt Aminoalkohole einsetzen kann, die aus den Aminosäuren leicht zugänglich sind. Dadurch kann man auf einfache Weise eine große Variation des Linkers über die Aminosäureseitenketten realisieren (**Schema 42**).

Schema 42: S-Glycopeptide durch Variation über Aminosäurespacer mit Rest R₁

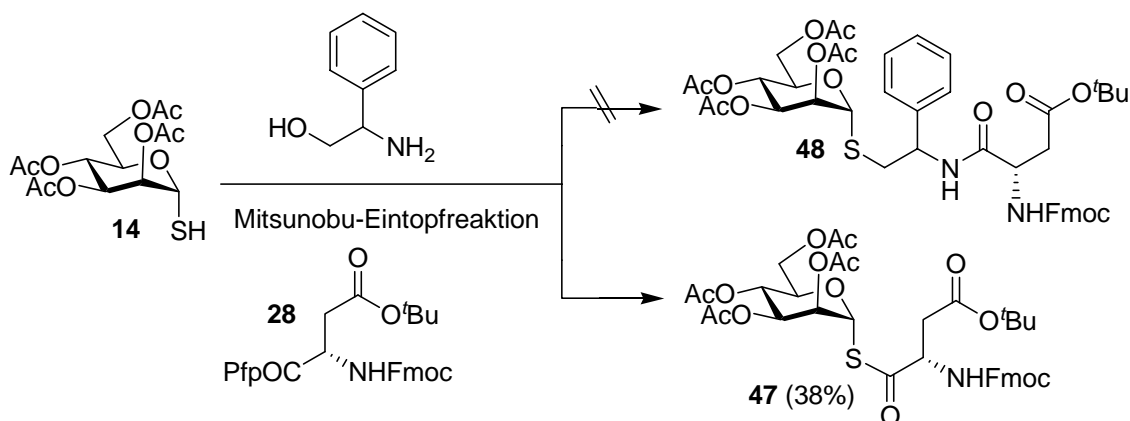
Für die Darstellung der gewünschten Aminoalkohole wurde die Carboxylfunktion der Aminosäure mit Chlorameisensäureethylester zum gemischten Anhydrid verestert, das sich anschließend mit NaBH₄ zum entsprechenden Aminoalkohol^[161] reduzieren ließ. Dabei wurde Boc-geschütztes Valin zum entsprechenden Boc-Valinol **45** in guten Ausbeuten (71%) reduziert (**Schema 43**).

Schema 43: Reduktion von Boc-Valin zu Boc-Valinol **45**

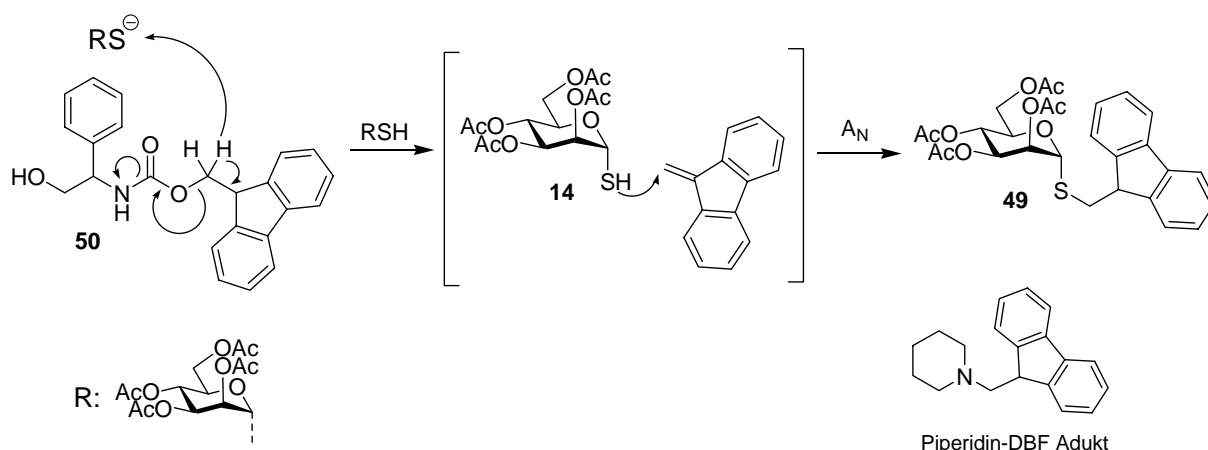
Desweiteren gelang es, aus der Asparaginsäure das geschützte Aspartol **46** in zufriedenstellender Ausbeute (51%) herzustellen. Die etwas schlechten Ausbeuten im Vergleich zum Valinol **45** erklären sich durch die teilweise Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe während der Reduktion, die bei der Detektion mittels Dünnschichtchromatographie deutlich zu erkennen war. Somit eignen sich Boc-geschützte Aminosäuren besser zur Darstellung der entsprechenden Aminoalkohole (**Schema 44**).

Schema 44: Reduktion der Asparaginsäure zum Aspartol **46**

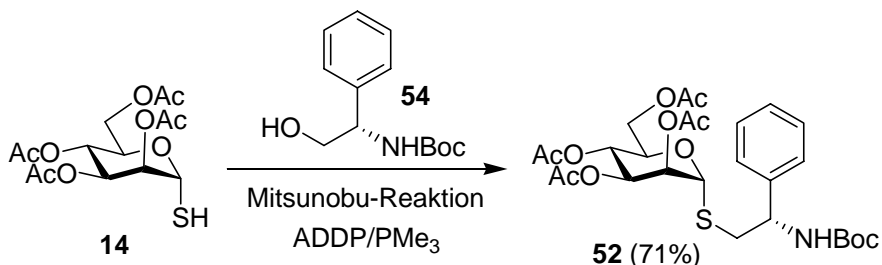
Viele der Aminoalkohole sind käuflich zu erwerben und müssen vor ihrer weiteren Verwendung an ihrer Aminofunktion Boc geschützt werden. Die zur Einführung der n-Pentylspacer verwendete Mitsunobu-Eintopfreaktion mit ungeschützten Phenylglycinol führte zu schlechten Ausbeuten und hauptsächlich der Thioester **47** wurde isoliert (**Schema 45**).

Schema 45: Mitsunobu-Eintopfreaktion mit Phenylglycinol

Um die Bildung des Nebenprodukts **47** zu vermeiden, wurden die Reaktionszeiten nach Zugabe von Phenylglycinol von 20 min auf 3 h verlängert bevor die Asparaginsäure **28** zugegeben wurde. Dabei bildete sich wieder ausschließlich Nebenprodukt **47**, womit die Verwendung der Eintopfvariante in diesem Fall nicht anwendbar war. Deshalb wurde die Aminfunktion von Phenylglycinol geschützt und die Mitsunobu-Reaktion wiederholt. Bei der Verwendung des Fmoc-geschützten^[162] Phenylglycinol **50** zeigte das Dünnschichtchromatogramm einen quantitativen Umsatz. Nach der Reinigung mittels Säulenchromatographie erhielt man aber nur das Fluorenylmannosid **49** als Hauptprodukt, das gewünschte Produkt **48** konnte nicht isoliert werden. Erklären ließ sich die Bildung von **49** über eine nucleophile Addition der SH-Gruppe der 1-Thiomannose **14** an das Dibenzofulven (DBF), die durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe über das Thiolat freigesetzt wurde^[163]. Dieser Mechanismus tritt auch bei der Abspaltung mit Piperidin auf, bei der sich ein analoges Piperidin-DBF Addukt bildet, das seit langem zur UV-Spektroskopischen Quantifizierung verwendet wird^[164] (**Schema 46**).

Schema 46: Bildung des Fluorenylmannosids **49** bei Fmoc-Abspaltung

Wodurch die Abspaltung der Fmoc-Gruppe verursacht wurde, konnte nicht sicher erklärt werden. Um die Bildung des Nebenprodukts **49** zu verhindern, wurde die Aminfunktion von Phenylglycinol mit einer Boc-Schutzgruppe^[165] verestert, die gegen nukleophilen Angriff sehr stabil ist und sich im Säuren mit TFA leicht abspalten lässt. Nach Durchführung der Mitsunobu-Reaktion mit ADDP/PMe₃ und dem Boc-geschützten Phenylglycinol **54** konnte Verbindung **52** in guter Ausbeute (71%) isoliert werden. Das Dünnschichtchromatogramm zeigte dabei eine Spot to Spot Reaktion.

Schema 47: Mitsunobu-Reaktion mit Boc-Phenylglycinol **54**

Für die weitere Umsetzung des S-Glycopeptid-Bausteins **48** wurde die Boc-Schutzgruppe mit TFA abgespalten und die Aminofunktion des Phenylglycinspacers am Thioglycosid **53** freigesetzt. Für die darauffolgende Kupplung mit der Asparaginsäure wurden verschiedene Aktivierungsreagenzien auf ihre Anwendbarkeit untersucht und das Thioglycosid **53** mit der freien Aminofunktion ohne Reinigung weiter umgesetzt (**Schema 48**). Die Peptid-Kupplungsreagenzien HOBT/DCC und HODhbt/DCC zeigten die besten Ergebnisse mit sehr guten Ausbeuten (90%) von Verbindung **48**, wobei das Produkt mit HODhbt/DCC nach der säulenchromatographischen Reinigung noch eine leicht gelbliche Farbe hatte. Bei der Verwendung von HATU und HBTU waren die Ausbeuten (68%) deutlich schlechter. Zusätzlich zu den in situ Aktivierungen wurde die pentafluorphenolaktivierte Asparaginsäure **28** mit Verbindung **53** umgesetzt. Dabei waren die Reaktionszeiten mit 5 h deutlich länger und die Ausbeuten (78%) schlechter als bei HOBT/DCC und HODhbt/DCC (**Tabelle 10**). Somit wa-

ren die Peptid-Kupplungsreagenzien HOBt/DCC und HODhbt/DCC zur Darstellung des *S*-Glycopeptid-Bausteins **48** am Besten geeignet.

Schema 48: Kupplung des Aminophenylglycin-1-thioglycosids **53** mit Asparaginsäure

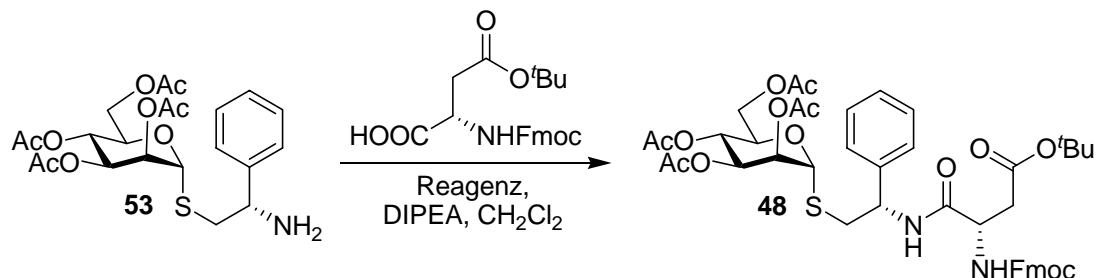
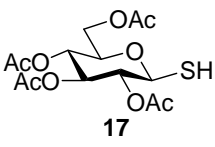
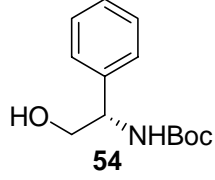
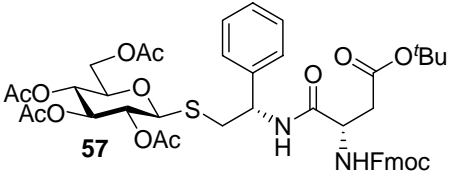
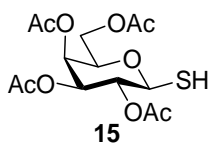
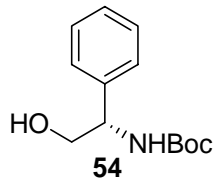
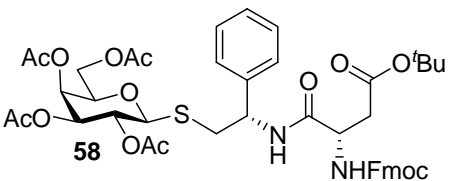
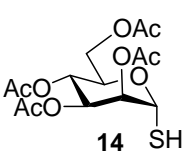
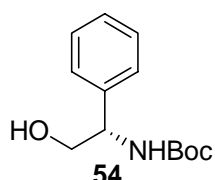
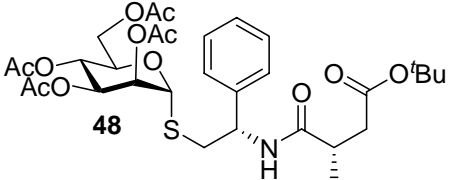
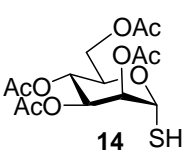
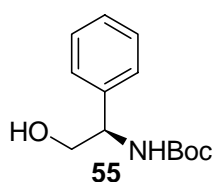
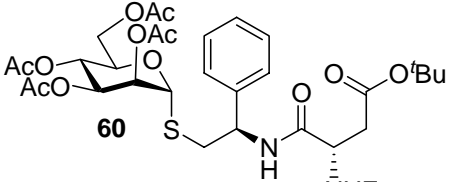
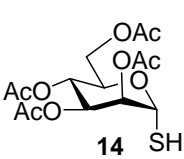
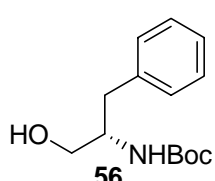
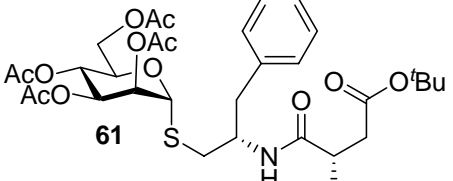
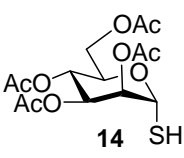
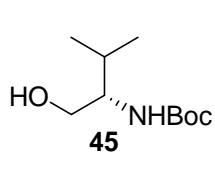
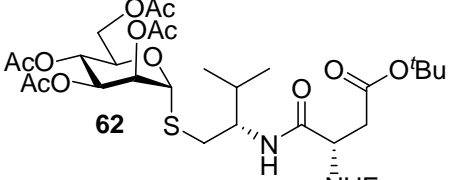
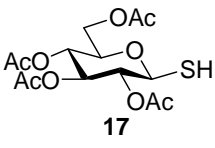
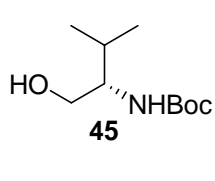
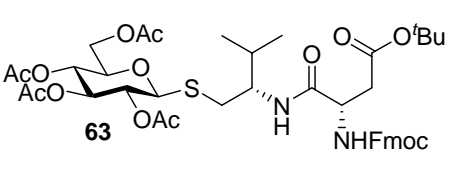
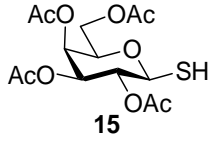
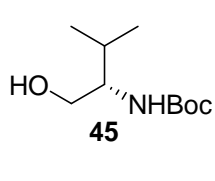
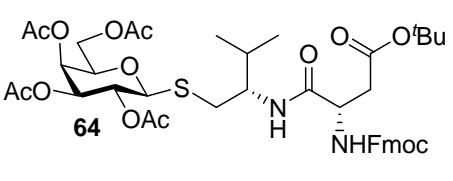


Tabelle 10: Kupplungsbedingungen des Phenylglycinthioglycosids **53**

| Edukt | LM | Reagez | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|---------------------------------|------------|----------------|-----------|----------|
| 53 | CH ₂ Cl ₂ | HBTU | 45 min; 0°C→RT | 48 | 68% |
| 53 | CH ₂ Cl ₂ | HATU | 45 min; 0°C→RT | 48 | 67% |
| 53 | CH ₂ Cl ₂ | HODhbt/DCC | 45 min; 0°C→RT | 48 | 90% |
| 53 | CH ₂ Cl ₂ | HOBt/DCC | 45 min; 0°C→RT | 48 | 89% |

Die untersuchten Reaktionsbedingungen der zweistufigen Synthese konnten auf weitere Boc-geschützt Aminoalkohole problemlos übertragen werden, so dass eine große Zahl an unterschiedlichen Aminoalkoholen für die Darstellung der *S*-Glycopeptid-Bausteine verwendet werden kann. Die Anwendbarkeit der Synthese wurde an weiteren Beispielen durchgeführt, die in **Tabelle 11** zusammengefasst sind.

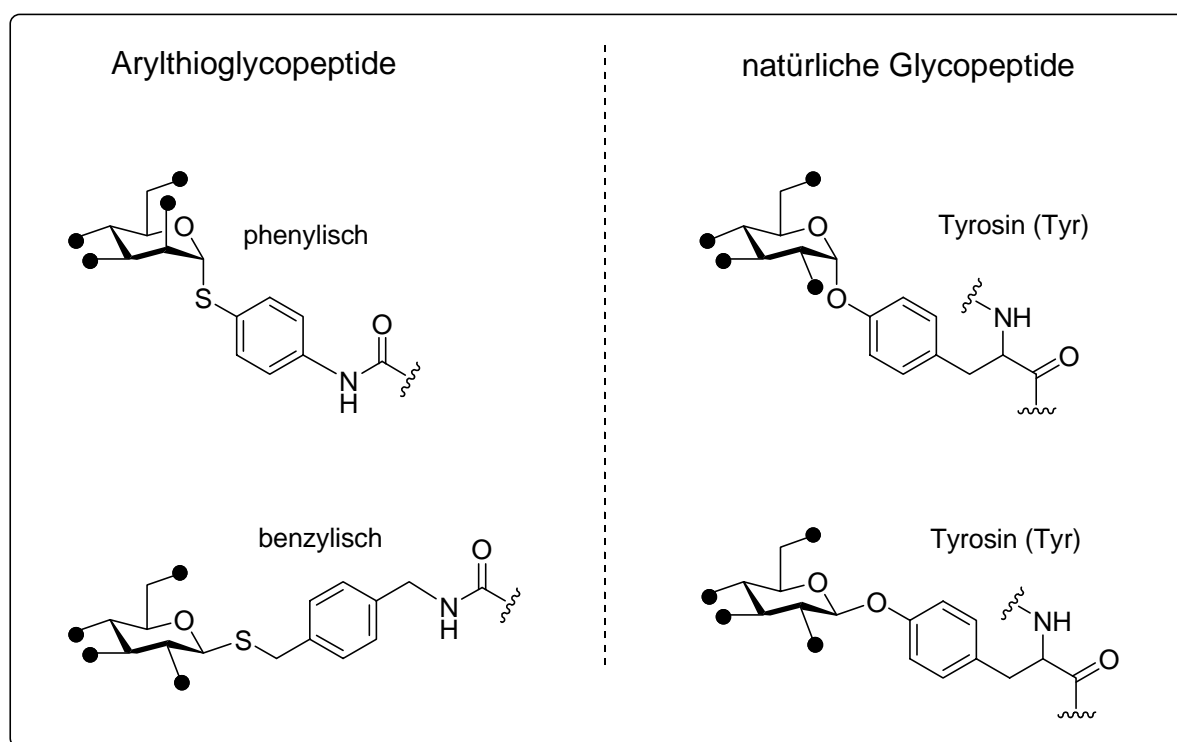
Tabelle 11: Ausbeuten der S-Glycopeptid-Bausteine mit Aminosäurespacer

| 1-Thioglycopyranosen (Edukt) | Boc-aminoalkohol (Edukt) | S-Glycopeptidbausteine (Produkt) | Ausbeute |
|---|---|--|----------|
|  17 |  54 |  57 | 64% |
|  15 |  54 |  58 | 69% |
|  14 |  54 |  48 | 67% |
|  14 |  55 |  60 | 48% |
|  14 |  56 |  61 | 45% |
|  14 |  45 |  62 | 73% |
|  17 |  45 |  63 | 75% |
|  15 |  45 |  64 | 72% |

6.1.3 Bausteine mit Aromat-Spacer

In der Natur kommen neben Glycopeptiden mit aliphatischen Aminosäuren auch aromatisch verknüpfte Glycoside mit Thyrosin vor. Zum Beispiel wurde herausgefunden, dass Tyr(β -D-Glc) in Insekten als Thyrosin-Speicher dient^{[166],[167]}. Das Antibiotikum Vancomycin und die verwandten Ristocetine enthalten β -Glc und β -Man, die über einen phenolischen Sauerstoff verknüpft sind^[168]. In den Eubakterien^{[169],[170]} *Clostridium thermohydrolyticum* dient 4-Hydroxyphenylglycin als Verbindung zu Zelloberflächenproteinen. Die Biosynthese von Glycogen im Muskelgewebe wird durch Glycogenin^{[171],[172],[173]} initiiert, einem Glycoprotein, bei dem Tyrosin als Tyr(α -D-Glc) maßgeblich beteiligt ist. Im Unterschied zu den aliphatischen Aminosäuren, die hauptsächlich durch ihre hydrophoben Wechselwirkungen die Konformation eines Glycoproteins beeinflussen, können die aromatischen Aminosäuren zusätzlich π - π Wechselwirkungen mit anderen Aromaten ausbilden.

Schema 49: Vergleich Arylthioglycopeptide mit den natürlichen Glycopeptiden



● : Positionen weiterer Saccharidbausteine

Um diesen Strukturtyp bei den S-Glycopeptid-Bausteinen zu berücksichtigen wurde versucht einen phenylischen p-Nitrothiophenol-Spacer an das anomere Zentrum von Mannose **65**, **66** zu glycosylieren (**Schema 50**). Dazu wurden verschiedene Reaktionsbedingungen untersucht (**Tabelle 12**). Zuerst wurde versucht, über eine Phasentransferreaktion mit Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) das Bromid von Acetobrommannose **66** gegen die SH-Gruppe von p-Nitrothiophenol nucleophil auszutauschen. Bei der Verwendung des klassischen Dichlormethan/Wassergemisches war nach 24 h kein Umsatz auf dem Dünnschichtchroma-

togramm zu erkennen. Erst als Dichlormethan gegen Ethylacetat ausgetauscht wurde, war ein deutlicher Umsatz auf der Dünnschichtplatte zu erkennen. Nach der Säulenchromatographie konnte das Phenylthioglycopeptid **67** mit mäßiger Ausbeute (41%) isoliert werden. Deshalb wurde versucht, den p-Nitrothiophenolspacer direkt in die peracetylierte Mannose **65** mit Lewisäure als Promotor einzuführen^[174]. Mit BF₃-Etherat war die Ausbeute (55%) schlechter als die Ausbeute mit SnCl₄ (71%), bei dem das Edukt **65** vollständig innerhalb von 6 h zum Phenylthioglycopeptid **67** abreagierte und somit das beste Ergebnis lieferte.

Schema 50: Darstellung des Phenylthioglycopeptids **67** über p-Nitrothiophenol

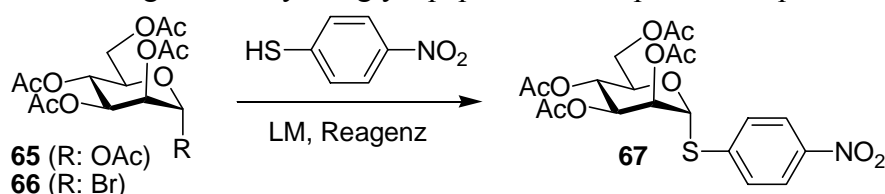


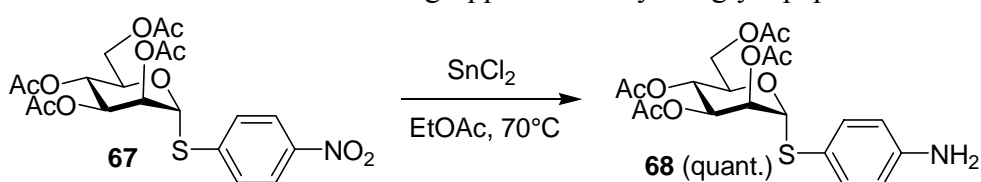
Tabelle 12: Reaktionsbedingungen bei der Darstellung des Phenylthioglycopeptids **67**

| Edukt | LM | Reagenz | Zeit; Temp. | Produkt | Ausbeute |
|-----------|---|---------------------------------------|-------------|-----------|----------|
| 66 | CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O | TBAHS/NaOH | 24 h; RT | kein* | — |
| 66 | EtOAc/H ₂ O | TBAHS/Na ₂ CO ₃ | 2 h; RT | 67 | 41% |
| 65 | CH ₂ Cl ₂ | BF ₃ -Etherat | 6 h; 0°C→RT | 67 | 55% |
| 65 | CH ₂ Cl ₂ | SnCl ₄ | 6 h; 0°C→RT | 67 | 71% |

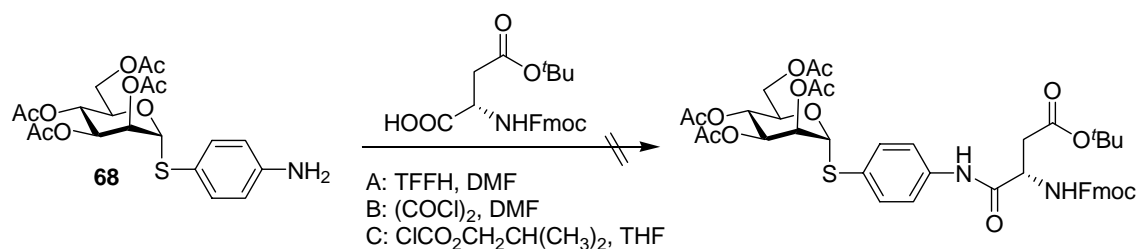
* (kein Umsatz auf DC)

Für die Kupplung mit der Asparaginsäure zum Thioglycopeptidbaustein, musste die Nitrogruppe zur Aminfunktion reduziert werden. Das gelang, indem man Verbindung **67** und SnCl₂^[175] in Ethylacetat löste und bei 70°C 4 h rührte, danach war laut Dünnschichtchromatogramm alles zu Verbindung **68** umgesetzt.

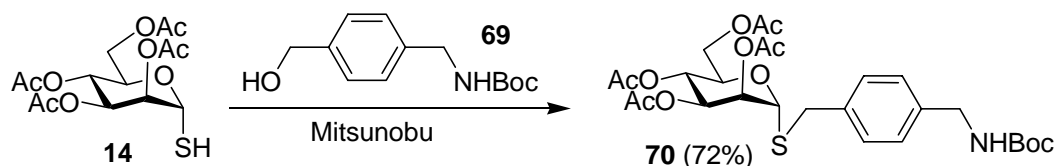
Schema 51: Reduktion der Nitrogruppe des Phenylthioglycopeptids **67**



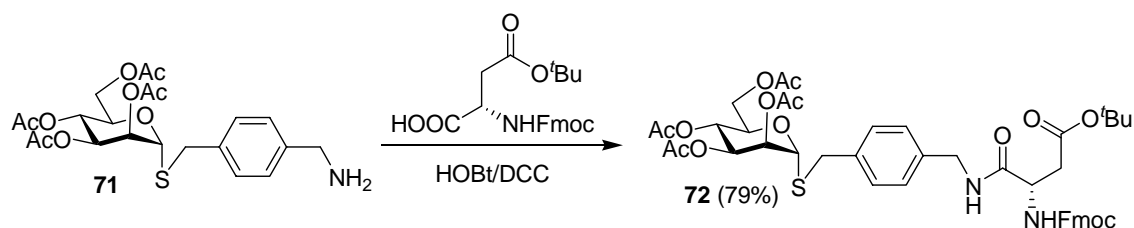
Die anschließende Kupplung mit der Asparaginsäure bereitete größere Schwierigkeiten, da das aromatische Amin für eine Peptidkupplung zu wenig nucleophil war. Die bisherigen Standardkupplungen mit DCC und der pentafluorphenolaktivierten Asparaginsäure **28** führten zu keinem Umsatz, deshalb wurden weitere Aktivierungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit untersucht. Dabei bildete sich bei keiner der eingesetzten Aktivierungsreagenzien (A: TFFH, B: Oxalylchlorid, C: Isobutylchlorformiat) das gewünschte Produkt, obwohl die Literatur^{[176],[177]} diese für schwierige Peptidkupplungen vorschlägt (**Schema 52**).

Schema 52: Kupplungsversuche des Phenylaminothioglycosids **68** mit Asparaginsäure

Das gleiche Reaktivitätsproblem wurde in unserer Arbeitsgruppe an einem anderen Beispiel untersucht und führte zu ähnlichen Ergebnissen. Dort wurde ein neuer benzylischer Spacer hergestellt, der für meine Arbeit zur Verfügung gestellt wurde^[178]. Dabei handelte es sich um einen aromatischen Aminoalkohol **69**, bei dem die Aminofunktion Boc-geschützt wurde. Der Spacer ließ sich in guten Ausbeuten (72%) mit den zuvor verwendeten Mitsunobu-Bedingungen (ADDP/PMe₃) in die 1-Thioglycose **14** einführen (**Schema 53**).

Schema 53: Einführen des benzylischen Spacers **69** in die 1-Thioglycose **14**

Nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit TFA ließ sich das benzylische Amin **71** problemlos mit der Asparaginsäure und HOBt/DCC zum Zielmolekül **72** verknüpfen (Gesamtausbeute 57%, **Schema 54**).

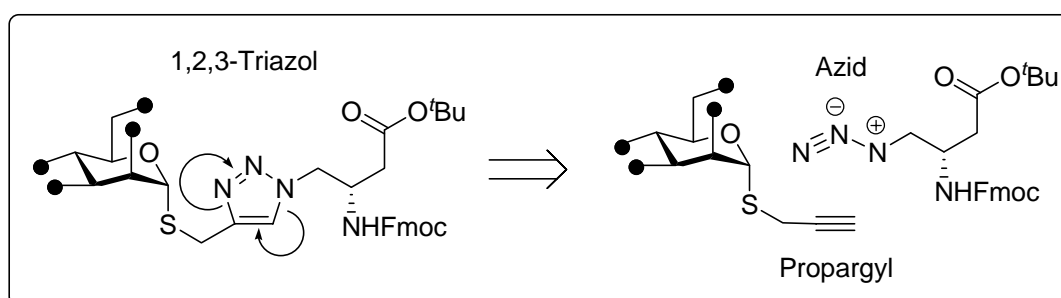
Schema 54: Darstellung des S-Glycopeptid-Bausteins **72** mit aromatischem Spacer

Das Beispiel verdeutlicht nochmals die breite Anwendbarkeit der Mitsunobu-Reaktion zum Einführen der Aminoalkohole als Spacer zwischen 1-Thioglycosen und einer Aminosäure wie Asparaginsäure.

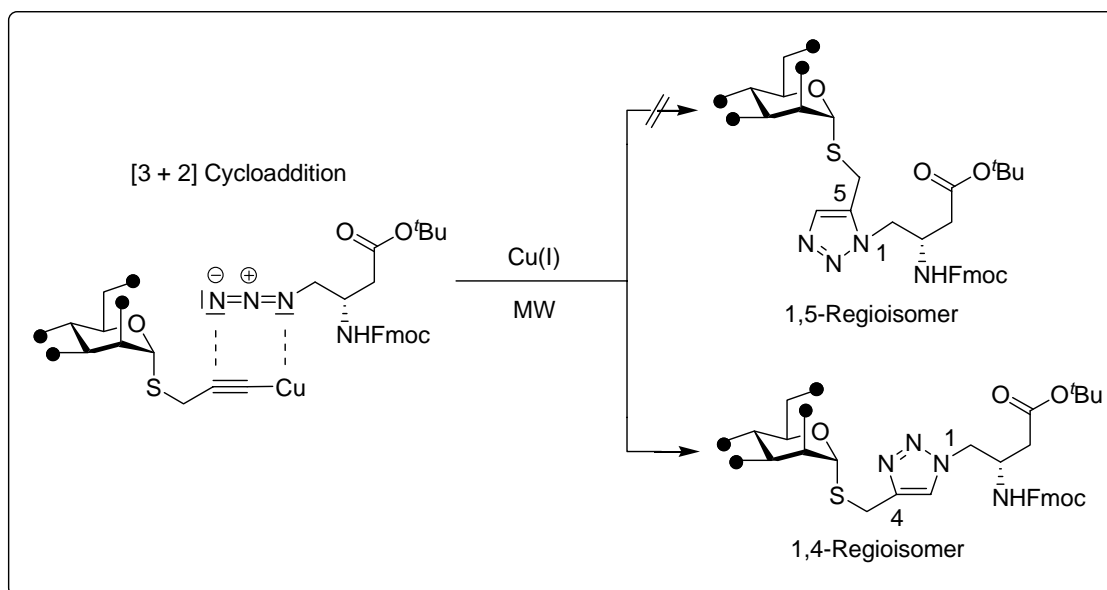
6.1.4 Bausteine mit 1,2,3-Triazol-Spacer

Fünfring-*N*-Heterocyclen sind in der Natur weit verbreitet und haben in Form von Pyrrol, Pyrazol, Imidazol und Triazol in vielen Naturstoffen wichtige biologische Funktionen. In der Aminosäure Histidin spielt Imidazol in den aktiven Zentren von Enzymen eine wichtige Rolle als Protonenüberträger. Enthält der Heterocyclenring mehr als zwei Stickstoffatome im Ring, so kommt es zu freien Elektronenpaaren, die nicht in das aromatische Ringsystem eingegliedert sind und als Protonendonator und -akzeptor wirken können. Triazole besitzen in Holzschutzmitteln (z.B. Tebuconazol) fungizide^[179] und antibakterielle^[180] Eigenschaften. In der Literatur findet man Beispiele, bei denen sie anti-HIV Aktivität^{[181],[182],[183]} besitzen und als Antagonisten von β_3 -Adrenalinrezeptoren^[184] dienen. Aufgrund dieser interessanten pharmakologischen Eigenschaften wurde versucht, ein 1,2,3-Triazol als Spacer zwischen Zucker und Asparaginsäure aufzubauen. Dazu musste der 1-Thiozucker propargyliert und die Säurefunktion der Asparaginsäure gegen eine Azidfunktion ausgetauscht werden (**Schema 55**).

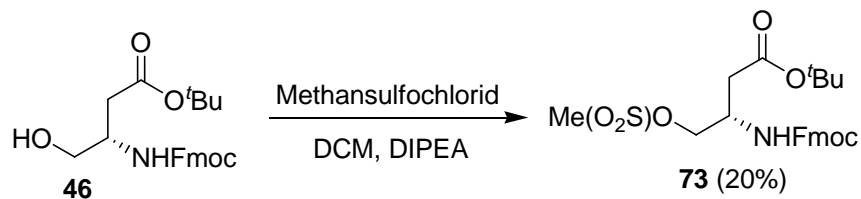
Schema 55: Retrosynthese eines Triazolglycopeptidbausteins



Aus der Literatur^{[185],[186],[187],[188]} ist bekannt, dass Azide mit Alkinen in einer 1,3-dipolaren [3+2] Cycloaddition zu 1,2,3-Triazolen reagieren. Azide sind gute Dipolarophile und sind bei den gebräuchlichen Reaktionsbedingungen^[189] (H_2O , O_2) stabil. Nachteilig wirkt sich bei diesem Reaktionstyp die geringe Regioselektivität, die hohen Reaktionstemperaturen (Toluol bei 80°C) und die langen Reaktionszeiten (>10 h) aus. Seit dem wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, um das Regioisomerenverhältnis^{[190],[191],[192]} zwischen 1,4 und 1,5 Triazolen zu verbessern (**Schema 56**). Dabei zeigte sich, dass mit Cu(I) Salzen^[193] ausschließlich das 1,4-Regioisomer entsteht und durch Einsatz von Mikrowellenstrahlung die Reaktionszeiten auf unter 1 h sinken^[194].

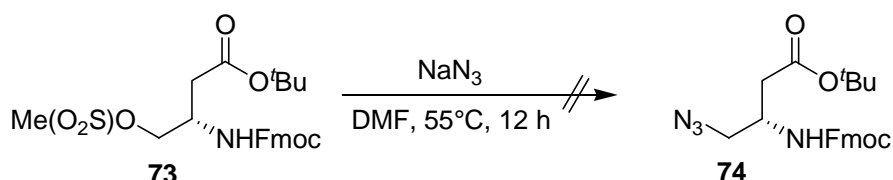
Schema 56: Darstellung von 1,4 verknüpften 1,2,3-Triazolen über Cu(I) Katalyse

Damit wird die Darstellung der 1,2,3-Triazole Spacer zu einer sehr effizienten Methode, die eine spezifische Verknüpfung zwischen Zucker und Rückgrataminosäure als letzten Syntheseschritt von großen Bausteinen ermöglicht^[195], bei dem nicht wie bisher ein stufenweiser Aufbau der *S*-Glycopeptid-Bausteine nötig ist. Um nun die Thioglycopeptidbausteine mit dem Triazolspacer herzustellen, musste die OH-Gruppe von Aspartol **46** gegen Azid ausgetauscht werden. Dazu wurden verschiedene Reaktionen auf ihre Anwendbarkeit untersucht. Im ersten Schritt sollte aus der Alkoholfunktion von **46** eine gute Abgangsgruppe hergestellt werden, die im nächsten Schritt durch das Azid nucleophil substituiert wird. Dazu wurde versucht die OH-Gruppe mit *p*-Toluolsulfonsäure zu verestern. Wegen der Fmoc-Schutzgruppe im Aspartol **46**, wurde die Base DIPEA zum abfangen der HCl verwendet. Nach 24 h Reaktionszeit konnte kein Umsatz auf dem Dünnschichtchromatogramm zum Tosylat erkannt werden. Als Ursache für die schlechte Reaktivität wurden sterische Hinderungen zwischen dem Aromaten des Tosylchlorid und den Schutzgruppen der Asparaginsäure angenommen. Deshalb wurde die Reaktion mit dem sterisch weniger anspruchsvollen Methansulfochlorid^[196] wiederholt und es konnte Verbindung **73** mit geringer Ausbeute (20%) isoliert werden (Schema 57).

Schema 57: Einführen von Mesylat als Abgangsgruppe am Aspartol **46**

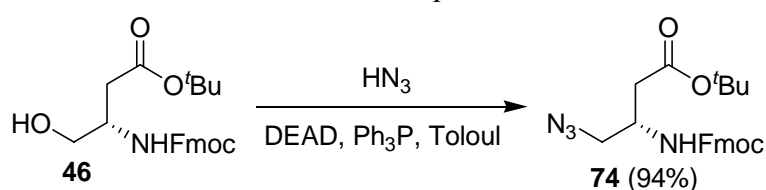
Anschließend wurde Verbindung **73** mit NaN_3 in DMF gelöst und für 12 h bei 55°C erhitzt. Danach konnte die Zielverbindung **74** über Säulenchromatographie nicht isoliert werden (**Schema 58**).

Schema 58: Substitution der Methansulfongruppe von Verbindung **73**



Da die Substitution des Sulfonsäurederivats mit NaN_3 nicht erfolgreich war, wurde versucht, über eine andere Methode das Azid einzuführen. Dazu verwies die Literatur auf eine Mitsunobu-Variante^[193], bei der die OH-Gruppe von Aminoalkoholen mit Stickstoffwasserstoffsäure direkt in das Azid überführt wird. Um die Reaktion durchzuführen musste kurz vor der Mitsunobu-Reaktion eine 4-10%ige HN_3 -Lösung^{[197],[198]} in Toluol hergestellt werden. Dabei ist strengstens zu beachten, dass Stickstoffwasserstoffsäure sehr giftig^[199] ist und in reiner Form hochexplosiv^[200] gegen Stoß reagiert. Deshalb müssen vor der Reaktion Sicherheitsvorkehrungen^[201] getroffen werden und es sollten keine großen Mengen an HN_3 -Lösung hergestellt oder eingelagert werden. Bei richtiger Handhabung unter Beachtung der Sicherheitsvorkehrungen ist die 4-10%ige HN_3 -Lösung in Toluol gut handhabbar. Um die Mitsunobu-Reaktion durchzuführen wurden die HN_3 -Lösung, Ph_3P und das Aspartol **46** in Toluol gelöst und DEAD zur Lösung injiziert. Dabei entfärbte sich die orangene Reaktionslösung, und nach 1 h konnte Verbindung **74** in sehr guten Ausbeuten (94%) über Säulenchromatographie isoliert werden (**Schema 59**).

Schema 59: Einführen der Azidfunktion in das Aspartol **46**



Als nächstes wurden die Reaktionsbedingungen zur Einführung des Propargylrests in die 1-Thioglucopyranose **14** untersucht (**Schema 60**). Dazu wurde Verbindung **14** mit Propargylbromid in verschiedenen Lösemitteln (DCM, Toluol, DMF) und mit zwei unterschiedlichen Basen (DIPEA, DBU) umgesetzt. Die Auswahl der besten Kombination Lösungsmittel/Base konnte über das Dünnschichtchromatogramm getroffen werden. Dabei war nur mit DCM/DIPEA ein vollständiger Umsatz zu einem Spot (45 min) zuerkennen. Nach chromatographischer Reinigung konnte Verbindung **76** in sehr guten Ausbeuten (79%) isoliert werden. Es zeigte sich, daß die Methode auch allgemein auf die anderen Thioglycosen anwendbar ist (**Tabelle 13**).

Schema 60: Propargylierung der 1-Thiomannopyranose **14****Tabelle 13:** Ausbeuten der propargylierten 1-Thiomannosen

| Edukt | LM | Base | Zeit | Produkt | Ausbeute |
|-----------|---------------------------------|-------|--------|-----------|----------|
| 14 | CH ₂ Cl ₂ | DIPEA | 45 min | 76 | 79% |
| 15 | CH ₂ Cl ₂ | DIPEA | 45 min | 77 | 76% |
| 17 | CH ₂ Cl ₂ | DIPEA | 45 min | 78 | 83% |
| 32 | CH ₂ Cl ₂ | DIPEA | 45 min | 79 | 87% |
| 34 | CH ₂ Cl ₂ | DIPEA | 45 min | 80 | 81% |

Die propargylierte Mannose **76** wurde jetzt mit Verbindung **74** in einer Mikrowellenreaktion (30 min bei 30 W) zum Triazolglycopeptidbaustein **81** in sehr guter Ausbeute (85%) umgesetzt. Als regiospezifischen Katalysator für die 1,4-Verknüpfung wurde dabei ein in Toluol löslicher (EtO)₃P-CuI-Komplex^[202] verwendet. Die Reaktion wurde unter den gleichen Bedingungen mit weiteren propargylierten Thioglycosiden **77-80** durchgeführt, wobei ähnlich gute Ergebnisse erhalten wurden (**Tabelle 14**). Die Triazolglycopeptidbausteine konnten alle mit wenig Zeitaufwand über eine kurze Kieselsäule aufgereinigt werden. Somit stellt die 1,3-dipolare Cycloaddition hier eine sehr effiziente Synthesemethode dar.

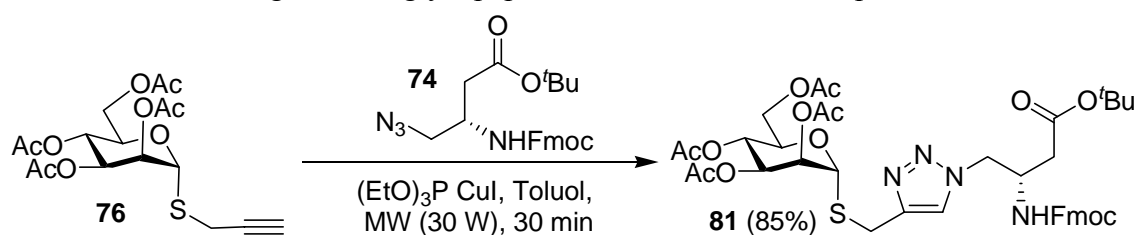
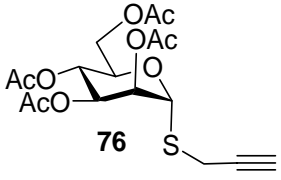
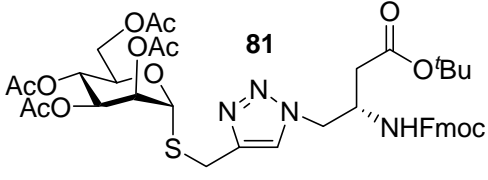
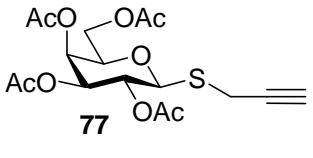
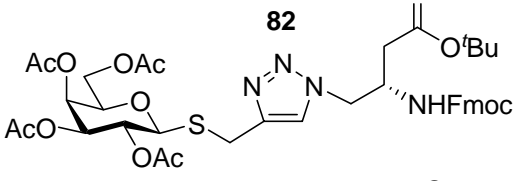
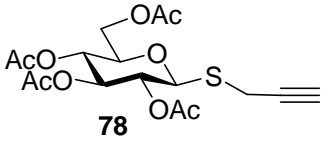
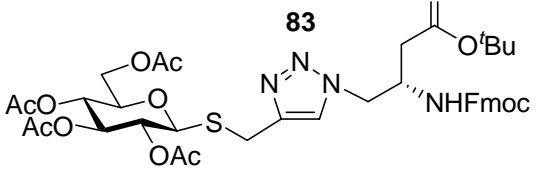
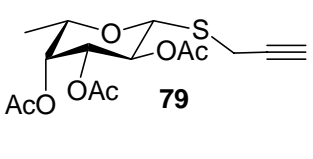
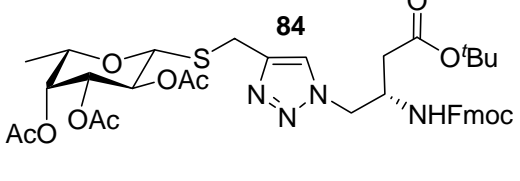
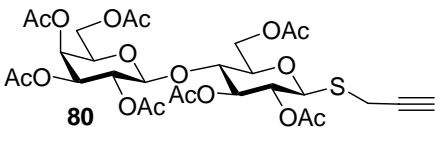
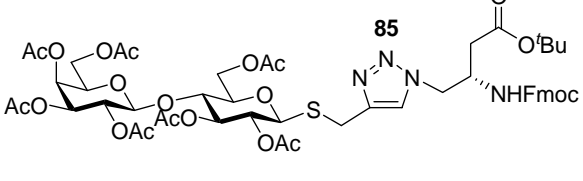
Schema 61: Darstellung der Thioglycopeptidbausteine mit Triazol-Spacer

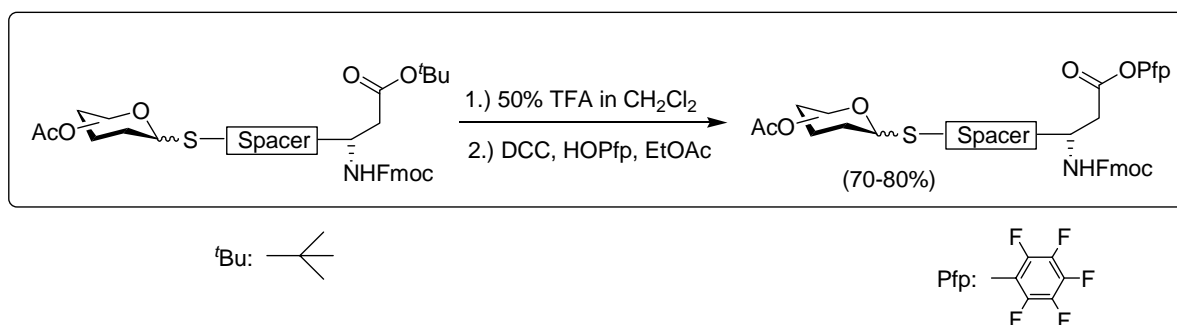
Tabelle 14: Ausbeuten der S-Glycopeptid-Bausteine mit Triazol-Spacer

| 1-Thioglycopyranosen (Edukt) | S-Glycopeptid-Bausteine (Produkt) | Ausbeute |
|--|---|----------|
|  <p>76</p> |  <p>81</p> | 85% |
|  <p>77</p> |  <p>82</p> | 69% |
|  <p>78</p> |  <p>83</p> | 72% |
|  <p>79</p> |  <p>84</p> | 76% |
|  <p>80</p> |  <p>85</p> | 66% |

6.1.5 Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine

Um die *S*-Glycopeptid-Bausteine für die Synthese der *S*-Glycopeptide verwenden zu können, wurde die *tert*-Butylgruppe am β -Aminosäurerückgrat mit TFA abgespalten und über Pentafluorphenol (Pfp) zum Aktivester umgesetzt (**Schema 62**). Dabei wurden die pentafluorphenolaktivierten *S*-Glycopeptid-Bausteine in sehr guten Ausbeuten (70-80%) erhalten.

Schema 62: Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine über Pentafluorphenol



Über die vorgestellten Synthesen wurden insgesamt zweiundzwanzig neue *S*-Glycosyl-Bausteine hergestellt, die für die Synthese der *S*-Glycopeptide verwendet werden können. Wie aus der Übersicht ersichtlich, ist das Potential an neuen Bausteinen noch lange nicht ausgereizt und eine große Anzahl an Bausteinen könnte noch synthetisiert werden. Außerdem können über neue Aminoalkohole unter Mitsunobu-Bedingungen weitere noch nicht bekannte Bausteine hergestellt werden, bei denen ihre molekulare Struktur auf das jeweilige Problem zugeschnitten ist (maßgeschneiderte Bausteine). Da die Mitsunobu-Reaktion unter Konfigurationsumkehr verläuft, können enantiomere Alkohole stereospezifisch als Spacer eingeführt werden. Dadurch wird das ganze Synthesekonzept extrem variabel und effektiv.

Tabelle 15: Übersicht der Pentafluorphenol aktivierten S-Glycopeptid-Bausteine

| S-Glycosid | $R = \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH} \text{---} \text{OPfp} \\ \\ \text{NH Fmoc} \end{array}$ |
|------------|---|
| | 86 95 99 103 |
| | 87 96 98 100 102 104 |
| | 88 97 101 105 |
| | 89 |
| | 90 |
| | 106 |
| | 91 |
| | 92 |
| | 93 |
| | 94 |
| | 107 |

Pfp: Pentafluorphenol

6.2 Synthese der S-Glycopeptide auf Zellulosemembranen

6.2.1 Festphasensynthesen

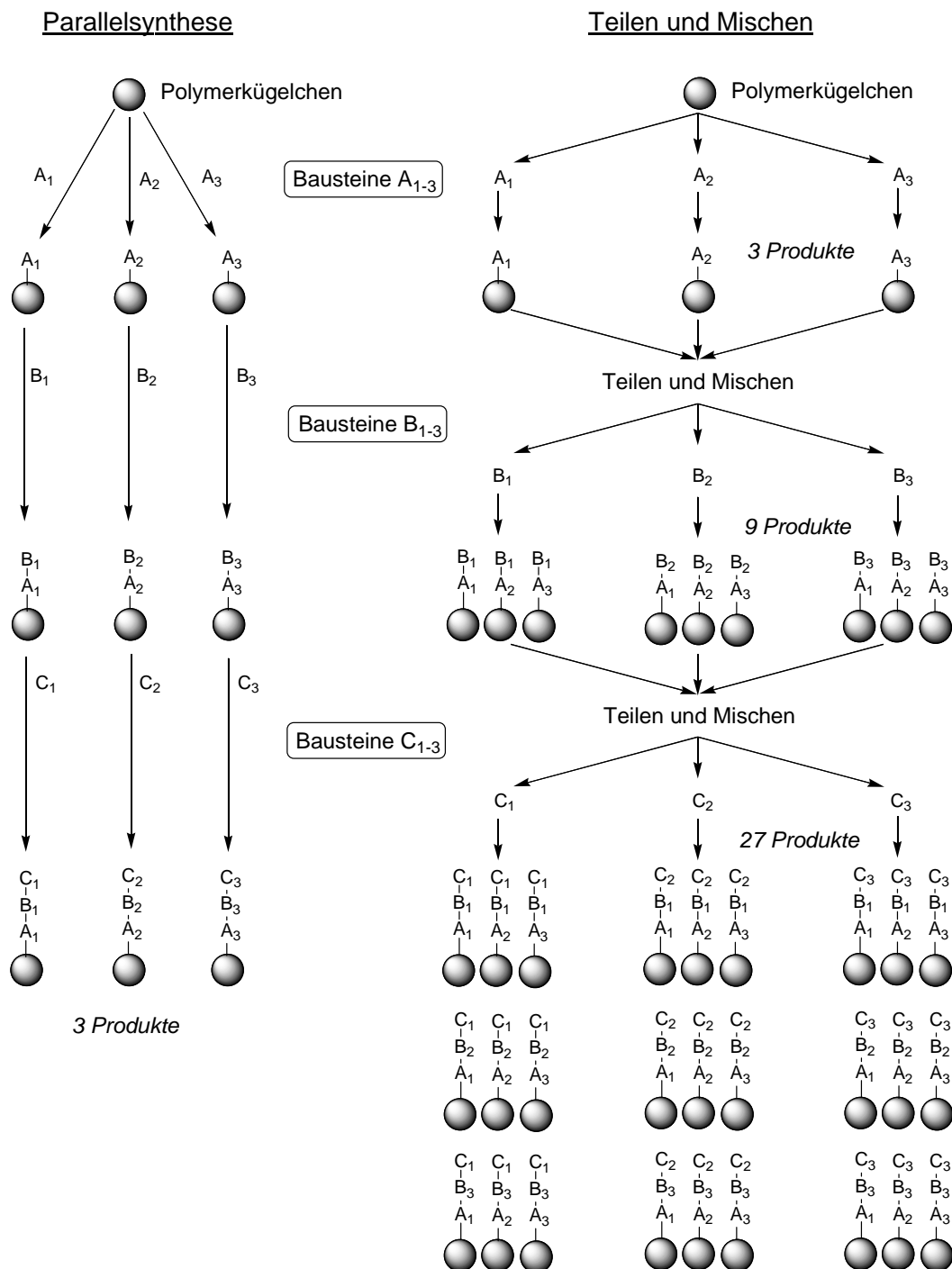
Eines der größten Probleme bei der Synthese von komplexen Naturstoffen ist ihre aufwändige Reinigung über chromatographische Verfahren, die zeitaufwändig und kostenintensiv sind. Im Jahr 1963 entwickelte Merrifield die Festphasensynthese von Peptiden auf Polystyrol-Harzenkügelchen und ermöglichte, große Peptide in reiner Form herzustellen^[203]. Dabei wird eine Aminosäure am Träger kovalent gebunden und das Peptidrückgrat durch mehrere Synthesesyklen vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Aufwändige Reinigungsschritte werden durch einfache Waschschriffe ersetzt, indem nach jedem Syntheseschritt überschüssiges Reagenz auf den Kügelchen durch Waschen entfernt wird.

Durch die Verwendung von überschüssigem Reagenz, bei einer geeigneten Peptidaktivierungsmethoden und einer ausgefeilten Schutzgruppenstrategie war es möglich, Ribonuclease A^[204] erstmals vollsynthetisch herzustellen. Das Konzept der Peptidfestphasensynthese wurde in den letzten Jahren immer stärker auf andere organische Reaktionen erweitert. Dazu mussten neue Polymermaterialien, Linker und analytische Verfahren entwickelt werden. Neben der chemischen Weiterentwicklung des Konzepts setzte eine immer stärkere Automatisierung der Festphasensynthese Mitte der achtziger Jahre ein^[205], wobei Peptide an mehreren Harzenkügelchen gleichzeitig, sozusagen parallel synthetisiert wurden. Das führte zu Synthesemethoden der „Pins-“^[206] oder der „Tea-Bag“-Synthese^[207] und schließlich zur automatisierten „Parallelsynthese“ in Reaktoren^[208] mit Robotern. Kombinatorische Ansätze und eine immer stärkere Miniaturisierung revolutionierten die Festphasensynthesen und ermöglichten kostengünstige Forschung in der medizinischen Chemie, um neue Ligand-Rezeptor-Systeme zu finden. So gelang es, über die „Teilen-und-Mischen“-Methode^[209] in kurzer Zeit sehr große Substanzbibliotheken zu erzeugen (**Schema 63**). Nach der Synthese über diese Verfahren können zwar biologisch aktive Substanzen identifiziert werden, aber ihre Sequenz ist nicht bekannt und eine aufwändige Analytik mit dem Nachsynthetisieren der Substanz ist nötig.

Zur Erzeugung kleinerer Bibliotheken eignet sich deshalb die „Parallel“-Synthese besser, bei der die Substanzen räumlich voneinander getrennt auf festen Positionen synthetisiert werden und deshalb die Sequenz der Substanzen immer bekannt ist. Neben der erwähnten „Pin“-Methode und Reaktormethode gehört die Auftragung der Substanzen auf planaren Oberflächen (Arrays) mit einem Pipettierroboter zu den parallelen Syntheseverfahren. Dazu wurde von R. Frank^[210] und praktisch gleichzeitig von J. Eicher^[211] im Jahr 1988 erstmals eine funktionalisierte Cellulosemembran als Träger eingesetzt, bei der die Synthese an der Celluloseoberfläche durchgeführt wird. Des Weiteren können funktionalisierte Glasplatten^{[212],[213]} (Microarrays) als Träger dienen, bei denen sehr geringe Substanzmengen (ca. 10 pmol) verwendet werden und eine aufwändige Analytik benötigt wird (SPR, FCS, QCM, MS)^[214]. Diese Microarraytechnologie hat in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen und es existieren DNA-, Protein-, Peptid-, Proteom-Chips mit bis zu 200.000 separierten Spots^[215]. Aufgrund der komplexen Synthese und aufwändigen Analytik von Oligosacchariden sind Kohlenhydrat-Chips noch in ihrer Entwicklungsphase. Wegen der fundamentalen Bedeutung

von Oligosacchariden bei immunologischen Erkennungsprozessen nimmt das Forschungsinteresse auf diesem Gebiet stark zu.

Schema 63: Prinzip der Parallelsynthese und der Teilen- und Mischen-Methode

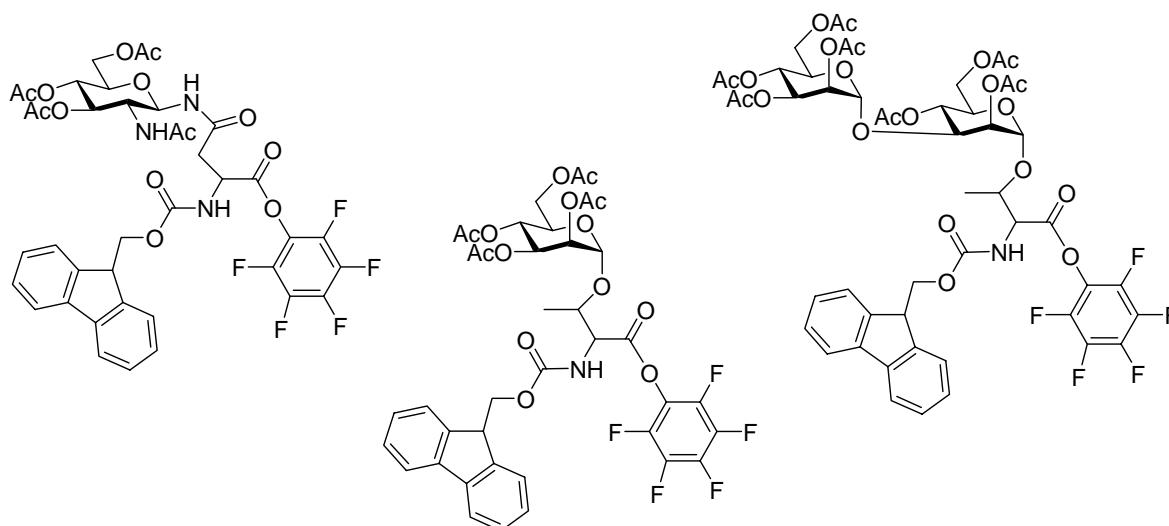


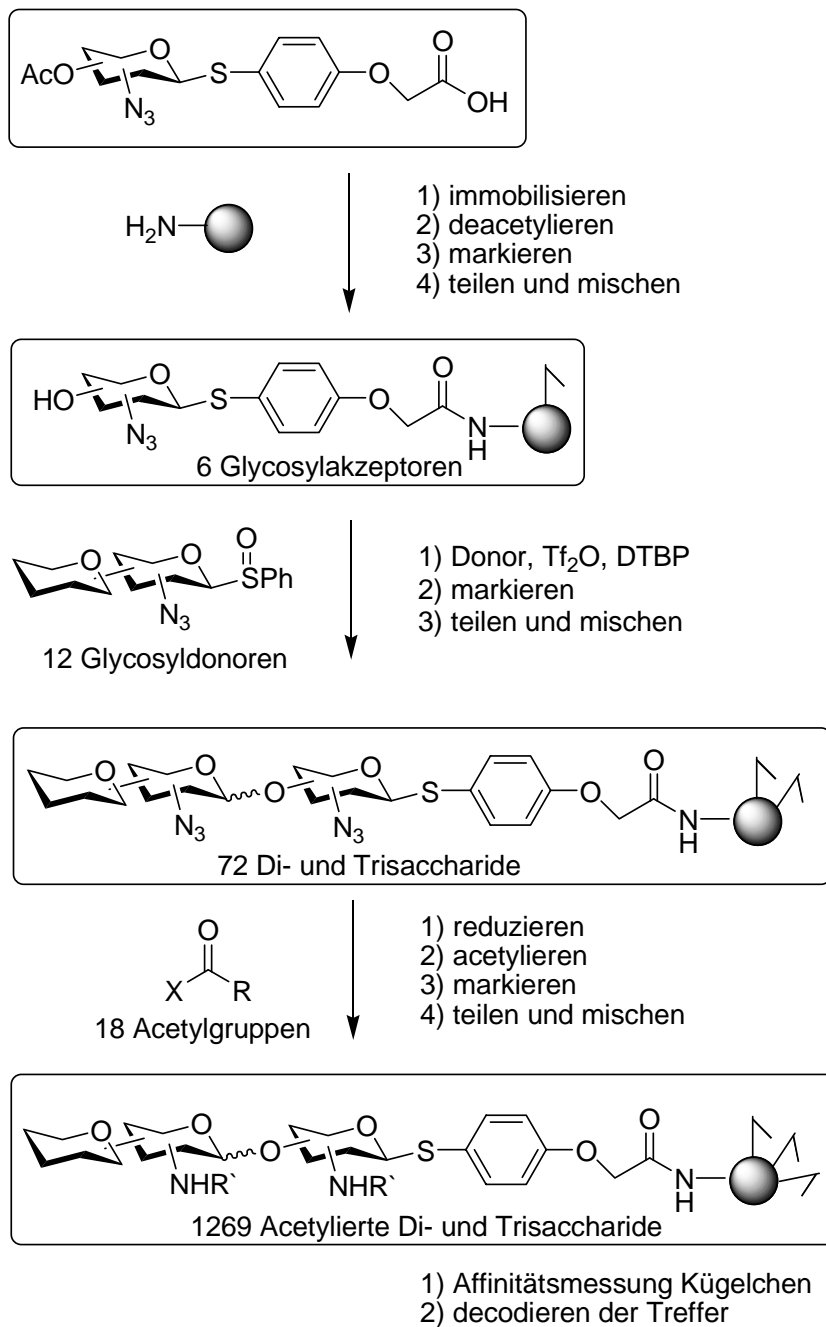
In den vergangenen Jahren wurden bei der Festphasensynthese von Oligosacchariden und Glycopeptiden von verschiedenen Forschergruppen erhebliche Fortschritte^{[216],[217]} gemacht. Eine der ersten Oligosaccharidbibliotheken wurde von Hindsgaul^[218] 1995 mit einem unge-

geschützten Disaccharid und einem geschützten Fucosebaustein hergestellt. Dabei wurde eine statistische Mischung aus 12 Trisacchariden hergestellt, die chromatographisch aufgetrennt wurden. Eine entscheidende Verbesserung wurde bei Kahne's^[219] kombinatorischer Bibliothek mit 1300 Substanzen erreicht. Dazu wurden acetylierte Thioglycoside mit Glycosylsulfoniden als Donoren über eine Teilen und Mischen-Methode kombinatorisch synthetisiert (**Schema 65**). Aus 6 Thioglycosidbausteinen mit einer Azidfunktion und 12 Glycosylsulfonidbausteinen ebenfalls mit einer Azidfunktion, konnten im ersten Schritt 72 unterschiedliche Di- und Trisaccharide hergestellt werden. Danach wurden die Azidfunktionen zu den Aminen reduziert und mit 18 unterschiedlichen Acetylgruppen zur Bibliothek differenziert. Durch ein anschließendes Screening der Harzkügelchen konnten zwei Kohlenhydrate mit höherer Affinität als ihr natürlicher Ligand identifiziert werden.

Ein weiterer Fortschritt in der Glycopeptidsynthese war der Einsatz von Glycopeptidbausteinen mit einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie (**Schema 64**). So hat Meldal als erster pentafluorphenolaktivierte Glycopeptide mit acetylierten Zuckern und Fmoc-geschützter Aminfunktion eingesetzt, um Glycopeptide zu synthetisieren^[220]. Durch das Vorsynthetisieren der Bausteine müssen bei der späteren Synthese keine komplizierten Oligosaccharidbindungen geknüpft werden. Die Synthese kann analog der Peptidchemie mit der Fmoc-Strategie durchgeführt werden und ist somit gut automatisierbar^[221]. Durch die Teilen- und Mischen-Methode war es möglich, aus drei Bausteinen eine Bibliothek mit 300000 Substanzen, bestehend aus Heptaglycopeptiden, herzustellen^[222]. Der Einsatz einer Decodierungsstrategie über Aminosäuren und der MALDI-TOF-Analyse ermöglichte, die Sequenz der aktiven Substanzen nach einem Screening schnell zu bestimmen.

Schema 64: Meldal's Glycopeptid-Bausteine^[220]



Schema 65: Kahne's Substanzbibliothek^[219]

6.2.2 Verwendung der SPOT-Synthese

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Strategien sollen für eine kombinatorische S-Glycopeptidsynthese effektiv genutzt werden. Dazu soll eine kombinatorische SPOT-synthese nach der Methode von R. Frank auf Cellulosemembranen mit den S-Glycopeptid-Bausteinen durchgeführt werden^{[223],[224]}. Da niemand zuvor mit Bausteinen dieser Art nach der Methode gearbeitet hat, muss die ganze Synthesestrategie (Anker, Linker, Schutzgruppen, Aktivierung, Analytik) auf das Verfahren angepasst werden. Zunächst soll das Prinzip der SPOT-Synthese kurz erläutert werden. Bei der SPOT-Synthese wird mit einer Pipette eine Reagenzienlösung aus einem Vorratsgefäß auf eine Zellulose-Membran aufgetüpfelt (**Schema 66**). Dabei entstehen viele räumlich voneinander getrennte Flecken (Spots), wobei der auf jedem einzelnen Spots eine unabhängige Synthese des Glycopeptids stattfindet (örtliche Adressierung). So wird durch den Einsatz unterschiedlicher Bausteine (Farbe der Kugeln in **Abbildung 1**) auf jedem Spot ein Glycopeptide synthetisiert, das sich in der Sequenzabfolge der einzelnen Bausteine unterscheidet. Die Größe der Spots begrenzt dabei die Anzahl der parallel synthetisierbaren Substanzen auf der Membran und hängt von der Viskosität des Lösungsmittels, dem pipettierten Volumen, der Benutzbarkeit der Membran und der Flüchtigkeit des Lösungsmittels ab^[225]. Durch den Einsatz eines Pippettierroboters (X,Y programmierbare Auftragung), lassen sich auf einer Membran mit der Größe von 19 x 28 cm maximal 8.000 Spots auftragen^[226]. Durch die Automatisierung über ein Computerprogramm wird nach der Synthese jedem einzelnen Spot eine eindeutige Peptidsequenz zugeordnet, was die Auswertung deutlich vereinfacht. Die hergestellte Substanzmenge (1-100 nmol / mm²) ist für ein Screening (Lectin, Antikörper) gut geeignet und reicht für eine massenspektroskopische Analytik aus (MALDI-TOF, HPLC-MS)^[227]. Weitere Vorteile gegenüber der konventionellen Harzsynthese sind ein geringer Verbrauch an Reagenzien und das Erzeugen vieler Verbindungen auf einer einzigen planaren Oberfläche. Bei der SPOT-Synthese wird Analog der zur Harzsynthese die Fmoc-Strategie angewendet. Die wichtigsten Unterschiede zwischen der SPOT- und der Harz-Synthese sind in **Tabelle 16** nochmals zusammengefasst.

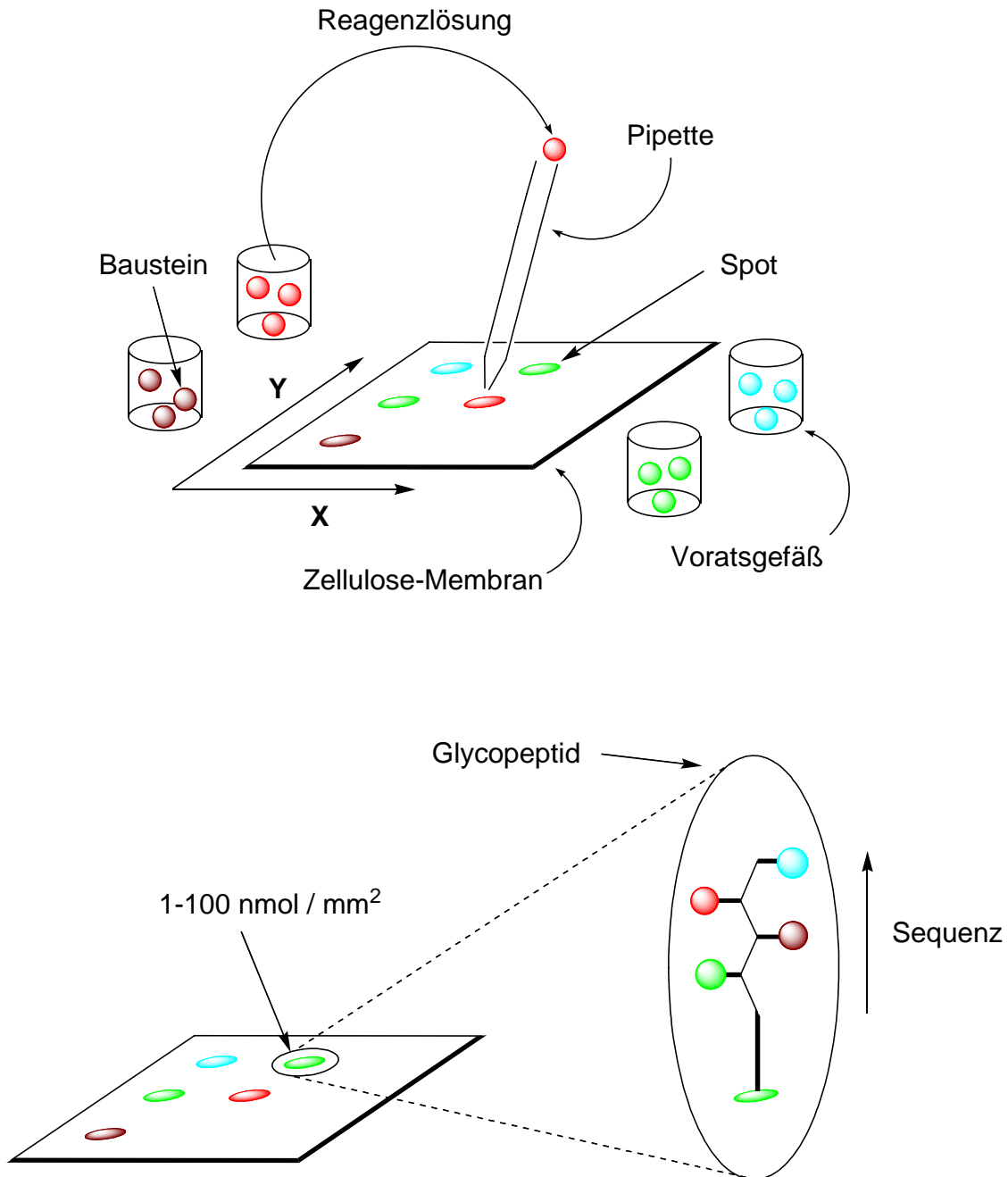
Tabelle 16: Unterschiede zwischen der SPOT- und der Harz- Synthese

| Kriterium | SPOT-Synthese ^[228] | Harz-Synthese ^[229] |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Feste Phase | Zellulosemembran | Polystyrolharzkügelschen |
| Schutzgruppenstrategie | Fmoc | Fmoc, Boc |
| Reagenzienbedarf | 25-100 µg / SPOT | 10-500 mg / g |
| Beladung | 0.05-1.5 µmol / cm ² | 10-1000 µmol / g |
| Analytik | MALDI-TOF, HPLC-MS | HPLC-MS, MAS-NMR, IR |

Die SPOT-Synthese hat eine breite Anwendung im medizinisch immunologischen Bereich gefunden, um große Peptidbibliotheken zu erzeugen, mit denen anschließend Bioassay durchgeführt werden, um biochemische Fragestellungen zu klären^[230]. Darunter fallen vor allem:

B-Zell^[231] oder T-Zell^{[232],[233]} Epitop-Mapping, Protein-Protein-Wechselwirkungen^{[234],[235]} und Enzym-Substrat-Erkennung^[236]. Daneben wurden in jüngster Zeit auch andere Substanzklassen wie PNA^{[237],[238]}, Peptide^[239], Heterocyclen^{[240],[241],[242]} und N-Glycopeptide^[243] mit Hilfe der SPOT-Synthese auf Membranen synthetisiert. Eine Arbeitsgruppe berichtet von einer mikrowellenunterstützten SPOT-Synthese, mit der die Reaktionszeiten drastisch gesenkt werden^[244].

Abbildung 1: Schematische Darstellung der SPOT-Synthese

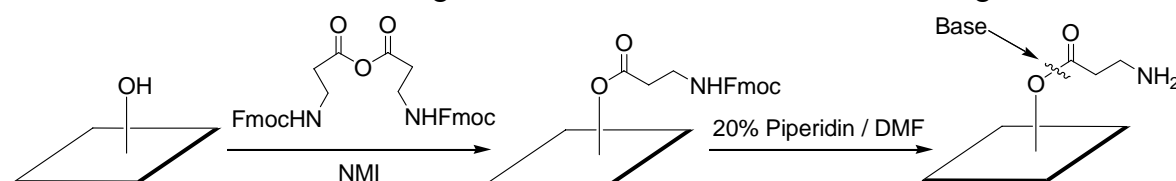


6.2.3 Derivatisierung der Zellulosemembranen

Das kettenförmige Polysaccharid Zellulose besteht aus langen β -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten, die ein faseriges Netzwerk bilden und durch ihre Porosität eine innere Oberfläche besitzt. Dadurch haben sie einen guten Funktionalisierungsgrad, kombiniert mit einer guten mechanischen Stabilität^[245]. Aufgrund ihrer breiten Verwendung als Filtermedium ist Zellulose ein sehr preisgünstiges Trägermaterial. Bei Behandlung mit den typischen Lösemitteln der Festphasensynthese (DMSO, Wasser, DMF, NMP, DCM, MeOH, Et₂O, Toluol) ist Zellulose auch bei höheren Temperaturen (80°C, Mikrowellenstrahlung) vollständig inert. Selbst bei basischen Bedingungen, unter mehrstündiger Behandlung mit methanolischer Natriummethylat-Lösung (Zemplen-Bedingungen) oder mit konzentrierten Aminen bleibt die Membran stabil. Lediglich Hydrazin-Lösungen vermögen die Zellulose langsam zu zersetzen. Hauptschwierigkeit bilden stark saure Bedingungen, die zu einer Hydrolyse der acetalischen Bindungen zwischen den Glucoseeinheiten führen, in Abhängigkeit von Konzentration, Temperatur, Zeit und Wassergehalt^[246].

Um einen Verlust der Zellulosestruktur bei der Abspaltung von Seitenschutzgruppen und Linkern unter sauren Bedingungen (95% TFA) zu vermeiden, sollten die Reaktionszeiten (< 2 h) kurz gehalten werden und währenddessen auf mechanische Belastungen wie Schütteln verzichtet werden. Nötigenfalls muss mehrmals hintereinander die Abspaltung wiederholt werden. Bevor eine SPOT-Synthese auf der Zellulosemembran durchgeführt werden kann, muss die Oberfläche für die spätere Peptidsynthese modifiziert werden. Dazu werden bei der Zellulose die freien Alkoholfunktionen der Glucoseeinheiten mit einer Anker-Verbindung derivatisiert. Die einfachste und am häufigsten verwendete Methode ist die Veresterung der Hydroxygruppen mit einer Aminosäure. Hierzu inkubierte Frank et al. eine vorgetrocknete Zellulosemembran mit β -Alaninanhydrid in DMF und entfernte die N-terminale Fmoc-Gruppe mit 20%-iger Piperidinlösung (Schema 66). Dadurch wurde eine teilweise aminofunktionalisierte Membran erhalten, die mit einer beliebigen Aminosäure direkt weiter umgesetzt wird^[225].

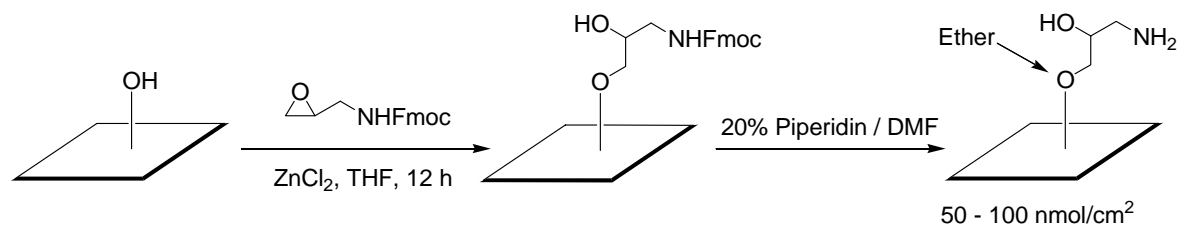
Schema 66: Aminoderivatisierung der Zellulosemembran durch Veresterung



Eine Verwendung von Aminosäuren als Ankerbindung hat den Nachteil, dass unter basischen Bedingungen die Esterbindung gespalten wird und ein Verlust der synthetisierten Glycopeptide zur Folge hat. Diese Bedingungen treten zum Beispiel bei der Verwendung von Pufferlösungen in biologischen Assays auf. So werden 90% eines festphasengebundenen Glycins über Nacht von einem Phosphatpuffer (pH 8.0) abgespalten^[247]. Des Weiteren kann bei der Synthese der S-Glycopeptide keine Verankerung über Esterbindungen verwendet werden, da die Acetylschutzgruppen im letzten Syntheseschritt unter stark basischen Bedin-

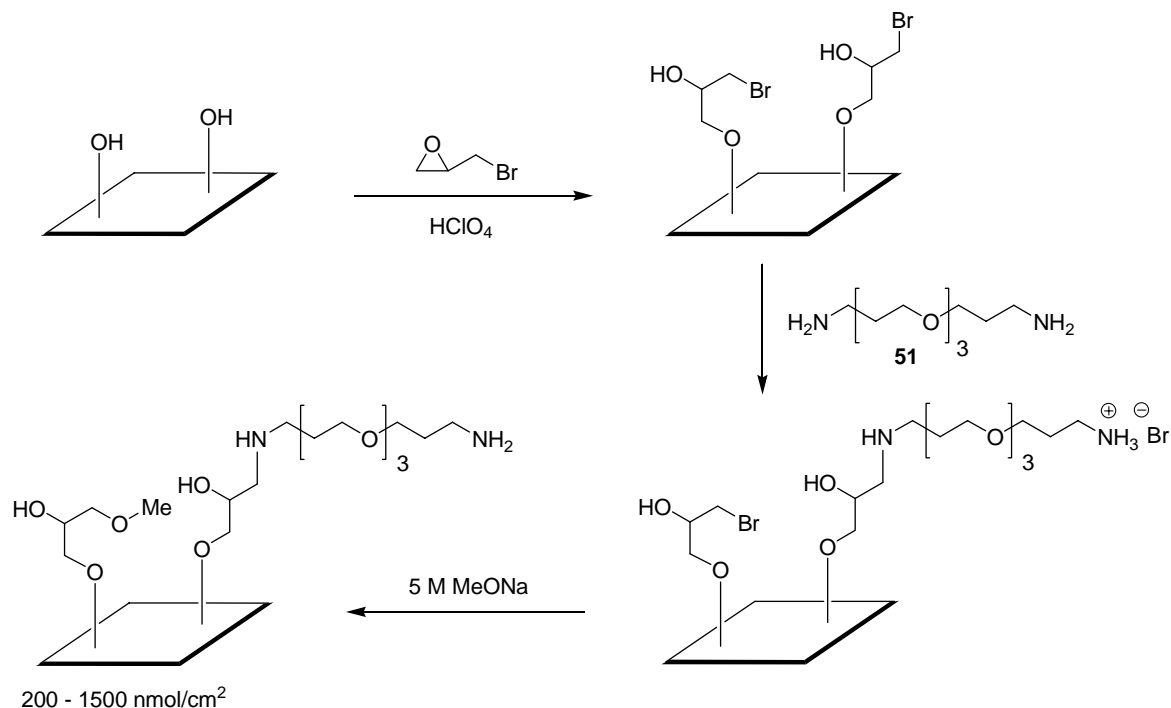
gungen abgespalten werden und einen Verlust der Glycopeptide zur Folge hätte. Deshalb wurde eine esterfreie Derivatisierungsmethode auf ihre Anwendbarkeit untersucht. In der Literatur wurde von Volkmer-Engert ein Epoxid mit einer Fmoc-geschützten Aminofunktion verwendet, um unter Ausbildung einer Etherbindung die Zellulosemembranen mit Aminogruppen zu modifizieren^[248] (**Schema 67**). Nach Öffnung des Epoxidrings durch die Hydroxylgruppen der Membran bildet sich ein geschütztes Aminopropanol, das mit 20%-iger Piperidin-lösung zu freiem Amin gespalten wird. Dabei werden Derivatisierungsgrade von 50 – 100 nmol/cm² erreicht.

Schema 67: Aminoderivatisierung der Zellulosemembran durch Veretherung



Einen höheren Derivatisierungsgrad von bis zu 1500 nmol/cm² kann man durch Alkylierung mit dem reaktiveren Epibromhydrin erreichen. Bei der Epoxidöffnung bildet sich ein Brompropanol, das mit einem Diamin wie Diaminopropan^[249] oder 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin^[250] **51** umgesetzt wird (**Schema 68**).

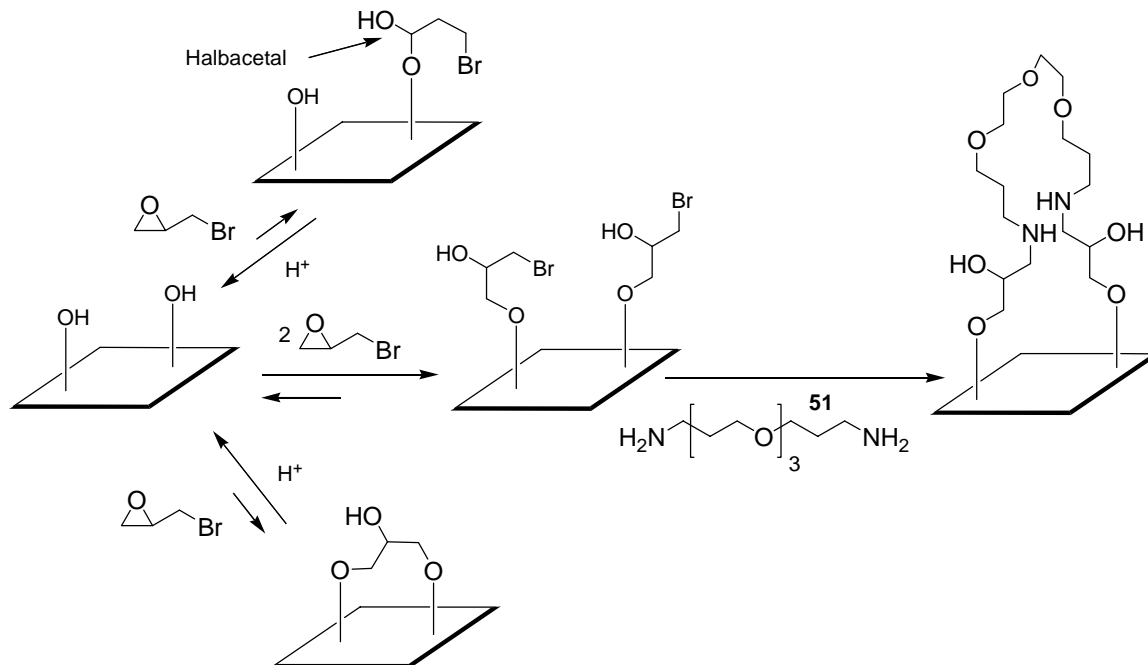
Schema 68: Aminoderivatisierung der Zellulosemembran über Epibromhydrin



Anschließend werden nicht umgesetzte Brompropanoleinheiten mit Natriummethanolatlösung verethert und gleichzeitig das Ammoniumsalz des Ankers zum freien Amin neutralisiert. Dadurch werden Nebenreaktionen bei der späteren Peptidsynthese mit geschützter Aminofunktion (Fmoc-Abspaltung) und der Membranoberfläche vermieden. Diese Derivatisierungsmethode hat gleich mehrere Vorteile. Eine aufwendige Synthese von Aminoepoxiden entfällt und es können käufliche Chemikalien verwendet werden. Der erhaltene Anker besitzt durch seine Länge einen gewissen Abstand zur Oberfläche, was die sterische Zugänglichkeit bei der Synthese und bei Festphasen-Bindungsassays deutlich verbessert. Über die Reaktionsdauer und die Konzentration bei der Umsetzung von Verbindung **51** mit dem Brompropanol kann die Beladung ($200 - 1500 \text{ nmol/cm}^2$) mit Aminofunktionen kontrolliert werden. Das Ankersystem ist gegen Säuren und Basen weitgehend stabil und wird bei einer basischen Deacetylierung der S-Glycopeptide nicht abgespalten.

Als Nebenreaktion bei der Derivatisierungsmethode über Epibromhydrin kommt hauptsächlich eine intermolekulare Disubstitution eines Diamins mit zwei Brompropanoleinheiten in Frage (**Schema 69**). Diese Reaktion wird durch einen großen Überschuss an Verbindung **51** und durch den erhöhten sterischen Anspruch gering gehalten. Da unter stark sauren Bedingungen (Perchlorsäure) gearbeitet wird, ist das Gleichgewicht bei der Reaktion zu Gunsten der Bildung des Brompropanols verschoben.

Schema 69: Nebenreaktionen bei der Derivatisierungsmethode über Epibromhydrin

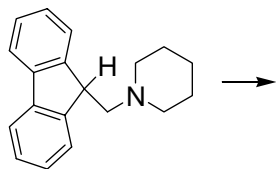


Um den Derivatisierungsgrad der Membranen zu bestimmen, wurden die Aminfunktionen Fmoc-geschützt und mit 20%igem Piperidin in DMF abgespalten. Das dabei gebildete Pipe-

ridin-DBF-Addukt lässt sich bei $\lambda=301$ nm ($\epsilon=7800$) UV-spektroskopisch verfolgen^[251] (**Schema 70**).

Schema 70: Berechnung der Beladung über UV-Messung

Piperidin-DBF Addukt



$$\epsilon_{301\text{nm}} = 7800 \text{ [mL/mmol cm]}$$

$$B = E \frac{V \cdot f}{\epsilon \cdot d \cdot A} \cdot 10^6$$

B: Beladung [nmol/cm²]

E: Extinktion

V: Abspaltvolumen [mL]

f: Verdünnungsfaktor

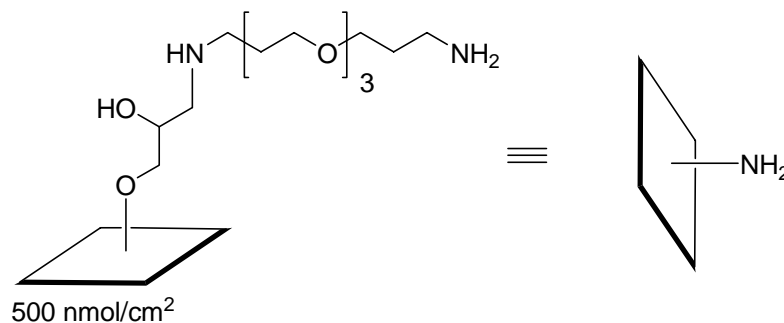
ϵ : Extinktionskoeffizient [mL/mmol cm]

d: Schichtdicke Küvette [cm]

A: Papierfläche [cm²]

Dazu wurde die Zellulosemembran (9 x 13 cm) mit einer Eipibromhydrinlösung (10%ig) und Perchlorsäure (1%ig) in Dioxan 2 h geschwenkt, mit Dioxan gewaschen und weitere 2 h mit einer Lösung von Verbindung **51** (20%ig) geschwenkt. Die mit MeONa neutralisierte und gründlich gewaschene Membran wurde 4 h mit FmocCl inkubiert. Nach erneutem Waschen und Trocknen wurde die Fmoc-Gruppe abgespalten und die Beladung über UV-Messung bestimmt. Nach Verdünnung wurde eine Beladung von 415 nmol/cm² bestimmt ($E_{300\text{nm}}=303$, $f = 100$, $V = 25$ mL, $A = (9 \times 13)^2 = 234$ cm², $d = 1$ cm). Die Beladungsbestimmungen wurden mit unterschiedlichen Membranen bei gleichen Reaktionsbedingungen mehrmals wiederholt. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Beladung von 500 nmol/cm², und dieser Wert passt zu dem angegebenen Bereich aus der Literatur von 200-1500 nmol/cm² (**Schema 71**).

Schema 71: Aminoderivatisierte Zellulosemembran mit Verbindung **51**



Neben Zellulosemembranen sind in der Zwischenzeit auch Polypropylenmembranen mit verschiedenen Linkern erhältlich. Diese besitzen den Vorteil einer größeren Stabilität gegenüber Säuren und mechanischer Beanspruchung, die durch „Pfpolymerisation“ hergestellt werden. Eine Übersicht über die Membranen ist in **Tabelle 17** zusammengefasst.

Tabelle 17: Übersicht kommerziell erhältlicher Membranen^{[252],[253]}

| Anker | Membran Art / Beladung in nmol | | | |
|------------|--------------------------------|-------------------|------------------------|--|
| | Zellulose | Zellulose-PEG | Polypropylen | Polypropylen-PEG |
| Amino | K. A. | 400 ¹⁾ | K. A. | 600/70 ¹⁾ ; 200-800 ²⁾ |
| Hydroxyl | K. A. | K. A. | 200/1500 ¹⁾ | 100-400 ²⁾ |
| Fmoc-β-Ala | 800 ¹⁾ | K. A. | K. A. | K. A. |
| Carboxyl | 500 ¹⁾ | K. A. | K. A. | 300-1100 ²⁾ |
| Brom | 800 ¹⁾ | K. A. | K. A. | K. A. |
| Fmoc-Prol | 600 ¹⁾ | K. A. | K. A. | K. A. |
| Mercapto | 600 ¹⁾ | K. A. | K. A. | K. A. |
| Palmityl | 400 ¹⁾ | K. A. | K. A. | K. A. |
| d-Thymidin | 1000 ¹⁾ | K. A. | K. A. | K. A. |

* K. A.: Keine Angabe der Firma, 1) Rapp Polymere GmbH, 72072 Tübingen; 2) PolyAn GmbH, Berlin

6.2.4 Auswahl eines geeigneten Linkers

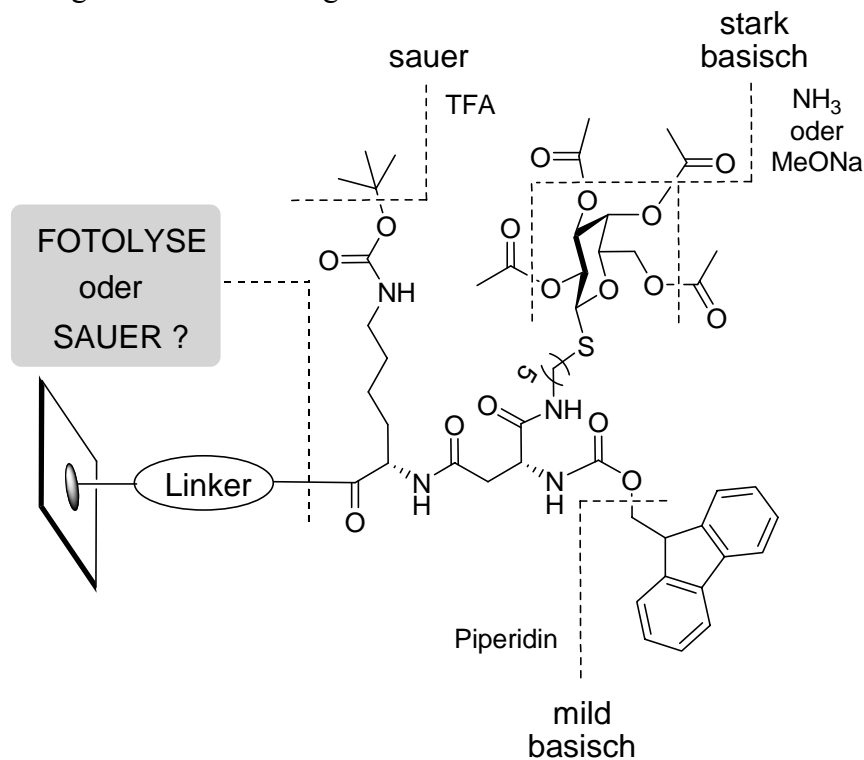
Voraussetzung für eine erfolgreiche Festphasensynthese der Glycopeptide ist ein geeigneter Linker zwischen Zellulosemembran und hergestellter Verbindung. Der Linker muss dabei alle Reaktionsbedingungen unbeschadet überstehen und nach der Synthese wieder leicht zu spalten sein, um die Substanz für analytische Kontrollen und andere Anwendungen möglichst quantitativ zugänglich zu machen. Für die Auswahl sind folgende Kriterien zu beachten^[254]:

- der Linker muss mit den Synthesebedingungen kompatibel sein
- quantitative Ausbeuten bei der Einführung und Spaltung des Linkers
- nach der Spaltung des Linkers muss das Produkt in hoher Reinheit vorliegen

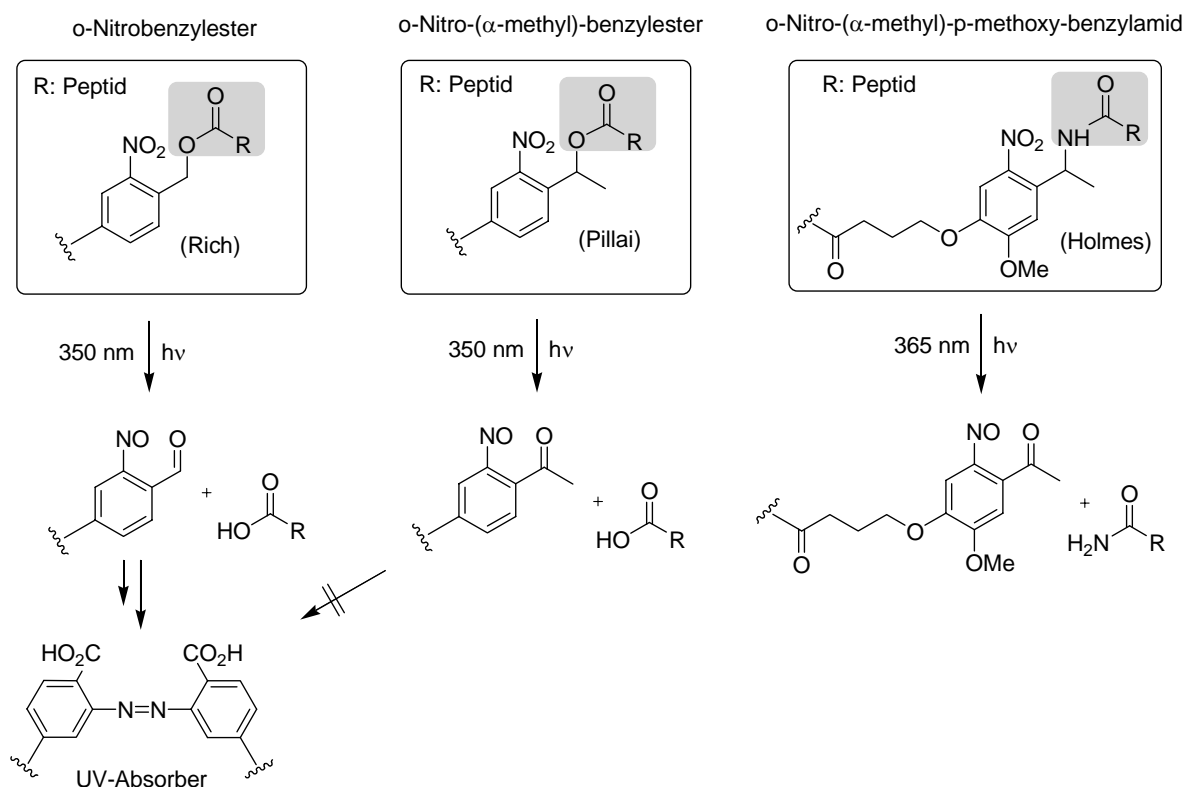
Um eine Auswahl treffen zu können, müssen die Synthesebedingungen genau beachtet werden. Für die SPOT-Synthese der S-Glycopeptide soll eine orthogonale Fmoc-Synthesestrategie^[255] verwendet werden, wie sie bei der Peptidsynthese allgemein üblich ist. Vorteil dabei sind die mild basischen Entschützungsbedingungen bei der Fmoc-Abspaltung (20% Piperidin in DMF), wobei die Acetylgruppen am Zucker stabil sind und nicht abgespalten werden. Zusätzlich können bei dieser Strategie Aminosäuren mit sauer spaltbaren Seitenschutzgruppen (tBu, Boc, Trt, Tmb, Pmc, Pbf) verwendet werden. Eine wie bei der Harzsynthese auch noch verwendete Boc-Strategie^[256] kann wegen der säurelabilen Zellulosemembran nicht angewendet werden. Im Hinblick auf die stark basischen Bedingungen bei der Deacetylierung der Zucker im letzten Syntheseschritt, kommt bei der Glycopeptidsynthese nur ein photolytisch oder sauer abspaltbarer Linker in Frage. Bei einem sauer abspaltbaren Linker werden gleichzeitig mit der Linkerspaltung, die Seitenschutzgruppen der Aminosäuren ent-

fernt, die bei einem fotolytischen Linker erhalten bleiben. Deshalb soll die Anwendbarkeit eines fotolytisch und sauer spaltbaren Linker genauer untersucht werden.

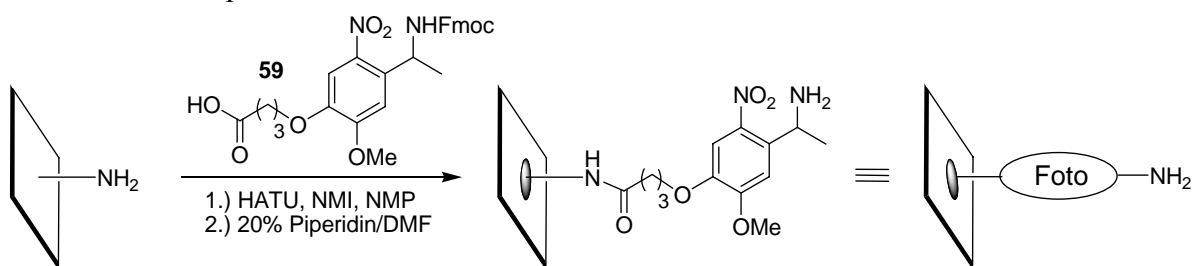
Schema 72: Orthogonale Fmoc-Strategie



Vorteil eines fotolabilen Linkers ist seine breite Orthogonalität zu einer Vielzahl von Synthesebedingungen, vor allem wenn während der Synthese basische (Piperidin) und saure (TFA) Bedingungen nötig sind, da sich der Linker mit UV-Strahlung^[257] unter milden neutralen Bedingungen abspalten lässt. Diese Linker sind aber auf Anwendungen begrenzt, bei denen keine UV-Absorber während der Synthese entstehen. Einer der ersten lichtempfindlichen Linker die in der Festphasensynthese verwendet wurden war der 4-Hydroxy-3-nitrobenzylester^[258]. Dieser von Rich^[259] entwickelte O-Nitrobenzyl-Linker hatte allerdings einige Einschränkungen. Bei der Photolyse (350 nm) bildete sich ein Nitrosobenzaldehyd der zu einem Azoderivat dimerisiert das die UV-Strahlung absorbierte (**Schema 73**). Das führte zu sehr langen Abspaltungszeiten (> 10 h) und das Produkt wurde lediglich mit mittelmäßiger Ausbeute erhalten (< 70%). Lange Bestrahlungszeiten führten zu Nebenreaktionen, wie Oxidation des Thioethers im Methionin zum Sulfoxid. Um diese Nebenreaktion zu unterbinden wurde von Pillai^[260] eine Methylgruppe in die benzyliche Position eingeführt, die bei der Bestrahlung zu einem Nitrosobenzoketon führte das nicht zur Azoverbindung dimerisiert. Holmes^[261] verringerte die Abspaltzeiten deutlich durch die Einführung einer Methoxygruppe in para-Stellung zur Nitrogruppe und entwickelte in mehreren Versuchsstudien einen praktikablen photospaltbaren Linker mit kurzen Abspaltzeiten (< 2 h) und sehr guten Ausbeuten (> 90%)^[262].

Schema 73: Fotospaltbare o-Nitrobenzyl-Linker

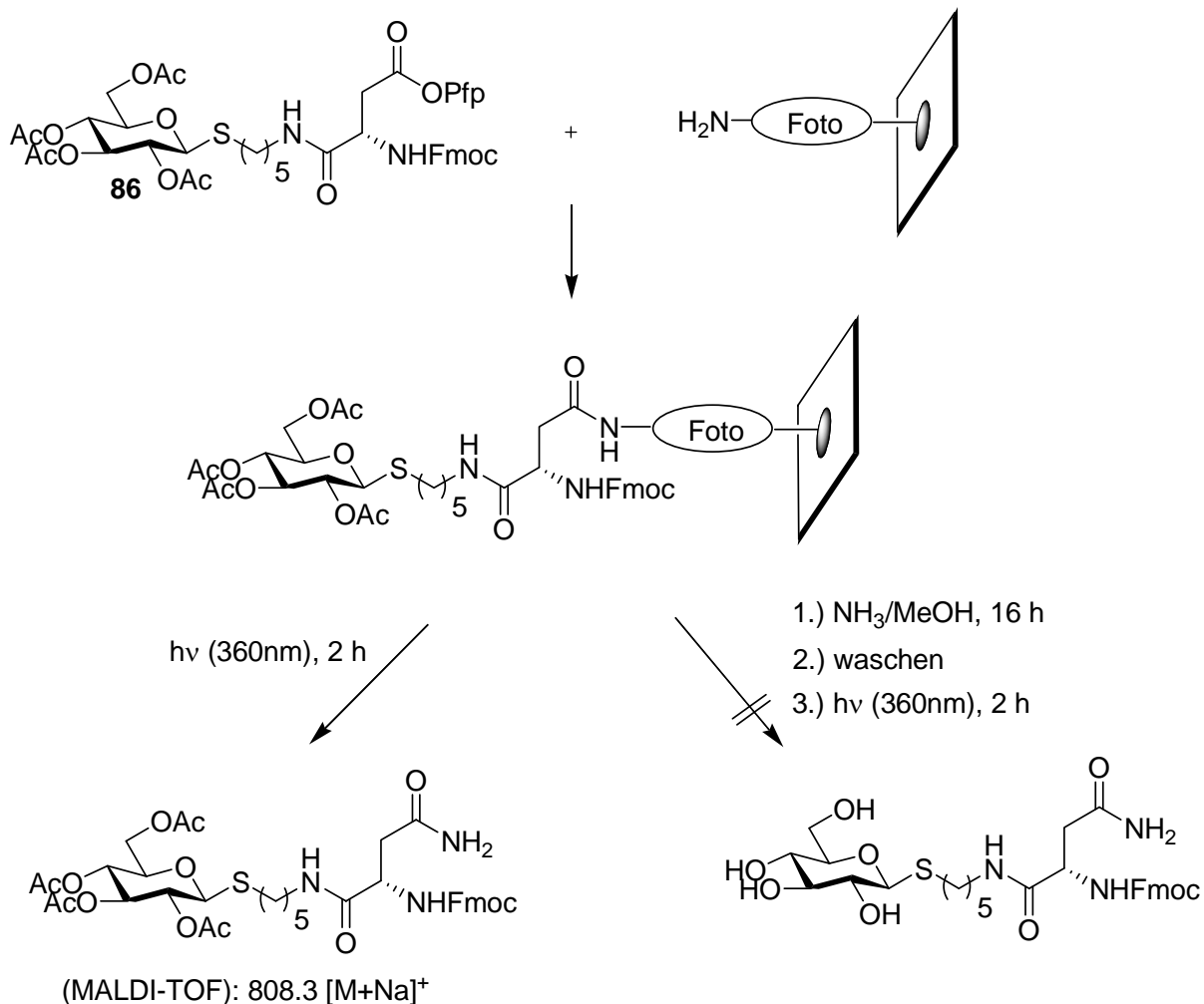
Der Linker von Holmes soll für die Glycopeptidsynthese auf seine Anwendbarkeit untersucht werden. Dazu wurde unter Lichtausschluss der käufliche Fmoc-geschützte Linker **59** über eine HATU Aktivierung^[263] auf die amioderivatisierte Membran aufgespottet und die Fmoc-Gruppe mit 20%igem Piperidin in DMF abgespalten (**Schema 74**).

Schema 74: Aufspotten des fotolabilen-Linkers **59**

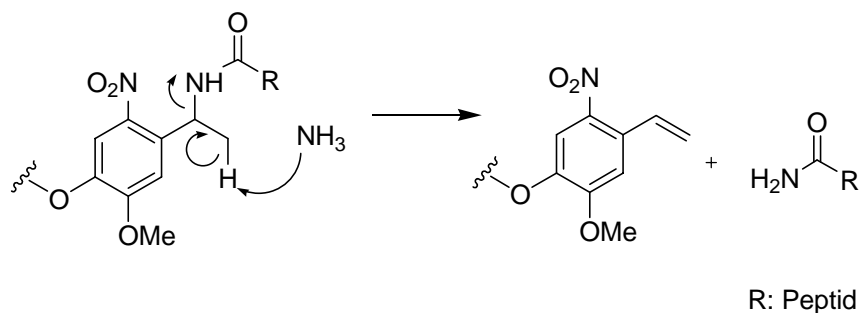
Um die Stabilität des fotolabilen Linkers unter den Synthesebedingungen zu testen wurde der pentafluorphenolaktivierte Glycopeptidbaustein **86** (0.25 M Lösung in NMP) 10 mal auf die Membran aufgetragen und nach 1 h gründlich mit DMF und MeOH gewaschen und getrocknet (**Schema 75**). Die ausgeschnittenen Spots wurden zur Hälfte aufgeteilt und einmal bei langwelligem UV-Licht (365 nm) bestrahlt (2 h), mit MeOH ausgewaschen und eine MALDI-TOF-Messung durchgeführt. Dabei war ein deutlicher Massepeak (808.3 $[M+Na]^+$) des acetylierten Glycopeptidbausteins zu erkennen. Die anderen 5 Spots wurden mit Ammoniak in Methanol über Nacht geschwenkt, um die Acetylgruppen am Zucker zu entfernen und nach

dem Waschen mit UV-Licht bestrahlt (2 h, 365 nm) und erneut eine MALDI-TOF Messung durchgeführt. Dabei waren im Massenspektrum weder Signale vom deacetylierten noch vom acetylierten Glycopeptid zu erkennen. Bei der Untersuchung der Abspaltung mittels MALDI-TOF konnte der vollständig deacetylierte Baustein nachgewiesen werden ($640.3 [M+Na]^+$). Somit wurde der fotolabile Linker bereits beim Deacetylieren mit Ammoniak gespalten und ist deshalb als Linker für die Synthese der S-Glycopeptide ungeeignet.

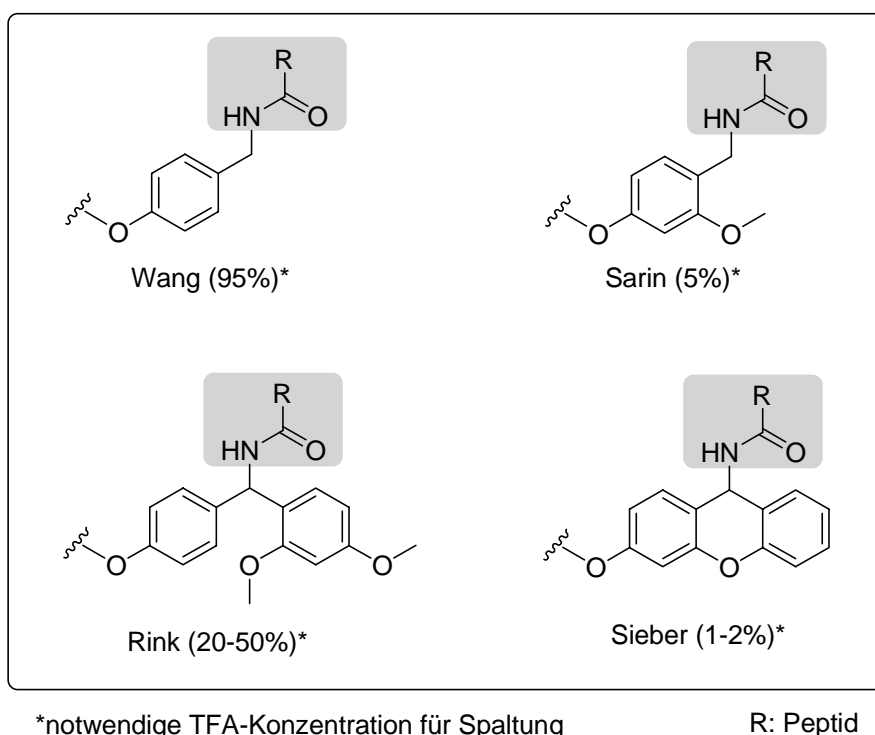
Schema 75: Stabilität des fotolabilen Linkers unter Synthesebedingungen



Als Ursache für die Spaltung des Linkers wird hier der basische Einfluss von Ammoniak angenommen, der den Austritt des Protons an der Methylgruppe begünstigt und in einer β -Eliminierung zur Spaltung des Linkers und zur Freisetzung des Peptids führt (**Schema 76**).

Schema 76: Basische Spaltung des fotolabilen Linkers mit Ammoniak

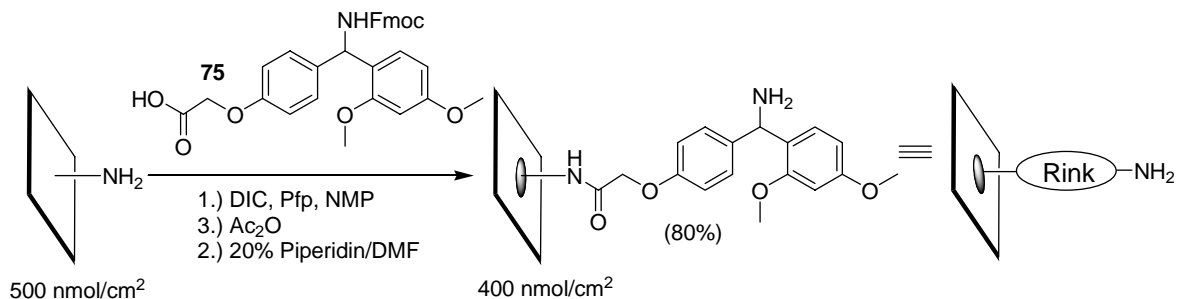
Sauer spaltbare Linker gehören zu den ältesten und meist verbreiteten Linker-Systemen in der Harzsyntaxe um Carbonsäuren zu immobilisieren. Darunter fallen vor allem die mit TFA spaltbaren Benzylester (Wang, Sasrin, HAL), die unter Fmoc-Bedingungen (20% Piperidin/DMF) stabil sind. Da die Ester gegen stark basische Bedingungen (NH_3 , NaOMe) unbeständig sind, kommen für die Glycopeptidsynthesen nur die analogen Amide als Linker in Frage (**Schema 77**).

Schema 77: Sauer spaltbare Amid-Linkersysteme

Dabei soll der Rink-Amid-Linker **75** auf seine Anwendbarkeit untersucht werden, da er unter basischen Bedingungen stabil ist und gute Ausbeuten (>80%) bei der Abspaltung des Peptids mit TFA (20-50%) liefert^{[264],[265]}. Dazu wurde der Linker **75** in NMP gelöst und über eine in situ-Aktivierung mit DIC und Pentafluorphenol mit der aminoderivatisierten Membran in

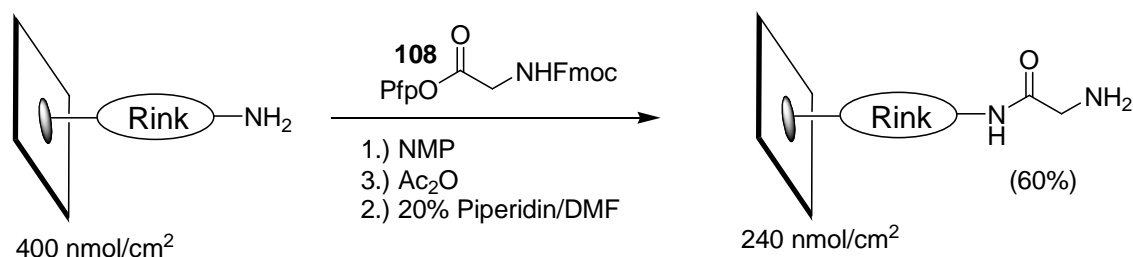
sehr gutem Umsatz (80%) gekoppelt. Anschließend wurden nicht umgesetzte Aminfunktionen mit Acetanhydrid acetyliert und die Fmoc-Gruppe abgespalten (**Schema 78**).

Schema 78: Aufspotten des Rink-Amid-Linkers 75



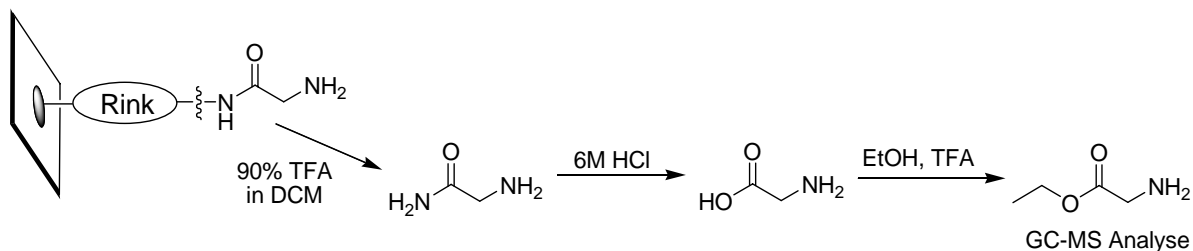
Es hat sich während den Kupplungsversuchen gezeigt, dass es aus sterischen Gründen sinnvoll ist, zwischen Rink-Amid-Linker und Glycopeptid eine Aminosäure (Gly, β-Ala) einzufügen, um bei der Kupplung des ersten Glycopeptids gleichbleibende Umsätze zu bekommen. Dazu wurde pentafluorphenolaktiviertes Glycin **108** in NMP gelöst und auf den Rink-Amid-Linker aufgespottet. Nach Acetylieren und Entschützen mit 20% Piperidin wurde ein Umsatz von 60% erreicht (**Schema 79**).

Schema 79: Aufspotten von Glycin 108



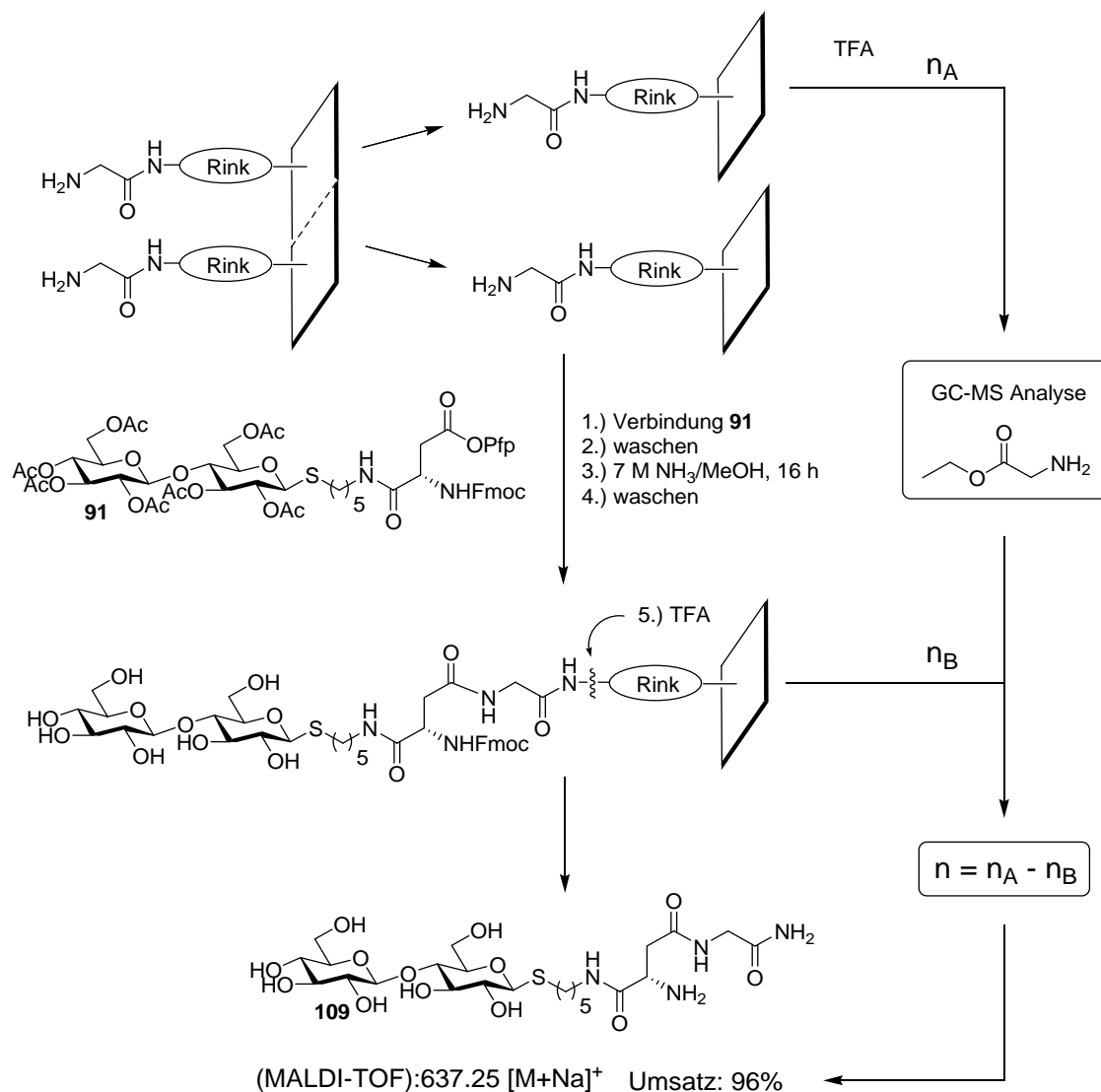
Ein weiterer Vorteil bei der Derivatisierung mit Glycin ist die Möglichkeit, das abgespaltene Glycinamid als Glycinmethylester über eine quantitative GC-MS-Analytik zu bestimmen (**Schema 80**). Da eine direkte Quantifizierung des Glycopeptids nach der basischen Deacetylierung über eine UV-Messung nicht mehr möglich ist (Fmoc-Gruppe bereits abgespalten), wurde eine indirekte Bestimmung über den Glycinmethylester gewählt.

Schema 80: Quantifizierung des Glycinamids über GC-MS als Glycinethylester



Dazu wurde eine mit Glycin und Rink-Amid-Linker beladene Membran in 2 gleiche Teile zerschnitten und aufgeteilt. Bei der ersten Membran wurde mit TFA (90% in DMF) 2 mal 1h das Glycinamid abgespalten und nach Derivatisierung (**Schema 81**) die Stoffmenge n_A an Glycinethylester über GC-MS bestimmt. Die andere Membran wurde mit einer Lösung (0.1 M) des pentafluorphenolaktivierten Bausteins **91** getränkt und nach 1 h gründlich gewaschen. Danach wurde das Zelluloseplättchen mit gesättigter NH_3 in MeOH (16 h) geschwenkt und erneut gewaschen. Anschließend wurde das Plättchen unter den gleichen Bedingungen wie beim ersten Plättchen mit TFA gespalten und die Stoffmenge n_B des Glycinethylester bestimmt. Aus der Differenz zwischen n_A und n_B wurde der Umsatz (91%) an Verbindung **109** bestimmt. Durch Wiederholen des Versuchs mit anschließender MALDI-TOF-Messung konnte das Produkt mit der Masse von 637.25 [M+Na]^+ eindeutig nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass sich der Rink-Amid-Linker sehr gut für die Glycopeptidsynthese eignet.

Schema 81: Stabilität des Rink-Amid-Linkers unter basischen Bedingungen

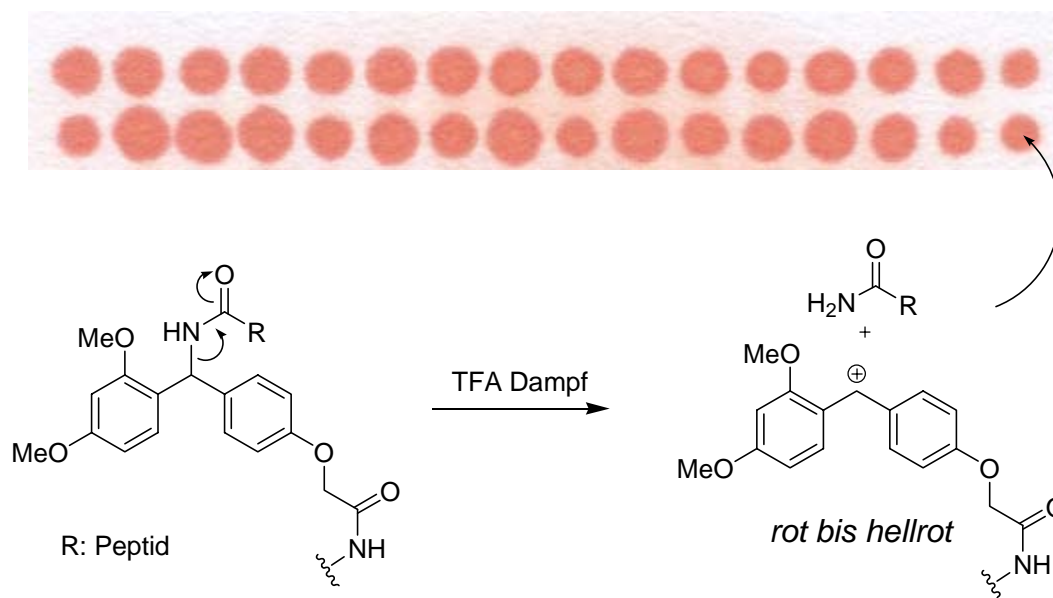


Um eine vollständige Abspaltung des Glycopeptids zu bekommen, sollten folgende Kriterien beachtet werden:

- es sollte zweimal 1 h mit 90% TFA in DCM abgespalten werden (effektiver als 2 h am Stück)
- gründliches Nachwaschen mit DCM und EtOH (Auswaschen des Glycopeptids)
- beim Spalten starke mechanische Beanspruchung durch Schütteln vermeiden (Gefahr Zersetzung der Zellulosemembran größer)
- Zugabe von 3% TIS; H₂O fängt Kation bei der Spaltung des Linkers ab (verhindert Nebenreaktionen)

Eine andere Methode ist die Abspaltung mit dampfförmigen TFA. Dazu wird in einen Exsikkator 90%-ige TFA-Lösung in DCM vorgelegt und bis zum Erreichen der Dampfsättigung (ca. 2 h) gewartet. Die Membran wird in den Exsikkator gelegt (30 min), wobei der aufgespottete Rink-Amid-Linker bei der Spaltung zu roten Spots führt. Bei dieser Methode werden alle Verbindungen auf den Spots unter Erhalt der räumlichen Adressierung abgespalten. Die adhäsiv gebundenen Glycopeptide können anschließend ausgestanzt und mit einem Lösemittel (DCM, EtOH) ausgewaschen werden. Vorteil dieser Methode ist eine sehr schonende und markierungsfreie Abspaltung des Glycopeptids (**Schema 82**).

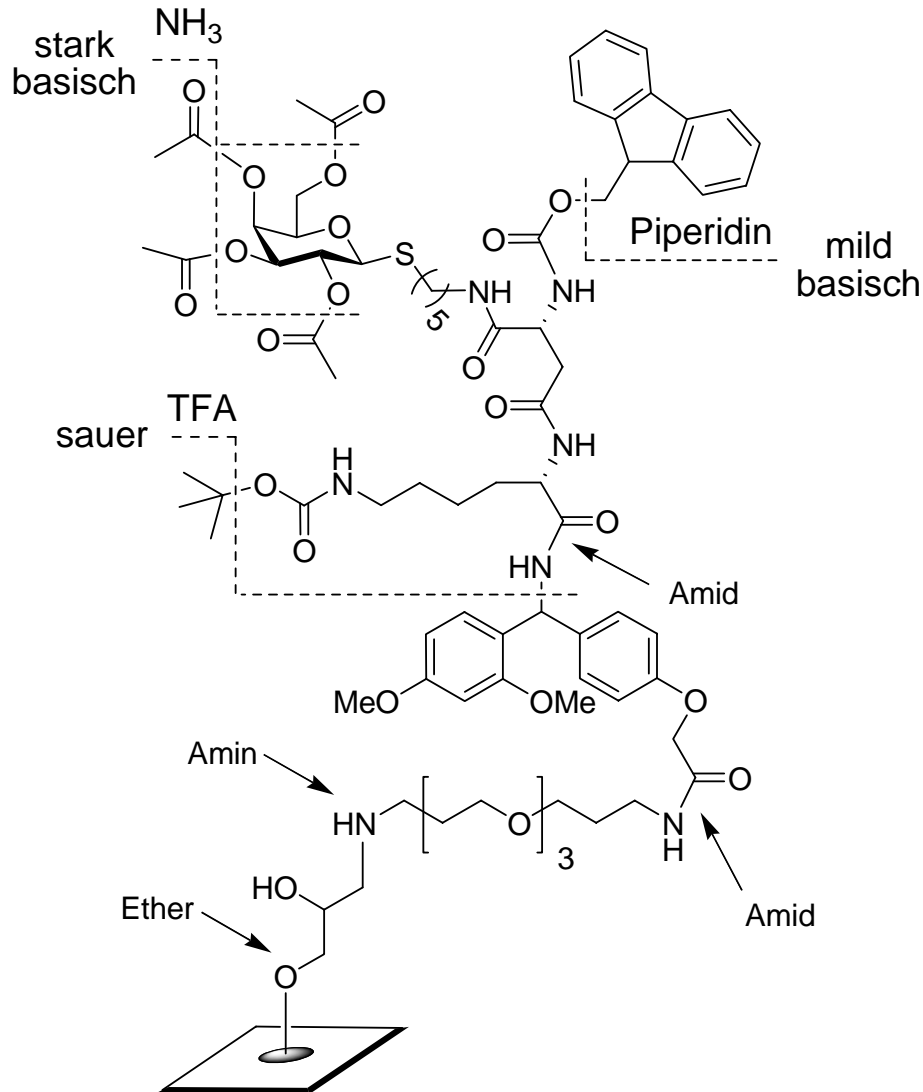
Schema 82: Spaltung des Rink-Amid-Linkers mit dampfförmigem TFA



Damit hat sich der Rink-Amid-Linker als sehr vorteilhaft für die Glycopeptidsynthese herauskristallisiert. Im **Schema 83** ist nochmals die Synthesestrategie bei Verwendung des Linkers zusammengefasst. Dabei wird das Peptidrückgrat über Fmoc-Chemie aufgebaut. Danach werden die Acetylschutzgruppen am Zucker abgespalten und anschließend wird der Rink-

Amid-Linker mit TFA gespalten, wobei die Seitenschutzgruppen der Aminosäuren gleichzeitig freigesetzt werden. Wie außerdem zu erkennen ist, besitzt das aufgebaute Linker-System basenstabile Verknüpfungen (Amid, Amin, Ether), was die Grundvoraussetzung für eine basische Deacetylierung der Zucker auf der Zellulosemembran ist.

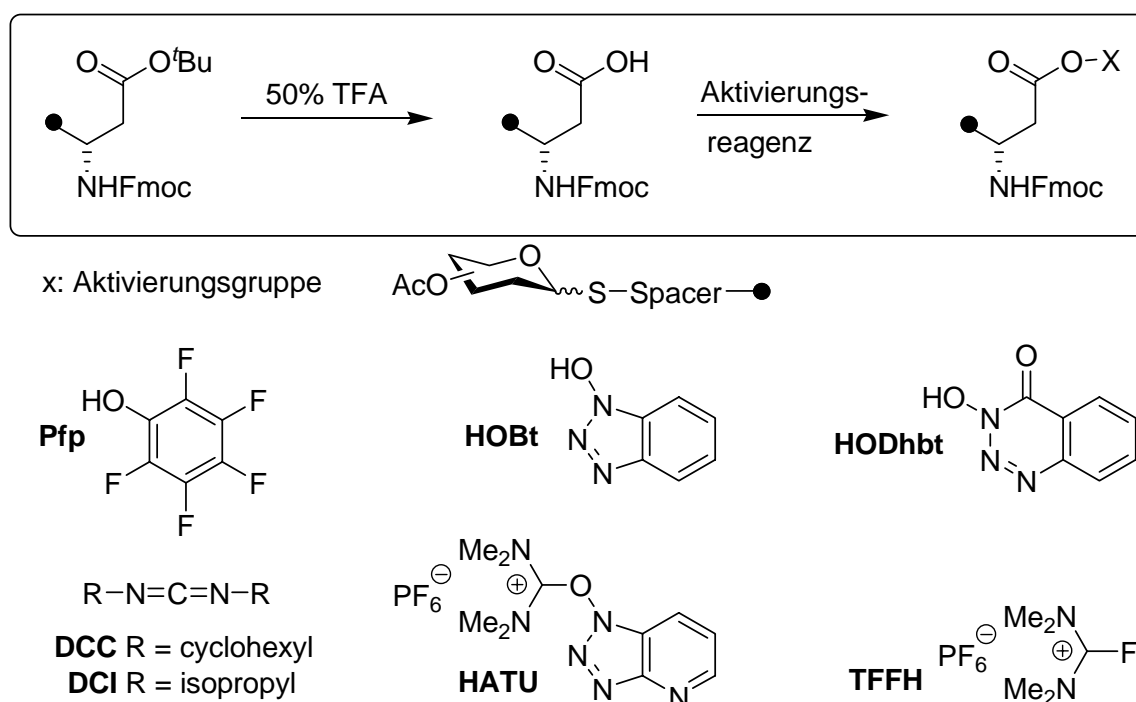
Schema 83: Synthesestrategie der S-Glycopeptide auf der Zellulosemembran



6.2.5 Auswahl der Peptidaktivierung am Aminosäurerückgrat

Für die Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine kommen verschiedene in der Literatur beschriebene Reagenzien in Frage^{[266],[267]}. In der Peptidsynthese unterscheidet man zwischen Aktivester-, Azid-, Säurehalogenid-, gemischter Anhydrid-, Carbodiimid-, Phosphoniumsalz- und Uronium/Guanidiniumsalz- Aktivierungen. Dabei haben sich vor allem in situ-Aktivierungen durchgesetzt, die vor der Reaktion mit der Aminosäure gemischt werden und eine anschließende Acylierung der Säurefunktion ermöglichen (**Schema 84**).

Schema 84: Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine durch in situ-Reagenzien

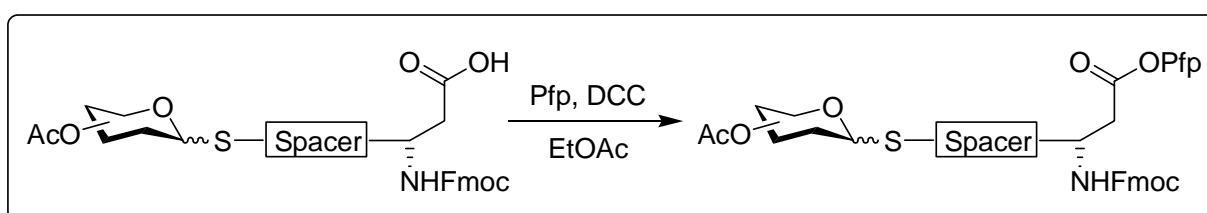


Bei der Carbodiimid-Methode^[268] wird in der Festphasensynthese DCI in Gegenwart von HOBt oder HODhbt mit der Carboxylfunktion umgesetzt, wobei sich ein reaktiver *O*-Acylisoharnstoff bildet. Dabei verhindern HOBt bzw. HODhbt als Additive intramolekulare Reaktionen (Racemisierung) während der Peptidsynthese, die durch Bildung von Aktivestern Nebenreaktionen zurückdrängen und ausschließlich zur Peptidknüpfung führen. DCC dagegen wird in der Lösungssynthese (DCM, EtOAc) eingesetzt und bildet im Gegensatz zu DCI während der Reaktion unlöslichen DCH (Dicyclohexylharnstoff), der nach der Reaktion abfiltriert wird. Weitere in situ-Reagenzien sind die käuflichen Uroniumsalze^[269] HATU und TFFH, die über ein Iminium-Salz die Carboxylfunktion aktivieren. Dabei besitzt das HOAt (7-Aza-1,2,3-Hydroxybenzotriazol) im HATU die gleiche Funktion wie HOBt bei DCC und gilt als besonders racemisierungssicher. TFFH^[270] bildet mit der Säurefunktion dagegen keinen Aktivester sondern ein Säurefluorid^[271], das im Gegensatz zu den Säurechloriden stabiler ist und sich für sterisch anspruchsvolle Peptidkupplungen besonders gut eignet. Für alle Ak-

tivierungsreagenzien ist die wichtigste Voraussetzung eine schnelle und quantitative Acylierung des festphasengebundenen *N*-terminalen Peptids ohne Nebenreaktionen (Racemisierung, intramolekulare Reaktionen). Für die Untersuchungen der *in situ*-Reagenzien, wird die *t*Bu-Gruppe von den Fmoc-geschützten *S*-Glycopeptid-Bausteinen mit TFA (50% in DCM) abgespalten und die Carboxylfunktion mit verschiedenen Reagenzien aktiviert.

Neben den *in situ*-Aktivierungen hat sich der Pentafluorphenolaktivester (Pfp) für die Festphasensynthese von Glycopeptiden besonders bewährt^{[272],[273],[265]}. Dazu wird über eine DCC-Aktivierung Pentafluorphenol (Pfp) mit der freien Säurefunktion des Glycopeptids verestert (Ausbeuten 70-80%, **Schema 85**)^[274].

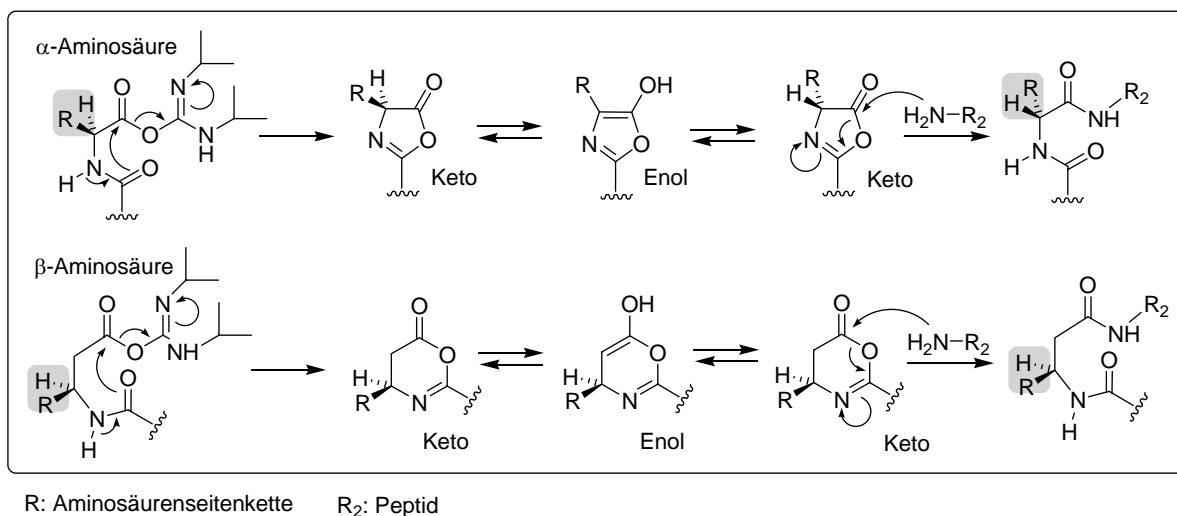
Schema 85: Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine mit Pentafluorphenol



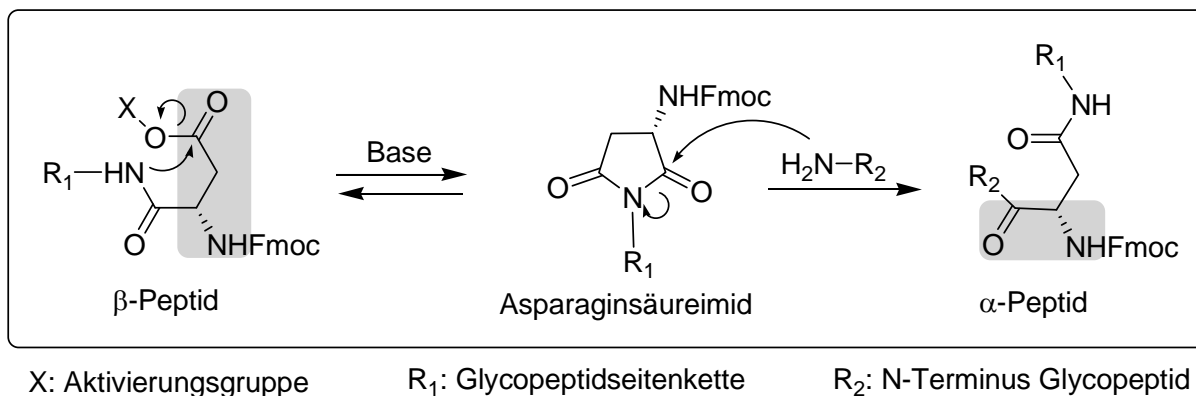
Die Pfp-Ester bieten für Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine eine Reihe von Vorteilen:

- sie sind hinreichend stabil (Luft, H₂O)
- sie lassen sich im lösemittelfreien Zustand gut lagern (mehrere Monate)
- sie können vor der Glycopeptidsynthese gereinigt werden (HPLC)
- sie sind für eine automatisierte Synthese gut einsetzbar (stabil)
- bei der Glycopeptidsynthese kann basenfrei gearbeitet werden (keine DIPEA)

Anders als bei den α -Aminosäuren besteht bei den β -Aminosäuren nicht die Gefahr über ein Oxazol-5(4*H*) zu racemisieren, da im Keto-Enol-Gleichgewicht durch die zusätzliche CH₂-Gruppe die Konfiguration des asymmetrischen Kohlenstoffatoms erhalten bleibt und so keine Racemisierung stattfindet (**Schema 86**).

Schema 86: Vergleich Racemisierung von α -Aminosäuren und β -Aminosäuren

Dafür kann bei der Aktivierung des Glycopeptid-Bausteins eine intramolekulare Nebenreaktion der Asparaginsäure stattfinden. In Gegenwart von Base und bei sterisch anspruchsvollen Glycopeptidkupplungen kann die aktivierte Säurefunktion mit dem Amin der Glycopeptidseitenkette intramolekular unter Ausbildung eines Asparaginsäureimids reagieren, das im Folgeschritt mit dem *N*-terminalen Glycopeptid zu einer α - anstatt zu einer β -peptidischen Verknüpfung führt. Diese Nebenreaktion ist bei der Synthese größerer *N*-Glycopeptiden bekannt und wird durch die Aktivierungsmethode beeinflusst^[275] (**Schema 87**).

Schema 87: Nebenreaktion bei der Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine

Um die vorgestellten Aktivierungsreagenzien auf ihre Anwendbarkeit für die SPOT-Synthese von *S*-Glycopeptiden zu untersuchen, sollen mit dem entschützten *S*-Glycopeptid-Baustein **110** tetramere *S*-Glycopeptide aufgebaut werden. Dazu wird Baustein **110** mit den in situ-Reagenzien TFFH, HATU, HOBT/DCI aktiviert und auf eine aminoderivatisierte Membran aufgespottet (2 x 20 min). Parallel dazu wird der pentafluorphenolaktivierte Baustein **96** in gleicher Weise aufgespottet und einmal zusätzlich mit HODhbt als Additiv versetzt^[193] (**Schema 88**)

Die tetrameren Glycopeptide werden anschließend mit TFA von den Spots abgespalten und mittels MALDI-TOF auf ihren vollständigen Umsatz überprüft (**Tabelle 18**).

Schema 88: Aktivierung der S-Glycopeptidbausteine

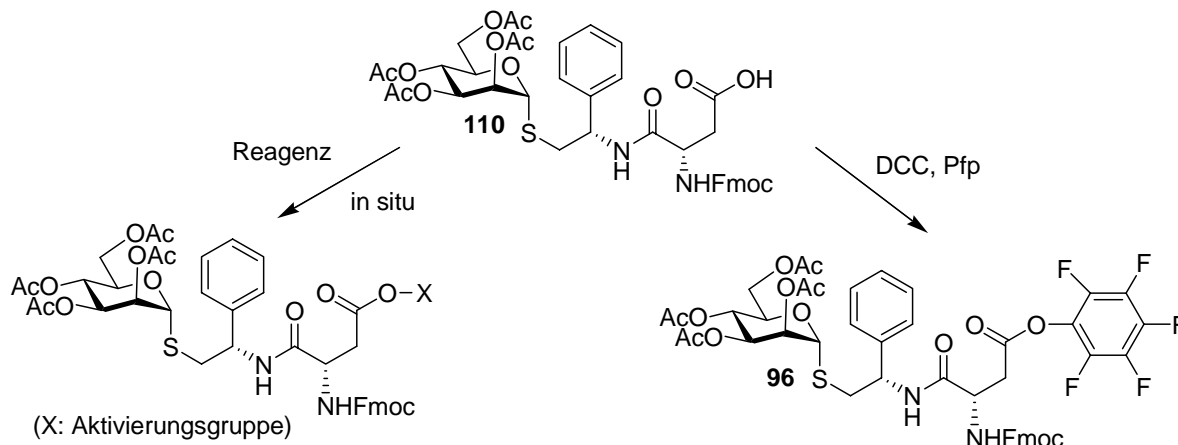
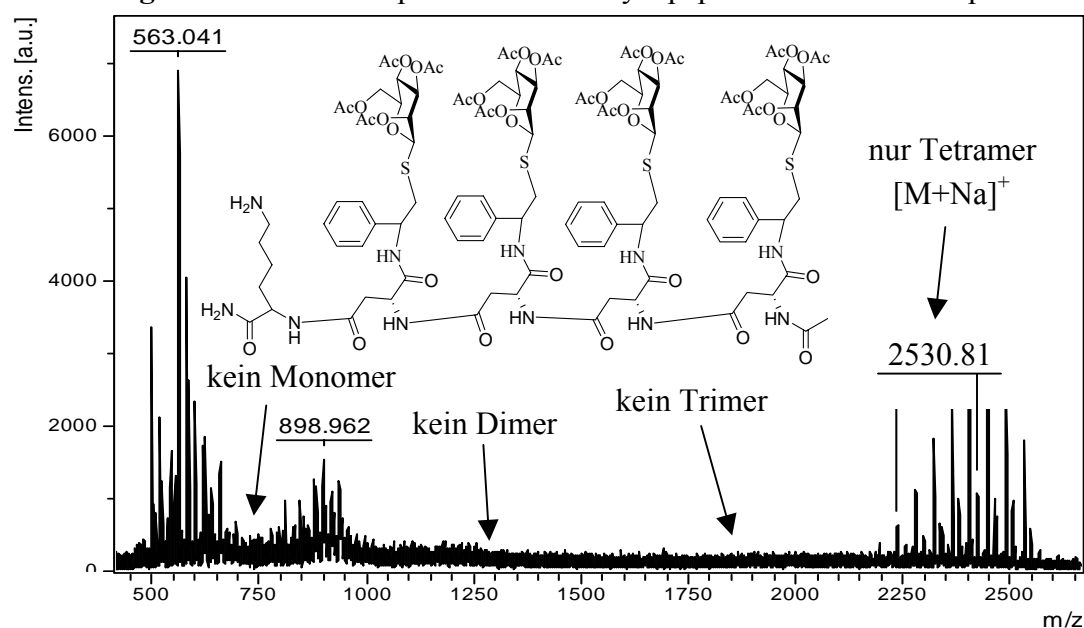


Tabelle 18: Aktivierung der S-Glycopeptid-Bausteine

| Aktivierung | MALDI-TOF [% Verhältnis der Peak Höhen] | | | |
|--------------|---|-------------------------------------|--------------------------------------|--|
| | Monomer 790.3 [M+Na] ⁺ | Dimer 1370.5 [M+Na] ⁺ | Trimer 1959.6 [M+Na] ⁺ | Tetramer 2530.8 [M+Na] ⁺ |
| TFFH | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HATU | 0 | 0 | 31 | 69 |
| HOBt / DCI | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pfp | 0 | 0 | 91 | 9 |
| Pfp / HODhbt | 0 | 0 | 0 | 100 |

Wie aus der **Tabelle 18** ersichtlich fallen die Ergebnisse sehr unterschiedlich aus. Die Aktivierung mit TFFH und HOBt / DCI ergibt überhaupt keinen Umsatz und ist damit völlig ungeeignet. HATU zeigt das zweitbeste Ergebnis, wobei immer noch 31% an Trimer nicht zum Tetramer umgesetzt wurden. Die reine Pfp-Aktivierung bleibt auf der Trimer-Stufe stehen und liefert nur 9% an Tetramer. Interessanterweise ändert sich durch Zugabe von HODhbt (1/3 Äquivalente zu Pfp) das Verhältnis vollständig und im MALDI-Spektrum ist nur das Tetramer (100%) zu erkennen (**Abbildung 2**). Somit zeigt eine Aktivierung mit Pfp / HODhbt optimale Umsätze für die SPOT-Synthese und soll für den Aufbau tetramerer S-Glycopeptid-Bibliotheken verwendet werden.

Abbildung 2: MALDI-TOF Spektrum des S-Glycopeptidtetramers über Pfp/HODhbt

6.2.6 Durchführung der SPOT-Synthesen

Für die Durchführung der SPOT-Synthese werden verschiedene Chemikalien und Ausrüstungsgegenstände benötigt^{[276],[277]}. Die Chemikalien sollten vor dem Gebrauch destillativ gereinigt werden. Insbesondere DMF^[278] und NMP müssen frei von Aminen sein um ein frühzeitige Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe während des Waschens und der Synthese zu vermeiden.

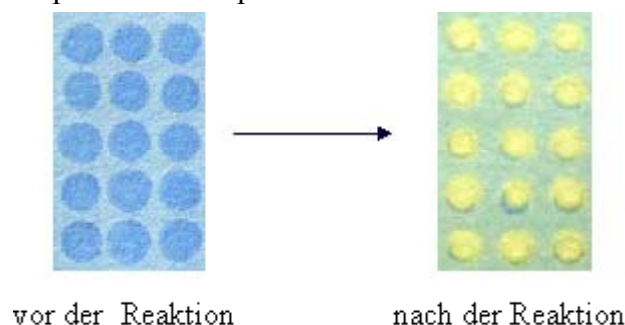
Tabelle 19: Chemikalien und Ausrüstung für die SPOT-Synthese

| Chemikalien und Ausrüstung | Beschreibung / Menge |
|---|---|
| Eppendorfpipette | für manuelles Aufspotten (0.1-10 μ L) |
| Föhn | Kaltluftstufe zum Trocknen der Membranen |
| Orbitalschüttler | zum Bewegen der Membran beim Waschen |
| Glasschale | zum Waschen und Aufbewahren der Membranen |
| Membranen | Whatman Filterpapier Chr 1 (No.1001917) |
| NMP | Amin frei für SPPS (Fluka) 100 mL |
| DMF, EtOH, Dioxan | zum Waschen der Membran (DMF Amin frei) 2 L |
| Piperidin, Ac ₂ O, TFA, DCM, TIS | zum Entschützen und Cappen 100 mL |
| Bromphenolblau (BPB) | zur visuellen Reaktionskontrolle 1 g |
| DCI, HODhbt, Pfp | zur Peptidaktivierung 25 mL, 10 g, 10 g |

Wird eine manuelle SPOT-Synthese durchgeführt, ist es ratsam, vor dem Aufspotten mit einem Bleistift die späteren Spots als Punkt zu markieren und durchnummerieren. Die freien

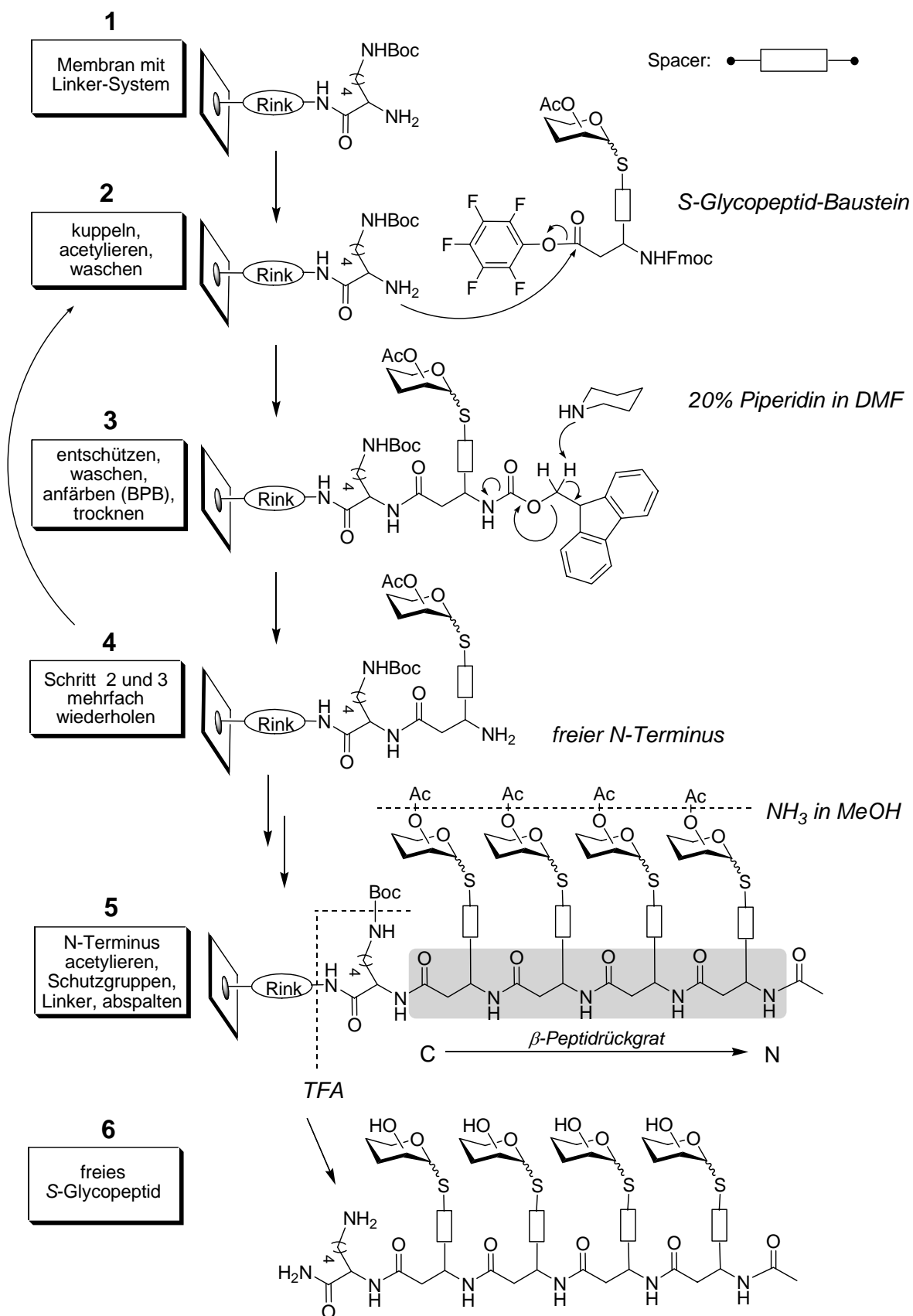
Aminfunktionen während der Synthese können mit Bromphenolblau (BPB) sichtbar gemacht werden, was eine einfache Methode darstellt, um die Reaktion während der SPOT-Synthese zu verfolgen (**Abbildung 3**).

Abbildung 3: Farbe der Spots mit Bromphenolblau vor und nach der Reaktion



Kurz vor dem Auftüpfeln wird die benötigte Menge des Pfp-aktivierten *S*-Glycopeptid-Baustein und HODhbt (1/3 äq) in NMP (0.1 M) gelöst. Danach ist der Baustein zum Auftragen einsatzbereit und sollte nicht länger als eine Woche aufbewahrt werden. Um ölige Pfp-Ester genau zu dosieren, werden diese in DCM gelöst (0.1 M), pipettiert, evaporiert und das Verfahren wird wie oben besprochen verfahren. Wie im **Schema 89** dargestellt, wird der Baustein auf die aminoderivatisierte Zellulosemembranen (**1**) aufgetüpfelt (**2**) (2 x 20 min). Danach werden nicht umgesetzte Aminofunktionen acetyliert (capping), um Fehlsequenzen beim wiederholten Aufspotten zu vermeiden. Überschüssiges Ac₂O wird durch mehrmaliges Waschen mit DMF und EtOH entfernt. Danach wird mit 20%igem Piperidin in DMF die Fmoc-Gruppe selektiv entschützt (**3**). Anschließend wird durch gründliches Waschen mit DMF und EtOH alles Piperidin entfernt. Um eine vollständige Reinigung und positive Kopplungsreaktion zu überprüfen, wird die Membran mit Bromphenolblau eingefärbt. Dabei werden die Spots mit freien Aminofunktionen als blaue Flecken sichtbar (**Abbildung 4**). Färbt sich die ganze Membran, wurde nicht ausreichend mit EtOH gewaschen. Tritt keine Färbung auf, so hat der vorherige Kopplungsschritt nicht funktioniert oder DMF/NMP war nicht aminfrei. Nach dem Trocknen mit dem Kaltluftföhn oder mit Vakuum im Exsikkator ist die Membran für einen erneuten Syntheszyklus vorbereitet (**4**) und durch Wiederholen der Schritte (**2 – 3**) wird das β -Peptidrückgrat vom *C*- zum *N*-Terminus aufgebaut (**5**). Ist die Synthese beendet, wird der freie *N*-Terminus acetyliert und die Alkoholfunktionen am Zucker (über Nacht) mit Ammoniak in Methanol deacetyliert. Nach dem Waschen mit EtOH und erneutem Trocknen kann ein Lectin-Screening durchgeführt werden oder der Rink-Amid-Linker wird gleichzeitig mit der Boc-Schutzgruppe der Lysinseitenkette durch TFA abgespalten. Mit dem freien Glycopeptid (**6**) kann man nun eine Analytik durchführen oder über das freie Amin der Lysinseitenkette an einem anderen Träger anbinden (RIFS, SPR, Magentik Beats) oder eine Verwendung als Baustein für andere Moleküle vornehmen (Wirkstoffe, Glycopeptidtrimere, Glycoproteine).

Schema 89: Aufbau der S-Glycopeptide über SPOT-Synthese

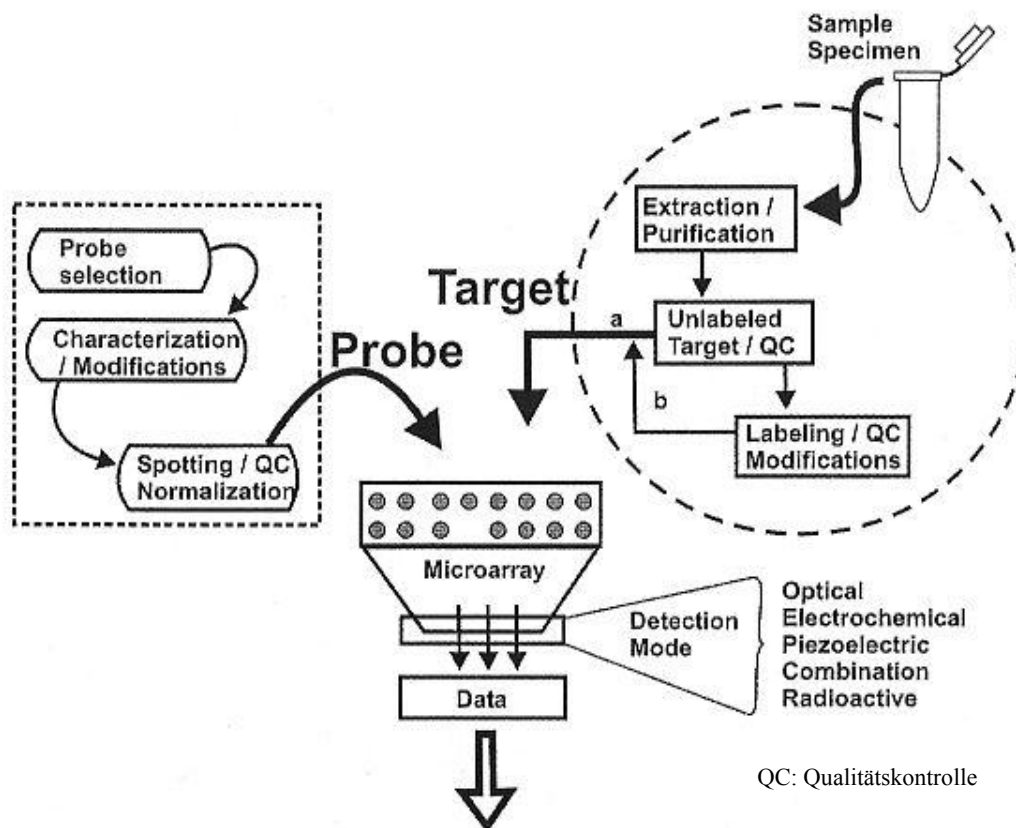


6.2.7 Aufbau kombinatorischer S-Glycopeptid-Bibliotheken

Mitte der neunziger Jahre hat mit der Microarray-Technologie und dem Hochdurchsatz-Screening (HTS) ein neuer Trend beim Screening großer Substanzbibliotheken eingesetzt. Bei dem Begriff Array (große Aufstellung) handelt es sich um eine räumliche Verteilung vieler Probemoleküle in Form von Punkten (100 bis 200000 pro cm²) auf einer planaren Oberfläche mit definierter Position. Dazu werden die Substanzen mit speziellen Verfahren (mechanisches Contact-Spotting, Piezo-Dispenser-Technologie) auf einen modifizierten Träger (Glas, Gold, Polymere, Semikonduktor) aufgetüpfelt^{[279],[280]}. Dieses Verfahren erlaubt mit sehr kleinen Substanzmengen einen großen Array zu erzeugen und in kurzer Zeit mehrere tausend Bindungsstudien parallel durchzuführen.

Die Arrays werden nach den aufgetragenen Substanzen in DNA-, Protein- und Peptid-Chips unterteilt. Die DNA-Chips^{[281],[282]} haben bereits Marktreife erlangt und dienen als Fänger-Sonden zur Untersuchung von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen. Protein-Chips^{[283],[284],[285]} sind dagegen noch in der Entwicklungsphase, weil eine gerichtete Anbindung von Proteinen auf der Oberfläche unter Erhalt der Affinität (Denaturierung) schwer zu realisieren ist. So hat sich bei den Peptid-Chips^[286] gezeigt, dass mit zunehmender Aminosäuresequenz eine sterische Ausrichtung der Peptide stattfindet, die sehr unterschiedlich von den Bindungspartnern erkannt werden. Deshalb ist man nun dabei, selektive Methoden, z. B. self assembled layers^[287], für die kovalente Anbindung (neue Anker-Systeme) der Probemoleküle an die Trägeroberfläche zu entwickeln, um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen. Peptid-Arrays verwendet man zum Screening von Proteinkinasen, Proteasen und Anikörpern. Allgemein lässt sich sagen, dass die Bio-Chips zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen dienen, um ein besseres Verständnis von biomolekularen Zusammenhängen zu bekommen. Insbesondere könnten Bio-Chips in der Zukunft diagnostische Aufgaben bei immunologischen Fragestellungen übernehmen, um hiermit ein Krankheitsbild schnell und sicher zu erkennen^[288]. Um einen Microarray aufzubauen müssen mehrere Punkte berücksichtigt werden (**Schema 90**):

- es müssen viele unterschiedliche Probemoleküle verfügbar sein (Arraygröße)
- die Probemoleküle müssen an der Trägeroberfläche gebunden werden (Anker)
- der Träger sollte wenig unspezifische Wechselwirkungen beim Screening zeigen
- die Targetmoleküle müssen sich detektieren lassen (labeln)
- durch die geringen Substanzmengen ist auf höchste Reinheit zu achten
- die Probemoleküle müssen reproduzierbar aufgetragen werden (Roboter)
- es muss ein geeignetes Detektionssystem vorhanden sein (SPR, Fluoreszenz)
- zur Auswertung ist ein geeignetes Datensystem notwendig (Scanner, Computer)

Schema 90: Prozess bei der Entwicklung von Microarray-Systemen^[289]

Seit jüngster Zeit gibt es Anstrengungen Kohlenhydrat-Microarrays herzustellen^[290]. Dazu wurde vor allem die Anbindung von modifizierten Kohlenhydraten auf verschiedene Trägeroberflächen untersucht. Als Träger wurden nitrozellulosebeschichtete Glasplatten^[291], Goldoberflächen^[292] und mit SH-Gruppen derivatisierte Glasplatten^{[293],[294]} verwendet^[295]. Um eine gleichmäßige Ausrichtung der Zucker an der Trägeroberfläche zu ermöglichen, wurden entweder die Träger oder die Zucker selbst mit einem Linkersystem modifiziert^[296]. Erste erfolgreiche Bindungsstudien mit Lectinen zeigten, dass kleine Oligosaccharide gut für Microarray-Experimente geeignet sind^{[297],[298]}.

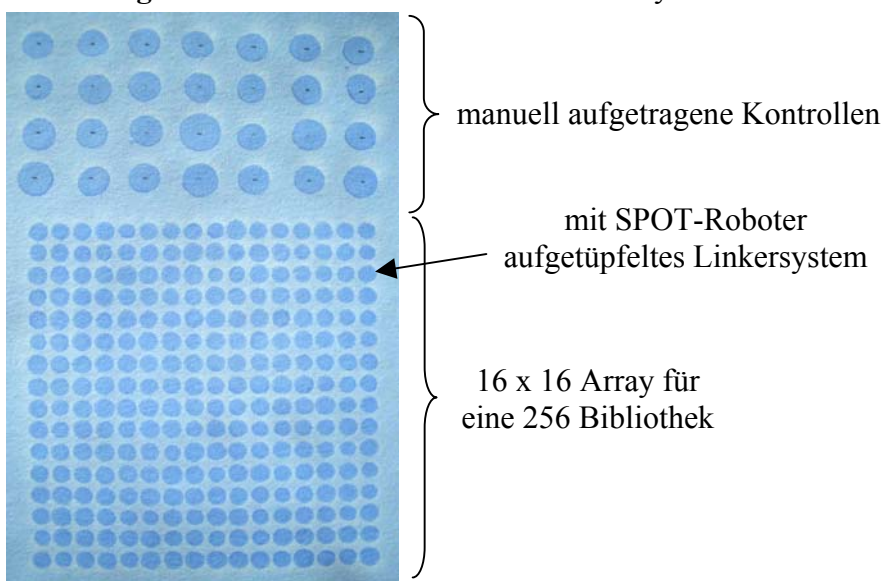
Trotz der enormen Miniaturisierung bleibt die Schwierigkeit, reines Probenmaterial mit bekannter chemischer Struktur in ausreichender Vielfalt bereitzustellen und bremst dadurch die Anwendung von Kohlenhydrat-Chips. Die Charakterisierung und Reinigung isolierter Oligosaccharide ist häufig zeitaufwendig, detaillierte NMR-Untersuchungen mit ausreichender Substanz sind zur Ermittlung der genauen Struktur notwendig. Aufgrund des stark heterogenen Charakters von Oligosacchariden in Form von Glycopeptiden wird auch in Zukunft eine Naturstoffisolierung problematisch sein. Deshalb ist es wichtig, möglichst einfache Synthesestrategien zu entwickeln, um genügend Probenmaterial für einen Kohlenhydrat-Microarray bereitzustellen. Synthetische Neo-Glycokonjugate mit einem durchdachten Synthesekonzept könnten zur Lösung des Problems einen wichtigen Beitrag leisten. Zur Herstellung kleiner Substanzmengen (10-100 nmol/Spot) eignet sich die SPOT-Synthese besonders gut. Das Syn-

thesekonzept, über Glycopeptid-Bausteine größere Glycopeptide herzustellen, hat eine Reihe von Vorteilen gegenüber einer reinen Oligosaccharidsynthese:

- Synthese über Peptidrückgrat vermeidet komplexe Oligosaccharidsynthesen
- milde Synthesebedingungen mit Fmoc-Schutzgruppenstrategie möglich
- kombinatorische Parallelsynthese durch Glycopeptid-Bausteine möglich
- Glycopeptid-Bausteine können vor der Synthese sehr leicht gereinigt werden
- Glycopeptid-Bausteine sind über optimierte Synthesen einfach zugänglich
- Glycopeptid-Bausteine lassen sich im Vorfeld gut modifizieren
- Eigenschaften der Glycopeptide lassen über Glycopeptid-Bausteine beeinflussen

Um das Potential des Synthesekonzepts vollständig zu nutzen, soll mit Hilfe eines SPOT-Roboters eine kombinatorische Parallelsynthese mit den *S*-Glycopeptid-Bausteinen durchgeführt werden. Aus 4 *S*-Glycopeptid-Bausteinen ergeben sich $4^4 = 256$ denkbare Kombinationen tetramerer *S*-Glycopeptide, die sich durch ihre Sequenz voneinander unterscheiden. Dazu wurde auf einer Zellulosemembran (9 x 13 cm) ein 16 x 16 Array für 256 Glycopeptiden aufgebaut (**Abbildung 4**). Um die Vollständigkeit der Synthese später zu überprüfen, wurden im oberen Teil der Membran manuelle Spots als Kontrollen aufgetragen, die für analytische Zwecke dienen sollen. Diese können für ein späteres Lectin-Screening auch zum Auftragen von positiven oder negativen Kontrollen dienen. Dabei wurden die *S*-Glycopeptid-Bibliotheken so konzipiert, dass sie direkt für ein Lectin-Screening verwendet werden können.

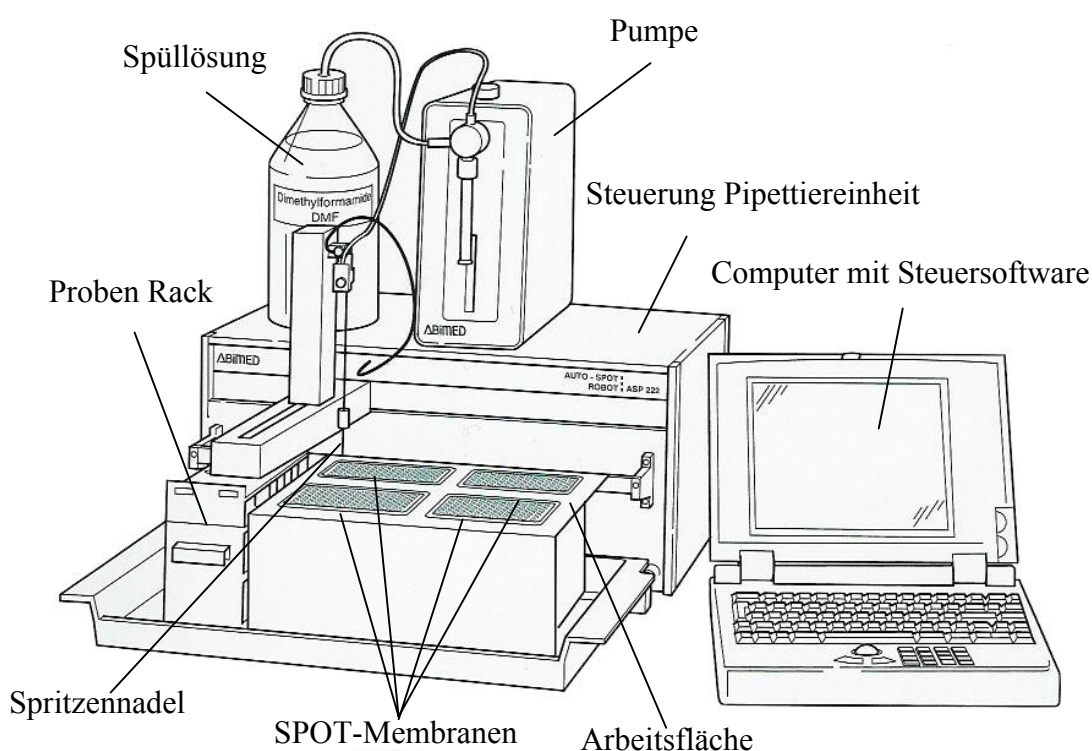
Abbildung 4: Zellulosemembran mit 16 x 16 Array für eine 256er Bibliothek



Zum Aufbau der Bibliotheken über eine kombinatorische Parallelsynthese wurden mit dem SPOT-Roboter folgende Schritte durchgeführt:

1. Positionieren der Spritzenadel über XYZ-Koordinaten im Standard-File
2. Definieren der SPOT-Sequenz im Sequence-File
3. Laden des Sequence-File in die Steuersoftware
4. Einstellen der SPOT-Parameter mit anschließendem Probelauf
5. Beladen des Proben-Rack mit den S-Glycopeptid-Bausteinen
6. Aufbringen der Membranen auf die Arbeitsfläche
7. Starten der Software und Abarbeiten der vorgegebenen Sequenz vom Roboter

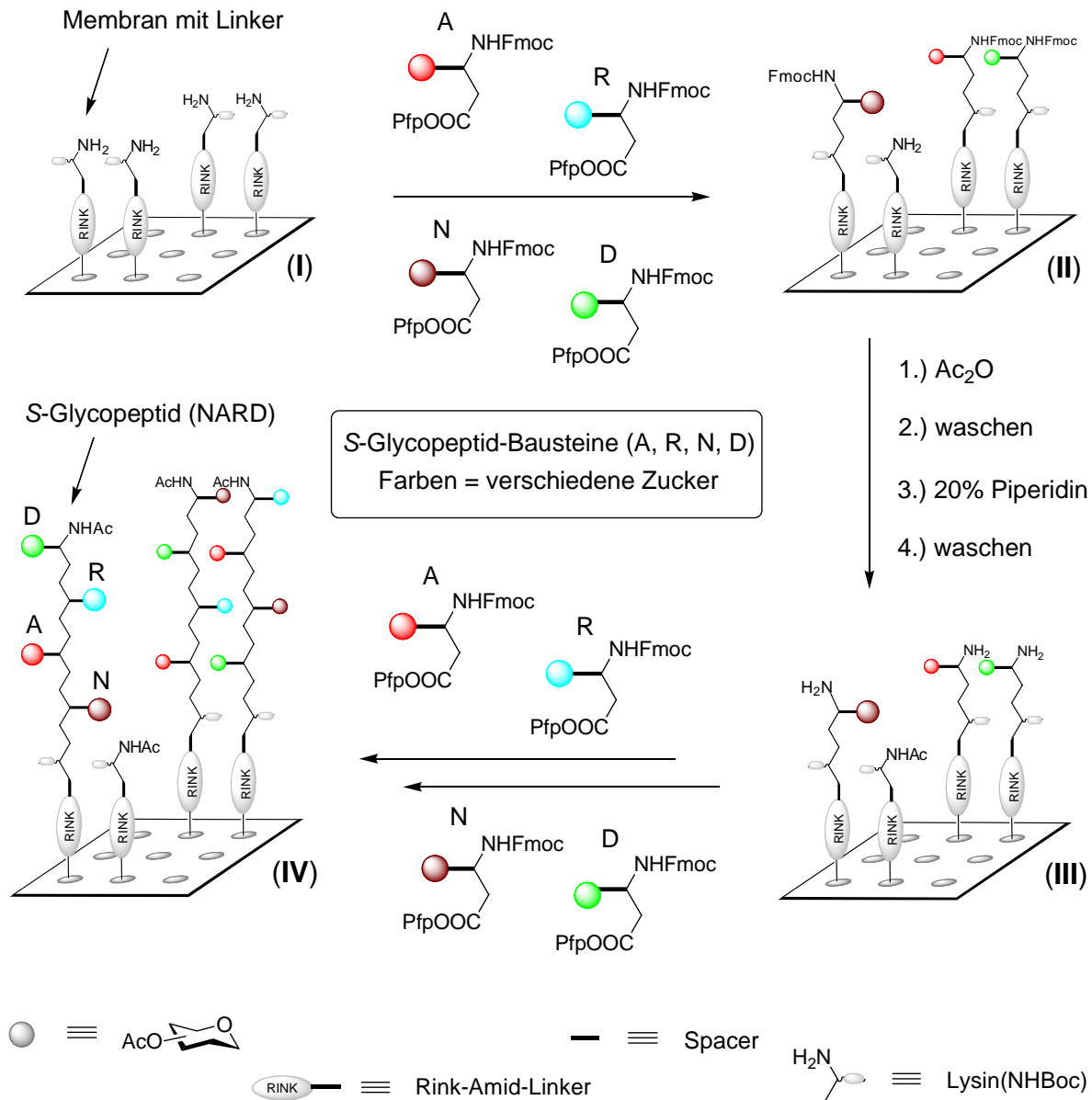
Abbildung 5: Aufbau des SPOT-Roboters (ASP 222)^[299]



Bei der Definition des Sequence-Files, wurden dem Roboter alle 256 Kombinationen in Form von 4 Buchstaben (z.B. A, R, N, D) vorgegeben. Dabei entspricht jedem Buchstabe eine Position im Proben-Rack und damit einem bestimmten Baustein (A = Baustein 1, R = Baustein 2 usw.). Die Sequenz wurde mit einem kleinen Computerprogramm namens *mutate*^[300] erzeugt, welches aus den 4 vorgegebenen Buchstaben, alle denkbaren Kombinationen in Form einer Buchstabenreihe als Text (ASCII) erzeugt, die direkt in das Sequence-File kopiert wurden.

Über das Standard-File wurde dem Roboter mitgeteilt wo sich die Membranen befinden und welche Positionen die Spritzennadel annehmen darf. Mit dem Roboter können 4 Membranen gleichzeitig mit unterschiedlichen Bibliotheken erstellt werden. Dazu können im Sequence-File 4 Sequenzreihen eingetragen werden, die der Roboter nacheinander abarbeitet und nach den Vorgaben des Standard-Files auf der Arbeitsfläche des Roboters auftupfelt. Die mögliche Größe der Bibliotheken hängt dabei von der Größe der Spot und der zur Verfügung stehenden Membranfläche ab. Auf eine 9 x 13 Membran sollten nicht mehr als 384 Spots aufgetragen werden. Beim Nutzen der gesamten Arbeitsfläche können bis zu 8000 Peptide auf einer Zellulosemembran (19 x 28 cm) synthetisiert werden^[301].

Der Aufbau einer *S*-Glycopeptid-Bibliothek wird im **Schema 91** veranschaulicht. Auf eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde der Rink-Amid-Linker und Lysin (mit Boc geschützter Seitenfunktion) vom SPOT-Roboter aufgetupfelt, so dass ein Array (**I**) für eine kombinatorische Parallelsynthese erzeugt wurde. Im nächsten Schritt arbeitet der Roboter die vorgegebene Sequenz ab (256iger Buchstabenreihe aus A, R, N, D) indem er aus dem Proben-Rack die aktivierten *S*-Glycopeptid-Bausteine (A, R, N, D) über die Spritzennadel aufnimmt und auf dem vorgegebenen Array verteilt. Nach dem Auftragen reagieren die freien Amine des Linkers mit der pentafluorphenolaktivierten Carboxylfunktion der Bausteine unter Ausbildung einer Amidbindung und kuppeln dabei mit der Membranoberfläche (**II**). Die verschiedenen Farben der Kugeln im **Schema 91** sollen dabei unterschiedliche Zucker einzelner Bausteine (A, R, N, D) sein. Nach diesem Syntheseschritt müssen die Membranen von der Arbeitsfläche des Roboters entfernt werden, um sie für den nächsten Synthesezyklus vorzubereiten. Dazu werden nicht umgesetzte Aminofunktionen acetyliert, um spätere Fehlsequenzen zu vermeiden. Nach dem Waschen der Membranen werden die N-terminalen Fmoc-Gruppen entschützt und die Membranen erneut gewaschen. Die getrockneten Membranen (**III**) sind jetzt für den nächsten Kupplungsschritt vorbereitet und werden wieder auf der Arbeitsfläche befestigt. Nun geht der Roboter zum nächsten Synthesezyklus über und tupfelt die Bausteine nach der vorgegebenen Sequenz erneut auf. Danach werden die Membranen wieder entfernt und analog wie oben beschrieben für den nächsten Synthesezyklus vorbereitet. Nach insgesamt vier Zyklen (**IV**) hat der Roboter die vorgegebene Synthesesequenz (256iger Buchstabenreihe aus A, R, N, D) abgearbeitet und auf den einzelnen Spots (256) befinden sich tetramere *S*-Glycopeptide, die sich durch die Abfolge einzelner Bausteine (z. B. *S*-Glycopeptid NARD) voneinander unterscheiden. Mit 4 *S*-Glycopeptid-Bausteinen (A, R, N, D) erhält man so 256 neue *S*-Glycopeptide mit unterschiedlicher Sequenz.

Schema 91: Aufbau der S-Glycopeptid-Bibliotheken über SPOT-Synthese

Durch die räumlich getrennte Synthese kann jedem Spot auf der Membran eine eindeutige Sequenz zugeordnet werden. Das Computer-Programm erzeugt während der Synthese ein Report- (.rep) und ein Peptid-File (.pep). Im Peptid-File wird jedem erzeugten Spot eine Nummer (1-256) mit der zugehörigen Sequenz (1 = NARD) zugeordnet und im Report-File werden die Syntheszyklen protokolliert. Mit dem Programm FindSPOT lässt sich über die Spot Nummer (Peptid-File) jedem Spot die zugehörige Sequenz zuordnen.

Die verwendeten Parameter zum Aufbau der 256iger Bibliotheken sind in **Tabelle 20** zusammengefasst. Berechnet man aus den Parametern die benötigte Menge an S-Glycopeptid-Baustein pro 256iger Bibliothek (256 Spots x 4 Zyklen x 2 Wiederholungen x 0.1 μL x 0.1 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$), so ergeben sich 20.48 μmol . Bei einer Molmasse von 1000 g/mol werden nur 20.48 mg an Baustein zum Aufbau der 256iger Bibliothek benötigt. Bei der nächst größeren

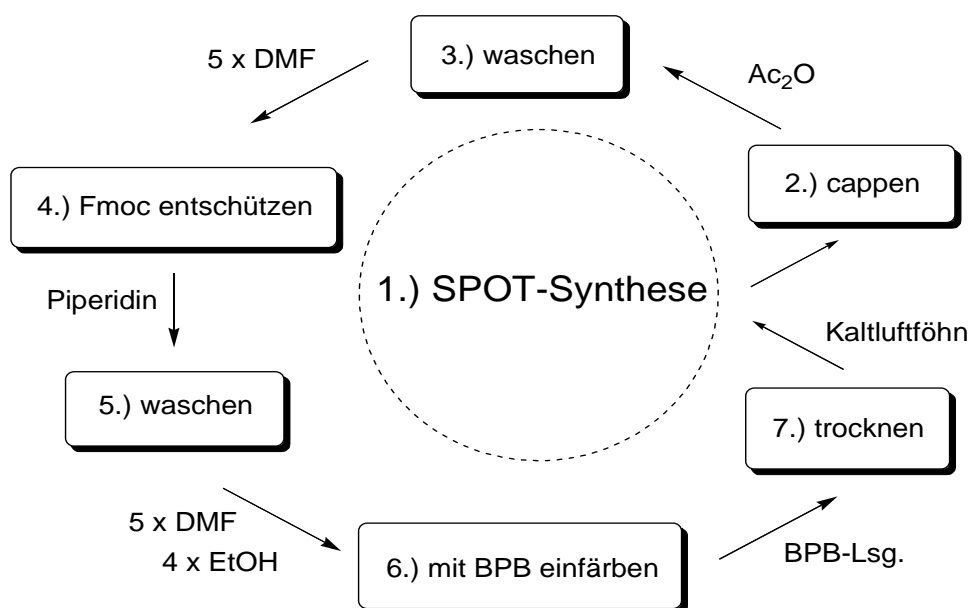
Bibliothek ($5^5 = 3125$) benötigt man ca. 250 mg pro Baustein. Somit ist eine Vergrößerung der Bibliotheken aus Sicht der einfach durchzuführenden Bausteinsynthese (Synthesemengen zwischen 1-2 g) gut praktizierbar. Theoretisch wäre die Synthese einer 6^6 Bibliothek (46656) mit einer Substanzmenge von ca. 4 g pro Baustein denkbar. Bei 8000 SPOT's pro Membran (19 x 28 cm) könnte man mit 6 Membranen auskommen, auf die man die Bibliothek verteilt. Somit könnte über eine kombinatorische SPOT-Synthese eine große Bibliothek für ein Microarray-System zur Verfügung gestellt werden.

Tabelle 20: Parameter zum Erzeugen einer 256-Bibliothek

| Parameter | Einstellung |
|--|-----------------|
| Pipettier-Volumen | 0.1 μ L |
| Konzentration des S-Glycopeptid-Baustein | 0.1 mmol / mL |
| Reaktionszeit | 20 min |
| Anzahl der Wiederholungen | 2 |
| Menge an Baustein (256 Array) | 20.48 μ mol |
| Generieren des Arrays | ja |

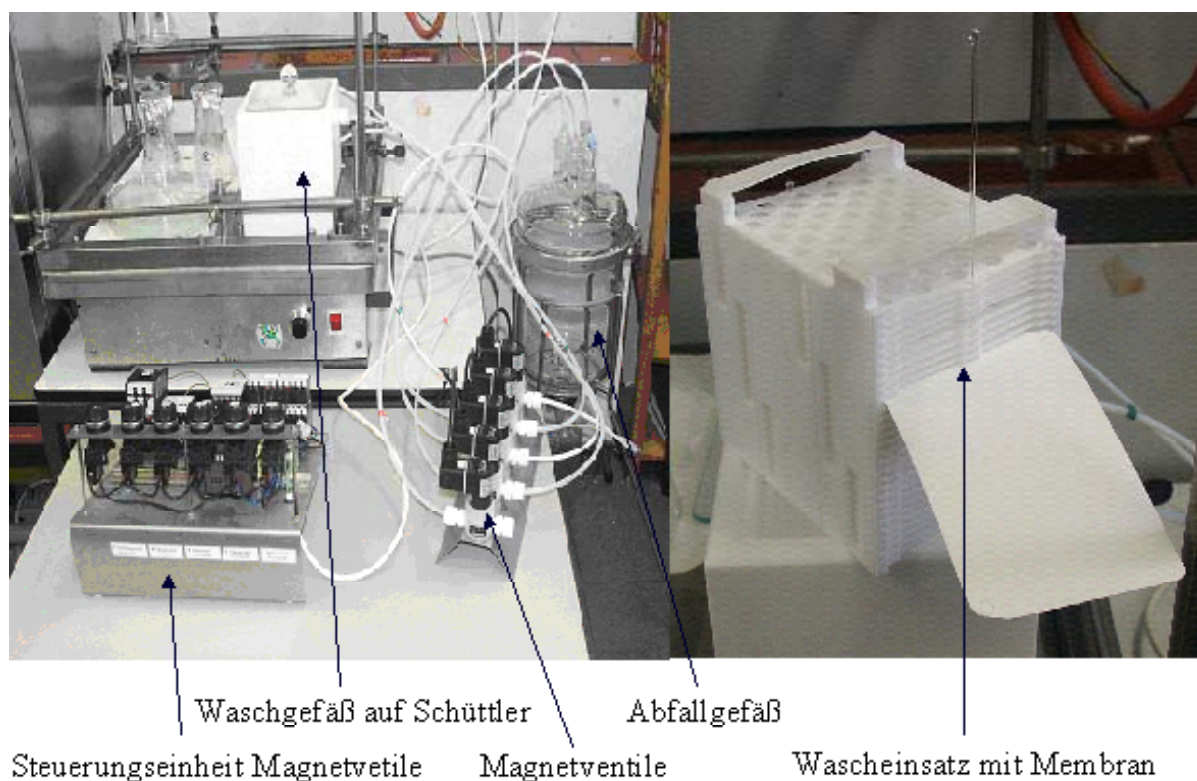
Der Hauptarbeitsaufwand bei der halbautomatisierten SPOT-Synthese besteht in den Waschschritten nach jedem Syntheszyklus. Die einzelnen Schritte (cappen, waschen, entschützen), die nach jedem Syntheszyklus manuell durchgeführt werden müssen, sind im **Schema 92** dargestellt. Insgesamt benötigt man dafür etwa zwischen 50 bis 60 min.

Schema 92: Ablauf der SPOT-Synthese mit Waschschritten



Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit der Universitätswerkstatt eine “Papierwaschmaschine“ entwickelt, mit der bis zu 28 Papiere gleichzeitig gewaschen werden können (**Abbildung 6**).

Abbildung 6: Aufbau der “Papierwaschmaschine“



Die “Waschmaschine“ wird dabei über eine Vakuumpumpe gefüllt und entleert. Für die Steuerung des Vakuums dienen 5 Magnetventile, die je nach Waschgang unterschiedlich geschaltet werden (**Tabelle 21**).

Tabelle 21: Ablaufplan der “Papierwaschmaschine“

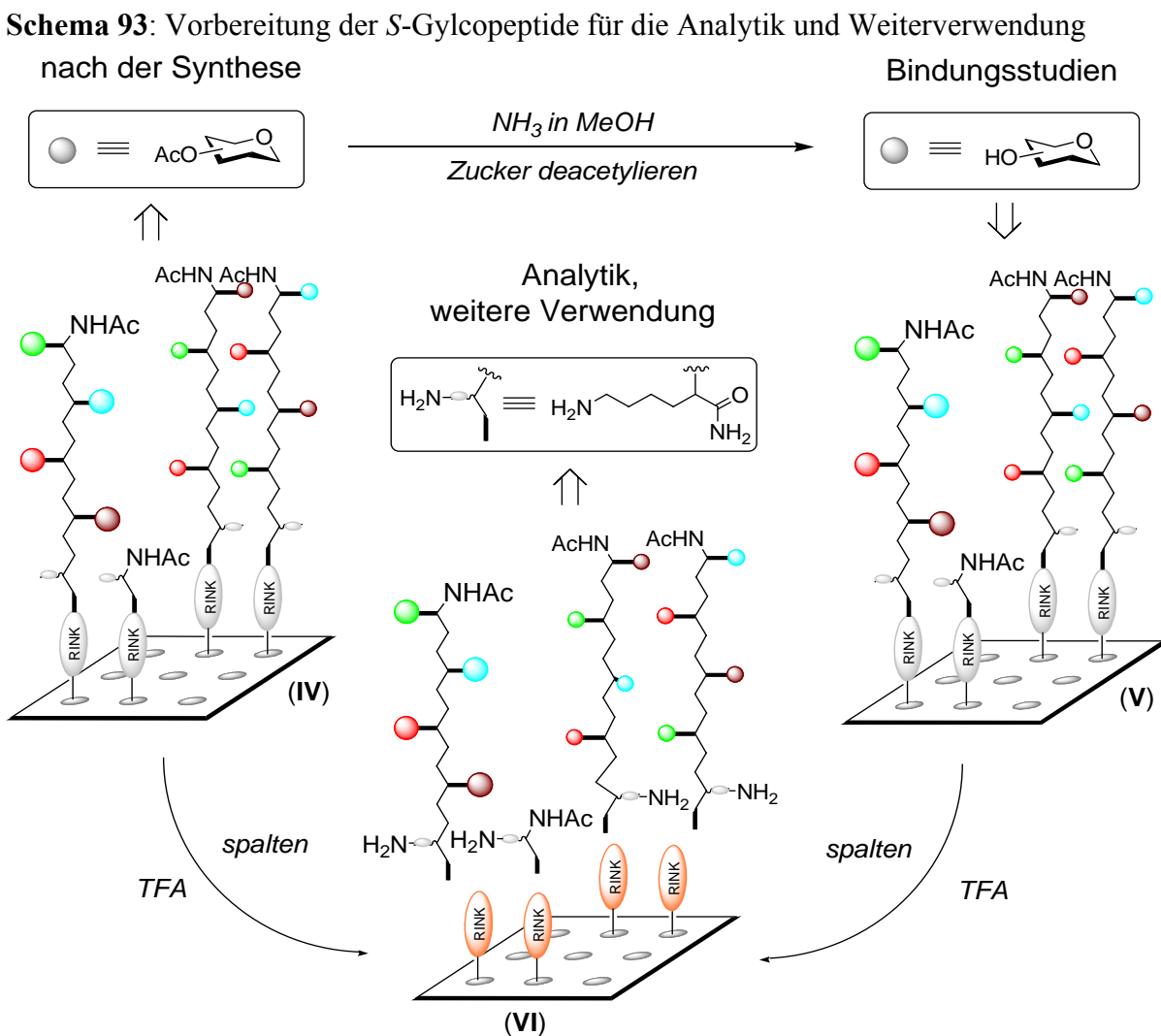
| Waschzyklus | *Magnetventile Nr. | |
|--------------|--------------------|---------------|
| | geöffnet | geschlossen |
| Grundzustand | | 1, 2, 3, 4, 5 |
| Dosieren | 1, 2 | 3, 4, 5 |
| Auslassen | 3, 4 | 1, 2, 5 |
| Trocknen | 4 | 1, 2, 3, 5 |
| Entlüften | 3, 5 | 1, 2, 4 |

1: Dosierventil (Waschgefäß); 2: Vakuumentil (Waschgefäß); 3: Ablassventil (Waschgefäß); 4: Vakuumentil (Abfallgefäß); 5 Entlüftungsventil (Abfallgefäß)

Da das Waschgefäß, die Ventile und alle Zu- und Ableitungen aus Teflon gebaut sind, können alle gängigen Lösemittel für den Waschprozess verwendet werden. Über die Höhe des Vakuums kann außerdem die Dosiergeschwindigkeit und die Trocknungsdauer der Membranen reguliert werden. Durch die stapelartige Anordnung der Papiere im Wascheinsatz kann eine größere Anzahl an Papieren sparsam mit Lösemittel gewaschen werden, da über kürzere Schaltzeiten der Ventile mehr oder weniger Waschflüssigkeit in das Waschgefäß dosiert werden kann. Über eine geplante Computersteuerung der Magnetventile könnte die "Papierwaschmaschine" vollautomatisiert werden, so dass nach jedem Synthesesyklus die Papiere nur noch in die "Waschmaschine" eingesetzt und entnommen werden müssten. Alle Schritte wie Acetylieren, Entschützen und Waschen reduzieren sich damit auf einen minimalen Arbeitsaufwand.

6.2.8 Analytik und weitere Verwendung der S-Glycopeptide

Um die kombinatorisch hergestellten S-Glycopeptide für analytische Zwecke und für weitere Anwendungen bereitzustellen, wurde der Rink-Amid-Linker gespalten und die adhäsiv gebundenen S-Glycopeptide in einem Lösemittel aufgenommen. Je nach späterer Verwendung der S-Glycopeptide (**Schema 93**) können diese vor der Deacetylierung des Glycosids (**IV**) oder danach mit TFA von den Membranen abgespalten werden (**V**). Für eine Bindungsstudie der S-Glycopeptide mit Lectinen müssen die Alkoholfunktionen des Glycosids auf jeden Fall durch Schwenken der Membranen in einer Lösung von Ammoniak in Methanol freigesetzt werden (**IV** → **V**). Als Endkontrolle der vollständigen Deacetylierung und vorherigen SPOT-Synthese können danach die aufgetragenen analytischen Kontrollen aus der Membran ausgestanzt und mit TFA abgespalten werden (**V** → **VI**). Sollen die Zucker der S-Glycopeptide geschützt bleiben (z. B. für Folgesynthese), werden die S-Glycopeptide direkt nach der SPOT-Synthese von der Membran abgespalten (**IV** → **VI**).



Da nach der Derivatisierung mit dem Rink-Amid-Linker als erste Anbindung Lysin mit Boc-geschützter Seitenfunktion verwendet wurde, wird bei der Abspaltung mit TFA die Aminofunktion der Lysin-Seitenkette freigesetzt (VI). Die Aminobutyl-Seitenkette kann zur Synthese oder Anbindung an andere Peptide, Moleküle oder Oberflächen dienen und macht damit die S-Glycopeptide für weitere Anwendungen zugänglich. Eine Anbindung des Lysins im letzten Syntheszyklus ist auch denkbar und hat den Vorteil, dass nur S-Glycopeptide mit vollständiger Sequenz mit dem Lysin reagieren und nur vollständige S-Glycopeptidsequenzen den Lysin-Anker tragen (unvollständige S-Glycopeptidsequenzen liegen im letzten Syntheszyklus am N-Terminus durch capping acetyliert vor). Nachteilig wirkt sich diese Verfahrensweise nach einem positiven Lectin-Screening auf der Membran aus, wenn die Sequenz bei der Übertragung des S-Glycopeptids auf einen anderen Träger zur Bestimmung von Bindungskonstanten gleich bleiben muss. Dazu ist ein vorgeschalteter Anker im Glycopeptid besser geeignet und muss vor der Synthese je nach Anwendung auf das Problem angepasst werden. Durch die in der Peptidchemie weit verbreitete Fmoc-Strategie stehen bei der SPOT-Synthese eine große Zahl an käuflichen Ankern, Markern und unnatürlichen Aminosäuren zur Verfügung, die direkt in die Glycopeptidsynthese einbezogen werden können, um weitere Anwendungen zu erschließen. Alle bei der SPOT-Synthese durchgeführten Reaktionen lassen sich wegen der gleichen Synthesestrategie auf eine Harz-Synthese übertragen, um größere Mengen an S-Glycopeptid für eine Anwendung bereitzustellen (n- μ \rightarrow mg-g Mengen). Dadurch bildet die SPOT-Synthese optimale Voraussetzungen um S-Glycopeptide für Forschungszwecke herzustellen. Da die S-Glycopeptide gegen enzymatischen Abbau stabil sind, erschließt sich ein breiter Anwendungsbereich für Fragestellungen in der Glycobiology (**Tabelle 22**).

Tabelle 22: Denkbare Anwendungen der S-Glycopeptide in der Glycobiology

| Anwendung | S-Glycopeptide* | |
|--|---------------------------|----------------------|
| | Funktion | Darstellung |
| Microarrays ^{[302],[303],[298]} | Diagnostika, Leitstruktur | SPOT-Synthese |
| Microtiterplatten ^[304] | Diagnostika, Leitstruktur | SPOT-Synthese |
| Glyco-Quantum Dots ^[305] , ^[306] | Molekulare Sonden | SPOT-Synthese |
| Untersuchung ^[307] mit SPR, RIFS | Wechselwirkungen | SPOT-Synthese |
| Glycopeptide / -proteine ^{[308],[309]} | Synthesebaustein | SPOT / Harz-Synthese |
| Glyco-Dentrimere ^{[310],[311]} | Synthesebaustein | SPOT / Harz-Synthese |
| Vakzine / Wirkstoffe ^{[312],[313]} | Leitstrukturoptimierung | SPOT / Harz-Synthese |

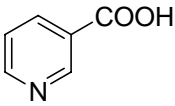
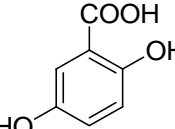
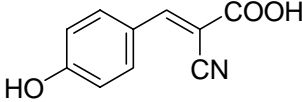
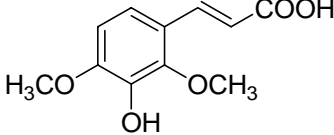
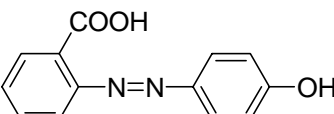
*Synthese über Rückgrataminosäure mit S-Glycopeptid-Bausteine

In der Glycobiology haben sich zur Untersuchung kleiner Substanzmengen (sub-nanomolarer Bereich) massenspektroskopische Analysemethoden durchgesetzt^[314]. Neben der FAB-MS^[315] zu Beginn der 80er Jahre hat sich Anfang der 90er Jahre vor allem die ES-MS^[316] und MALDI-MS^[317] etabliert. Dabei wird die „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation“ (MALDI) zur Analyse großer Glycopeptide und Glycoproteine ($m/z > 2000$) aufgrund der schonenden Ionisierung und der guten Empfindlichkeit eingesetzt (femtomol Bereich). Dabei

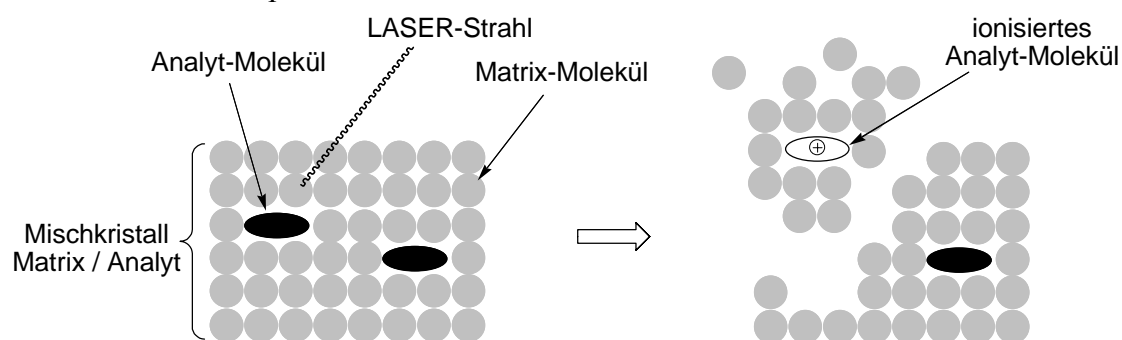
entstehen weniger störende Fragmente und häufig ist der Molekülpeak als einfach geladenes Fragment im Spektrum zu identifizieren. Dazu muss der Analyt in einer Matrix, die aus einer organischen Säure besteht eingebettet sein (**Tabelle 23**)^{[318],[319]}. Die Matrix liegt üblicherweise in einem molaren Überschuss von etwa 1000:1 mit dem Analyten vor und hat entscheidenden Einfluss auf die spätere Ionisation der Analytmoleküle^[320]. Dabei müssen folgende Eigenschaften erfüllt werden:

- die Matrix muss das Laserlicht absorbieren (UV-, IR-Laser)
- die Matrix muss den Analyten als Mischkristall einbetten
- die Matrix muss Ladungsträger für eine Ionisation des Analyten liefern

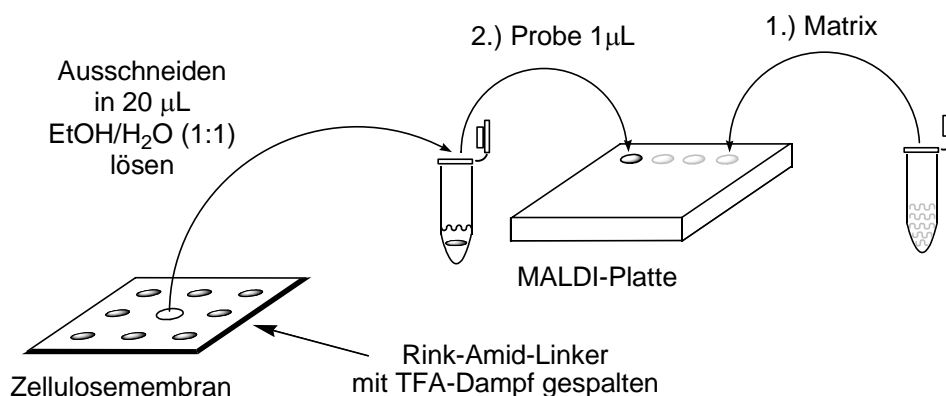
Tabelle 23: Häufig verwendete Matrixsubstanzen für UV-MALDI-MS

| Matrix | Struktur | λ (UV) | Anwendung |
|--|---|----------------------------|-----------------------------------|
| Nicotinsäure |  | 266 nm | Nucleotide Proteine Peptide |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) |  | 266 nm 337 nm 355 nm | Proteine Peptide Zucker |
| α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA) |  | 337 nm 355 nm | Peptide Glycopeptide |
| Sinapinsäure |  | 266 nm 337 nm 355 nm | Proteine Peptide |
| 2-(4'-Hydroxybenzylazo)-benzoesäure (HABA) |  | 355 nm | Peptide Zucker Glycopeptide |

Während des Ionisationsprozesses wird davon ausgegangen, dass der Laserstrahl einen Verbund von Matrix-Molekülen und Analyt-Molekülen aus der Probenoberfläche herauslöst (**Schema 94**). Die dabei absorbierte Laser-Energie wird teilweise von der Matrix auf die Analyt-Moleküle übertragen und führt zu deren Ionisation in der Gasphase. Wie die Energieübertragung physikalisch abläuft ist noch nicht vollständig geklärt und wird noch untersucht^{[321],[322],[323],[324]}. Als Analysator zum Auftrennen der ionisierten Analyt-Moleküle dient häufig ein Flugzeit-Analysator (Time of Flight, TOF). Dabei werden die Ionen unterschiedlicher Masse in einem elektrischen Feld mit gleicher kinetischer Energie beschleunigt und kommen aufgrund unterschiedlicher Geschwindigkeiten mit unterschiedlichen Zeiten am Massendetektor an. Anschließend lässt sich die Masse der Ionen über die Flugzeit berechnen^[325].

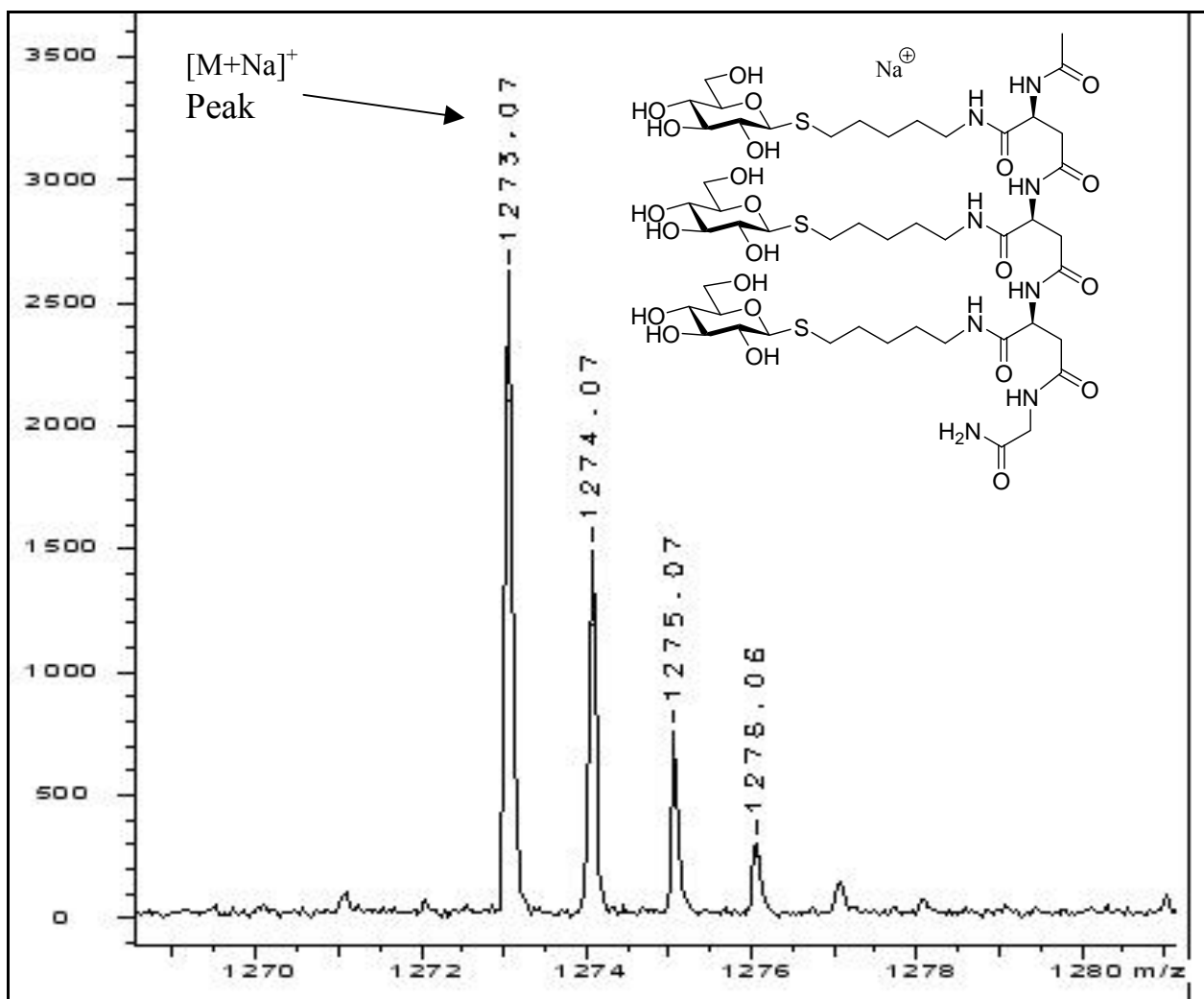
Schema 94: Ionisationsprozess bei MALDI-MS

Wichtig für den Anwender ist die Auswahl einer geeigneten Matrix, um eine hohe Empfindlichkeit bei guter Auflösung des Spektrums zu erhalten. Wegen der unterschiedlichen Wasserlöslichkeit der Matrizes müssen für die Präparation unterschiedliche Methoden verwendet werden. Die gängigsten Verfahren sind dabei die dried-droplet- und die layer-Methode^[326]. Die layer-Methode wird bei schlecht wasserlöslichen Matrix-Substanzen wie Sinapinsäure verwendet. Dazu wird die Matrix in Aceton oder Methanol gelöst und auf die MALDI-Platte aufgetragen. Nach dem Verdampfen des Lösemittels bildet sich eine sehr feine Kristallschicht, auf die ein wässriger Analyt aufgetropft wird. Durch Anlösen der Matrix-Kristalle werden dabei die Analyt-Moleküle teilweise als Mischkristall eingebaut und es bildet sich eine homogene Verteilung der Analyt-Moleküle auf der Oberfläche. Bei der dried-droplet-Methode wird eine in Wasser gelöste Matrix auf der MALDI-Platte mit der wässrigen Analytlösung vermischt. Beim Trocknen bilden sich am Rand des Tropfens größere Kristalle, während sich in der Mitte ein amorpher Bereich entsteht. Für die Analytik der *S*-Glycopeptide wurden deshalb verschiedene Verfahren und Matrixsubstanzen auf ihre Anwendbarkeit untersucht. Dazu wurde ein trimeres *S*-Glycopeptid über SPOT-Synthese hergestellt und von der Membran mit TFA (90% in DCM) abgespalten. Nach dem vollständigen Evaporieren der TFA wurde die Substanz mit 20 μL (EtOH/H₂O 1:1) aufgenommen (**Schema 95**). Parallel dazu wurden gesättigte Lösungen der Matrixsubstanzen angefertigt (**Tabelle 24**). Anschließend wurden die Matrizes auf die MALDI-Platte aufgetragen (2 x je 1 μL) und die Abspaltlösung des *S*-Glycopeptid (je 1 μL) auf der Matrix aufgetüpfelt. Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Proben mit MALDI-TOF vermessen.

Schema 95: Dried-droplet-Methode für MALDI-TOF Messung der S-Glycopeptide**Tabelle 24:** Verwendete Matrixsubstanzen für das trimere S-Glycopeptid

| Matrix | Lösungsmittel | Präparations-Methode | Massen im Spektrum |
|--------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| CHCA | ACN/H ₂ O (1:1) + 0.1% TFA | dried droplet | nur Matrixsignale |
| Sinapinsäure | ACN/H ₂ O (1:1) + 0.1% TFA | dried droplet | nur Matrixsignale |
| DHB | ACN/H ₂ O (1:1) + 0.1% TFA | dried droplet | Satelitenpeaks |
| DHB | EtOH/H ₂ O (1:1) | dried droplet | Schwach [M+Na] ⁺ |
| HABA | ACN/H ₂ O (1:1) + 0.1% TFA | dried droplet | Satelitenpeaks |
| HABA | EtOH/H ₂ O (1:1) | dried droplet | Stark [M+Na] ⁺ |

Dabei zeigte sich, dass die Matrizes CHCA und Sinapinsäure nicht geeignet sind. Im MALDI-Spektrum waren nur Matrixsignale aber keine Signale des Glycopeptids zu erkennen. DHB und HABA zeigten abhängig vom Lösungsmittel der Matrix unterschiedliche Ergebnisse. Bei Verwendung von ACN/H₂O (1:1) + 0.1% TFA waren im Spektrum um den Molekülionenpeak viele weitere Satellitenpeaks verteilt, die eine Auswertung des Spektrums erschwerten. Vermutlich wurde durch die Zugabe von 0.1% TFA das Glycopeptid stärker protoniert und bei der Ionisation entstanden mehr Teilfragmente. Mit der Lösemittelmischung EtOH/H₂O (1:1) wurden dagegen sehr gute Ergebnisse erzielt, wobei DHB bei gleicher Konzentration der Probe eine schlechtere Empfindlichkeit als HABA beim Signal-Rauschverhältnis zeigte. Somit eignete sich HABA sehr gut als Matrix bei Verwendung von EtOH/H₂O (1:1) als Lösungsmittel. Das MALDI-TOF-Spektrum des trimeren S-Glycopeptids mit HABA ist in **Abbildung 7** wiedergegeben. Man erkennt neben dem [M+Na]⁺-Peak gut die Isotopenverhältnisse und bekommt ein ausgezeichnetes Signal-Rauschverhältnis.

Abbildung 7: MALDI-TOF des trimeren *S*-Glycopeptids mit HABA (EtOH/H₂O 1:1)**Tabelle 25:** Isotopenverhältnisse des trimeren *S*-Glycopeptids

| Berechnet | | Gefunden | |
|-----------|----------------|----------|----------------|
| m/z | Intensität (%) | m/z | Intensität (%) |
| 1273.49 | 100 | 1273.03 | 100 |
| 1274.49 | 57.3 | 1274.07 | 55.2 |
| 1275.49 | 21.9 | 1275.07 | 20.9 |
| 1275.48 | 13.7 | 1278.06 | 11.5 |
| 1276.49 | 11.0 | 1276.07 | 8.4 |

7 SCREENING DER S-GLYCOPEPTID-BIBLIOTHEKEN

7.1 Lectine als kohlenhydraterkennende Proteine

Mit der Entdeckung der Blutgruppen A, B und 0 durch Landsteiner im Jahre 1908 wurde die Basis für sichere Bluttransfusionen geschaffen. Innerhalb des ABO-Systems unterscheidet man die beiden antigenen Blutgruppenmerkmale A und B, die gemeinsam vorkommen können (Blutgruppe AB) beziehungsweise fehlen können (Blutgruppe 0). Die Blutgruppenbestimmung wird mit Hilfe der Zusammenballung (Hämagglutination) roter Blutkörperchen durch serumfremde Blutgruppen durchgeführt (Kreuzprobe). Erst 1950 zeigten Morgan und Watkins bei Versuchen mit Erythrozyten vom Typ A, dass diese bei Zugabe von *N*-Acetylgalactosaminen agglutinieren. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Kohlenhydrate die Blutgruppenantigene bilden und über spezifische Kohlenhydrat-Proteinwechselwirkungen Immunreaktionen auslösen. Damit wurde zum ersten Mal indirekt gezeigt, dass Glycokonjugate über Oligosaccharide biologische Informationen für die Erkennungsprozesse kodieren.

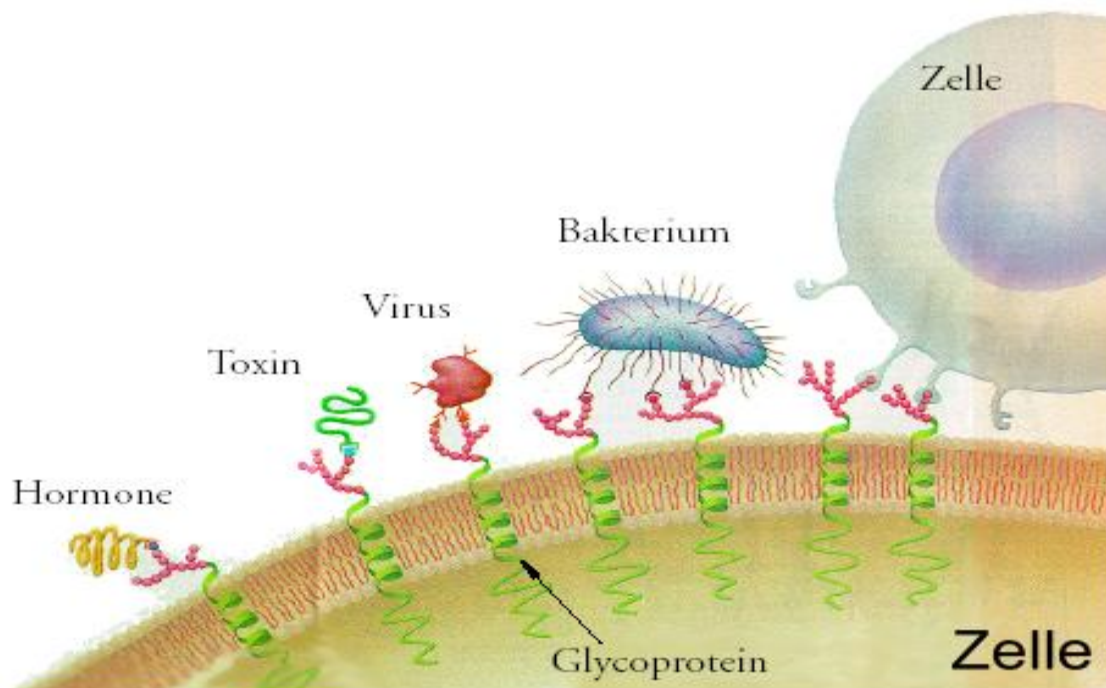
Parallel zu diesen Entdeckungen wurden aus Pflanzenextrakten Proteine isoliert, die in der Lage waren, nur bestimmte Blutgruppen zu agglutinieren. Diese Proteingruppe wurde von Boyd zum ersten Mal als Lectine bezeichnet, abgeleitet vom lateinischen „legere“, was soviel heißt wie „auswählen“. 1980 schlug Goldstein vor, dass Lectine zuckerbindende Proteine sind, die nicht aus dem Immunsystem stammen und Glycokonjugate agglutinieren können. Barondes hingegen schlug vor, Lectine als allgemein kohlenhydratbindende Proteine zu bezeichnen, unabhängig von ihrer Herkunft. So lassen sich Lectine am besten als Kohlenhydrat-Erkennungsmoleküle bezeichnen, die mit den Zuckern einen Kohlenhydrat-Protein-Komplex bilden.

Heute weiß man, dass dieser Prozess für Zell-Zell-, Zell-Antikörper-, Zell-Bakterien-, Zell-Virus-, Zell-Molekül- (Hormone, Toxine) Erkennungen verantwortlich ist und somit eine fundamentale Rolle bei biologischen Prozessen spielt^[327] (**Abbildung 8**).

7.1.1 Vorkommen und Funktion

Die Oligosaccharide auf der Zellmembranoberfläche sind dabei an integrale Proteine der Zellmembran gebunden und fungieren dabei als Antigenmarker, indem sie zwischen „Fremd“ und „Eigen“ unterscheiden können. Der Kontakt von Bakterien und Viren erfolgt über diesen Mechanismus und bildet den ersten Schritt einer Infektion der Wirtszelle. Auch die Lymphocyten als körpereigene Abwehrzellen nutzen die Adhäsion an Kohlenhydrate, um in die Blutgefäße einzudringen (Lymphocyt rolling). Des Weiteren hat man bei Krebszellen festgestellt, dass die Kohlenhydratstruktur auf der Zelloberfläche verändert ist und sich dadurch von gesunden Zellen unterscheidet. Da diese Prozesse maßgeblich an Krankheitsbildern beteiligt sind, werden Lectin-Rezeptoren immer stärker Gegenstand immunologischer und medizinischer Forschung^[328] (**Tabelle 26**).

Abbildung 8: Bedeutung der Kohlenhydrat-Lectin-Wechselwirkungen^[329]

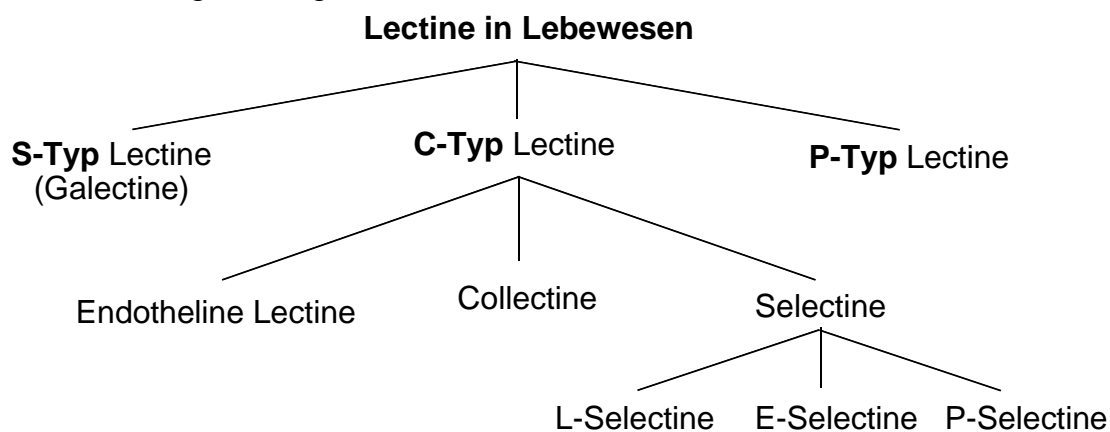


Bei den Lectinen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe oligomerer Proteine, die sich in Größe und molekularer Struktur teilweise stark voneinander unterscheiden. Auf Grund ihrer Zuckerspezifität werden sie häufig zur Untersuchung der Kohlenhydratstruktur von Glycoproteinen verwendet und unterteilen sich in Mannose, Galactose/GalNAc, GalNAc, L-Fucose bindende Lectine. Über Affinitätschromatographie mit immobilisierten Lectinen lassen sich so verschiedene Glycoproteine voneinander trennen. Dazu werden die Lectine aus Keimen und Samen von Pflanzen isoliert und bilden mit derzeit weniger als 500 bekannten Lectinen die am besten untersuchte Gruppe^[330].

Tabelle 26: Funktion von Lectinen^[331]

| Vorkommen der Lectine | | Funktion |
|-----------------------|------------------------|----------------------------------|
| Mikroorganismen | Amöben | Infektion |
| | Bakterien | Infektion |
| | Influenza Virus | Infektion |
| Pflanzen | verschiedenen Pflanzen | Verteidigung, Gift |
| | Legumes | Stickstoff-Fixierung |
| Lebewesen | Calnexin, Calreticulin | Glycoprotein Biosynthese |
| | Collectins | Immunreaktion |
| | Galectins | Zell-Zell-Kontakt |
| | Siglecs | Zell-Zell-Kontakt Immunsystem |
| | E- und P-Selectine | Leukozytadhäsion |

Eine andere Gruppe bilden die in Lebewesen vorkommenden Lectine. Anders als bei den pflanzlichen Lectinen handelt es sich um eine homogenere Gruppe, die sich in verschiedene Untergruppen einteilen lässt. Diese sind Bestandteil wichtiger Lectin-Rezeptoren und für viele immunologische Prozesse bei Säugetieren verantwortlich^{[332],[333],[334]}. Sie lassen sich in 3 Subgruppen unterteilen: S-Typ, C-Typ und P-Typ-Lectine (**Schema 96**).

Schema 96: Untergliederung von Lectinen in Lebewesen^[1]

Die S-Typ-Lectine werden auch als Galectine bezeichnet, da sie spezifisch für Galactose sind. Sie sind an der Zelladhäsion beteiligt und kommen in allen Zelltypen innerhalb und außerhalb der Zelle vor. C-Typ-Lectine bilden die größte Gruppe kohlenhydratbindender Lectine. Sie werden so bezeichnet, da sie Ca^{2+} -Ionen für ihren Bindungsprozess benötigen und unterteilen sich weiter in endotheline Lectine, Collectine und Selectine. Bei den endothelinen Lectinen handelt es sich um Zellmembran gebundene Rezeptoren. Dabei ist der Mannose bindende Rezeptor auf Makrophagen zu nennen, der zur Phagozytose notwendig ist. Bei den Collectinen handelt es sich um Lectine mit kollagenen Strukturen, die nicht membranständig sind und als gelöste Proteine vorkommen. Schließlich bilden die L-, E-, P-Selectine eine wichtige Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die auf Leukozyten vorkommen und im Blutstrom den Kontakt zu Endothelzellen herstellen. Dabei führen multivalente Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten (Sialyl-Lewis-X, sLe^x) der Endothelzellen und der Selectine zum Abbremsen (rolling) und im zweiten Schritt bewirken Protein-Protein-Wechselwirkungen von Integrinen das Anhaften der weißen Blutkörperchen. Im Gegensatz zu der großen Gruppe der C-Type-Lectine besitzen die P-Typ Lectine (P von Phosphat) nur einen als Mannose-6-Phosphat bezeichneten Rezeptor.

Tabelle 27: Auswahl einiger Lectine in Lebewesen

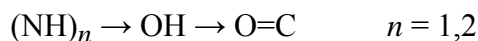
| Gruppe / Lectin | Vorkommen | Zuckerspezifität |
|--|--|---|
| Galectine (S-Typ) | sehr häufig in allen Zellen | Gal |
| Endotheline Lectine (C-Typ) hepatic Lectin (Säugetiere) hepatic Lectin (Vögeln) | Hepatozyten im Zellgewebe Hepatozyten im Zellgewebe | Gal/GalNAc GalNAc |
| Collectine (C-Typ) Mannose-bindendes Protein A | Serum der Säugetiere | Man |
| Selectine (C-Typ) L-Selectine E-Selectine P-Selectine | Leukozyten Endotheline Zellen Endotheline Zellen | Neu5Ac α 2,3-(6-Sulfat)Gal β 4-(Fuc α 3)-GlcNAc sLe ^x , sLe ^a sLe ^x , sLe ^a |
| p-Type Lectine Mannose-6-Phosphat (P-Typ) | sehr häufig in allen Zellen | Man6P |

7.1.2 Strukturelle Basis der Kohlenhydraterkennung

Um ein besseres Verständnis der Kohlenhydraterkennung zu bekommen, muss man sich mit den kohlenhydratbindenden Zentren (CRDs) der Lectine beschäftigen. Jedes Lectin besitzt ein oder mehrere CRDs, die zu einer spezifischen Bindung der Saccharide befähigt sind. Trotz der großen strukturellen Vielfalt der Lectine lassen sie sich gut über die CRDs beschreiben und einteilen. Durch Röntgenstrukturaufnahmen der Kohlenhydrat-Protein-Komplexe konnte in den letzten 15 Jahren ein besseres Verständnis über die strukturellen Voraussetzungen und die beteiligten Wechselwirkungen gewonnen werden. Für die Adhäsion der Kohlenhydrate sind hauptsächlich folgende Wechselwirkungen verantwortlich:

- Wasserstoffbrückenbindungen über Alkoholfunktionen des Zuckers
- über Wasser dirigierte Wasserstoffbrückenbindungen
- ionische Wechselwirkungen über divalente Kationen (Ca^{2+} , Mn^{2+})
- unpolare Wechselwirkungen über aromatische Aminosäuren des Lectins
- ionische Wechselwirkungen über geladene Zuckergruppen zu geladenen Aminosäuren des Lectins

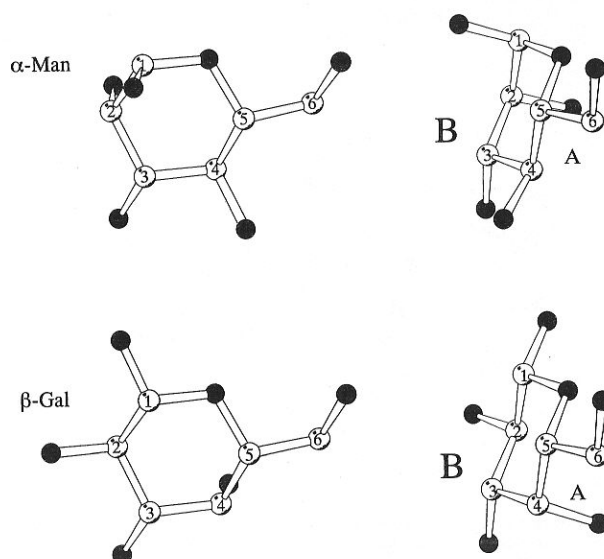
Die OH-Gruppen am Zucker können direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren im CRD ausbilden. Dabei fungiert der Sauerstoff über seine freien Elektronenpaare als Protonen-Akzeptor für Aminosäuren des Lectins. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Wechselwirkungen zwischen Wasserstoffatomen von Amidfunktionen der Peptidhauptkette und von Aminosäureseitenfunktionen (Asn, Gln) im CRD. Des Weiteren können die Wasserstoffatome der Zucker-OH-Gruppen mit Carbonyl- und Carboxylatfunktionen der Aminosäuren im CRD als Protonen-Donor Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Das soll über folgende Schreibweise schematisch wiedergegeben werden:



Wie Röntgenstrukturaufnahmen gezeigt haben, sind Wassermoleküle als Vermittler von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zucker und den Aminosäuren im CRD beteiligt und modellieren die zuckerspezifische Affinität der Lectine. Verschiedene Lectine benötigen für die Ausrichtung einzelner Aminosäuren und für koordinative Bindungen mit den Zucker-OH-Gruppen divalente Kationen wie Ca^{2+} und Mn^{2+} . In dem Legume Lectin Concannavalin A stabilisieren Ca^{2+} - und Mn^{2+} - Ionen die Ausrichtung der Aminosäuren im CRD. Bei den C-Typ Lectinen führen koordinative Bindungen von Ca^{2+} - Ionen mit OH-Gruppen des Zuckers zu einer besseren Anbindung. Neben den polaren Wechselwirkungen spielen unpolare Wechselwirkungen über Van-der-Waals-Kräfte eine wichtige Rolle. Seitenketten von aromatischen

Aminosäuren (Trp, His) im CRD können sich gegen die unpolare Seite (B-Face) des Zuckerrings legen und über eine Art Stapel-effekt den Zucker im CRD vororientieren, was zu deutlich stärkeren Anbindungen führt. Dabei haben Monosaccharide einen unpolaren Anteil von etwa 25%, bei Disacchariden ist dieser mit ca. 50% deutlich größer und kann bei Oligosacchariden abhängig von der Substitution einzelner OH-Gruppen weiter steigen^[335].

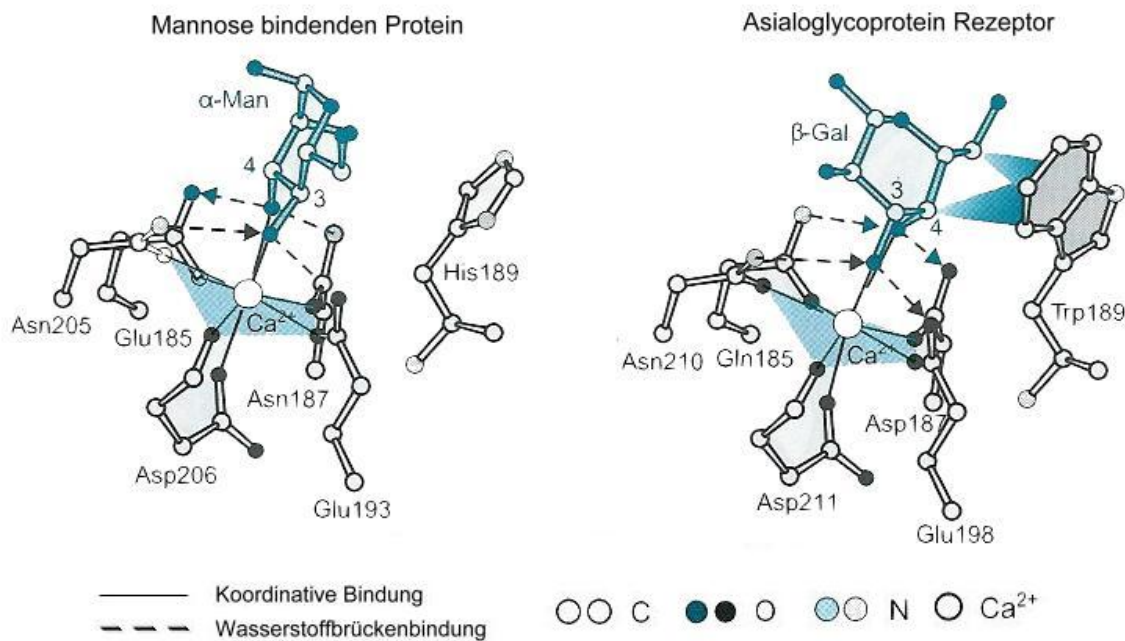
Abbildung 9: Unpolares B-Face von α -Man und β -Gal^[336]



Schließlich können geladene Gruppen am Zucker wie die Carboxylfunktion bei Sialylsäure und Neuraminsäure über Salzbrücken mit positiv geladenen Aminosäuren (Arg, Lys, His) wechselwirken. Am Beispiel des CRD von Mannose bindendem Proteins (**Schema 97**) erkennt man, wie die einzelnen Wechselwirkungen bei der Erkennung von Mannose zusammenarbeiten. Das Protein gehört zu den C-Typ-Lectinen, die über die OH-Gruppen der Mannose zu einer spezifischen Anbindung führen. Voraussetzung ist eine äquatoriale Anordnung der Hydroxylgruppen an 3- und 4- Position, wodurch auch Glucose angebunden werden kann. Die Anbindung von Galactose ist nicht möglich, da die OH-Funktion in 4-Position axial-ständig ist. Die Unterscheidung geschieht somit über die Alkoholfunktion in 4-Position. Im CRD ist Ca^{2+} koordiniert, das zu einer günstigen Ausrichtung der Aminosäuren führt (Glu 185, Asn 187, Asn 205, Asp206, Glu 193). Dabei sind die Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxyfunktionen des Zuckers polar und kooperativ, das heißt, negativ geladene Carboxylfunktionen (Glu 185, Glu 193) wirken als Protonen-Akzeptoren, und im Gegenzug wirken die Asparaginfunktionen (Asn 187, Asn 205) als Protonen-Donoren. Gleichzeitig werden die OH-Gruppen (Positionen 3 und 4) über Ca^{2+} koordiniert. Über diese multivalenten Wechselwirkungen zu den OH-Gruppen findet eine spezifische Anbindung der Mannose statt. Im Asialoglycoprotein-Rezeptor hat man eine sehr ähnliche Faltung der Peptide im CRD, aber mit entgegengesetzter Erkennung von Galactose. Beim Vergleich der CRDs erkennt man einen kleinen aber entscheidenden Unterschied bei den kooperativen Bindungen der OH-Gruppe in Position 4. Die Aminosäuren von Glu 185 und Asn 187 im Mannose bindenden Protein werden im Asialoglycoproteinrezeptor durch Gln 185 und Asp 187 ersetzt. Dadurch

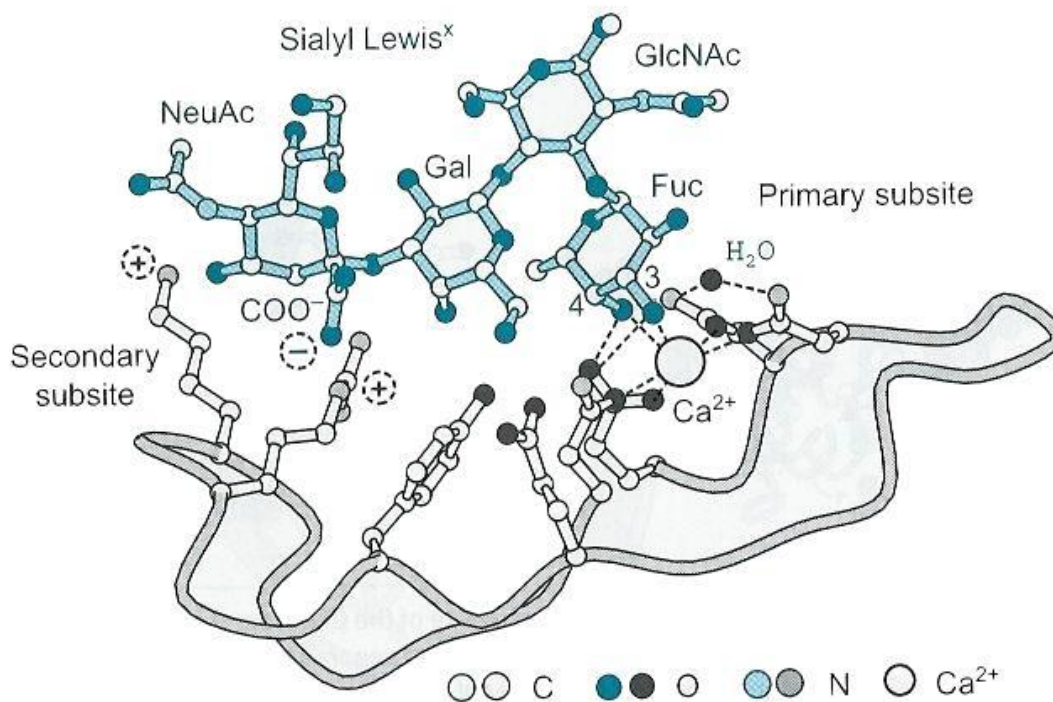
ergibt sich eine günstige Anordnung zum Erkennen der axialen Alkoholfunktion in 4-Position der Galactose. Um Mannose erkennen zu können, müsste die 4-OH-Gruppe in eine konformativ ungünstige Position überführt werden. Ein weiterer Unterschied besteht im Austausch von His 189 gegen Trp 189, was zu einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem B-Face der Galactose und dem Tryptophanring des CRDs führt. Durch die Kombination der polaren Wasserstoffbrückenbindungen und die unpolaren Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren kommt es ausschließlich zur Anbindung von Galactose.

Schema 97: CRD vom Mannose bindenden Protein / Asialoglycoprotein-Rezeptor^[337]



Bei der Anbindung von Oligosacchariden reichen die einfachen Bindungstaschen nicht mehr für eine spezifische Bindung aus. Als Beispiel sind die Selectine zu nennen, bei denen zur primären eine sekundäre Bindungsstelle hinzukommt, um Sialyl-Lewis^x-Strukturen zuerkennen (**Schema 98**).

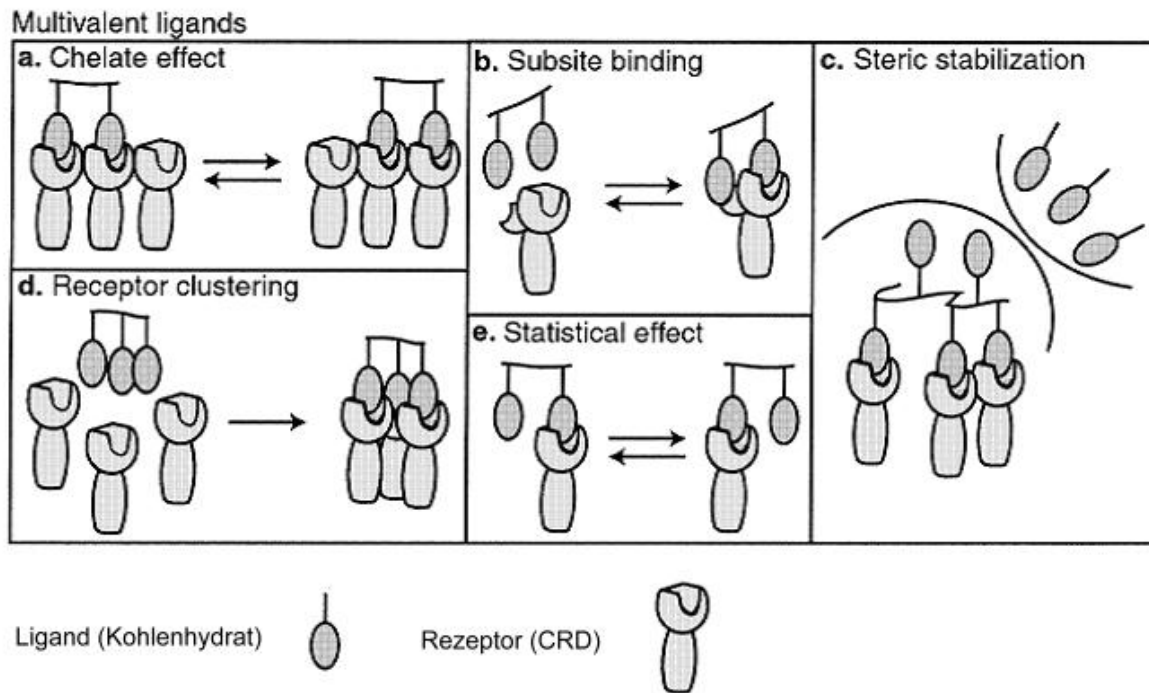
Dabei wird ähnlich wie bei den vorherigen Beispielen in der primären Bindungstasche Fucose über die 3- und 4-OH-Gruppe gebunden und am anderen Ende des Oligosaccharids Neuraminsäure über eine Salzbrücke mit Arginin gebunden. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den B-Faces von Galactose und Fucose innerhalb des Oligosaccharids führen zu einer Stabilisierung der Konformation. Somit führen multivalente Wechselwirkungen an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen im CRD zur spezifischen Oligosacchariderkennung.

Schema 98: Selectin-Rezeptor zur Erkennung von Sialyl-Lewis^x Strukturen^[337]

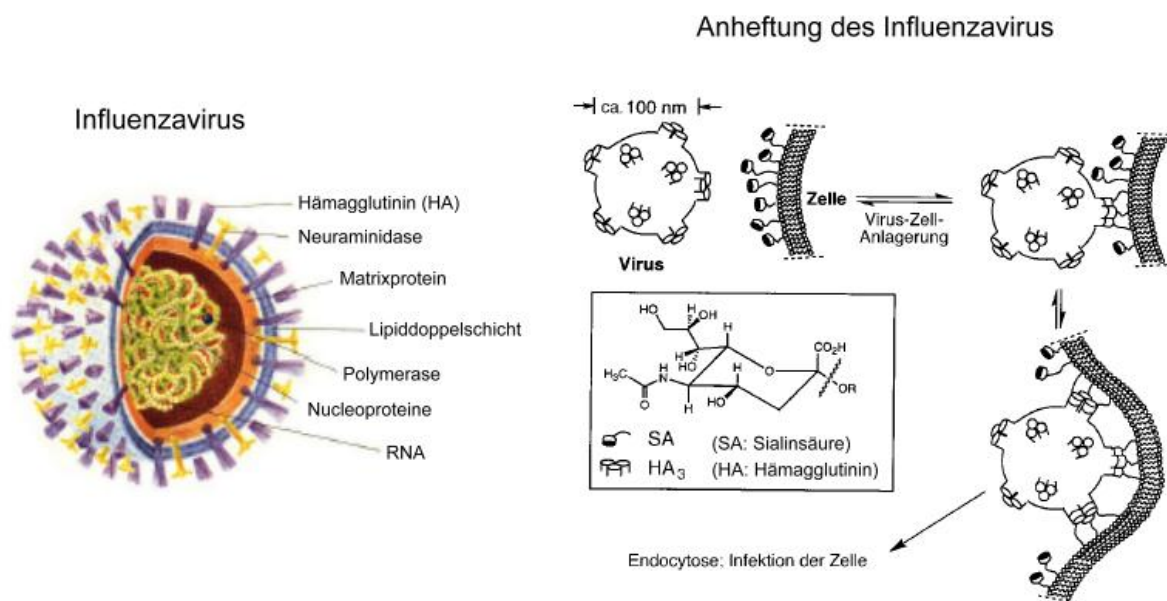
7.1.3 Multivalente Wechselwirkungen

Die Anbindung von Monosacchariden an ein einziges Kohlenhydrat erkennendes Zentrum (CRD) führt nur zu schwachen Affinitäten mit Dissoziationskonstanten im millimolaren Bereich^[338]. Um eine effektive Antigen-Rezeptor-Erkennung zu bekommen, benötigt man multivalente Wechselwirkungen von Oligosacchariden mit mehreren CRDs, die zu deutlich erhöhter Affinität führen und als glycosidischer Cluster-Effekt bezeichnet werden^[339]. Lectine besitzen dazu mehrere CRDs, die unterschiedlich über ihre äußere Oberfläche verteilt sind. Je nach zu erkennender Oligosaccharidstruktur können mehrere CRDs gleichzeitig an der molekularen Erkennung beteiligt sein. Dazu müssen strukturelle Parameter wie Größe, Dichte und Art der Liganden auf die molekulare Architektur des Lectins abgestimmt sein. Bei multivalenten Wechselwirkungen von Ligand und Rezeptor können verschiedene Erkennungsmechanismen von Bedeutung sein^{[340],[341]} (**Schema 100**):

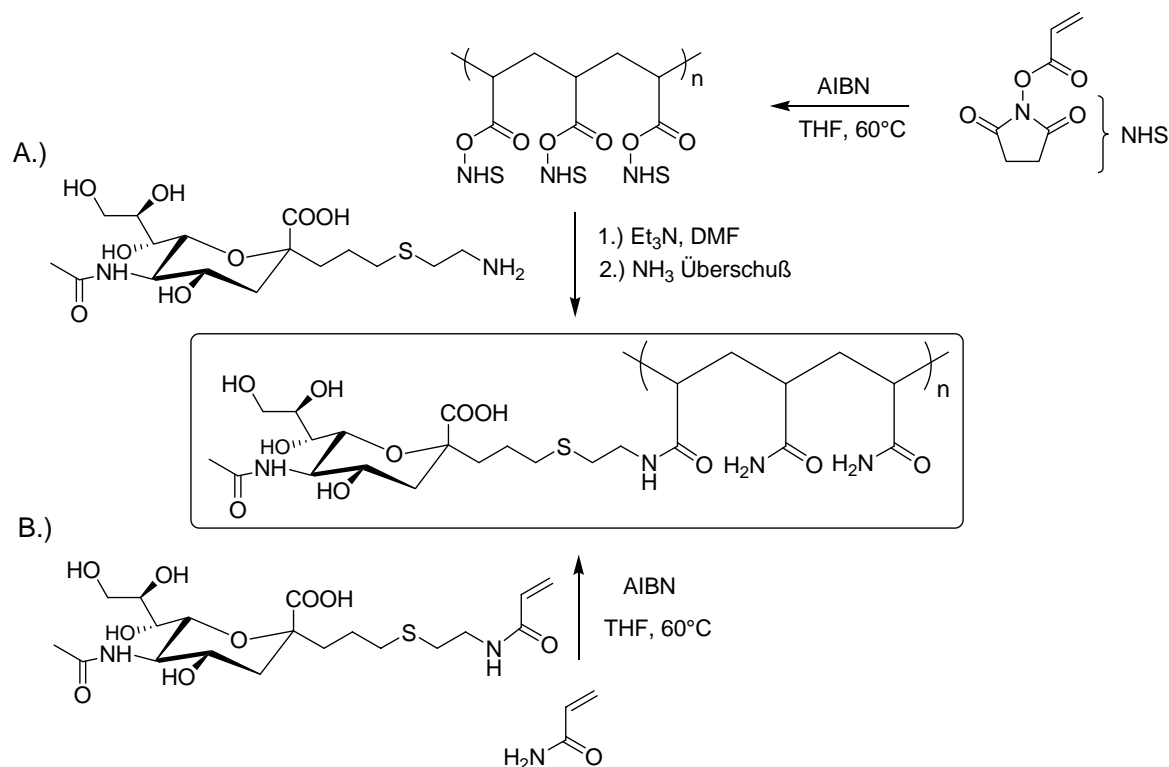
- über Chelat-Effekte der Liganden werden die off-Raten verringert
- neben dem ersten Rezeptor existiert ein zweiter, der zu höherer Affinität führt
- die sterische Zugänglichkeit des Rezeptors beeinflusst die Ligandanbindung
- durch Annäherung der Liganden ändert sich die Ausrichtung der Rezeptoren
- hohe Konzentrationen an Ligand begünstigen die Rückbindung

Schema 100: Multivalente-Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor^[342]

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Anlagerung des Influenzavirus über polyvalente Wechselwirkungen an bronchialen Epithelzellen^{[343],[344],[345]}. Dabei spielen entropisch verstärkte Bindungen und sterische Stabilisierungseffekte eine Rolle. Bei der Infektion lagert sich im ersten Schritt das Influenzavirus an die Oberfläche einer bronchialen Epithelzelle an (**Schema 101**). Die Anheftung wird über eine multivalente Wechselwirkung mit mehreren trimeren Hämagglutinin-Rezeptoren (HA) auf dem Virus und von Sialinsäuren (SA) auf der Epithelzelloberfläche vermittelt. Das Hämagglutinin ist mit 2 – 4 Kopien pro 100 nm² auf der Virusoberfläche verteilt, wobei die Sialinsäure mit 50 – 200 Kopien in Form von Glycoproteinen auf der Zelloberfläche verteilt ist und somit genügend Liganden zur Wechselwirkung bereitstellen. Das dadurch bedingte Anheften des Virus führt zur Endocytose und damit zur Infektion der Wirtszelle. Genaue Affinitätsmessungen zwischen Influenzaviren und Erythrocyten sind bisher noch nicht durchgeführt worden, doch ist geschätzt worden, dass die Bindungskonstante größer als 10¹³ M⁻¹ ist. Monovalente Wechselwirkungen von einem SA-Molekül mit einem HA-Rezeptor liegen bei ca. 10³ M⁻¹. Somit handelt es sich um eindeutig polyvalente Wechselwirkungen. Neben Hämagglutinin kommen auf der Virusoberfläche tetramere Neuraminidasen vor, die endständige Sialinsäurereste abspalten, was verhindert, dass der Virus durch Schleimabsonderungen, die reichlich Sialinsäure enthalten, eingeschlossen wird und eine Infektion nicht stattfinden kann. Durch den Einsatz von Neuraminidase-Hemmern wird die Vermehrung der Influenzaviren unterbrochen. Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung ist ein Einnahmebeginn des Arzneimittels in den ersten beiden Tagen nach Auftreten der ersten Grippe-symptome. Zu den ersten Neuraminidase-Hemmern gehören Zanamivir (Relenza®) und Oseltamivir (Tamiflu®).

Schema 101: Infektion mit Influenzavirus durch Anheftung an Zelloberfläche^{[346],[347]}

Somit ist freie Sialinsäure in der Lage, die Zelladhäsion über kompetitive Inhibierung zu unterbrechen. Diese Verfahrensweise, mit monomeren Sialinsäuren zu inhibieren, ist aber oft schwierig, da auch unspezifische Anbindung stattfinden kann und schwer von spezifischen Anbindungen zu unterscheiden ist. Dazu haben verschiedene Gruppen (Whitesides, Matrosovich^{[348],[349]}, Roy^{[350],[351]}, Gamian^[352], Sabesan^[353]) eine breite Palette an Glycopolymeren entwickelt, die eine Anlagerung an den Influenzaviren hemmen können. Dabei waren die wirksamsten Inhibitoren aus linearen Polyacrylamiden mit mehreren Sialinsäuren (SA) in Form von α -C-Glycosiden als Seitenkette aufgebaut (**Schema 102**). Die Synthese erfolgte dabei über zwei verschiedene Wege. Bei Weg A.) wurde zuerst ein Poly(N-acryloyloxysuccinimid) über radikalische Addition hergestellt^[354], das dann mit einem Sialinsäurederivat über einen Aminlinker mit den aktivierten NHS-Seitenketten des Polymers umgesetzt wurde. Bei Weg B.) wurde aus zwei oder mehreren monomeren Acrylamiden über direkte radikalische Copolymerisation das Glycopeptidpolymer hergestellt. Vorteil der Methode A.) war eine gleichmäßigere Verteilung der Sialinsäure im Polymer, und über die Molverhältnisse bei Zugabe des Sialinsäurederivats konnte der Substitutionsgrad im Polymer beeinflusst werden.

Schema 102: Glycopeptidpolymer mit Sialinsäure (NeuAc) als Seitenkette^[351]

Mit diesem Glycopeptidpolymer^[355] wurden Steigerungen der Affinität bis um das 10^8 -fache erreicht, und dies ist eine der größten Affinitätssteigerungen für ein synthetisches polyvalentes System überhaupt. Die Fähigkeit, die Hämagglutinin-Rezeptoren kompetitiv zu hemmen, hängt direkt mit der Dissoziation des Liganden von der viralen Oberfläche ab. Beschrieben werden die Verhältnisse über das Gleichgewicht zwischen Dissoziation und Assoziation, wobei die Bindungskonstante ein quantitatives Maß für die Lage des Gleichgewichts ist (**Schema 103**): a) Verwendet man Sialinsäure (SA)-Monomere zur Hemmung des trimeren Hämagglutinin, so ergeben sich Bindungskonstanten von $4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$; b) Bei Anbindung eines Polyacrylamids mit mehreren SA-Seitenketten ergeben sich mit einem trimeren Hämagglutinin (HA_3) nur Werte die kleiner 10^2 M^{-1} sind; c) Bei Verwendung aller HA_3 -Rezeptoren der viralen Oberfläche ergeben sich allerdings Konstanten von $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ ^[356]. Trotz des höheren Polyvalenzgrades scheint das Polymer schwächer an HA_3 zu Binden als das Monomer SA. Diese niedrigere Affinität des Polymers zu HA_3 könnte auf eine sterische Hinderung bei der Wechselwirkung zwischen jeder SA-Gruppe und der Bindungstasche von HA_3 zurückzuführen sein. Die Bindung des polyvalenten SA an die polyvalente Oberfläche des Virus ist jedoch wesentlich wirksamer (viele HA_3 -Rezeptoren).

Schema 103: Hemmung der Anheftung des Influenzavirus^[357]

Inhibierung der Anheftung

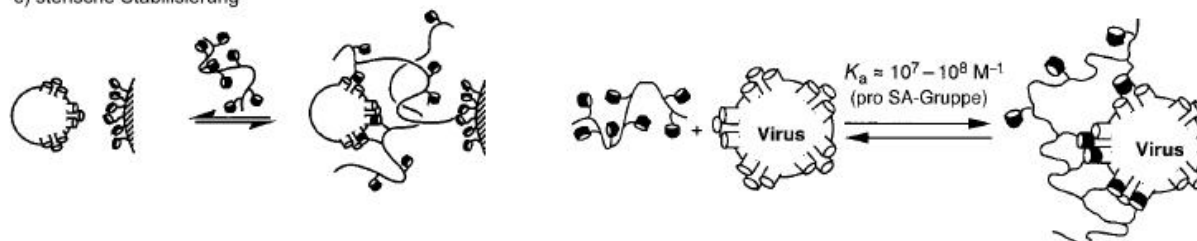
a) monovalente kompetitive Inhibierung



b) polyvalente kompetitive Inhibierung

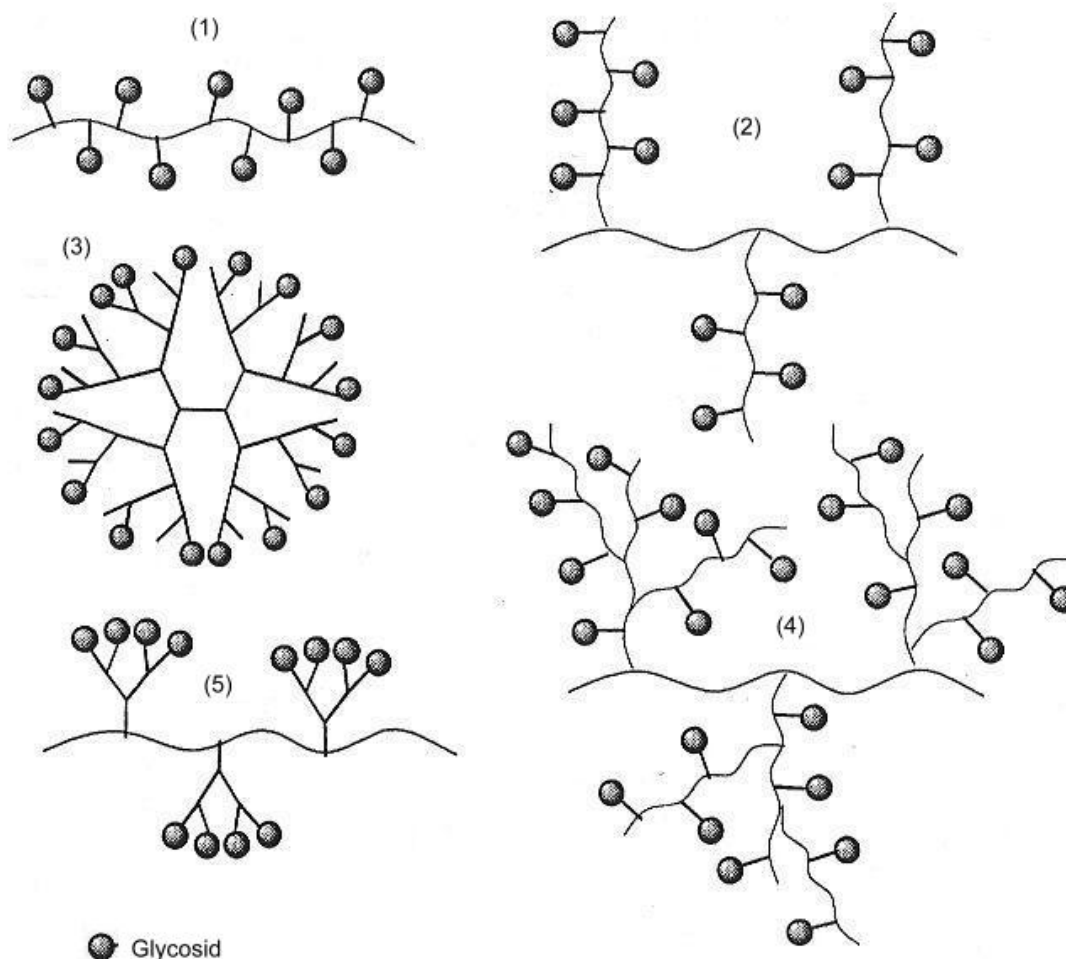


c) sterische Stabilisierung



Bei vielen weiteren RNA- und DNA-Viren verläuft der erste Schritt einer viralen Infektion über den Kontakt mit membranständigen Glycoproteinen^[358]. Das HIV-Virus kann an alternerende Membranproteine binden und nutzt somit die große Vielfalt an Liganden, die auf der Membranoberfläche vorkommen. Die diskutierten Beispiele lassen sich auch auf Wechselwirkungen von Zell-Bakterium, Zell-Zell, Zell-Molekül und Molekül-Molekül anwenden. Da polyvalente Wechselwirkungen bei diesen Prozessen von entscheidender Bedeutung sind, bilden sie eine neue Strategie zur Entwicklung effektiver Inhibitoren und somit potenzieller neuer Arzneimittel^[359]. Aufgrund der vielen thermodynamischen Parameter (Entropie, Enthalpie), die sich während der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung verändern, ist es schwer, eine optimale "Ligand-Architektur" als potentiellen Inhibitor im Vorfeld auszuwählen^[360]. Deshalb wurden verschiedene "Ligand-Architekturen" entwickelt, wobei vor allem die Anordnung der Liganden verändert wurde, um der unterschiedlichen räumlichen Verteilung einzelner Rezeptoren gerecht zu werden. Hierzu wurden die unterschiedlichsten Synthesekonzepte verwendet^[361] (**Schem 104**).

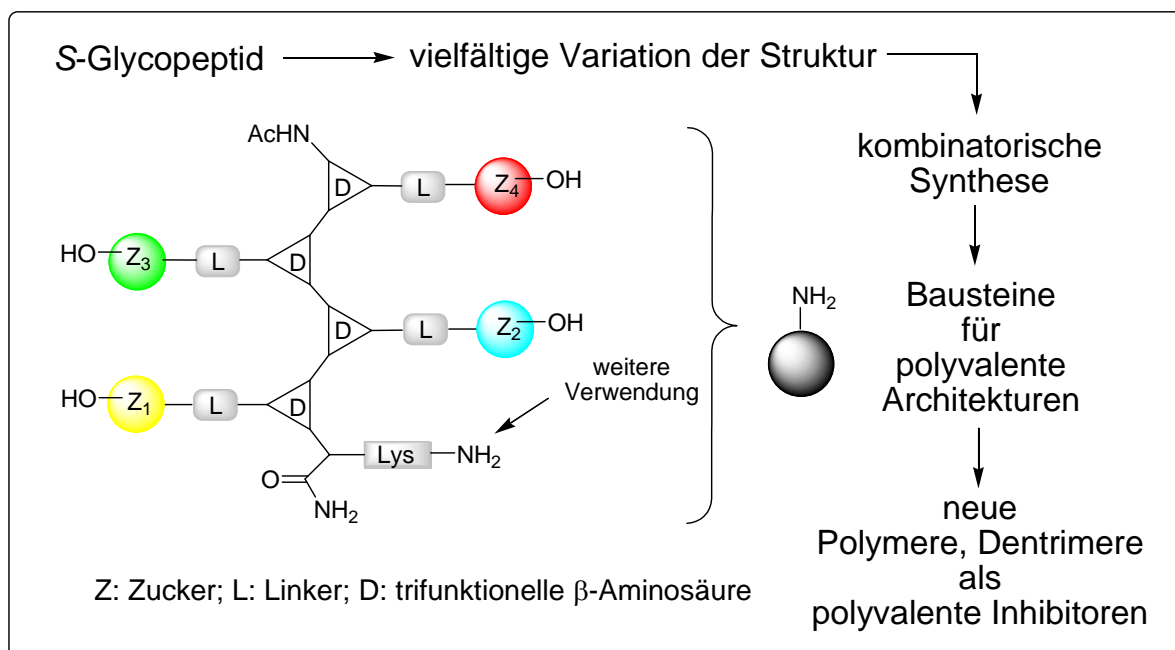
Schema 104: Verschiedene Glycopolymere zur multiplen Anbindung: (1) reguläres Glycopolymer, (2) kammförmiges Glycopolymer, (3) sphärisches Glycopolymer, (4) gepfropftes Glycodotrimer, (5) Glycopolymer mit dentrimerer Verästelung^[361].



Bei der Synthese von Glycopolymeren werden wie beschrieben Monomerbausteine über radikalische Addition aufgebaut. Dabei handelt es sich um eine recht unspezifische Reaktionsführung, mit der kein kontrollierter Einbau unterschiedlicher Monomerbausteine möglich ist und somit maßgeschneiderte Glycopolymere für einen speziellen Rezeptor nicht hergestellt werden können. Das Gleiche gilt auch für den Aufbau bisheriger Dendrimerstrukturen^{[362],[363],[364],[365],[366],[367],[368]} bei denen sich die Glycoside nicht in größerer Zahl variieren lassen. Diese Strukturen eignen sich deshalb hauptsächlich, um polyvalente Wechselwirkungen aufzubauen. Deshalb bildet das bei der *S*-Glycopeptidsynthese verwendete Synthesekonzept ein optimales Werkzeug zum Modellieren neuer Glycosidstrukturen (**Schema 105**). Der große Vorteil dabei liegt in der Möglichkeit, kleine *S*-Glycopeptide optimal mit guten Affinitäten für einen bestimmten Rezeptor zu modellieren (Zucker, Linker, Rückgrataminosäure). Es ist davon auszugehen, dass bei Verwendung dieses Synthesekonzepts, in Kombination mit Polymer- und Dendrimer-Architekturen, neue polyvalente Inhibitoren erzeugt werden kön-

nen, die spezifisch als kompetitive Hemmstoffe eingesetzt werden könnten. Somit könnte sich ein interessantes Anwendungsgebiet für die enzymatisch stabilen *S*-Glycopeptide bei in vitro- und in vivo-Anwendungen ergeben^[369]. Dazu könnte man die *S*-Glycopeptide auf Quantum Dots oder Magnetic Beads aufbringen^[370]. Über ein vorgeschaltetes Lectin-Screening nach der kombinatorischen Synthese könnten die geeigneten Kandidaten für ein polyvalentes Mimetikum ausgewählt werden. Daraus würde sich eine breite Anwendungsmöglichkeit für die kombinatorisch synthetisierten *S*-Glycopeptide für zukünftige Entwicklungen ergeben.

Schema 105: Variationensmöglichkeiten am *S*-Glycopeptid über die Bausteine



7.2 Auswahl der Lectine

Um zu zeigen, dass die hergestellten *S*-Glycopeptid-Bibliotheken an Kohlenhydrat-Rezeptoren binden können, soll über ein optisches Screening mit käuflichen Lectinen die Anbindung unterschiedlicher *S*-Glycopeptide untersucht werden. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Auswahl geeigneter Lectine
- Sichtbarmachen der Lectine über eine spezifische Färbemethode
- Entwicklung eines Lectin-Screening-Tests

In der Molekularbiologie werden Lectine schon lange zur Unterscheidung von Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen verwendet. Dabei werden vor allem gut isolierbare pflanzliche Lectine verwendet, die meist aus Samen oder Wurzeln der Pflanze mittels Affinitätschromatographie über immobilisierte Zucker gewonnen werden. Entscheidend für ihre spezifische Anbindung sind der Aufbau des kohlenhydraterkennenden Zentrums (CRD) und deren dreidimensionale Verteilung auf der Proteinoberfläche. Dabei ist das CRD für die spezifische Anbindung der Glycoside und die multiple Verteilung für die polyvalenten Wechselwirkungen verantwortlich. Pflanzliche Lectine besitzen einen sehr heterogenen Aufbau und werden oft nach ihrer Zuckerspezifität eingeteilt. Man kann auch eine taxonomische Einteilung vornehmen, die aber keine strukturellen Gesichtspunkte berücksichtigt. So spricht man von Legume-Lectinen (aus den Leguminosen), Chitin-binding Lectinen, Monocot mannose-binding Lectinen, Cucurbitaceae pholem Lectinen, Amaranthin Lectinen. Dabei wurden die Lectine oft mit dem lateinischen Namen der Pflanze aus der sie isoliert werden bezeichnet. Generelle Regel für deren Bezeichnung gibt es nicht und die Abkürzung des Trivialnamens wird oft verwendet.

Die Pflanzenlectine wurden nach ihrer Zuckerspezifität ausgesucht, wobei zwischen Lectinen zu unterscheiden ist, die Monosaccharide oder Oligosaccharide erkennen^[371] (**Tabelle 28**). Legume-Lectine sind eine große Familie von homologen Proteinen, die aus den Pflanzen mit dem taxonomischen Namen Leguminosen stammen. Legume-Lectine unterscheiden sich stark in ihrem strukturellen Aufbau. Die größte Zahl der Gruppe besitzt eine Spezifität zu Mannose und Glucose wie Con A oder LCA. Alle Legume-Lectine besitzen in ihren CRDs divalente Kationen (Mn^{2+} , Ca^{2+}), die zur Kohlenhydraterkennung notwendig sind. Bei den chitin-bindenden Lectinen handelt es sich um eine Gruppe die aus Hevein-Einheiten aufgebaut und in der Lage ist sich an Chitin mit hoher Affinität zu binden. Das Hevein besteht aus 43 Aminosäuren und ist reich an Cystein und Glycin. Die Monocot-Lectin-Familie gehört einer relativ neuen Gruppe von Proteinen an. Das erste Lectin das entdeckt wurde, war Galenthus nivalis (1987). Seitdem wurden weitere strukturell verwandte Lectine gefunden, die eine ausgesprochene Affinität zu Mannose haben und deshalb als Monocot Mannose-bindende Lectine bezeichnet werden^[372].

Tabelle 28: Ausgewählte Lectine zur Untersuchung der S-Glycopeptide

| Lectin | Gruppe | Spezifität | Aufbau | Vorkommen |
|--|-------------------|---|--|----------------------|
| <i>Arachis hypogaea</i> (PNA) ^[373] | Legume | Gal terminal (Gal β 1,3GalNAc) | Homotetramer (110 kD) | Erdnuß |
| <i>Canavalia ensiformis</i> (Con A) ^[374] | Legume | Man > Glc | Homotetramer (104 kD) pH > 5.6 Homodimer (52 kD) pH < 5.6 | Riesenbohne |
| <i>Euonymus europaeus</i> (EEA) ^[375] | Keine Gruppe | Gal α 1,3Gal Oligosaccharide | Glycoprotein (166 kD) | Spindelbaum |
| <i>Galanthus nivalis</i> (GNA) ^[376] | Monocot | Man α 1,3Man Oligosaccharide | Homotetramer (50 kD) | Schnee- glöckchen |
| <i>Lens culinaris</i> (Lentil, LCA) ^[377] | Legume | Man > Glc | Aus α - und β - Peptidketten (5.7 u. 17.5 kD) | Linse |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> E (PHA-E) ^[378] | Legume | Gal β 1,4GlcNAc β 1, 2Man Oligosaccharide | Aus Isolectinen (118 kD) | Kidney Bohne |
| <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (WBA-I) ^[379] | Legume | GalNAc > Gal | Dimeres Glycoprotein (58 kD) | Flügelbohne |
| <i>Triticum vulgare</i> (WGA) ^[380] | Chitin bindend | GlcNAc Oligomere | Dimeres Protein | Weizenkorn |

Die in der Tabelle aufgeführten Lectine sind alle käuflich und gut untersucht. Sie sollen deshalb zum Screening der S-Glycopeptide verwendet werden um zu zeigen, dass diese in der Lage sind, mit den CRDs in Wechselwirkung zu treten. Besonders interessant sind dabei die Lectine, die nur mit Oligomeren wechselwirken (EEA, GNA, PHA-E, WGA).

7.3 Auswahl der Färbemethode

Um die Anbindung der Lectine an die *S*-Glycopeptide auf der Zellulosemembran sichtbar zu machen, benötigt man eine geeignete Detektion. Dazu können radioaktiv (^{125}I , ^{35}S), kolloidales Gold oder mit Enzymen markierte Lectine verwendet werden. Bei Western-Blots (Immunoblot) werden häufig mit einem Enzym markierte (gelabelte) Lectine verwendet, um vorhandene Glycopeptide auf der Nitrocellulosemembran sichtbar zu machen^[381]. Das Enzym am Lectin katalysiert dabei eine Farbreaktion mit einem Substrat, wobei die Anbindung des Lectins auf der Nitrocellulose sichtbar gemacht wird. Dabei sollte das Enzym folgende Eigenschaften besitzen^[382]:

- hohe Spezifität für gut nachweisbare Substrate
- Lectin-Enzym-Konjugat sollte keinen Aktivitätsverlust beim Lagern aufweisen
- der gebildete Farbstoff sollte gut auf der Zellulosemembran haften (unlöslich)
- der Färbetest sollte empfindlich und gut reproduzierbar durchzuführen sein
- der Hintergrund sollte sich während der Farbreaktion nicht anfärben

In der Immunologie haben sich die beiden Enzyme Alkalische Phosphatase (AP) und die Meerrettichperoxidase (POD) zur Markierung von Antikörpern durchgesetzt, die bei Western-Blots und bei ELISA-Tests Verwendung finden^[383]. Die Peroxidase aus Meerrettich wird meist als eine Mischung aus Isoenzymen verwendet, in der die Peroxidase C dominiert. Dieses Enzym besitzt eine relativ geringe Molekülmasse von ca. 44 kDa. Aufgrund des hohen Kohlenhydratanteils des Enzyms von über 20 % und der geringen Größe hat sich zur Kopplung mit einem Antikörper die Periodat-Methode als sehr effektiv erwiesen. Dabei werden die Kohlenhydratreste der Peroxidase mit Periodat zum Aldehyd oxidiert, wobei die Kohlenhydratreste in leicht alkalischem Milieu (pH 9,5) mit den zu markierenden Proteinen (Antikörper, Lectin) zu Schiff'schen Basen reagieren. Anschließend werden die labilen Schiff'schen Basen mit NaBH_4 zu stabilen sekundären Aminen reduziert^[384] (reduktive Aminierung). Viele mit POD markierte Lectine sind bereits käuflich zu erwerben (Sigma-Aldrich, EY Laboratories), so dass man sich das Labeln sparen kann. Wichtig bei der Verwendung von POD ist, dass keine Azide zur Haltbarmachung des Lectin-POD-Konjugats wie üblich zugesetzt werden, da Azide die POD-Aktivität hemmen. Alternativ kann Thymol als antibakterielles Agens zugegeben werden. Die aus Kälberdarm gewonnene Alkalische Phosphatase ist ein homodimeres Enzym mit einer Molmasse von ca. 140 kDa. Es wird häufig mit Avedin (68 kDa) gekoppelt, indem Glutardialdehyd im Einschrittverfahren zu Avedin und AP in leicht saurem Milieu (pH 6,8) zugegeben wird und über die freien Amingruppen (Lys) die beiden Proteine miteinander kovalent verknüpft werden^[385]. Anschließend wird das Avedin-AP-Konjugat säulenchromatographisch getrennt und kann bei 4°C in Tris/HCl-Puffer gelagert werden. Das nachzuweisende Protein (Antikörper, Lectin) lässt sich aus sterischen und chemischen Gründen oft nur unter großem Aufwand direkt mit AP direkt markieren. Eine Markierung mit Biotin^[386] dagegen ist oft problemlos möglich, und viele Lectine sind mit

Biotin gelabelt käuflich (Sigma-Aldrich). Avedin und Biotin bilden zusammen einen sehr starken Avedin-Biotin-Komplex ($K_d = 10^{-15}$) der sehr beständig ist (pH, Temperatur, Denaturierungsbedingungen) und zum indirekten Markieren des Lectins verwendet werden kann^{[387],[388],[389]}. Für die beiden Enzyme stehen eine Reihe von Substraten zur Verfügung, die mit dem Enzym zur Bildung eines wasserunlöslichen Farbstoffs führen, die das Lectin sichtbar machen (**Tabelle 29**).

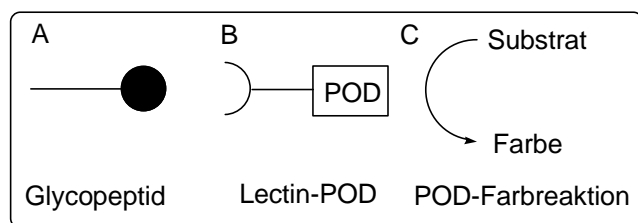
Tabelle 29: Substrate für Farbreaktion mit Peroxidase und alkalische Phosphatase

| Enzym | Substrat | Farbe |
|------------------------------|--|------------------|
| Meerrettich-Peroxidase (POD) | TMB ^{[390],[391]} (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) / H ₂ O ₂ | dunkelblau |
| | DAB ^[392] (3,3'-Diaminobenzidin) / H ₂ O ₂ | braun |
| | AEC ^[393] (3-Amino-9-Ethylcarbazol) / H ₂ O ₂ | rot |
| | CN ^{[394],[395]} (4-Chlor-1-Naphthol) / H ₂ O ₂ | grau-blau |
| | Luminol / H ₂ O ₂ | Chemilumineszenz |
| Alkalische Phosphatase (AP) | BCIP / NBT ^[396] (Bromchlorindolylphosphat / Nitro-tetrazoliumblau) | blau-purpur |
| | Naphtol AS-MX-Phosphat / fast red | rot |
| | Naphtol AS-MX-Phosphat / fast blue | blau |
| | Neu-Fuchsin | rot |

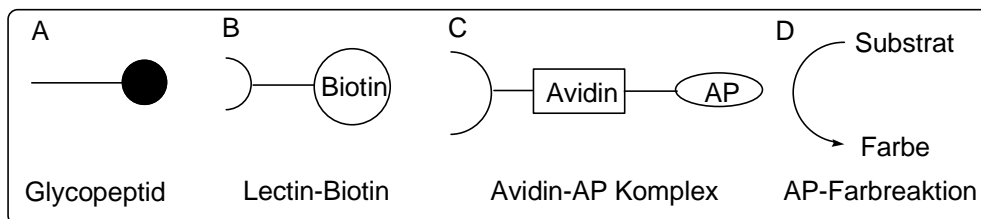
Das Prinzip der Färbereaktion ist in **Schema 106** verdeutlicht. Bei der direkten Farbreaktion mit POD markiertem Lectin wird die Membran mit dem Glycopeptid in einer Lectin-POD-Lösung geschwenkt (A). Nach der Inkubation werden nicht angebundene Lectine von der Membran ausgewaschen (B). Danach wird das Substrat zugegeben und die angebotenen Lectine über den Niederschlag eines unlöslichen Farbstoffs auf der Membran über die POD- / Substrat-Reaktion sichtbar gemacht (C). Bei der indirekten Methode über biotinyliertes Lectin wird nach der Anbindung des Lectins (B) mit Avedin-AP inkubiert (C) und erst anschließend die Farbreaktion (D) durchgeführt. Somit ist bei der indirekten Methode eine Folgekubation zur Markierung des Lectins notwendig.

Schema 106: Sichtbarmachen der angebotenen Lectine über Enzym-Farbreaktion

Direkte Farbreaktion mit Lectin-POD:

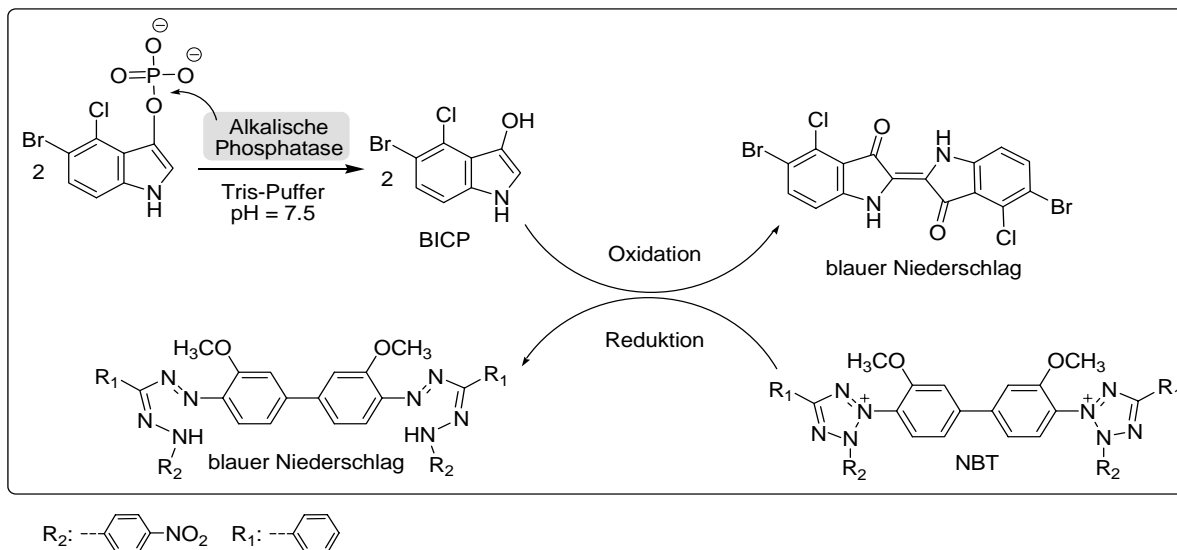


Indirekte Farbreaktion mit Lectin-Biotin und Avidin-AP:

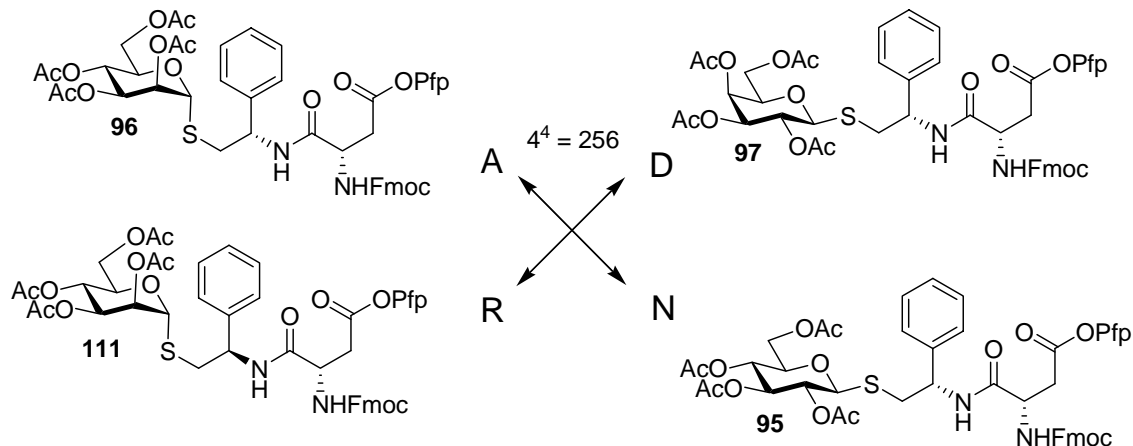


POD: Peroxidase AP: Alkalische Phosphatase

Beide Verfahren sollen mit unterschiedlichen Substraten auf ihre Anwendbarkeit für ein Lectin-Screening der S-Glycopeptide überprüft werden. Dazu wurde als erstes die indirekte Methode über biotinylierte Lectine mit Avedin-AP untersucht. Als Farbstoff wurde BCIP/NBT verwendet, der am gebräuchlichsten und sensitivsten für AP-Reaktionen ist und einen blau-purpurnen Farbstoff ergibt (**Schema 107**). Die Signalstärke kann durch die Länge der Inkubationszeit beeinflusst werden und verhält sich zu Beginn proportional zur Reaktionszeit. Im Allgemeinen erreicht man mit dieser Methode deutliche Verfärbungen bei einer geringen Hintergrundverfärbung. Dabei dient BCIP als AP-Substrat, welches nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient NBT, welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff abreagiert. NBT wirkt somit farbverstärkend und erhöht die Sensitivität.

Schema 107: Farbreaktion von BCIP / NBT mit Alkalischer Phosphatase

Um die Färbemethode auf ihre Anwendbarkeit zu überprüfen, wurden mit 4 *S*-Glycopeptid-Bausteinen (A, R, N, D) drei gleiche 256-Bibliotheken mit tetrameren *S*-Glycopeptiden aufgebaut und die Zucker der Glycopeptide für das Lectin-Screening deacetyliert (**Schema 108**).

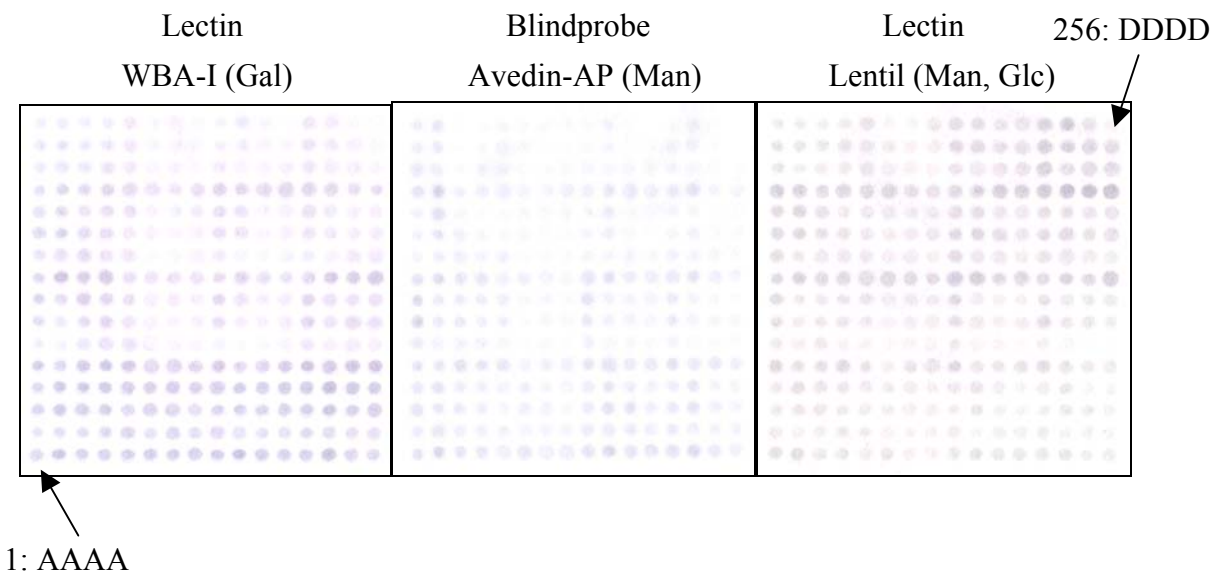
Schema 108: *S*-Glycopeptid-Bausteine (A, R, N, D) für die 256-Bibliotheken

Als Lectine wurden *Psophocarpus tetragonolobus* (WBA-I) und *Lens culinaris* (Lentil), die biotinyliert waren, verwendet. Bei dem Färbetest wurde wie folgt vorgegangen:

1. zwei Zellulosemembranen wurden 2 h mit WBA-I und Lentil inkubiert
2. nach dem Waschen wurden die zwei Membranen 1 h mit Avedin-AP inkubiert
3. zusätzlich wurden die 3 Membranen als Blindprobe 1 h mit Avedin-AP inkubiert
4. nach dem Waschen wurde die Farbreaktion mit BCIP/NBT durchgeführt

Das Ergebnis des Färbetests ist in **Abbildung 10** wiedergegeben. Dabei befindet sich die Membran, die nur mit Avedin-AP inkubiert wurde in der Mitte, links die mit WBA-I und rechts die mit Lentil zusätzlich inkubierte Membran. Beim Vergleich der WBA-I und Lentil Membran mit der Avedin-AP Membran erkennt man, dass Avedin-AP selbst zu einem Anfärben der Spots geführt hat. Das lässt sich nur dadurch erklären, dass Avedin selber an die S-Glycopeptide bindet und im zweiten Inkubationsschritt die angebondenen Lectine von den S-Glycopeptiden verdrängt. Dadurch wurde ein falsches Ergebnis erzielt, und es konnte nicht zwischen der Anbindung von Lectin und Avedin unterschieden werden, so dass bei allen Membranen eine ähnliche Anfärbung auftrat, obwohl WBA-I nur Galactose und Lentil nur Mannose, Glucose erkennen sollte. Des Weiteren wird Avedin in der Literatur eine Affinität zu Mannose zugeschrieben. Aufgrund des störenden Einflusses von Avedin ist die Methode für ein Lectin-Screening der S-Glycopeptide ungeeignet, da keine Unterscheidung zwischen Affinität des Lectins und des Avedins getroffen werden kann.

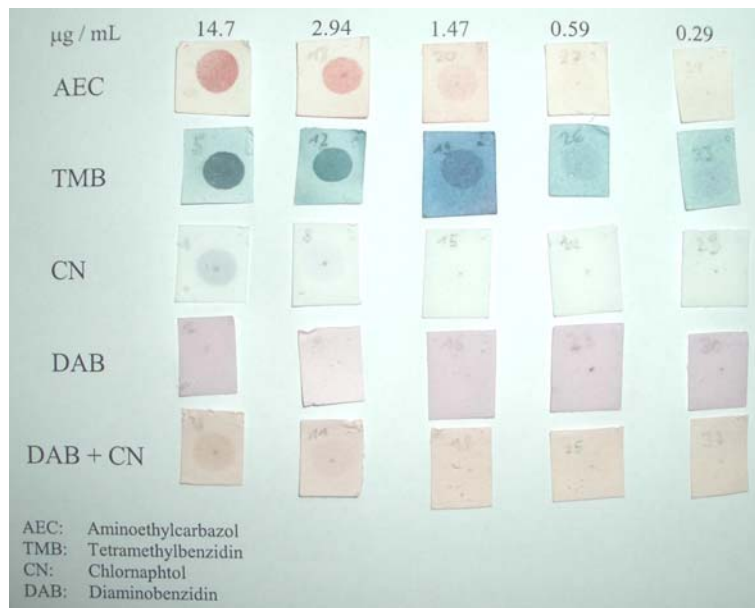
Abbildung 10: Farbtest mit AP-BCIP/NBT und biotinylierten Lectinen WBA-I, Lentil



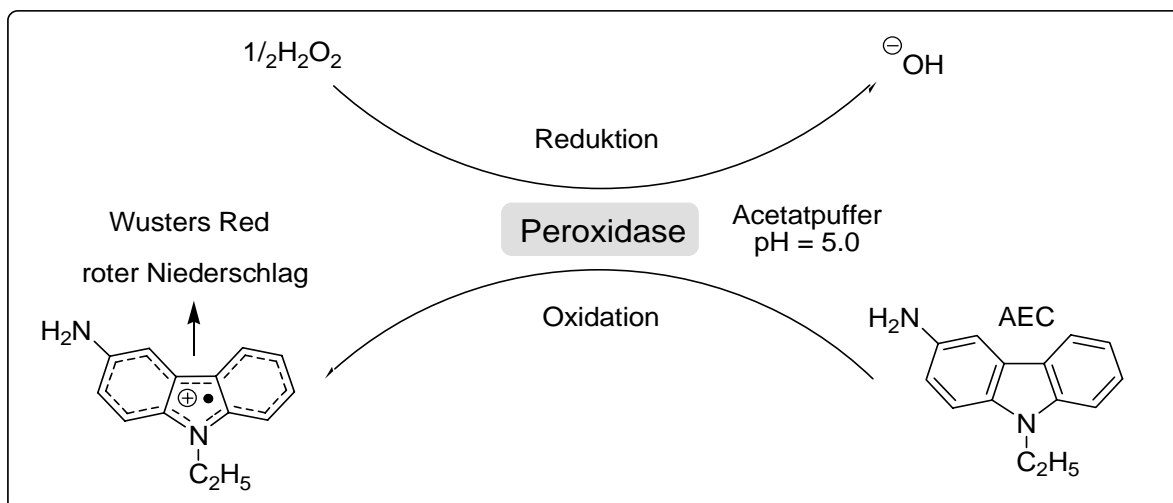
Zur Untersuchung der anderen Färbemethode über direkt mit POD markierten Lectinen, wurden zuerst unterschiedliche Substrate (AEC, TMB, CN, DAB, DAB + CN) für die Farbreaktion getestet. Dazu wurde S-Glycopeptid-Baustein A mehrmals (25 mal) auf eine Zellulosemembran aufgespottet, die Zucker deacetyliert und in einzelne Papierschnipsel aufgeteilt. Um zu überprüfen wie empfindlich die einzelnen Farbreaktionen sind, wurde eine Lectin-Stammlösung (14.7 µg/mL) aus ConA-POD verdünnt (2.94, 1.47, 0.59, 0.29 µg/mL), und als Inkubationsreagenz verwendet. Bei dem Färbetest wurde wie folgt vorgegangen:

1. 5 Papierschnipsel wurden mit je 5 Konzentrationen an ConA-POD inkubiert
2. nach 30 min wurden die 25 Papierschnipsel kurz gewaschen
3. die 25 Papierschnipsel wurden auf je 5 Gefäße verteilt
4. jedes Gefäß enthielt 5 Papierschnipsel mit den 5 unterschiedlich inkubierten ConA-POD Konzentrationen
5. in jedes Gefäß wurde gleichzeitig ein anderes Färbereagenz zugegeben

Das Ergebnis des Färbetests ist in **Abbildung 11** zu erkennen. Dabei zeigte sich, dass mit DAB und DAB + CN^[397] ein starker Hintergrund zu erkennen war. Die Spots sind deshalb schlecht zu erkennen und zum Detektieren der Lectin-POD auf der Zellulosemembran ungeeignet. Die Verwendung von CN zeigt bei der höchsten Lectin-POD-Konzentration (14.7 µg/mL) einen deutlichen grau-blauen SPOT mit geringem Hintergrund. Bei der nächst kleineren Konzentrationsstufe (2.94 µg/mL) ist der SPOT nur noch schwach zu erkennen. TMB dagegen besitzt die höchste Empfindlichkeit und selbst bei der geringsten Konzentration (0.29 µg/mL) ist ein schwacher SPOT zu erkennen. Leider entspricht die Farbintensität nicht der verwendeten Lectin-POD-Konzentration. Bei niedrigerer Konzentration (1.47 µg/mL) kann es zu einer stärkeren Verfärbung kommen und somit zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen. Das zeigt sich auch durch eine starke Verfärbung des Hintergrunds. Die besten Ergebnisse von allen Färbereagenzien lieferte AEC. Dabei ist nur ein schwacher Hintergrund sichtbar und die Spots mit Lectin-POD sind als roter Farbflecken gut zu erkennen. Auch die Reproduzierbarkeit der Färbereaktion war gut, da bei geringerer Konzentration an Lectin eine deutliche, immer gleich starke Abnahme der Verfärbung zu erkennen war. Bei einer Konzentration von 0.59 µg/mL ist noch ein schwacher SPOT zu erkennen, bei einer Konzentration > 2.94 µg/mL ergibt sich ein optimales Verhältnis, um die mit POD markierten Lectine sichtbar zu machen. Somit ist die Empfindlichkeit der Färbereaktion für das Lectin-Screening völlig ausreichend.

Abbildung 11: Farbttest mit ConA-POD und verschiedenen Substraten

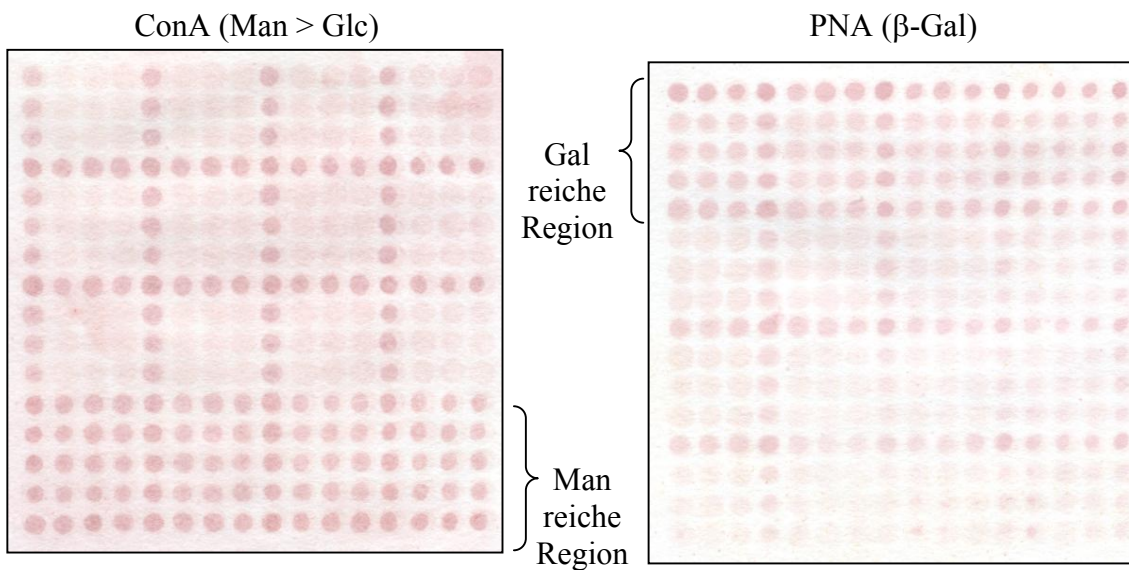
Bei der Farbreaktion von 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) katalysiert die Peroxidase die Oxidation von AEC, wobei Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert wird. Dabei entsteht aus AEC ein Radikalkation das zu einem rot gefärbten Polymer (Wusters Red) abreagiert und auf der Membran, wo sich das gebundene Lectin befindet, ausfällt.

Schema 108: Farbreaktion von AEC mit Peroxidase

Um die Färbemethode mit AEC auf ihre Anwendbarkeit bei den S-Glycopeptid-Bibliotheken zu überprüfen, wurden zwei Membranen mit den gleichen 256-Bibliotheken wie bei dem Farbttest mit Avedin-AP und BCIP/NBT erzeugt und die Zucker der S-Glycopeptide für das Lectin-Screening deacetyliert. Anschließend wurden die beiden Membranen mit ConA-POD und PNA-POD inkubiert (30 min) und nach dem Waschen AEC/H₂O₂ als Substrat zugegeben. Das Ergebnis des Farbttests ist in **Abbildung 12** zu sehen. Man erkennt, dass die beiden

Membranen eine entgegengesetzte Verfärbung aufweisen. Das muss auch so sein, da ConA Mannose erkennt und im unteren Bereich der Membran eine mannosereiche Region an *S*-Glycopeptiden vorhanden ist. PNA dagegen erkennt β -Galactose, und eine stärkere Verfärbung tritt im oberen Bereich der Membran auf, wo sich β -galactosereiche *S*-Glycopeptide befinden. Da von ConA und PNA schon monomere Zucker erkannt werden, sind auf beiden Membranen viele tetramere *S*-Glycopeptide sichtbar geworden. Somit entspricht der Färbetest dem vorhergesagten Ergebnis der Lectinerkennung, und die Verwendung von Peroxidase markierten Lectinen mit AEC/H₂O₂ als Substrat ergibt ein gut reproduzierbares Ergebnis des Lectin-Screenings. Deshalb soll bei den folgenden Versuchen der Färbetest für das weitere Lectin-Screening verwendet werden.

Abbildung 12: Farbttest mit AEC und den POD-markierten Lectinen ConA und PNA



7.4 Durchführung des Lectin-Screenings

Für ein Lectin-Screening müssen die Membranen vorbereitet werden. Vor der Inkubation mit den Lectinen müssen die deacetylierten *S*-Glycopeptide zuerst hydratisiert werden. Dazu werden die Membranen mit TBS-Puffer (pH 7.5, 30 min) geschwenkt. Anschließend werden die Membranen normalerweise mit Blockierungslösung (0.5% Casein oder 3% BSA oder 2% Milchpulver in TBS) gewaschen (1-2 h), um unspezifische Bindungsstellen auf der Membranoberfläche abzusättigen. Bei den Vorversuchen hat sich jedoch gezeigt, dass eine Blockierung der Zellulosemembran nicht notwendig und das Waschen mit TBS/Tween (0.25%) völlig ausreichend war. Danach werden folgende Schritte durchgeführt:

A.) Das peroxidasegelabelte Lectin wird in TBS-Puffer (pH = 7.5) gelöst (5 nmol auf 100 mL → 2 bis 5 µg/mL). Je nach Aktivität der Peroxidase muss nach der Farbreaktion die Konzentration der Lectin-Lösung angepasst werden. Gegebenenfalls müssen der Lectin-Lösung noch divalente Kationen (CaCl₂, MnCl₂) für deren Aktivität zugegeben werden. Den hergestellten Lösungen wird kein NaN₃ zugegeben um die Bildung von Bakterien zu verhindern, was zu einer kompetitiven Hemmung der Peroxidase führen würde. Die Lösungen können 2 Monate ohne Bedenken im Kühlschrank aufbewahrt werden. Danach wird die Membran mit dem Lectin inkubiert. Dabei hat sich gezeigt, dass je nach Glycopeptid und Lectin zwischen 30 min bis 1 h Inkubationszeiten ausreichend sind.

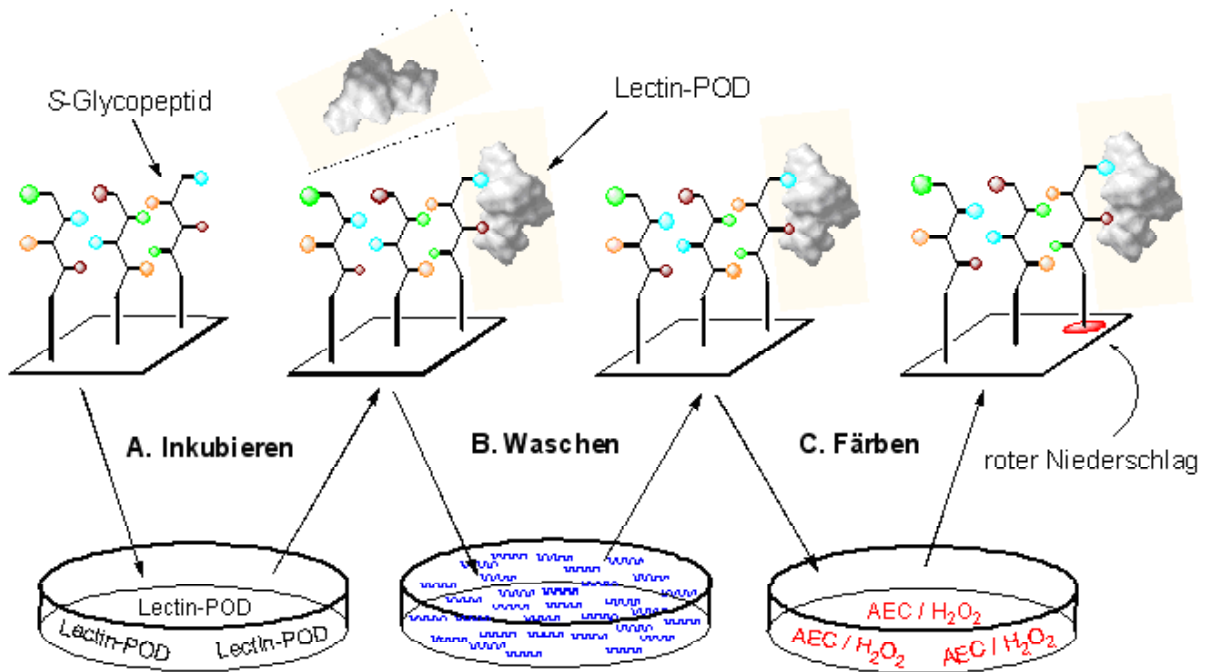
B.) Waschen der Membran mit TBS (1 x 30s, 2 x 5 min) und TBS/Tween (1 x 5 min) um nicht angebundene Lectine von der Membranoberfläche zu beseitigen. Dabei sollten längere Spülzeiten vermieden werden.

C.) Danach wird die Membran mit H₂O₂/AEC/Acetatpuffer-Färbelösung geschwenkt bis die nötige Farbintensität erreicht wird (5-15 min), danach wird durch mehrmaliges kurzes Waschen mit H₂O die Farbreaktion abgebrochen. Findet keine Verfärbung statt, sollte die Lectin-Lösung unter A. stärker konzentriert werden. Ist die Verfärbung zu stark, muss die Lectin-Lösung unter A. verdünnt werden. Eine Änderung der Inkubationszeiten hat dabei einen deutlich geringeren Einfluss und sollte erst verändert werden, wenn das Anpassen der Lectin-Lösung (Konzentration) keinen Einfluss hat. Nach der Färbereaktion ist das Ergebnis gleich zu dokumentieren, da die Farbe der einzelnen Spots im Laufe der Zeit verblasst. Dazu kann das Papier auf einen Scanner gelegt oder mit einer Digitalkamera abfotografiert werden.

Anschließend kann den abgefärbten Spots, bei denen die Lectine ange bunden haben, über die SPOT-Positionen die aktiven *S*-Glycopeptide zugeordnet werden. Dadurch ist es möglich, in kurzer Zeit eine große Zahl (Array) an *S*-Glycopeptiden (256 und größer) gleichzeitig auf ihre Aktivität mit verschiedenen Lectinen zu testen. Somit kann das Verfahren sehr gut zur Untersuchung großer kombinatorischer Bibliotheken verwendet werden, um optimale Koh-

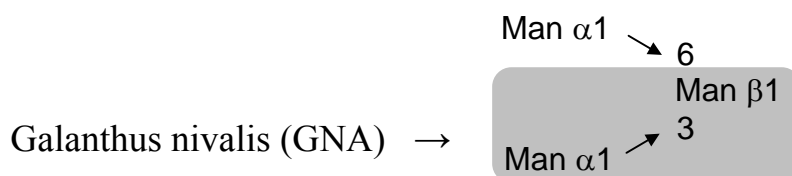
lenhydrat-Bindungspartner zu finden. Außer der Verwendung von markierten Lectinen könnten markierte Antikörper, Zellen, Bakterien oder Viren eingesetzt werden, wodurch sich eine breite Anwendung für das Screening von S-Glycopeptid-Bibliotheken ergibt.

Schema 109: Durchführung des Lectin-Screenings



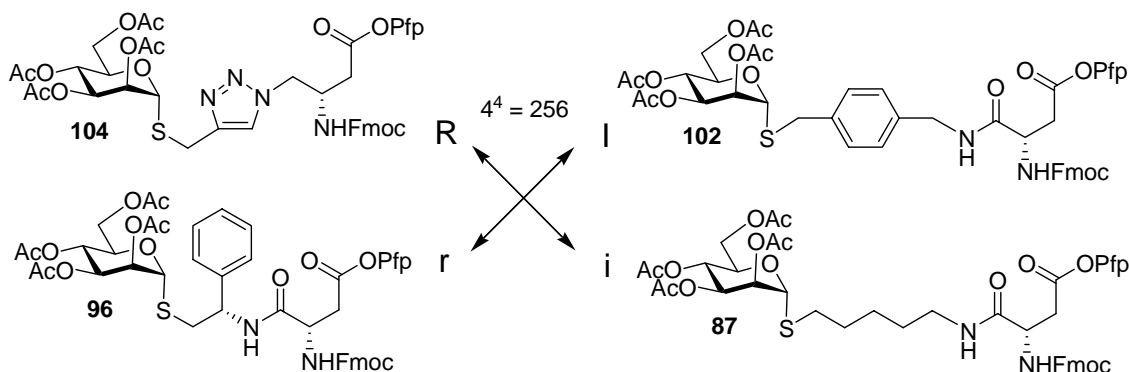
7.5 Ergebnisse des Lectin-Screenings

Um zu zeigen, dass die synthetisierten S-Glycopeptide in der Lage sind, Oligosaccharide zu imitieren, wurden POD-markierte Lectine verwendet, die keine Monosaccharide erkennen können. Dazu wurde als erstes das Monoct-Lectin *Galanthus nivalis*^[398] (GNA) ausgewählt, welches bevorzugt terminale $\text{Man}\alpha(1,3)\text{Man}$ Disaccharideinheiten erkennt:

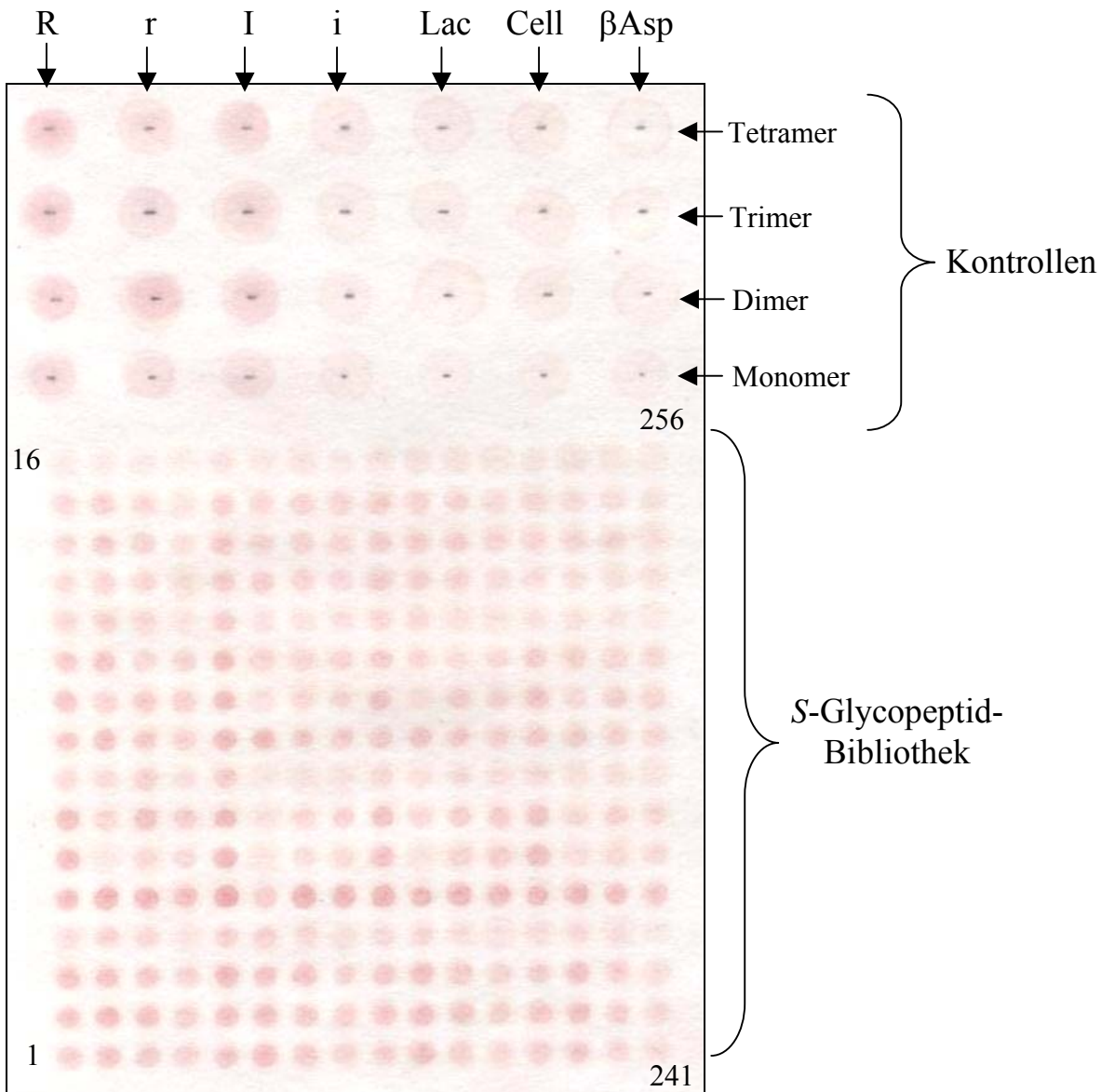


GNA ist ein Tetramer (50 kDa), das aus 4 Subeinheiten (12.5 kDa) aufgebaut ist und Kaninchenerythrozyten agglutiniert, aber nicht menschliche Erythrozyten. Die Aminosäuresequenz des Lectins wurde vollständig entschlüsselt und eine Kristallstruktur wurde bereits aufgenommen^{[399],[400],[401]}. Aufgrund der hohen Spezifität für terminale Mannoseeinheiten wurde mit GNA ein ELISA-Test entwickelt, mit dem HIV- und SIV-Glycoproteine quantifiziert werden können^{[402],[403]}. Um die ausgeprägte Erkennung von Mannoseeinheiten zu untersuchen, wurde eine 256er S-Glycopeptid-Bibliothek mit Mannose-Bausteinen aufgebaut, die sich durch ihren Spacer zwischen Mannose und Rückgrat unterschieden (**Schema 110**).

Schema 110: Aufbau der 256er S-Glycopeptid-Bibliothek für GNA-Screening



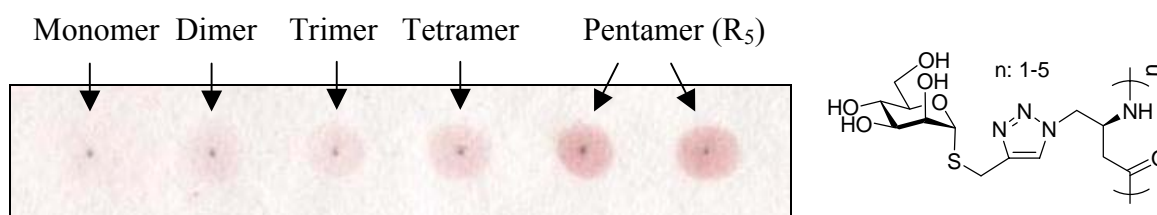
Zusätzlich zu der S-Glycopeptid-Bibliothek mit den tetrameren S-Glycopeptiden wurden im oberen Bereich der Membran Kontrollen aus Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer aufgetragen um zu untersuchen, ob kleinere S-Glycopeptide erkannt werden. Dazu wurden die Mannose-S-Glycopeptid-Bausteine (R, r, I, i) der kombinatorischen Bibliothek und zusätzlich der Lactose- und Cellobiose-S-Glycopeptid-Baustein mit n-Pentyllinker und das β -Asparaginsäurerückgrat aufgespottet. Das Ergebnis des Screenings ist in **Abbildung 13** wiedergegeben.

Abbildung 13: Screening der *S*-Glycopeptid-Bibliothek (R, r, I, i) mit GNA

Anhand der unterschiedlich starken Verfärbung der Spots kann man erkennen, dass die tetrameren Mannose-*S*-Glycopeptide unterschiedlich starke Affinitäten zu GNA besitzen. Die dunkleren Flecken enthalten mehr GNA, die sich aufgrund der stärkeren Affinität zu den *S*-Glycopeptiden beim Waschen der Membran nicht abgelöst haben. Der Membranhintergrund ist sehr gering eingefärbt, da die Zellulose von GNA aufgrund der ausgeprägten Mannose-Spezifität nicht erkannt wird. Gleiches gilt bei den Kontrollen mit Lactose und Cellobiose. Auch das β -Aspartatrückgrat trägt nicht wesentlich zur Erkennung bei. Dafür spielen die Spacer eine wichtige Rolle für die Erkennung der Zucker. Wie bei den Kontrollen zu erkennen ist, führen aromatische Spacer zu einer deutlichen Verstärkung des Signals, der *n*-Pentyllinker von Baustein i führt zu schwächerer Anfärbung. Um den Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurden Homomere des Mannose-*S*-Glycopeptid-Bausteins (R) mit einem 1,2,3-

Triazolspacer aufgetüpfelt und einem erneuten Screening mit GNA unterworfen (**Abbildung 14**). Bei Vergleich der einzelnen Spots in **Abbildung 14** ist eine deutliche Zunahme der Verfärbung von Trimer zu Tetramer zu erkennen, wobei von Tetramer zu Pentamer die stärkste Farbvertiefung auftritt. Bei Monomer ist keine Verfärbung und bei Dimer und Trimer nur eine schwache Verfärbung zu erkennen. Inwieweit der heterozyklische Spacer zur Zuckerererkennung beiträgt, kann nicht abgeschätzt werden. Es ist denkbar, dass der Aromat selber im kohlenhydrat-erkennenden Zentrum zu einer Verstärkung der Wechselwirkung führt oder das pentamere *S*-Glycopeptid in eine günstigere Konformation zwingt, die von GNA besser erkannt wird.

Abbildung 14: GNA-Erkennung von homomeren Mannose-*S*-Glycopeptiden (R_5)

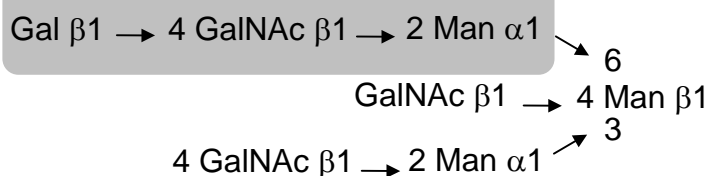


Die Ergebnisse des Lectin-Screenings mit GNA lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- GNA erkennt *S*-Glycopeptide mit unterschiedlicher Spezifität
- aromatische Spacer führen zu einer Signalverstärkung
- Pentamere Mannose-*S*-Glycopeptide mit Triazol-Spacer besitzen eine deutlich höhere Affinität zu GNA als die tetrameren
- Das β -Aspartatrückgrat wird nicht von GNA erkannt
- Das Screening ist gut für die Suche neuer GNA-Inhibitoren geeignet

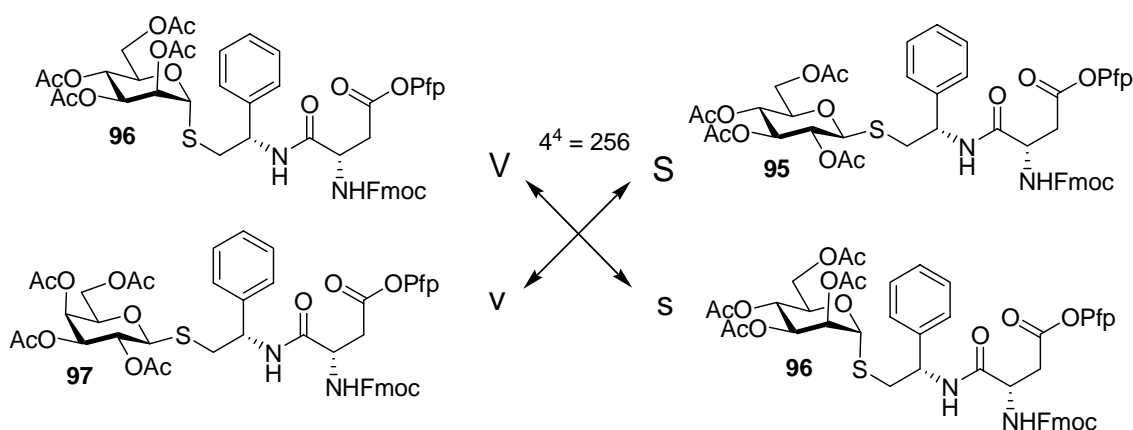
Als nächstes wurden Versuche mit dem Legume-Lectin *Phaseolus vulgaris*^[404] (PHA-E) durchgeführt. PHA-E ist aus tetrameren Einheiten aufgebaut und besitzt eine Molekülmasse von 118 kDa^[405]. Daneben gibt es 4 weitere Isolectine^[406] L₄, L_{3E}, L_{2E2}, LE₃ die alle aus der Kidney-Bohne über Affinitätschromatographie mit Oligosacchariden isoliert wurden^[407]. PHA-L erkennt dabei die doppelte Verzweigung in der Mannose Core Struktur und wird als hochselektiver Tumor-Marker in der Krebsdiagnose verwendet^{[408],[409],[410],[411]}. PHA-E erkennt dagegen nur die einfache Seitenverzweigung und besitzt eine hohe Affinität zu Gal β (1,4)GalNAc β (1,2)Man^[412]. Versuche mit Monosacchariden haben gezeigt, dass es nicht möglich ist, mit einfachen Zuckern PHA-E zu inhibieren und als kleinste inhibierende Einheit das Disaccharid GalNAc β (1,2)Man^[413] darstellt. Mit PHA-L und PHA-E kann man so bivon monoverzweigten *N*-Glycanen unterscheiden^[414]. Die PHA-Lectine in der Pflanze dienen dabei als Abwehrgift. Der Verzehr von ungekochten roten Kidney-Bohnen führt zu Brechreiz, damit schützt sich die Pflanze gegen den Verzehr durch Tiere.

Phaseolus vulgaris
(PHA-E) →

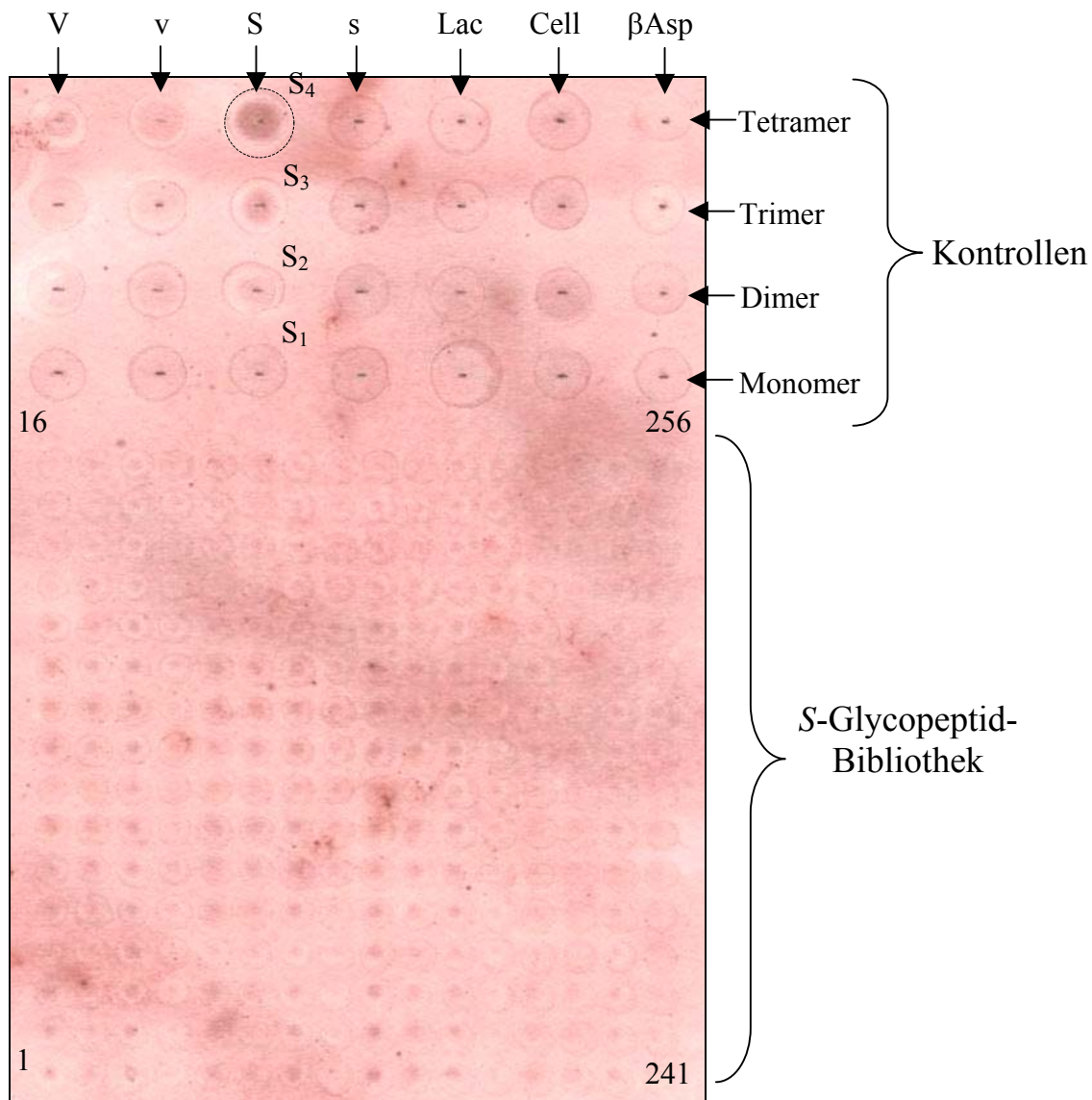
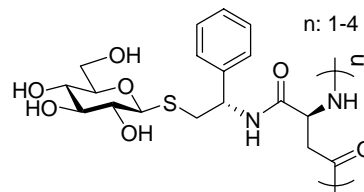
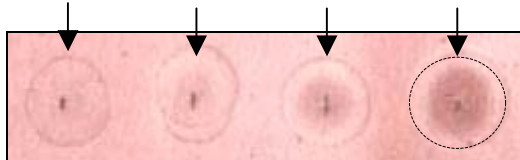


Um zu untersuchen, ob PHA-E tetramere S-Glycopeptide erkennen kann, wurde eine neue 256er S-Glycopeptid-Bibliothek aufgebaut (**Schema 111**). Dazu wurden S-Glycopeptid-Bausteine (V, v, S, s) mit den Monosacchariden Mannose (2 mal), Galactose, Glucose verwendet, ohne den Spacer (Seitenkettenaromat) zu variieren, um eine spätere Auswertung der Ergebnisse zu vereinfachen. Wie bei dem Screening mit GNA sind die Kontrollen wieder im oberen Bereich der Membran aufgetragen. Die Ergebnisse des Screenings sind in **Abbildung 15** wiedergegeben.

Schema 111: Aufbau der 256er S-Glycopeptid-Bibliothek für GNA-Screening



Dabei erkennt man, dass der Hintergrund der Zellulosemembran deutlich stärker angefärbt ist als beim vorherigen Screening mit GNA. Das Lectin PHA-E scheint auch zu Zellulose eine gewisse Affinität zu besitzen. Trotz des schwach angefärbten Hintergrunds besitzen einzelne SPOTs der Bibliothek eine tiefere Verfärbung. Eine genaue Auswertung wird dadurch deutlich erschwert, so dass bei einem Screening mit PHA-E besser ein anderes Trägermaterial (z. B. Polypropylenmembran) verwendet werden sollte oder unspezifische Bindungen mit einer Blockierungslösung vor dem Test abgesättigt werden sollten. Beim Betrachten der Kontrolle S (Glucose-Baustein) erkennt man von Trimer zu Tetramer eine eindeutige Zunahme der Farbvertiefung, die unterhalb der Membran in **Abbildung 16** nochmals vergrößert dargestellt ist. Bei dem Tetramer handelt es sich um das homomere S-Glycopeptid, das aus 4 Glucose-S-Glycopeptid-Bausteinen (S₄) aufgebaut ist (**Schema 112**).

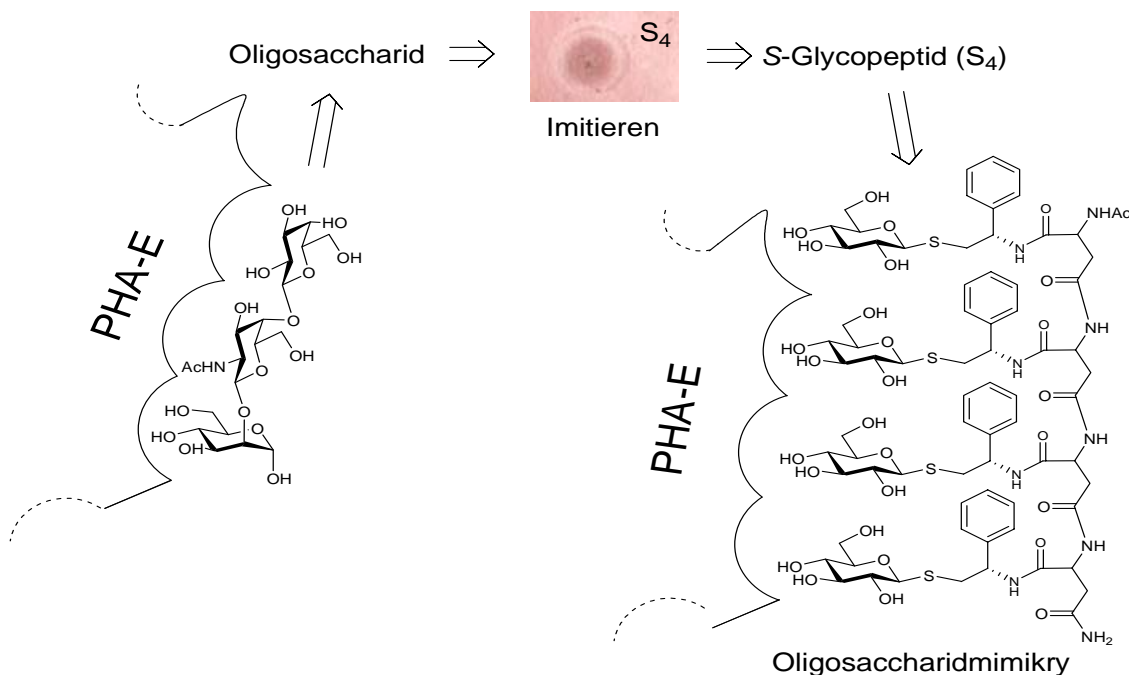
Abbildung 16: Screening der S-Glycopeptid-Bibliothek (V, v, S, s) mit PHA-EMonomer Dimer Trimer Tetramer (S₄)

Interessant bei der Erkennung des homomeren Glucose-S-Glycopeptid (S_4) durch PHA-E sind folgende Sachverhalte:

- Erst beim Tetramer findet eine deutliche Erkennung durch PHA-E statt
- Laut Literatur besitzt PHA-E eine spezifische Erkennung von Galactose- und Mannose-Oligosacchariden der Form $\text{Gal}\beta(1,4)\text{GalNAc}\beta(1,2)\text{Man}$. In dem S-Glycopeptid S_4 sind aber nur Glucoseeinheiten vorhanden, also keine Galactose oder Mannose
- Die Zucker im S-Glycopeptid sind dabei nicht über glycosidische Bindungen miteinander verknüpft
- Die Homomeren von Mannose (V_4) und Galactose (v_4) (siehe Kontrollen) werden von PHA-E nicht erkannt
- Bei den verwendeten S-Glycopeptiden wurden nur die Zucker variiert, das Rückgrat und der Spacer sind bei allen S-Glycopeptiden gleich gewählt
- Der aromatische Spacer ist nicht direkt an der molekularen Erkennung im kohlenhydrat-bindenden Zentrum beteiligt, sondern hauptsächlich der Zucker ist für die Erkennung verantwortlich

Eine Wiederholung des Screenings mit Monomeren, Dimeren, Trimeren und Tetrameren mit dem Glucose-Baustein (S) ergab erneut das gleiche Ergebnis. Somit ist davon auszugehen, dass tetramere Glucose-S-Glycopeptide (S_4) in der Lage sind das Oligosaccharid $\text{Gal}\beta(1,4)\text{GalNAc}\beta(1,2)\text{Man}$ zu imitieren und für PHA-E-Rezeptoren ein neues Oligosaccharidmimikry darstellt (**Schema 112**).

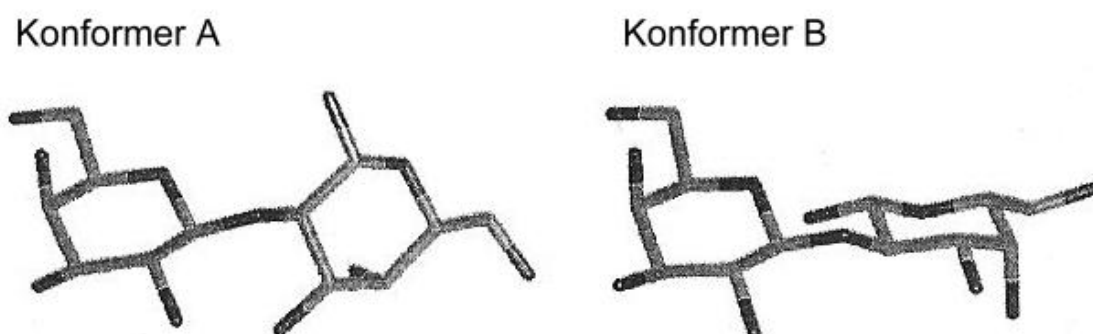
Schema 112: Imitierende Eigenschaften des homomeren S-Glycopeptids (S_4)



Der Grund warum sich Oligosaccharide mit S-Glycopeptid imitieren lassen hängt mit der flexiblen Struktur von Oligosacchariden und mit dem Sachverhalt, dass nur bestimmte Teile des Oligosaccharids zu einer molekulare Erkennung beitragen^{[415],[416]}. So sind meistens nur wenige OH-Gruppen für die Wechselwirkungen im kohlenhydrat-Erkennenden Zentrum notwendig. Wichtig jedoch ist die räumlich richtige konformative Anordnung der OH-Gruppen.

Genaue Untersuchungen der Flexibilität von Disacchariden mit Molekular Modelling^{[417],[418]} und NMR-Spektroskopie^{[419],[420],[421],[422],[423]} haben gezeigt, dass nur eine geringe Anzahl an möglichen Konformationen für die molekulare Erkennung wichtig sind und die Lectine an das Konformer binden das am besten in die Bindungstasche passt. Während der Anbindung am kohlenhydraterkennenden Zentrum wird die freie Drehbarkeit der Zucker aufgehoben, was zu einer Verringerung der Entropie, aber gleichzeitig zu einer Erhöhung der Bindungsenthalpie führt. Ein gut untersuchtes Beispiel ist das Disaccharid Gal β (1,2)Gal bei dem in wässriger Lösung 2 Konformere bevorzugt sind, wie über NMR und Molekular Modelling gezeigt wurde (**Schema 113**). Dabei wurde in Versuchen mit Galectinen festgestellt, dass Konformer A an Mistletoe Agglutinin und das Konformer B an Avian Galectin bindet. Somit ermöglicht die flexible Struktur von Gal β (1,2)Gal das Anbinden an verschiedene Lectin-Rezeptoren und macht eine Kodierung eines einzigen "Schlüssels" für unterschiedliche "Schlösser" möglich^[424]. Berücksichtigt man dabei die Vielfalt der Verknüpfungsmöglichkeiten von 20 verschiedenen Hexosen zu Hexasacchariden, so ergeben sich 1.44×10^{15} neue Oligosaccharide, die gleichzeitig an unterschiedliche Rezeptoren binden können. Unter den gleichen Voraussetzungen können mit den Aminosäuren nur 6.4×10^7 Hexapeptide erzeugt werden^[425]. Durch die einzigartigen Verzweigungsstrukturen der Oligosaccharide mit ihren unterschiedlichen Konformeren und ihrer großen Anzahl an OH-Gruppen sind sie wie kein anderes Biomolekül in der Lage, eine unglaubliche biologische Informationsvielfalt auf kleinstem Raum zu speichern.

Schema 113: Bevorzugte Konformere von Gal β (1,2)Gal in Lösung^[426].



NMR-Studien^[427] haben gezeigt, dass S-Glycoside im Vergleich zu den O-Glycosiden eine höhere Flexibilität besitzen und sich besser an die Bindungstasche anpassen können. Bei den S-Glycopeptiden wird die Ausrichtung der Zucker außerdem über das β -Aminosäurerückgrat und den Spacer beeinflusst. Dabei sind Wechselwirkungen zwischen

den Spacern und der Aminosäuren im Rückgrat von Bedeutung. Das Rückgrat bestimmt die Vororientierung der Zucker, wobei die Spacer eine direkte Wechselwirkung von Zucker und Rückgrat vermeiden sollen. Sie dürfen dabei nicht zu flexibel, aber auch nicht zu starr sein. Bei zu großer Flexibilität besteht die Gefahr des "Zurückklappens" der Zucker zum Rückgrat. Bei zu starrem Spacer besteht die Gefahr dass die Zucker zu unflexibel sind und konformativ zu stark eingeschränkt werden. Außerdem können dabei sterische Effekte eine Anbindung des *S*-Glycopeptids erschweren. Um in der Zukunft die Glycopeptide besser modellieren zu können müssen NMR-Experimente^[428] in wässriger Lösung (2D NOESY) und Molekular Modelling-Berechnungen^[429] nebeneinander durchgeführt werden, um ein bessere Verständnis von der räumlichen Struktur der synthetisierten *S*-Glycopeptide zu bekommen. Mit Hilfe dieses neu entwickelten Synthesekonzepts und der kombinatorischen SPOT-Synthese sollte es möglich sein, neue Oligosaccharidinhibitoren auf einfache Weise zu finden. Somit stellen die entwickelten *S*-Glycopeptide eine neue Stoffgruppe von Oligosaccharidmimikry dar, die möglicherweise einen Beitrag zum Öffnen der verschiedenen "Lectin-Schlössern" liefern können^[430].

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Allgemeines

Zur Durchführung und Auswertung der Versuche sowie Isolierung und Charakterisierung der Produkte wurden die folgenden Geräte verwendet:

¹H-,¹³C-NMR-Spektren: Bruker Avance 400 (400 MHz)

Die chemischen Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan (TMS) als inneren Standard oder CDCl₃ (¹³C : 77.16, ¹H : 7.26 ppm) bezogen und in δ-Werten [ppm] angegeben. Als Lösemittel wurde in der Regel Deuterchloroform verwendet, auf die Verwendung von anderen Lösemitteln wie deuteriertem Aceton (Aceton-d₆), Deuteromethanol (CD₃OD) oder deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) wird an entsprechender Stelle verwiesen. Die Auswertung der Protonenspektren erfolgte nach erster Ordnung, die Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben. Die ¹³C-NMR-Signale sind ¹H-breitbandenentkoppelt, die Zuordnung der Signale erfolgte durch Aufnahme von DEPT-Spektren sowie Korrelationsexperimenten (¹H¹H- und ¹³C¹H-COSY). Weitere zweidimensionale Experimente (HMQC, NOESY) wurden bei Bedarf durchgeführt. Die Multiplizitäten werden mit folgenden Abkürzungen bezeichnet:

- s: Singulett
- d: Dublett
- t: Triplet
- q: Quartett
- m: Multiplett
- b: breites Signal
- dd: Dublett vom Dublett
- ddd: Dublett vom Dublett vom Dublett
- dt: Dublett vom Triplet

Massenspektrometrie:

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

Drehwerte:

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

Schmelzpunkte:

Schmelzpunktbestimmungsapparatur Modell SMP-20 der Firma Büchi mit Siliconölbad. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Elementaranalysen:

C-H-N-S-Analysator Euro EA 300 der Firma HEKAtech GmbH.

HPLC:

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

Analytische Dünnschichtchromatographie:

Kieselgel-Polygram SIL G/UV254 Fertigfolien der Firma Macherey & Nagel. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlösung und / oder durch Verkohlung nach Besprühen der Plättchen mit 5%iger ethanolischer Schwefelsäure. Zur Detektion freier Amine wurde Ninhydrin als 5%ige Lösung in n-Butanol verwendet. In Ausnahmefällen wurde zur Detektion eine Iodkammer verwendet.

Präparative Säulenchromatographie:

Glassäulen verschiedener Größen, gepackt mit Kieselgel S der Korngröße 0.032 – 0.063 mm der Firma Macherey & Nagel. Die Laufmittel werden in den einzelnen Arbeitsvorschriften angegeben. Jede isolierte Fraktion wird nach Aufkonzentrieren im Vakuum durch Filtration über eine kurze Schicht gepresste Haushaltswatte von Kieselgelresten befreit.

Arbeitsweise:

Alle Lösemittel wurden nach Literatur bekannten Methoden gereinigt und / oder getrocknet. Alle feuchtigkeits- und luftempfindlichen Reaktionen wurden in einer im Vakuum ausgeheizten und mit Argon belüfteten Apparatur unter Schutzgas und Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Jede Lösung wurde vor der Entfernung des Lösemittels mit ausgeglühtem Na₂SO₄ getrocknet und bei einer Wasserbadtemperatur von < 40°C im Vakuum aufkonzentriert.

Reagenzien und Materialien:

5-Aminopentanol (Fluka), Acetonitril puriss. (Aldrich), ADDP (Aldrich), AEC (Aldrich), Asparaginsäurederivate (Novabiochem), Benzoylchlorid (Fluka), Benzyloxycarbonylchlorid (Aldrich), Bio Gel P2 (45-90 μm , Bio-Rad), Bromwasserstoff in Eisessig (33%ige Lösung, Fluka), tert.-Dibutyldicarbonat (Acros), DBU (Aldrich), DCC (Fluka), DEAD (Fluka), DIC (Fluka), Diisopropylethylamin (Fluka), 4-Dimethylaminopyridin (Merck), D-Galactose (Glycon Biochemicals), D-Glucose (Glycon Biochemicals), D-Glucosaminhydrochlorid (Glycon Biochemicals), 1-Hydroxybenzotriazol (Fluka), Lectine (Sigma-Aldrich / EY Laboratories INC.), Lysinderivate (Novabiochem), D-Mannose (Glycon Biochemicals), Molekularsieb 3Å und 4Å (Roth), Natriumhydrogencarbonat (trocken, Fluka), p-Nitrothiophenol (Fluka), NME (Fluka), Palladium auf Kohle (10%, trocken, Fluka), Pentafluorphenol (Fluka), Phenylaminol (Fluka), Phenylglucinol (Fluka), Piperidin (Riedel de Häen), Pyridin (Riedel de Häen), Rinkamid-Linker und Rinkamid-MBHA-Harz (Novabiochem.) Sicapent® (Merck), TBTU (Novabiochem), p-Toluolsulfonsäure (Merck), Trichloracetonitril (Fluka, Aldrich), Triethylamin (Fluka), Trifluoressigsäure (Fluka), Trifluormethansulfonsäure (Fluka), Trimethylphosphin 1 M in THF (Aldrich), Triphenylphosphin (Fluka).

8.2 Umsetzungen

Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: peracetylieren der Monosaccharide

In einem Rundkolben wird Natriumacetat (13 g, 150 mmol) zusammen mit Ac_2O (180 ml) unter Rühren auf 125 °C erhitzt. Dann wird das Monosaccharid (114 mmol) spatelweise zugegeben, so dass die Reaktionslösung selbstständig weitersiedet. Nach ca. 20-45 min weiterem Erhitzen (DC Kontrolle) wird der Ansatz auf Eiswasser (200 ml) gegeben und 3 h weitergerührt. Fällt das Produkt aus, wird abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen und gegebenenfalls mit Ethanol umkristallisiert. Handelt es sich um eine Reaktionslösung wird dreimal mit DCM (100 ml) extrahiert. Die vereinigten DCM-Phasen werden mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (2 mal 100 ml) und ges. NH_4Cl -Lsg. (2 mal 100 ml) gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und anschließend das Lösemittel im Vakuum entfernt.

AAV 2: peracetylieren der Disaccharide

Zu einer Lösung des Disaccharids (176 mmol) in Pyridin (300 ml) wird unter Rühren und Kühlung im Eisbad Ac_2O (200 ml) langsam zugetropft. Nach 2 Stunden wird die Eiskühlung entfernt, der Ansatz reagiert 48 Stunden bei Raumtemperatur weiter (DC Kontrolle). Danach gibt man Eiswasser zu (200 ml) und rührt 3 h weiter. Anschließend wird mit DCM (3 mal 200 ml) extrahiert und nacheinander mit 5% H_2SO_4 -Lsg. (2 mal 150 ml), ges. Na_2CO_3 -Lsg. (3 mal 150 ml) und H_2O (150 ml) gewaschen. Das Pyridin wird mehrmals mit Toluol coevaporiert und das Produkt im Vakuum zum Feststoff konzentriert. Falls notwendig wird aus Ethanol kristallisiert.

AAV 3: Bromieren der peracetylierten Glycoside

Das peracetylierte Glycosid (80 mmol) wird in abs. DCM (150 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird eine Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig (39 ml, 260 mmol, 33%ig) zugetropft und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird nacheinander mit Eiswasser (2 mal 50 ml), ges. NaHCO_3 -Lsg. (3 mal 50 ml) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Danach wird das Lösemittel evaporiert und das erhaltene Rohprodukt gleich weiter umgesetzt.

AAV 4: 1-Thioglycosen über Thioharnstoff

Zu einer Lösung des peracetylierten Glycosylbromid (50 mmol) in abs. Aceton (150 ml), wird Thioharnstoff zugegeben (4.18g, 55 mmol) und 7 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösemittel evaporiert und das Thiuroniumsalz am Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird anschließend in DCM (300 ml) suspendiert und eine Lösung von $K_2S_2O_5$ (55 mmol) in Wasser (100 ml) zugegeben und unter starkem Rühren 12 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die DCM Phase abgetrennt und die wässrige Phase (2 mal 50 ml) mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel evaporiert. Das Rohprodukt wird über eine Kieselgelsäule (P:E-1:1) gereinigt.

AAV 5: Mitsunobu-Eintopfreaktion

Zu einer Lösung aus ADDP (2.02 g, 8 mmol) in abs. THF (100 mL) injiziert man unter Argon bei 0°C mit einer Spritze Trimethylphosphin (8 mL, 8 mmol einer 1.0 M Lösung in THF) und rührt weitere 30 min bis die gelbe Farbe verschwindet (falls nicht, gibt man weitere 0.25 mL zu, bis zur Entfärbung). Danach gibt man 5-Aminopentanol (0.41 g, 4 mmol) und das 1-Thioglycosid (5.2 mmol) zu und rührt für weitere 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird der Asparaginsäurepentafluorphenolester **28** zugegeben (2.31 g, 4 mmol) und für weitere 3 h gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wird mit Ethylacetat (100 mL, 50°C) aufgenommen und das Nebenprodukt (Hydrazon) mit Petrolether (100 mL) ausgefällt und abfiltriert. Das Filtrat wird erneut eingeeengt und der Feststoff in CH_2Cl_2 (100 mL) aufgenommen, mit Wasser (2 mal 25 mL) und mit ges. $NaHCO_3$ -Lsg. (25 mL) gewaschen, mit $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Rohprodukt wird über eine Kieselgelsäule gereinigt (P:E-1:1).

AAV 6: Reduktion von Aminosäuren zu Aminoalkoholen

Zu einer Lösung der *N*-geschützten Aminosäure (50 mmol) in THF (250 mL) wurde bei -10°C *N*-Methylmorpholin (5.50 mL, 50 mmol) zugegeben und danach Chlorameisensäureethylester (4.80 mL, 50 mmol) zugetropft. Nach 10 min wurde $NaBH_4$ (5.67g, 150 mmol) in einer Portion zugegeben und MeOH (500 mL) über 20 min bei 0°C zugetropft. Nach weiteren 20 min wurde die Reaktionslösung mit 1 M $KHSO_4$ -Lsg. neutralisiert. Anschließend wurde die org. Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 mal 200 mL) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit 1 M $KHSO_4$ -Lsg., Wasser, 5%iger $NaHCO_3$ -Lsg., nochmals Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 7: Einführung der Boc-Schutzgruppe in die Aminoalkohole

Der Aminoalkohol (51 mmol) wurde in einer Mischung aus H₂O (56 mL), NaOH (2.3 g) und *tert*-Butanol (38 mL) gelöst und Boc₂O¹⁾ (12 mL, 56 mmol) unter kräftigem Rühren innerhalb von 5 min zugetropft und über Nacht gerührt. Der Ansatz wurde mit Pentan (2 x 100 mL) ausgeschüttelt und die vereinten organischen Phasen mit ges. NaHCO₃-Lsg. (3 x 30 mL) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und durch Zugabe von KHSO₄ auf einen pH-Wert von 1-1.5 eingestellt, wobei kein CO₂ mehr entweicht. Anschließend wurde die wässrige Phase mit Ether (4 x 20 mL) ausgeschüttelt und alle organischen Phasen vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel evaporiert. Anschließend wurde aus Diethylether / *n*-Hexan (1:1) über Nacht (4 °C) kristallisiert. Nach mehrmaligem Wiederholen der Kristallisation wurde der Boc-Aminoalkohol als kristalliner Feststoff erhalten.

¹⁾ Boc₂O wurde im Wasserbad bei 35 °C verflüssigt

AAV 8: Einführung der Aminosäure-Spacer über Mitsunobu-Reaktion

Zu einer Lösung aus ADDP (1.52 g, 6 mmol) in abs. THF (150 mL) wird bei 0 °C unter Argon eine Lösung von PMe₃ injiziert (6 mL einer 1 M in THF) und 15 bis 30 min bis zur vollständigen Entfärbung abgewartet*. Danach wird der Boc-geschützte Aminoalkohol (4 mmol) als Lösung in THF zugegeben, wobei nach etwa 10 min ein weißer Niederschlag (Hydrazon von ADDP) ausfällt. Anschließend wird das Eisbad entfernt und der 1-Thiozucker (4 mmol) als Lösung oder Feststoff zugegeben. Nach etwa 30 min ist die Reaktion beendet (DC) und bis zum Feststoff eingengt. Danach wird der Rückstand mit EtOAc (100 mL) unter leichtem erwärmen (< 60 °C) aufgenommen bei sich eine klare Lösung bildet. Unter starkem Rühren wird durch Zugabe von Petrolether (100 mL) das Hydrazon bei 0 °C ausgefällt und über einen Büchnertrichter abgetrennt und verworfen. Das Lösemittel wird erneut im Vakuum verdampft und der Rückstand roh weiter nach AAV 9 zum *S*-Glycopepid-Baustein umgesetzt.

*findet keine vollständige Entfärbung statt, müssen weitere 0.25 mL PMe₃ injiziert werden.

AVV 9: Kupplung mit Fmoc-Asp(COO^tBu)-COOH

Das Rohprodukt aus AAV 8 (4 mmol) wird in 50%iger TFA in CH₂Cl₂ aufgenommen und 10 min gerührt. Anschließend wird die TFA mehrmals mit Toluol coevaporiert bis alles TFA entfernt ist. Der Rückstand und Fmoc-Asp(COO^tBu)-COOH (1.65 g, 4 mmol) werden in CH₂Cl₂ (75 mL) aufgenommen. Dazu werden HOBt (0.60 g, 4.4 mmol) und DIPEA (750 µL, 4.4 mmol) gegeben und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend gibt man DCC (0.91 g, 4.4 mmol) zu und rührt 1 h bei RT weiter. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und bis zum Feststoff eingengt. Nach Säulenchromatographie (P:E-1:1) wird der *S*-Glycopepid-Baustein in reiner Form erhalten.

AAV 10: Propargylierung der 1-Thioglycose

Zu einer Lösung des 1-Thioglycosids (4 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) wurden DIPEA (683 μL , 4 mmol) und Propargylbromid (431 μL , 4 mmol, 80%ige Lsg. in Toluol) gegeben und 65 min bei RT gerührt. Durch Zugabe von EtOAc (20 mL) wurde das DIPEA-Bromid-Salz ausgefällt, abfiltriert, bis zum Feststoff eingeengt und am Hochvakuum getrocknet. Danach wurden die propargylierten 1-Thioglycoside in guter Reinheit erhalten und konnten direkt ohne Reinigung weiterverwendet werden.

AAV 11: Mikrowellenunterstützte 1,3-dipolare Cycloaddition zu 1,2,3-Triazolen

Das propargylierte 1-Thioglycosid (0.6 mmol) wird in einem Mikrowellengefäß mit Toluol (5 mL) gelöst und dazu Verbindung **46** (250 mg, 0.6 mmol), DIPEA (310 μL , 1.8 mmol) und $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$ (24 mg, 0.06 mmol) zugegeben. Danach wurde das Mikrowellengefäß verschlossen und in die Mikrowellenhalterung gestellt. Mit der Mikrowelle wurde unter Druckluft-Kühlung für 30 min (80 °C, 20-30 W) erhitzt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand über eine kurze Säule chromatographisch gereinigt (Eluent: EtOAc) und Triazolglycosid erhalten.

AAV 12: Pentafluorphenolaktivierung der S-Glycopeptid-Bausteine**A. Abspaltung der *tert*-Butyl-Gruppe am β -Asparaginsäurerückgrat**

Der S-Glycopeptid-Baustein (0.5 mmol) wurde in CH_2Cl_2 (2 mL) gelöst und mit der gleichen Menge TFA (2 mL) versetzt. Nach 1.5 h wurde bis zum Feststoff eingeengt und mit Toluol (5 x 3 mL) mehrmals coevaporiert, bis keine TFA mehr vorhanden war. Durch trocknen am Hochvakuum wurden TFA Reste vollständig aus dem Reaktionsansatz entfernt.

B. Pentafluorphenolaktivierung der freien Carboxylfunktion am β -Asparaginsäure-rückgrat

Das Rohprodukt aus A. und Pentafluorphenol (92 mg, 0.5 mmol) wurden in EtOAc (5 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu der Lösung wurde DCC (103 mg, 0.7 mmol) in einer Portion zugegeben und über Nacht (12 h) gerührt (0 °C \rightarrow RT). Der ausgefallene DCH wurde abfiltriert und das Lösemittel evaporiert. Nach Reinigung über Säulenchromatographie oder HPLC wurde der Pentafluorphenol aktivierte S-Glycopeptid-Bausteine erhalten.

8.3 S-Glycopeptid-Bausteine

8.3.1 Zu Kapitel 6.1.1

1,5-Diiodpentan (1)

In einem Kolben wird zunächst Phosphorpentoxid (32,5 g; 229 mmol) mit Phosphorsäure (85%; 67,5 ml) gemischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur gibt man 1,5-Pentandiol (26,03 g; 250 mmol) und KI (166 g; 1 mol) zu und erhitzt 4 Stunden auf 100-120 °C. Nach dem Abkühlen gibt man H₂O (25 ml) und Ether (125 ml) zu und schüttelt kurz auf. Die Etherphase wird abgetrennt und mit Natriumthiosulfatlsg. gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde über eine fraktionierte Destillation bei 100 °C / 10 mbar aufgereinigt.

Ausbeute: 68.02 g (210 mmol; 84 % d. Th.)

n_D^{20} : 1,60

IR: ν = 2930,35 (CH-I); 1449,09 (CH₂); 868,84 (CH₂); 793,88 (CH₂); 718,63 (I); 587,57 (I).

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1,42-1,49 (dt, 2 H, H-3); 1,75-1,87 (dt, 4 H, H-2, H-4); 2,91-2,93 (dt, 4 H, H-1, H-5).

1,4-Diiodbutan (2)

In einem Kolben wird zunächst Phosphorpentoxid (32,5 g; 229 mmol) mit Phosphorsäure (85%; 67,5 ml) gemischt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur gibt man 1,4-Butandiol (22,53 g; 250 mmol) und KI (166 g; 1 mol) zu und erhitzt 4 Stunden auf 100-120 °C. Nach dem Abkühlen gibt man H₂O (25 ml) und Ether (125 ml) zu und schüttelt kurz auf. Die Etherphase wird abgetrennt und mit Natriumthiosulfatlsg. gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Produkt wurde über eine fraktionierte Destillation bei 68 °C / 15 mbar aufgereinigt.

Ausbeute: 62.76 g (203 mmol; 81 % d. Th.)

n_D^{20} : 1,60

IR: ν = 2930,35 (CH-I); 1449,09 (CH₂); 868,84 (CH₂); 793,88 (CH₂); 718,63 (I); 587,57 (I).

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 1,74-1,86 (dt, 4 H, H-2, H-3); 2,92-2,94 (dt, 4 H, H-1, H-4).

5-Brom-1-nitrilpentan (3)

1,4-Dibrombutan (86.9 ml, 724 mmol) und Natriumcyanid (7.10 g, 145 mmol) werden in Methanol (250 ml) gelöst und 24 h unter Rückfluss (70°C) erhitzt. Danach wird das Lösemittel entfernt das erhaltene Öl mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und fraktioniert destilliert. Nach der ersten Fraktion (Edukt) wird (102°C / 20 mbar) das Produkt erhalten.

Ausbeute: 7.3 ml (63.5 mmol; 43.8 % d. Li.)

n_D^{20} : 1.478 (1.479^[431])

5-Mercaptopentansäure (4)

5-Bromvaleronitril **3** (7.0 g, 43.3 mmol) und Thioharnstoff (3.6 g, 47,6 mmol) werden in Ethanol (25 mL) 3 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT gibt man NaOH (100 mL, 5 N) zu und erhitzt erneut 2 h unter Rückfluss. Danach extrahiert man mit Petrolether, wäscht mit ges. NaCl-Lsg. (2 mal 40 mL), trocknet über NaSO₄ und vollständig eingengt, dabei bleibt ein farbloses Öl übrig.

Ausbeute: 0.46 g roh (3.96 mmol; 51% d.Th.)

¹H-NMR (d₄-CH₃OH): δ = 7.0-8.0 (br, 1H), 2.57 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.38 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.6-1.9 (m, 4H), 1.37 (t, J = 7.8 Hz, 1H).

¹³C-NMR (CD₃OD): δ = 179.4 (COOH), 33.4, 33.3, 24.2, 23.3 (CH₂-Alkyl).

Tetrahydrothiopyran-2-imin (5)

Natriumthiophosphat Dodekahydrat (7.0 g, 17.6 mmol) werden in Wasser (40 mL) gelöst und zu 5-Bromvaleronitril **3** (1.4g, 8.8 mmol) zugegeben. Nach 12 h verdünnt man mit Wasser (7.5 mL), stellt mit HCl 10%iger den pH-Wert auf 4 ein und rührt weitere 4 h. Danach extrahiert man mit n-Pentan, wäscht mit ges. NaCl-Lsg. (10 mL), trocknet über NaSO₄ und verdampfen das Lösungsmittel im Vakuum, bei der **5** als farbloses Öl zurück bleibt.

Ausbeute: 0.46 g roh (3.96 mmol; 45% d.Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8.21 (s, 1 H, =NH), 3.21 (m, 2 H, S-CH₂), 2.63, 2.07 (m, 2 H, H=N-C-CH₂), 1.69, 1.22 (m, 4 H, S-CH₂-CH₂, CH₂-CH₂-CH₂).

MS [EI (m/z = 115.0)]: 115.2 [M]⁺.

N-Benzoyloxycarbonyl-5-aminopentanol (6)

Zu einer Lösung von 5-Aminopentanol (12.5 g, 120 mmol) und Natriumcarbonat (25.7 g, 0.24 mol) in 200 ml Wasser gibt man bei 0°C eine Lösung von Benzoyloxycarbonylchlorid (16.8 ml, 20.4 g, 120 mmol) in 150 ml Dichlormethan in einer Portion zu und rührt für 45 min weiter. Nachdem man die wäßrige Phase zweimal mit je 100 ml Dichlormethan extrahiert hat, werden die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Aufkonzentration im Vakuum kristallisiert man das Produkt aus absolutem Diethylether.

Smp.: 44°C

Ausbeute: 22 g (100 mmol, 76% d. Th.)

***N*-Benzyloxycarbonyl-5-aminopentan-p-toluolsulfonsäure (7)**

In eine Lösung von 5-(Benzyloxycarbonyl)-aminopentanol **6** (13,28 g, 60 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (11,44 g, 60 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (150 mL), werden bei 0 bis 3° C absolutes Pyridin (5,2 mL, 100 mmol) unter Rühren und Ausschluss von Luftfeuchtigkeit zugetropft und anschließend 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionslösung im Vakuum aufkonzentriert und drei mal mit Toluol coevaporiert. Nach Trennung über Kieselgel (Ethylacetat-Petrolether 1:3) und anschließender Aufkonzentration, wird das Produkt ($R_f = 0,31$ Ethylacetat-Petrolether 1:1) als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 17.08 g roh (47 mmol, 78 % d.Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.77$ (d, 2 H, $\text{CH}_3\text{-Ph-SO}_3$), 7.33 (m, 7 H, *Ph-CH*₂), 5.08 (s, 2 H, *Ph-CH*₂-CO), 4.77 (s, b, 1 H, $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$), 4.00 (t, 2 H, $\text{SO}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.14 (dt, 2 H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.44 (s, 2 H, $\text{CH}_3\text{-PH}$), 1.65 (tt, 2 H, CH_2), 1.44 (tt, 2 H, CH_2), 1.34 (tt, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 156.4$ (NH-COO), $\delta = 144.8, 136.5, 133.1, 129.8, 128.5, 128.1, 127.9$ (aromatische-C-Phenyl), 66.6 ($\text{CH}_2\text{-Phenyl}$), 60.4 ($\text{SO}_3\text{-CH}_2$), 40.7 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 31.7, 29.3, 28.5 ($\text{CH}_2\text{-aliphatisch}$), 21.6 ($\text{CH}_3\text{-Phenyl}$).

[FAB ($m/z = 391.48$): 392.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-Benzyloxycarbonyl-5-aminopentanxanthogenat (8)**

Zu Verbindung **7** (9,36 g, 25 mmol) wird Kaliummethylxanthogenat (6,09 g, 38 mmol) gegeben und 1 h evakuiert. Danach gibt man 200 mL absolutes Acetonitril unter Argon hinzu und erhitzt unter Rühren auf 80°C. Nach 1,5 h wird die Reaktion abgebrochen, das ausgefallene Salz abgetrennt und mit Dichlormethan gewaschen. Die organische Lösung wird im Rotationsverdampfer eingedunstet, wobei **3** als blass gelber Feststoff zurück bleibt.

Ausbeute: 9.56 g roh (28 mmol, 110 % d.Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7.34 (m, 5 H, *Ph-CH*₂), 5.10 (s, 2 H, *Ph-CH*₂-CO), 4.77 (s, b, 1 H, $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$), 4.63 (q, 2 H, $\text{S}_2\text{CO-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.17 (dt, 2 H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.10 (t, 2 H $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.71 (tt, 2 H, CH_2), 1.51 (tt, 2 H, CH_2), 1.34 (tt, 2 H, CH_2), 1.44 (t, 3 H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 215.0$ ($\text{S}_2\text{C-O}$), 156.4 (NH-COO), $\delta = 136.6, 128.5, 128.1$ (aromatische-C-Phenyl), 69.9 (O-CH_2), 66.6 ($\text{CH}_2\text{-Phenyl}$), 40.9 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 35.7 (S-CH_2), 29.5, 28.0, 25.9 ($\text{CH}_2\text{-aliphatisch}$), 13.8 ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$).

MS[FAB ($m/z = 341.49$): 341.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-Benzyloxycarbonyl-5-amino-1-mercaptopentan (9)**

Das Rohprodukt **8** (9.56 g) wird mit 50 mL Diethylamin aufgenommen und 5 h unter Argon bei 30°C aminolysiert. Die Reaktionslösung wird auf ein Gemisch aus Eis (100 g) mit 2%iger

Schwefelsäure (50 mL) gegossen und dreimal mit Diethylether (50 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird nochmals zweimal mit 2%iger Schwefelsäure (100 mL) gewaschen, mit ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert und zweimal mit Wasser (100 mL) gewaschen. Der Etherextrakt wird über Natriumsulfat getrocknet und der Ether im verdampft, wobei Produkt **9** als weißer Feststoff erhalten wird, den man mit Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 5.75 g (22.68 mmol, 81 % d. Th.)

Smp.: 57° C

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.35 (m, 5 H, *Ph-CH*₂), 5.09 (s, 2 H, *Ph-CH*₂-CO), 4.79 (s, b, 1 H, *CH*₂-*NH*-CO), 3.19 (dt, 2 H, *NH-CH*₂-*CH*₂), 2.66 (t, 2 H, *HS-CH*₂-*CH*₂), 1.69 (tt, 2 H, *CH*₂), 1.58 (s, 1 H, *SH*), 1.53 (tt, 2 H, *CH*₂), 1.43 (tt, 2 H, *CH*₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 136.4, 128.4, 128.0 (aromatische-C-Phenyl), 66.5 (*CH*₂-Phenyl), 40.8 (*CH*₂-*NH*), 38.7 (*CH*₂-*SH*), 29.6, 27.9, 26.1 (*CH*₂-aliphatisch).

MS [EI (m/z = 253.1)]: 253.2 [M]⁺.

| | | | | | | | | | |
|--|-------|---|-------|---|------|---|------|---|-------|
| C ₁₃ H ₁₉ NO ₂ S (253,36) | Ber.: | C | 61.36 | H | 7.56 | N | 5.53 | S | 12.66 |
| | Gef.: | C | 62.05 | H | 7.48 | N | 5.30 | S | 12.63 |

2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid (10)

Durchführung nach AAV 1. Mit α-D-Glucosemonohydrat (22.5 g, 114 mmol) als Monosaccharid. Nach der Aufarbeitung fällt Produkt **10** als weißer Feststoff aus.

Smp.: 133°C (132°C^[432])

Ausbeute: 40.6 g (104 mmol, 91 % d. Th.)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-glucopyranosylbromid (11)

Durchführung nach AAV 3. Mit **Penta-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid** (31 g, 80 mmol). Man erhält **11** weißen Feststoff.

Ausbeute: 47.00 g (114 mmol, 77% d. Th.)

Smp.: 88°C (86-88°C)

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-α-D-glucopyranosyltrichloracetimidat (12)

Zu einer Lösung von 7.0g (20.1 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosid und 8 mL Trichloracetonitril in 40 mL absolutem Dichlormethan wird 1g Natriumhydrid zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur intensiv gerührt. Das überschüssige Natriumhydrid wird über eine mit Celite bedeckte Glasfritte abfiltriert und im Vakuum zum Rückstand konzentriert. Nach der anschließenden Trennung über Kieselgel wird Verbindung **6** als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 7.72 g (6.7 mmol, 78% d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 9.77 (s, 1 H, C=NH), 6.48 (s, 1 H, H-1), 5.46 (t, 1 H, H-3), 5.05 (m, 2 H, H-4, H-2), 4.20 (m, 1 H, H-6a) 4.04 (m, 2 H, H-6b, H-5), 2.06, 2.04, 2.00, 1.97 (4 x s, 12 H, CH₃OO).

N*-Benzyloxycarbonyl-(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (13)*A. Mit BF₃-etherat**

Zu einer Lösung aus Pentaacetylglucose **10** (159 mg, 0.31 mmol) und *N*-Benzyloxycarbonylaminomercaptopentan **9** (93.7 mg, 0.37 mmol) in abs. DCM, injiziert man bei 0°C BF₃-etherat (160 μ L, 0.77 mmol) unter Argonatmosphäre und lässt auf RT erwärmen. Nach 12 h wird das Lösemittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Feststoff über eine Kieselgelsäule (Eluent E:P-1:2) gereinigt.

Ausbeute: 58.4 mg (0.10 mmol, 31% d. Th.)

B. Mit SnCl₄

Zu einer Lösung aus Pentaacetylglucose **10** (152 mg, 0.39 mmol) und *N*-Benzyloxycarbonylamionmercaptopentan **9** (111.7 mg, 0.44 mmol) in abs. DCM, injiziert man bei 0°C SnCl₄ (360 μ L, 1.95 mmol, einer 1 M-Lsg in DCM) unter Argonatmosphäre und lässt auf RT erwärmen. Nach 10 h wird zum Feststoff eingengt und über eine Kieselgelsäule (Eluent E:P-1:2) gereinigt.

Ausbeute: 77.3 mg (0.13 mmol, 34% d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): 7.36, 730 (m, 5 H, Ar-H), 5.14 (m, 1 H, H-4), 5.09 (s, 2 H, CH₂-Ph), 4.99 (m, 2 H, H-2, H-3), 4.80 (s, b, 1 H, NH), 4.39 (d, 1 H, J_{1,2} = 10.11 Hz, H-1), 4.16 (m, 1 H, H-6), 4.06 (m, 2 H, H-6'), 3.88 (m, 2 H, 5-H, O-CH₂), 3.48 (m, 1 H, O-CH₂), 3.11 (dt, 2 H, NH-CH₂-CH₂), 2.60 (m, 2 HS-CH₂-CH₂), 2.14, 2.04, 2.03, 1.98 (s, 12 H, CH₃-OAc), 1.54, 1.44, 1.34 (m, 6 H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.0, 170.5, 170.1, 169.8 (H₃C-CO-O), 156.3 (NH-COO), 136.3, 128.9, 128.5, 128.2, 127.9, 125.2 (Ar-C), 83.5 (C-1), 76.1 (C-5), 74.3 (C-3), 70.2 (C-2), 68.6 (C-4), 66.9 (CH₂-Phenyl), 62.5 (C-6), 41.0 (CH₂-NH), 29.9, 29.8, 29.5, 26.1 (CH₂-aliphatisch), 21.4, 21.1, 21.0, 20.9 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 583.21)]: 584.2 [M+H]⁺.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranose (14)

Durchführung nach AAV 4. Mit Tetraacetylmannopyranosylbromid (20.6 g, 50 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **14** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 14.38 g (39.5 mmol, 79% d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.45, 5.38, 5.24 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4), 5.20 (d, 1 H, J = 6.1 Hz, H-1), 4.34 (m, 2 H, H-6), 4.10 (m, 1 H, H-5), 2.35 (d, 1 H, SH), 2.04, 2.02, 1.98, 1.97 (4 s, 12 H, CH₃-Acetyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7, 170.2, 169.5, 169.4 (CH₃-CO), 81.5 (C-1), 78.6 (CH₂-C), 72.0 (C-CH), 70.5 (C-5), 69.7 (C-4), 69.4 (C-2), 66.3 (C-3), 62.4 (C-6), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

MS [FAB (m/z = 364.1)]: 365.1 [M+H]⁺, 387.1 [M+Na]⁺.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranose (15)

Durchführung nach AAV 4. Mit Tetraacetylgalactopyranosylbromid (20.6 g, 50 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **15** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 15.29 g (42 mmol, 85% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 5.42 (t, 1 H, H-4), 5.17 (t, 1 H, H-2), 5.00 (m, 1 H, H-3), 4.52 (t, 1 H, H-1), 4.11 (t, 1 H, H-6), 3.93 (m, 1 H, H-5), 2.36 (d, 1 H, *SH*), 2.15, 2.08, 2.04, 1.97 (4 s, 12 H, CH_3 -Acetyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 170.5, 170.3, 170.1, 169.9 (CH_3 -CO), 79.3 (C-1), 75.1 (C-3), 71.7 (C-5), 70.9 (C-2), 67.4 (C-4), 61.6 (C-6), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3OO).

MS [FAB (m/z = 364.1)]: 365.3 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 387.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose (17)

A. Über Tetraacetylglucopyranosylthioacetamidhydrobromid **16b**:

Unter einer Argonschutzatmosphäre wird bei 120°C von Verbindung **11** (6.95 g, 16,9 mmol) und Thioacetamid (1,36 g, 18,4 mmol) bis zur Schmelze erhitzt und für weitere 5 min gerührt. Nachdem der Ansatz auf RT abgekühlt ist, werden 100 ml absoluter MeOH zugegeben und solange gerührt, bis der ganze Feststoff gelöst ist. Nach 10 min wird das Lösemittel im Vakuum verdampft und der gelbe Feststoff mehrmals über eine Kieselgelsäule gereinigt (Eluent: P:E-1:1), nach dem **17** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 3.14 g (8.62 mmol, 51% d. Th.)

B. Über Tetraacetylglucopyranosylthiuroniumhydrobromid **16c**:

Durchführung nach AAV 4. Mit Tetraacetylglucopyranosylbromid **11** (20.6 g, 50 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **17** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 16.40 g (45 mmol, 90% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 5.19 (t, 1 H, J = 9.3 Hz, H-3), 5.10 (t, 1 H, J = 9.6 Hz, H-4), 4.97 (t, 1 H, J = 9.35 Hz, H-2), 4.54 (t, 1 H, J = 9.9 Hz, H-1), 4.24 (t, 1 H, H-6a) 4.12 (t, 1 H, H-6b), 3.72 (m, 1 H, H-5) 2.30 (d, 1 H, *SH*), 2.09, 2.08, 2.02, 2.00 (4 s, 12 H, CH_3OO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.8, 170.3, 169.8, 169.5 (CH_3 -CO), 78.9 (C-1), 76.5 (C-5), 73.7 (C-3), 68.2 (C-4), 68.1 (C-2), 62.1 (C-6), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (CH_3OO).

MS [FAB (m/z = 364.1)]: 365.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

5-Iod-1-nitrilpentan (18)

1,4-Diiodbutan **2** (61.98 g, 200 mmol) und Natriumcyanid (1.96 g, 40 mmol) werden in Methanol (250 ml) gelöst und 24 h unter Rückfluss (70°C) erhitzt. Danach wird das Lösemittel im Vakuum entfernt, das erhaltene Öl mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und fraktioniert destilliert (116°C / 20 mbar) und das Produkt als leicht gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 3.51 g (16.8 mmol; 42 % d. Th.)

{[5-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl)pentyl]}-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (19)

Verbindung **19** wurde aus der Reaktionslösung nach der Darstellung von Verbindung **20** isoliert.

Ausbeute: 1.43 g (1.80 mmol; 60 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5.18 (t, 2 H, H-4, H-4'), 5.03, 5.01 (m, 4 H, H-2, H-2', H-3, H-3'), 4.46 (d, 2 H, $J_{1,2} = 10.11$ Hz, H-1, H-1'), 4.22 (m, 2 H, H_a -6, H_a -6'), 4.12 (m, 2 H, H_b -6, H_b -6'), 3.69 (m, 2 H, H-5, H-5') 2.65 (m, 4 H, S- CH_2 - CH_2), 2.07, 2.04, 2.03, 2.01 (m, 24 H, CH_3 -OAc), 1.57 (m, 4 H, S- CH_2 - CH_2), 1.47 (m, 4 H, S- CH_2 - CH_2 - CH_2).

MS [ESI ($m/z = 796.23$)]: 818.9 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

(5-Iodpentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (20)

Zu einer vorgelegten Lösung von 1,5-Diiodpentan **1** (0.97g, 3 mmol), DBU (225 μl , 1.5 mmol) in DCM (50 ml) wurde Verbindung **17** (1.09 g, 3 mmol), DBU (225 μl , 1.5 mmol) in DCM (10 ml) über 30 min langsam zugetropft. Danach wurde mit ges. NH_4Cl -Lsg. (25 mL), ges. NaHCO_3 -Lsg. (25 mL), Wasser (25 mL) gewaschen und mit NaSO_4 getrocknet. Nach dem Reinigen über eine Kieselgelsäule (Eluent: E:P-1:1) erhielt man ein farbloses Öl.

Ausbeute: 0.61 g (1.08 mmol; 36 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 5.20 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.04 (m, 2 H, H-4, H-2), 4.46 (d, 1 H, $J = 9.8$ Hz, H-1), 4.23 (m, 1 H, H-6a), 4.11 (m, 1 H, H-6b), 3.69 (bm, 1 H, H-5), 3.19 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, I- CH_2 -Alkyl), 2.63 (m, 2 H, S- CH_2 -Alkyl), 2.07, 2.06, 2.01, 1.99 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.82 (t, 2 H, Br- CH_2 - CH_2 -Alkyl), 1.61 (bm, 2 H, S- CH_2 - CH_2 -Alkyl), 1.48 (m, 2 H, CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7, 170.3, 169.5, 169.5 (CH_3 -CO), 83.6 (C-1), 76.0 (C-5), 74.0 (C-3), 69.9 (C-4), 68.4 (C-2), 62.2 (C-6), 33.5 (CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2), 29.7 (S- CH_2), 29.6 (I- CH_2 - CH_2), 28.6 (S- CH_2 - CH_2), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3OO), 5.8 (I- CH_2 - CH_2).

MS [FAB ($m/z = 560.06$)]: 583.1 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-5-aminopentanol (21)**

Es wurde 5-Aminopentanol (18 g; 69,58 mmol) mit einer äquimolaren Menge FmocCl (7,18 g) in 300 ml Dioxan und 200 ml 10%iger Na_2CO_3 -Lösung 4 Stunden unter Eiskühlung und anschließend weitere 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Ausgefallenes NaCl wurde mit H_2O in Lösung gebracht und anschließend die organische Phase abgetrennt. Die Wasserphase wurde noch zweimal mit Ether ausgeschüttelt. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen bis zum Feststoff eingengt. Das Produkt wurde über eine Säulenchromatographie aufgereinigt (Eluent: a. E-P / 1-1 ; b. E-P / 3-1).

Ausbeute: 14,64 g (44,99 mmol; 64,7 % d. Th.)

Smp.: 103-108 $^\circ\text{C}$

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-5-aminopentylidiod (22)

Iod (3,41 g, 13,4 mmol) wird zu einer Suspension aus Triphenylphosphinpolymer (5 g, 13,4 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (100 mL) gegeben und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Suspension gibt man Imidazol (0,96 g, 15,3 mmol) und rührt weitere 15 min. Dazu gibt man eine Lösung aus 5-Z-Aminopentanol (2,02 g, 6,2 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (25 mL) und erhitzt 3 h unter Rückfluss. Das Polymer wird aus der Reaktionslösung über Celite abfiltriert und der Filter mit Dichlormethan nachgespült. Die Dichlormethanolösung wird mit einer Natriumthiosulfatlösung und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und zu einem gelblichen Öl konzentriert.

Ausbeute: 1.71 g (79.1 %, 4.9 mmol, roh)

EI für $C_{13}H_{18}INO_2$ ($m/z = 347,04$): 347.0 $[M]^+$, 348.0 $[M+H]^+$.

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 7.23$ (m, 5 H, *Ph-CH*₂), 5.05 (s, b, 1 H, *CH*₂-*NH-CO*), 4.98 (s, 2 H, *Ph-CH*₂-*CO*), 3.05 (dt, 2 H, *NH-CH*₂-*CH*₂), 3.05 (t, 2 H, *HS-CH*₂-*CH*₂), 1.70 (tt, 2 H, *CH*₂), 1.38 (s, 1 H, *SH*), 1.30 (tt, 2 H, *CH*₂).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 155.4$ (*NH-CO-O*), 135.6, 127.4, 127.0 (aromatische-C-Phenyl), 65.5 (*CH*₂-Phenyl), 40.3 (*CH*₂-*NH*), 32.0, 28.6, 26.5 (*CH*₂-aliphatisch), 5.6 (*I-CH*₂).

N-Fluorenylmethoxycarbonyl-(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (23)

Zu einer Lösung von Verbindung **9** (3.64 g, 10 mmol) in absolutem Dichlormethan (100 mL) gibt man Verbindung **5** (2.27g, 6.8 mmol) in (20 mL) absolutem Dichlormethan. Hierzu wird unter Rühren 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-en (1.5 mL) als Base zugegeben und erhitzt 42 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zum Öl konzentriert. Nach Trennung über Kieselgel (Ethylacetat-Petrolether 1:1) wird als zweite Fraktion Verbindung **10** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 2.28 g (50.5 %, 3.4 mmol)

Drehwert $[\alpha]_D$: - 18,7° (c(1.0), $CHCl_3$)

1H -NMR ($CDCl_3$): 7.69, 7.52, 7.31, 7.25 (m, 8 H, *Ph-CH*₂), 5.15 (tt, 1 H, 4-H), 4.97 (m, 2 H, 2-H, 3-H), 4.80 (s, b, 1 H, -*NH*-), 4.39 (d, 1 H, $J_{1-2} = 10.11$ Hz, 1-H), 4.32 (d, 1 H, *CH*₂-Benzyl), 4.16 (m, 1 H, 6-H), 4.06 (m, 2 H, 6-H', 5-H), 3.64 (d, 1 H, *CH*₂-*CH*(*Ph*)₂) 3.11 (dt, 2 H, *NH-CH*₂-*CH*₂), 2.60 (m, 2 *HS-CH*₂-*CH*₂), 1.54 (tt, 2 H, *CH*₂), 1.44 (tt, 2 H, *CH*₂), 1.34 (tt, 2 H, *CH*₂).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 171.0$, 170.5, 169.8 (*H*₃*C-CO-O*), 156.8 (*NH-COO*), $\delta = 144.3$, 141.7, 128.0, 127.4, 125.4, 120.4 (Ar-Fmoc), 83.8 (1-C), 76.2 (5-C), 74.3 (3-C), 70.2 (2-C), 68.6 (4-C), 66.9 (*O-CH*₂-Phenyl), 62.5 (6-C), 47.7 (*CH*₂-*CH*(*Ph*)₂), 41.2 (*CH*₂-*NH*), 29.9, 29.8, 29.5, 26.1 (*CH*₂-aliphatisch), 21.4, 21.1, 21.0, 20.9 (*O-CO-CH*₃).

[FAB ($m/z = 671.24$): 672.2 $[M+H]^+$.

| | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| $C_{34}H_{41}NO_{11}S$ (671.75): | Ber.: | C | 60.79 | H | 6.15 | N | 2.09 | S | 4.77 |
| | Gef.: | C | 60.99 | H | 6.16 | N | 1.95 | S | 4.93 |

(5-Nitrilpentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (24)

Unter Rühren wurde eine Lösung Verbindung **17** (4,95 g, 7,58 mmol) in DCM mit 5-Iodpentanitril (1,06 g, 5,05 mmol) und DBU (0,77 g, 5,05 mmol) versetzt und 24 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde eine Säulenchromatographie (Eluent: E-P / 1-1) durchgeführt, dabei wurde **24** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.94 g (4.70 mmol; 62 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 5.20 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.04 (m, 2 H, H-4, H-2), 4.46 (d, 1 H, $J = 9.8$ Hz, H-1), 4.23 (m, 1 H, H-6a), 4.11 (m, 1 H, H-6b), 3.69 (bm, 1 H, H-5), 3.32 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, Br- CH_2 -Alkyl), 2.64 (m, 2 H, S- CH_2 -Alkyl), 2.37 (m, 2 H, CH_2 -CN), 2.07, 2.06, 2.01, 1.99 (4 s, 12 H, CH_3 -Acetyl), 1.82 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.61 (bm, 2 H, S- CH_2 - CH_2 -Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7, 170.3, 169.5, 169.5 (CH_3 -CO), 120.9 (CN), 83.6 (C-1), 76.0 (C-5), 74.0 (C-3), 69.9 (C-4), 68.4 (C-2), 62.2 (C-6), 33.2 (CH_2 -Alkyl), 29.7 (S- CH_2), 25.1 (CH_2 -Alkyl), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3 -Acetyl), 17.1 (CH_2 -CN).

[FAB ($m/z = 445.1$): 468.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(5-Brompentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (25)

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid **17** (0.73 g, 2 mmol) wurde auf 120 °C erhitzt, bis der ganze Feststoff geschmolzen war und dazu 5-Brom-1-penten (237 μL , 2 mmol) und AIBN (33 mg, 0.2 mmol) unter rühren zugegeben. Nach 10 min wurde auf RT abgekühlt und nach dem Trocknen am Hochvakuum ein leicht gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.97 g roh (1.89 mmol; 95 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 5.20 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.04 (m, 2 H, H-4, H-2), 4.46 (d, 1 H, $J = 9.8$ Hz, H-1), 4.23 (m, 1 H, H-6a), 4.11 (m, 1 H, H-6b), 3.69 (bm, 1 H, H-5), 3.32 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, Br- CH_2 -Alkyl), 2.63 (m, 2 H, S- CH_2 -Alkyl), 2.07, 2.06, 2.01, 1.99 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.82 (t, 2 H, Br- CH_2 - CH_2 -Alkyl), 1.61 (bm, 2 H, S- CH_2 - CH_2 -Alkyl), 1.48 (m, 2 H, CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7, 170.3, 169.5, 169.5 (CH_3 -CO), 83.6 (C-1), 76.0 (C-5), 74.0 (C-3), 69.9 (C-4), 68.4 (C-2), 62.2 (C-6), 33.5 (Br- CH_2 - CH_2), 33.2 (Br- CH_2 - CH_2), 29.7 (S- CH_2), 29.6 (CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2), 28.6 (S- CH_2 - CH_2), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3 -Acetyl).

[FAB ($m/z = 512.07$): 535.20 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(5-Azidopentyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (26)

Zu einer Lösung von TBAHS (0.64 g, 1.89 mmol) in ges. NaHCO_3 -Lsg. (10 mL) wurde Rohprodukt **25** (0.97 g) in DCM (10 mL) zugegeben. Dazu gab man unter starkem Rühren NaN_3 (0.49 g, 7.56 mmol) zu. Nach 8 h wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (100 mL) aufgenommen und die org. Phase abgetrennt. Anschließend wurde mit ges. NaHCO_3 -Lsg. (2

mal 20 mL), H₂O (2 mal 20 mL) und ges. NaCl-Lsg. (20 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel entfernt. Nach dem Trocknen am Hochvakuum erhielt man einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 0.80 g roh (1.68 mmol; 89 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.20 (t, 1 H, *J* = 9.4 Hz, H-3), 5.04 (m, 2 H, H-4, H-2), 4.46 (d, 1 H, *J* = 9.8 Hz, H-1), 4.22 (m, 1 H, H-6a), 4.11 (m, 1 H, H-6b), 3.68 (bm, 1 H, H-5), 3.25 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz, N₃-CH₂-Alkyl), 2.66 (m, 2 H, S-CH₂-Alkyl), 2.06, 2.04, 2.00, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.57 (bm, 4 H, N₃-CH₂-CH₂-Alkyl, S-CH₂-CH₂-Alkyl), 1.46 (m, 2 H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7, 170.3, 169.5, 169.5 (CH₃-CO), 83.6 (C-1), 76.0 (C-5), 74.0 (C-3), 69.8 (C-4), 68.4 (C-2), 62.2 (C-6), 51.3 (N₃-CH₂-CH₂), 29.6 (S-CH₂), 29.2 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 28.5 (S-CH₂-CH₂), 25.9 (N₃-CH₂-CH₂), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

MS [FAB (m/z = 475.2)]: 498.3 [M+Na]⁺.

(5-Aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosid (27)

A. über *N*-Fmoc-(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosid **23**:

Zu einer Lösung von Verbindung **23** (1.50 g, 2.23 mmol) in Acetonitril (50 mL) wird unter Rühren Piperidin (2.4 mL) zugegeben. Nach 20 min wird zum Feststoff eingeeengt. Der erhaltene weiße Feststoff wird für 1h am Hochvakuum getrocknet und danach ohne weitere Aufarbeitung direkt weiter umgesetzt.

Ausbeute: 0.91 g roh (2.03 mmol; 91 % d. Th.)

B. Über (5-Azidopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosid **26**:

Eine Lösung von Rohprodukt **26** (0.80 g) in EtOAc (10 mL) wurde mit Wasserstoff und einer katalytischen Menge Pd/C (ca. 10 mg) hydriert, bis auf dem DC kein Edukt mehr zu erkennen war. Danach wurde über Celite abfiltriert und am Vakuum zum Feststoff **27** konzentriert.

Ausbeute: 0.65 g roh (1.44 mmol; 86 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.21 (t, 1 H, *J* = 9.4 Hz, H-3), 5.04 (m, 2 H, H-4, H-2), 4.47 (d, 1 H, *J* = 9.8 Hz, H-1), 4.22 (m, 1 H, H-6a), 4.13 (m, 1 H, H-6b), 3.68 (bm, 1 H, H-5), 2.87 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, NH₂-CH₂-Alkyl), 2.66 (m, 2 H, S-CH₂-Alkyl), 2.07, 2.05, 2.01, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.63 (bm, 4 H, NH₂-CH₂-CH₂-Alkyl, S-CH₂-CH₂-Alkyl), 1.43 (m, 2 H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 171.1, 170.6, 170.0, 169.8 (CH₃-CO), 84.0 (C-1), 76.3 (C-5), 74.2 (C-3), 70.3 (C-4), 68.7 (C-2), 62.5 (C-6), 58.8 (NH₂-CH₂-CH₂), 29.8 (S-CH₂), 29.3 (CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 28.1 (S-CH₂-CH₂), 25.9 (NH₂-CH₂-CH₂), 21.2, 21.1, 21.0, 21.0 (CH₃OO).

MS [FAB(m/z = 449.2)]: 472.2 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (28)**

Eine Lösung von *N*- α -Fluorenylmethylenoxycarbonyl-(β -tert-butyl)-L-aspartat (15 g, 36,46 mmol) und Verbindung **14** (8,1g, 43,75 mmol) in 350 ml Ethylacetat wurde unter Rühren im Eisbad gekühlt, dann wurde Verbindung **13** (9,03 g, 43,75 mmol) zugegeben. Eine Stunde wurde unter Kühlung weitergerührt, danach 2 Stunden bei Raumtemperatur. DCH wurde abfiltriert, das eingeeengte Rohprodukt über eine Kieselgelsäule (Eluent: E:P-1:5) chromatographiert.

Ausbeute: 17.97 g (31.13 mmol; 85.4 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 1,41 (m, 9H, CH_3 tBu); 2,81-2,86 (dd, 1 H, $\text{H}_{\text{Asp-2A}}$); 3,05-3,10 (dd, 1 H, $\text{H}_{\text{Asp-2B}}$); 4,15-4,19 (m, 1 H, Fmoc-CH); 4,29-4,43 (m, 2 H, Fmoc- CH_2); 4,90-4,92 (t, 1 H, $\text{H}_{\text{Asp-1}}$); 5,91-5,93 (d, 1 H, NH); 7,20-7,24 (dd, 2 H, Fmoc- CH_{Ar}); 7,30-7,33 (dd, 2 H, Fmoc- CH_{Ar}); 7,50-7,52 (d, 2 H, Fmoc- CH_{Ar}); 7,67-7,69 (dd, 2 H, Fmoc- CH_{Ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 28,1-28,6 (3 C, CH_3 tBu); 38,0 (1 C, $\text{C}_{\text{Asp-3}}$); 47,4 (1 C, Fmoc-CH); 50,7 (1 C, $\text{C}_{\text{Asp-2}}$); 68,0 (1 C, Fmoc- CH_2); 83,2 (1 C, C tBu); 120,4 (1 C, C-O PfP); 125,4-128,2 (8 C, Fmoc- CH_{Ar}); 141,7-144,1 (9 C, C PfP / Fmoc- CH_{Ar}); 156,4 (1 C, Fmoc C=O); 167,8 (1 C, $\text{C}_{\text{Asp-1}}$); 170,1 (1 C, $\text{C}_{\text{Asp-4}}$).

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -tert-butylester (29)**

A. Über 5-Aminopentylglucosid **27**:

N-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester **28** (0.89 g, 1.55 mmol) wurden zu einer Lösung von Rohprodukt **27** (0.70g, 1.55 mmol) bei 0 °C gegeben und nach 30 min für 3 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über eine Kieselgelsäule gereinigt (Eluent: E:P-1:1), wobei **29** als weißer amorpher Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 1,10 g (1.30 mmol; 84% d. Th.)

B. Über Mitsunobu-Eintopfreaktion:

Durchführung nach **AAV 5**. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose **17** (1.89 g, 5.2 mmol) erhält man **29** als weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 1,88 g (2.23 mmol; 56% d. Th.)

$[\alpha]_{\text{D}} - 7.4^\circ$ (c 8.3, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.75, 7.56 (d, 4 H, $J = 7.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.39, 7.30 (t, 4 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.50 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.95 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.19 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.05 (m, 1 H, H-4), 4.99 (m, 1 H, H-2), 4.41 (m, 4 H, H-1, O- CH_2 -Fmoc, CH-Asp), 4.19 (m, 2 H, H-6a, CH-Fmoc), 4.11 (m, 1 H, H-6b), 3.66 (bm, 1 H, H-5), 3.21 (bd, 2 H, NH- CH_2 -Alkyl), 2.84 (m, 1 H, CH- CH_2 -COO^tBu), 2.62 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl,

CH-CH₂-COO^tBu), 2.04, 2.02, 1.99, 1.97 (4 s, 12 H, CH₃-Acetyl), 1.58 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.47, 1.37 (m, 13 H, [CH₃]₃-C, CH₂-Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH₂-Alkyl)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.2, 170.7, 170.3, 169.4 (CH₃-CO), 156.1 (NH-COO), 144.7, 141.3, 127.8, 127.1, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 83.8 (C-1), 81.8 (C[CH₃]₃), 76.2 (C-3), 74.2 (C-5), 69.8 (C-2), 68.3 (C-4), 67.5 (O-CH₂-Fmoc), 62.1 (C-6), 51.2 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc) 39.4 (NH-CH₂-Alkyl), 37.6 (CH-CH₂-COO^tBu), 29.6, 29.0, 25.8 (CH₂-Alkyl), 28.1 (C[CH₃]₃), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (CH₃-Acetyl).

MS [FAB (m/z = 842.3)]: 843.2 [M+H]⁺, 865.1 [M+Na]⁺.

C₄₂H₅₄N₂O₁₄S (842.33): Ber.: C 59.84 H 6.46 N 3.32 S 3.80
Gef.: C 59.82 H 6.52 N 3.13 S 3.82

2-Acetamido-3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranose (30)

A. Darstellung von 2-Acetamido-3,4,6-tetra-O-acetyl-1-chloro-β-D-glucopyranose

N-Acetylglucosamin (5 g, 22.6 mmol) werden mit Acetylchlorid (10 mL) versetzt und über Nacht gerührt. Danach wurde die Viskose weinrote Masse in CHCl₃ (40 mL) aufgenommen und mit Eiswasser (40 mL) übergossen. Anschließend wurde die org. Phase abgetrennt und mit ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert und über MgSO₄ getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel evaporiert und der verbleibende Sirup mit versetzt Ether (50 mL), dabei fällt das Produkt als weißer Feststoff aus.

Ausbeute: 7.6 g (20.8 mmol, 92% d. Th.)

B. Darstellung des 1-Thioglucosamins 30

Durchführung nach AAV 4. Mit 2-Acetamido-3,4,6-tetra-O-acetyl-1-chlor-β-D-glucopyranosid (7.6 g, 20.8 mmol) erhält nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:2) man Verbindung 30 als weißer Feststoff.

Ausbeute: 5.23 g (14.4 mmol, 69% d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 6.69 (d, 1 H, NHAc), 5.12 (t, 1 H, *J* = 9.3 Hz, H-3), 4.99 (t, 1 H, *J* = 9.6 Hz, H-4), 4.63 (t, 1 H, *J* = 9.9 Hz, H-1), 4.15 (m, 1 H, H-6a), 4.02 (m, 2 H, H-6b, H-2), 3.68 (m, 1 H, H-5) 2.47 (d, 1 H, SH), 2.09, 2.08, 1.94, 1.90 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.8, 170.7, 169.3 (CH₃-CO), 79.9 (C-1), 76.0 (C-5), 73.4 (C-3), 68.3 (C-4), 62.0 (C-6), 56.6 (C-2), 23.2 (CH₃-NHAc), 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

MS [FAB (m/z = 363.1)]: 364.2 [M+H]⁺, 386.1 [M+Na]⁺.

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-thio-β-D-rhamnopyranose (31)

Durchführung mit halbem Ansatz nach AAV 4. Mit Tetraacetyl-rhamnopyranosyl-bromid (8.82 g, 25 mmol) erhält man nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-3:1) Verbindung 31 als farbloses Öl.

Ausbeute: 3.36 g (11 mmol; 44% d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.47 (m, 1 H, H-3), 5.32, 5.29 (m, 2 H, H-2, H-4), 5.25 (m, 1 H, H-1), 5.12 (m, 1 H, H-5), 2.16, 2.06, 1.99 (3 s, 9 H, CH₃OO) 1.25 (m, 3 H, CH₃, H-6).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 170.2, 170.0, 168.5 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 90.8 (C-1), 72.5 (C-3), 71.2 (C-4), 70.6 (C-2), 68.8 (C-5), 21.0, 20.8, 20.7 (CH_3OO), 17.4 (CH_3 , C-6).

MS [FAB ($m/z = 306.08$): 307.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-fucopyranose (32)

Durchföhrung nach AAV 4. Mit Tetraacetylfucopyranosylbromid (3.52 g, 10 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **32** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 2.02 g (6.6 mmol, 66 % d. Th.)

^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 5.25 (m, 1 H, H-4), 5.18 (d, 1 H, $J = 10.1$ Hz, H-2), 5.06 (dd, $J = 9.9$, $J = 3.3$ 1 H, H-3), 4.68 (d, 1 H, $J = 9.8$ Hz, H-1), 3.83 (q, 1 H, $J = 6.5$ Hz, H-5), 2.35 (d, 1 H, *SH*), 2.14, 2.03, 1.95 (4 s, 12 H, CH_3OO) 1.20 (m, 3 H, CH_3 , H-6).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7, 170.1, 169.8 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 82.3 (C-1), 73.8 (C-3), 71.7 (C-4), 70.5 (C-2), 67.3 (C-5), 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3OO).

MS [FAB ($m/z = 306.08$): 307.0 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose (33)

Durchföhrung nach AAV 4. Mit Heptaacetylcellopyranosylbromid (34.9 g, 50 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **33** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 23.15 g (35.5 mmol; 71% d. Th.)

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 5.52$ (t, 1 H, H-3'), 5.17, 5.08 (m, 2 H, H-4', H-3), 4.93 (m, 1 H, H-2'), 4.53 (m, 1 H, H-2), 4.36 (m, 1 H, H-1'), 4.18 (m, 2 H, H-1, H-6a), 4.06 (m, 2 H, H-6a, H-6a'), 4.08, 4.04 (m, 2 H, H-6b, H-6b'), 3.83 (m, 1 H, H-5'), 3.68 (bs, 1 H, H-5), 2.35 (d, 1 H, *SH*), 2.14, 2.09, 2.04, 2.00, 1.98, (7 s, 21 H, CH_3OO).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 169.0$, 168.8, 168.7, 168.5, 167.9, 167.5 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 99.13 (C-1'), 84.9 (C-1), 75.6 (C-4), 73.8 (C-5), 71.6 (C-3'), 71.5 (C-5'), 70.6 (C-3), 70.1 (C-2'), 69.3 (C-2), 66.3 (C-4'), 60.1 (C-6), 59.5 (C-6'), 20.6, 20.5, 20.4, 20.3 (CH_3OO).

MS [FAB ($m/z = 652.17$): 675.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose (34)

Durchföhrung nach AAV 4. Mit Heptaacetylactopyranosylbromid (34.9 g, 50 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **34** als weißen Feststoff erhalten.

Ausbeute: 24.45 g (37.5 mmol; 75% d. Th.)

^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 5.32 (s, 1 H, H-4'), 5.23 (t, 1 H, $J = 9.1$ Hz, H-2'), 5.08 (bt, 1 H, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 4.94 (m, 2 H, H-3, H-2), 4.74 (d, 1 H, $J = 10.1$ Hz, H-1'), 4.47 (m, 2 H, H-1, H-6a), 4.10 (m, 3 H, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.86 (bt, 1 H, $J = 6.6$, H-5'), 3.79 (bt, 1 H, $J_{3-4} = 9.6$, $J_{4-5} = 9.3$ H-4), 3.62 (bm, 1 H, H-5), 2.35 (d, 1 H, *SH*), 2.13, 2.10, 2.04, 2.03, 2.02, 1.94 (7 s, 21 H, $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 170.4, 170.2, 170.1, 169.8, 169.2, 169.1 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 101.1 (C-1'), 81.8 (C-1), 76.4 (C-4), 76.2 (C-5), 73.7 (C-3), 71.0 (C-3'), 70.8 (C-2), 70.2 (C-5'), 69.0 (C-2'), 66.7 (C-4'), 62.1 (C-6'), 61.0 (C-6), 21.2, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 ($\text{CH}_3\text{-Acetyl}$).

MS [FAB ($m/z = 652.17$)]: 653.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 675.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose (35)

Durchführung nach AAV 4. Mit Heptaacetylmaltopyranosylbromid (34.9 g, 50 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **35** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 22.8 g (35.0 mmol; 70 % d. Th.)

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 5.33, 5.28$ (m, 2 H, H-1', H-3'), 5.18 (t, 1 H, H-3), 4.99 (t, 1 H, H-4'), 4.78, 4.53 (m, 2 H, H-2', H-2), 4.39 (m, 1 H, H-1), 4.17 (bm, 2 H, H-6a, H-6a'), 3.96 (m, 3 H, H-6b, H-6b', H-5), 3.67 (m, 1 H, H-5), 2.21 (d, 1 H, *SH*), 2.09, 2.03, 1.99, 1.96, 1.94 (5 s, 21 H, CH_3OO).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 170.6, 170.5, 170.4, 170.0, 169.9, 169.8, 169.4$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 95.6 (C-1'), 78.2 (C-1), 76.4 (C-3), 74.3 (C-5), 72.6 (C-4), 69.9 (C-2), 69.2 (C-2'), 68.6 (C-3'), 67.9 (C-5'), 66.6 (C-4'), 62.9 (C-6), 61.5 (C-6'), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3OO).

MS [FAB ($m/z = 652.2$)]: 675.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranose (36)

Durchführung nach AAV 4. Mit Heptaacetylmelopyranosylbromid (34.9 g, 50 mmol). Nach der Säulenchromatographie wird **36** als weißen Feststoff erhalten.

Ausbeute: 23.48 g (36.0 mmol; 72% d. Th.)

^1H -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 5.42 (m, 3 H, H-3, H-3', H-4'), 5.30 (m, 2 H, H-2, H-2'), 5.00, 5.11, 5.18 (m, 3 H, H-4, H-1', H-1), 4.17 (m, 1 H, H-6a,) 4.03 (m, 3 H, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.67 (m, 2 H, H-5', H-4), 3.54 (bm, 1 H, H-5), 2.35 (d, 1 H, *SH*), 2.16, 2.09, 2.07, 2.02, 2.00, 1.98, 1.95 (7 s, 21 H, CH_3OO).

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ (ppm) = 170.6, 170.4, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.4, 168.9 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 96.1 (C-1'), 88.9 (C-1), 78.5 (C-4), 73.6 (C-5), 73.6 (C-3), 70.5 (C-3'), 69.9 (C-2), 69.3 (C-5'), 68.7 (C-2'), 68.5 (C-4'), 66.1 (C-6'), 61.7 (C-6), 21.1, 20.9, 20.7, 20.6, 20.5 (CH_3OO).

MS [FAB ($m/z = 652.17$)]: 675.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (37)**

Durchführung nach AAV 5. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranose **14** (1.89 g, 5.2 mmol) erhält man **37** als farbloses Öl.

Ausbeute: 1.41 g (1.68 mmol; 42% d. Th.)

$[\alpha]_{\text{D}} + 47.5^\circ$ (*c* 1.5, CHCl_3)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.74, 7.56 (d, 2 H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.37, 7.28 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.49 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.95 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.40 (bd, 1 H, H-3), 5.20 (t, 1 H, *J* = 9.6 Hz, H-4), 5.03 (dd, 1 H, *J* = 3.1 Hz H-2), 4.42 (m, 4 H, H-1, O-CH₂-Fmoc, CH-Asp), 4.20 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.11 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.89 (m, 1 H, H-5), 3.23 (bd, 2 H, NH-CH₂-Alkyl), 2.87 (m, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.64 (m, 3 H, S-CH₂-Alkyl, CH-CH₂-COO^tBu), 2.15, 2.13, 2.04, 2.01 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.59 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.47, 1.37 (m, 13 H, [CH₃]₃-C, CH₂-Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH₂-Alkyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.3, 170.5, 170.3, 169.7 (CH₃-CO), 156.1 (NH-COO), 143.8, 141.9, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 84.2 (C-1), 81.9 (C[CH₃]₃), 74.2 (C-5), 72.0 (C-3), 67.3 (C-2), 67.2 (C-4), 67.5 (O-CH₂-Fmoc), 61.5 (C-6), 51.2 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc) 39.5 (NH-CH₂-Alkyl), 37.6 (CH-CH₂-COO^tBu), 31.0, 29.9, 25.9 (CH₂-Alkyl), 28.1 (C[CH₃]₃), 21.1, 20.9, 20.8, 20.6 (CH₃OO).

MS [FAB (m/z = 842.3)]: 843.4 [M+H]⁺, 865.4 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|--|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₂ H ₅₄ N ₂ O ₁₄ S (842.33): | Ber.: | C | 59.84 | H | 6.46 | N | 3.32 | S | 3.80 |
| | Gef.: | C | 59.82 | H | 6.51 | N | 3.21 | S | 3.73 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*-butylester (38)**

Durchführung nach AAV 5. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-galactopyranose **15** (1.89 g, 5.2 mmol) erhält man **38** als weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 1.51 g (1.80 mmol; 45% d. Th.)

[α]_D -4.2° (c 4.3, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.73, 7.55 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.37, 7.28 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.50 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.95 (bd, 1 H, *J* = 6.6 Hz, NH-Asp), 5.39 (s, 1 H, H-4), 5.19 (t, 1 H, *J* = 9.9 Hz, H-2), 5.01 (m, 1 H, H-3), 4.40 (m, 4 H, H-1, O-CH₂-Fmoc, CH-Asp), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.09 (m, 2 H, H-6b, H-6a), 3.89 (m, 1 H, H-5), 3.20 (bd, 2 H, NH-CH₂-Alkyl), 2.85 (bm, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.62 (m, 3 H, S-CH₂-Alkyl, CH-CH₂-COO^tBu), 2.11, 2.02, 2.00, 1.95 (4 s, 12 H, CH₃-OO), 1.58 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.47, 1.41 (m, 13 H, [CH₃]₃-C, CH₂-Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH₂-Alkyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.3, 170.4, 170.1, 169.4 (CH₃-CO), 156.1 (NH-COO), 143.7, 141.3, 127.8, 127.1, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 84.1 (C-1), 81.9 (C[CH₃]₃), 74.4 (C-3), 71.9 (C-5), 67.3 (C-2), 67.2 (C-4), 67.5 (O-CH₂-Fmoc), 62.5 (C-6), 51.2 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc) 39.4 (NH-CH₂-Alkyl), 37.6 (CH-CH₂-COO^tBu), 29.9, 29.1, 25.9 (CH₂-Alkyl), 28.1 (C[CH₃]₃), 22.9, 22.4, 20.9, 20.7 (CH₃-OO).

MS [FAB (m/z = 842.3)]: 843.9 [M+H]⁺, 865.9 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|--|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₂ H ₅₄ N ₂ O ₁₄ S (842.33): | Ber.: | C | 59.84 | H | 6.46 | N | 3.32 | S | 3.80 |
| | Gef.: | C | 59.46 | H | 6.52 | N | 2.98 | S | 3.76 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(5-aminopentyl)-2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*-butylester (39)**

Durchführung nach **AAV 5**. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucosaminpyranosid **30** (1.89 g, 5.2 mmol) erhält man **39** als weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 0.74 g (0.88 mmol; 22% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.77, 7.58$ (d, 4 H, $J = 7.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.31 (t, 4 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.56 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 6.02 (d, 1 H, NHAc), 5.95 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.17, 5.07 (m, 2 H, H-3, H-4), 4.49, 4.43 (m, 4 H, H-2, O- CH_2 -Fmoc, CH-Asp), 4.22 (m, 2 H, H-1, CH-Fmoc), 4.12, 4.08 (m, 2 H, H-6), 3.64 (bm, 1 H, H-5), 3.22 (m, 2 H, NH- CH_2 -Alkyl), 2.88 (m, 1 H, CH- CH_2 -COO^tBu), 2.65 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl, CH- CH_2 -COO^tBu), 2.06, 2.02, 2.01, 1.94 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.58 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.44, 1.37 (m, 13 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$, CH_2 -Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.2, 170.9, 170.6, 169.5$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.1 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 83.8 (C-1), 82.1 (C $[\text{CH}_3]_3$), 75.9 (C-3), 73.9 (C-5), 68.4 (C-2), 68.3 (C-4), 67.3 (O- CH_2 -Fmoc), 62.4 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc) 39.5 (NH- CH_2 -Alkyl), 37.7 (CH- CH_2 -COO^tBu), 29.9, 28.9, 25.7 (CH_2 -Alkyl), 28.2 (C $[\text{CH}_3]_3$), 23.3 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 20.9, 20.7, 20.6, (CH_3OO).

MS [FAB ($m/z = 841.35$): 842.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 864.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-rhamnopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (40)**

Durchführung nach **AAV 5**. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-rhamnopyranosid **31** (1.59 g, 5.2 mmol) erhält man **40** als farbloses Öl.

Ausbeute: 0.63 g (0.80 mmol; 20% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.77, 7.75$ (d, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.61 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.39 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.30 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 6.0 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.85 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, NH-Asp), 5.30, 5.25 (m, 2 H, H-3, H-2), 5.11 (m, 1 H, H-4), 4.76 (m, 1 H, H-5), 4.46 (m, 1 H, H-1), 4.36 (t, 2 H, O- CH_2 -Fmoc), 4.26 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.89 (m, 2 H, NH- CH_2 -Alkyl), 3.00, 2.83 (m, 2 H, CH- CH_2 -COO^tBu), 2.16, 2.05, 1.97 (3 s, 9 H, CH_3OO), 1.68 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.47, 1.41 (m, 13 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$, CH_2 -Alkyl), 1.25 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 170.0, 169.9, 169.8, 168.9$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.1 (NH-COO), 144.1, 141.4, 127.8, 127.2, 125.4, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 91.9 (C-1), 82.4 (C $[\text{CH}_3]_3$), 77.4 (C-3), 71.4 (C-4), 70.4 (C-2), 69.6 (C-5), 69.1 (O- CH_2 -Fmoc), 50.7 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc) 39.4 (NH- CH_2 -Alkyl), 37.6 (CH- CH_2 -COO^tBu), 29.9, 29.1, 25.9 (CH_2 -Alkyl), 28.1 (C $[\text{CH}_3]_3$), 20.9, 20.8, 20.7, (CH_3OO), 17.5 (CH_3 , C-6).

MS [FAB ($m/z = 784.32$): 785.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 807.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (41)**

Durchführung nach **AAV 5**. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-cellobiose **33** (3.39 g, 5.2 mmol) erhält man **41** als weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 5.26 g (3.64 mmol; 91% d. Th.)

$[\alpha]_D - 15.3^\circ$ (*c* 3.2, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 7.75, 7.56$ (d, Fmoc-Ar-*H*), 7.37, 7.28 (m, Fmoc-Ar-*H*), 6.48 (bs, 1 H, *NH*-Pentyl), 5.93 (bs, 1 H, *NH*-Asp), 5.14 (m, 2 H, H-3, H-3'), 5.05 (m, 1 H, H-4'), 4.89 (m, 2 H, H-2', H-2), 4.48, 4.41, 4.34 (bm, 7 H, H-1', H-1, H-6a, H-6a', O-CH₂-Fmoc, CH-Asp), 4.20 (m, 1 H, H-6b), 4.08, 4.04 (m, 2 H, H-6b', CH-Fmoc), 3.74 (t, 1 H, *J* = 10.0 H-4), 3.63 (bd, 1 H, H-5), 3.58 (bs, 1 H, H-5') 3.21 (bs, 2 H, NH-CH₂-Alkyl), 2.85 (d, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.59 (m, 3 H, S-CH₂-Alkyl, CH-CH₂-COO^tBu), 2.09, 2.06, 2.02, 2.00, 1.99, 1.96 (7 s, 21 H, CH₃OO), 1.57 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.55, 1.43 (m, 13 H, [CH₃]₃-C, CH₂-Alkyl), 1.37, 1.24 (m, 2 H, CH₂-Alkyl). ¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 171.0, 170.2, 170.0, 169.5, 169.4, 169.1, 168.8$ (CH₃-CO), 155.8 (NH-COO), 143.4, 141.1, 127.5, 126.8, 124.8, 119.8 (Fmoc-Ar-C), 100.6 (C-1'), 83.2 (C-1), 81.6 (C[CH₃]₃), 76.2 (C-4), 73.2 (C-5), 72.7 (C-3'), 71.7 (C-5'), 71.3 (2 C, C-3, C-2'), 69.9 (C-2), 67.5 (O-CH₂-Fmoc), 66.9 (C-4'), 61.8 (C-6), 61.2 (C-6'), 50.9 (CH-Asp), 46.9 (CH-Fmoc) 39.1 (NH-CH₂-Alkyl), 37.3 (CH-CH₂-COO^tBu), 29.6, 28.8, 25.5 (CH₂-Alkyl), 27.9 (C[CH₃]₃), 20.6, 20.5, 20.4, 20.3 (1 C, 1 C, 1 C, 4 C, CH₃OO).

MS [FAB (*m/z* = 1130.4)]: 1131,1 [M + H]⁺, 1153,1 [M + Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₅₄ H ₇₀ N ₂ O ₂₂ S (1130.42): | Ber.: | C | 57.34 | H | 6.24 | N | 2.48 | S | 2.83 |
| | Gef.: | C | 57.33 | H | 6.36 | N | 2.31 | S | 2.56 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (42)**

Durchführung nach **AAV 5**. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-lactose **34** (3.39 g, 5.2 mmol) erhält man **42** als weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 5.12 g (3.56 mmol; 89% d. Th.)

$[\alpha]_D - 2.7^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 7.75, 7.55$ (bd, Fmoc-Ar-*H*), 7.37, 7.28 (m, Fmoc-Ar-*H*), 6.56 (bs, 1 H, *NH*-Pentyl), 6.01 (bs, 1 H, *NH*-Asp), 5.32 (s, 1 H, H-4'), 5.18 (bt, 1 H, *J* = 8.8 Hz, H-2'), 5.08 (bt, 1 H, *J* = 8.8 Hz, H-3'), 4.91 (m, 2 H, H-3, H-2), 4.43 (m, 6 H, H-1, H-1', H-6a, O-CH₂-Fmoc, CH-Asp), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.07 (m, 3 H, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.86 (bm, 1 H, H-5'), 3.75 (bt, 1 H, *J*₃₋₄ = 9.4, *J*₄₋₅ = 9.1 H-4), 3.57 (m, b, 1 H, H-5), 3.19 (bs, 2 H, NH-CH₂-Alkyl), 2.81 (m, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.59 (m, 3 H, S-CH₂-Alkyl, CH-CH₂-COO^tBu), 2.12, 2.07, 2.01, 1.94 (4 s, 21 H, CH₃OO), 1.55 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.42, 1.36, 1.22 (m, 13 H, [CH₃]₃-C, CH₂-Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH₂-Alkyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 171.0, 170.1, 170.3, 170.1, 170.0, 169.6, 169.0$ (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.6, 141.2, 127.7, 127.0, 125.0, 120.0 (Fmoc-Ar-C), 101.0 (C-1'), 83.3 (C-1), 81.6 (C[CH₃]₃), 76.6 (C-4), 76.1 (C-5), 73.7 (C-3), 70.9 (C-3'), 70.6 (C-2), 70.7 (C-5'), 67.4

(O-CH₂-Fmoc), 67.0 (C-2'), 66.6 (C-4'), 62.3 (C-6'), 61.2 (C-6), 51.1 (CH-Asp), 47.1 (CH-Fmoc) 39.3 (NH-CH₂-Alkyl), 37.5 (CH-CH₂-COO^tBu), 29.8, 28.8, 25.7 (CH₂-Alkyl), 28.0 (C[CH₃]₃), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (1 C, 1 C, 1 C, 1 C, 2 C, 1 C, CH₃OO).

MS [FAB (m/z = 1130.4)]: 1131,3 [M + H]⁺, 1153,3 [M + Na]⁺.

C₅₄H₇₀N₂O₂₂S (1130.42): Ber.: C 57.34 H 6.24 N 2.48 S 2.83
Gef.: C 57.18 H 6.30 N 2.52 S 2.73

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (43)**

Durchführung nach **AAV 5**. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-maltose **35** (3.39 g, 5.2 mmol) erhält man **43** als weißer amorpher Feststoff.

Ausbeute: 3.53 g (2.44 mmol; 61% d. Th.)

$[\alpha]_D + 19.4^\circ$ (*c* 0.2, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.57 (d, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.31 (m, Fmoc-Ar-*H*), 6.50 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.95 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.39 (d, 1 H, *J* = 3.3 Hz, H-1'), 5.35 (m, 1 H, H-3'), 5.26 (t, 1 H, *J* = 9.0 Hz H-3), 5.04 (t, 1 H, *J* = 10.0 Hz, H-4'), 4.87 (m, 1 H, H-2), 4.84 (m, 1 H, H-2'), 4.49, 4.46, 4.42 (bm, 4 H, H-1, H-6a, O-CH₂-Fmoc, CH-Asp), 4.25 (m, 1 H, H-6b), 4.23 (m, 1 H, H-6a'), 4.12 (m, 1 H, H-6b'), 4.06 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.02 (m, 1 H, H-4), 3.97 (m, 1 H, H-5'), 3.95 (m, 1 H, H-5) 3.22 (bs, 2 H, NH-CH₂-Alkyl), 2.87 (d, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.60 (m, 3 H, S-CH₂-Alkyl, CH-CH₂-COO^tBu), 2.14, 2.12, 2.09, 2.04, 2.01 1.99 (4 s, 21 H, CH₃OO), 1.57, 1.44 (m, 13 H, [CH₃]₃-C, CH₂-Alkyl), 1.37, 1.24 (m, 2 H, CH₂-Alkyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.4, 170.8, 170.7, 170.4, 170.2, 170.0, 169.7 (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.3, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 95.7 (C-1'), 83.3 (C-1), 81.9 (C[CH₃]₃), 72.8 (C-3), 70.9 (C-5), 70.1 (C-4), 69.5 (C-2), 68.6 (C-2'), 68.3 (C-3'), 68.1 (C-5'), 67.4 (O-CH₂-Fmoc), 66.6 (C-4'), 63.1 (C-6), 61.6 (C-6'), 51.2 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc) 39.5 (NH-CH₂-Alkyl), 37.7 (CH-CH₂-COO^tBu), 29.9 29.3, 25.9 (CH₂-Alkyl), 28.2 (C[CH₃]₃), 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (1 C, 1 C, 2 C, 2 C, 1 C, CH₃OO).

MS [FAB (m/z = 1130.4)]: 1131.4 [M+H]⁺, 1153.2 [M+Na]⁺.

C₅₄H₇₀N₂O₂₂S (1130.42): Ber.: C 57.34 H 6.24 N 2.48 S 2.83
Gef.: C 57.14 H 6.23 N 2.24 S 2.55

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (44)**

Durchführung nach AAV 5. Mit 5-Aminopentanol (0.42 g, 4 mmol) und Hepta-*O*-acetyl-1-thio- β -D-mellobiose 36 (3.39 g, 5.2 mmol) erhält man 44 als weißer amorpher Feststoff.

$[\alpha]_D + 68.2^\circ$ (c 1, CHCl₃)

Ausbeute: 2.53 g (2.24 mmol; 56% d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.58 (bd, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.31 (m, Fmoc-Ar-*H*), 6.55 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.96 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.45 (s, 1 H, H-3), 5.32 (m, 1 H, H-4'), 5.20 (m, 2 H, H-4', H-3), 5.07 (m, 2 H, H-2', H-2), 4.95 (t, 1 H, H-1'), 4.44 (m, 4 H, O-CH₂-Fmoc, CH-Asp, H-6'), 4.22 (m, 2 H, CH-Fmoc, H-1), 4.07 (m, 1 H, H-5), 3.70, 3.57 (m, 3 H, H-6a, H-6b, H-5'), 3.24 (bs, 2 H, NH-CH₂-Alkyl), 2.87 (m, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.62 (m, 3 H, S-CH₂-Alkyl, CH-CH₂-COO^tBu), 2.12, 2.04, 1.99, 1.97 (4 s, 21 H, CH₃OO), 1.62 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.44, 1.39, 1.25 (m, 13 H, [CH₃]₃-C, CH₂-Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH₂-Alkyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 170.6, 170.4, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.4, 168.9 (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.6, 141.2, 127.7, 127.0, 125.0, 120.0 (Fmoc-Ar-C), 96.1 (C-1'), 90.3 (C-1), 81.7 (C[CH₃]₃), 78.5 (C-4), 73.6 (C-5), 73.6 (C-3), 70.5 (C-3'), 69.9 (C-2), 69.3 (C-5'), 68.7 (C-2'), 68.5 (C-4'), 67.4 (O-CH₂-Fmoc), 66.1 (C-6'), 61.7 (C-6), 51.1 (CH-Asp), 47.1 (CH-Fmoc) 39.3 (NH-CH₂-Alkyl), 37.5 (CH-CH₂-COO^tBu), 29.8, 28.8, 25.7 (CH₂-Alkyl), 28.0 (C[CH₃]₃), 21.1, 20.9, 20.7, 20.6, 20.5 (5 s, 21 H, CH₃OO).

C₅₄H₇₀N₂O₂₂S (1130.41): Ber.: C 57.34 H 6.24 N 2.48 S 2.83
Gef.: C 57.62 H 6.36 N 2.40 S 2.41

MS [FAB (m/z = 1130.4)]: 1131.2 [M+H]⁺, 1153.3 [M+Na]⁺.

8.3.2 Zu Kapitel 6.1.2

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-valinol (**45**)

Durchführung nach **AAV 6**. Mit *L*-Boc-Valin (10.9 g, 50 mmol) erhält man **45** als weißen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 7.31 g (36 mmol; 72 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 4.66 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, *NH*), 3.58 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.37 (bm, 1 H, *CH-NH*), 3.10 (bs, 1 H, *OH*), 1.79 (m, 1 H, $\text{CH-(CH}_3)_2$), 1.44 (s, 9 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$), 0.89 (m, 6 H, $\text{CH-(CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 157.2 (*NH-COO*), 79.8 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 64.4 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 58.3 (*CH-NH*), 29.6 ($\text{CH-(CH}_3)_2$), 28.7 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 19.9, 18.8 ($\text{CH-(CH}_3)_2$).

[FAB ($m/z = 203.15$): 204.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -*L*-aspartol- β -*tert*-butylester (**46**)

Durchführung nach **AAV 6**. Mit *N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (20.5 g, 50 mmol) erhält man nach einer Säulenchromatographie (Eluent P:E:DCM-2:2:1) **46** als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 8.7 g (21.9 mmol; 43.8 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 7.76, 7.59 (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz, *Fmoc-Ar-H*), 7.39, 7.30 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, *Fmoc-Ar-H*), 5.58 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, *NH*), 4.39 (db, 2 H, $J = 5.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.20 (t, 1 H, *CH-Fmoc*), 4.04 (sb, 1 H, *OH*), 3.70 (sb, 2 H, CH_2OH), 2.56 (bd, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 1.44 (s, 9 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7 (COO^tBu), 156.4 (*NH-COO*), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1 (*Fmoc-Ar-C*), 81.6 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 64.5 (CH_2OH), 50.1 (*CH-NH*), 47.3 (*CH-Fmoc*), 37.4 ($\text{CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 28.1 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$).

[FAB ($m/z = 397.2$): 398.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl)-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butyl ester (**47**)

Durchführung nach **AAV 5**. Mit 1-Thiomannopyranose **14** (1.89 g, 5.2 mmol) und *L*- α -Phenylglycinol (0.60 g, 4 mmol) erhält man nach einer Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) **47** als weißer Feststoff.

Ausbeute: 1.15 g (1.52 mmol; 38 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.77, 7.76 (m, 2 H, *Fmoc-Ar-H*), 7.65, 7.61 (m, 2 H, *Fmoc-Ar-H*), 7.40, 7.33 (m, 4 H, *Fmoc-Ar-H*), 5.98 (m, 1 H, *NH-Asp*), 5.89 (s, 1 H, *NH-CH*), 5.37 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 1 H, H-4), 5.16 (m, 1 H, Hz H-2), 4.67 (m, 1 H, H-1), 4.57 (m, 1 H, *CH-Fmoc*), 4.41, 4.27 (m, 3 H, H-6a, $\text{O-CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.10 (m, 1 H, H-6b), 3.99, 3.96 (m, 2 H,

CH-Asp, H-5), 3.04 (dd, 1 H, *CH-CH*₂-COO^tBu), 2.67 (dd, 1 H, *CH-CH*₂-COO^tBu), 2.17 (m, 2 H, S-*CH*₂), 2.10, 2.08, 2.04, 1.99 (4 s, 12 H, *CH*₃-Acetyl), 1.44 (s, 9 H, [*CH*₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 170.6 (Asp-CO-CH), 170.1, 170.0, 169.9, 169.7 (*CH*₃-CO), 155.7 (NH-COO), 143.7, 143.5, 141.3, 127.7, 127.1, 125.0, 120.0 (Fmoc-Ar-C), 82.3 (C[*CH*₃]₃), 80.4 (C-1), 76.9 (C-5), 72.3 (C-3), 70.9 (C-4), 69.7 (C-5), 67.3 (O-*CH*₂-Fmoc), 65.8 (C-2), 62.0 (C-6), 57.6 (*CH*-Asp), 47.1 (*CH*-Fmoc), 37.3 (*CH*₂-Asp), 28.0 (C[*CH*₃]₃), 20.9, 20.7, 20.6, 20.5 (*CH*₃-Acetyl).

[FAB (m/z = 757.2)]: 780.2 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₃₇ H ₄₃ NO ₁₄ S (757.2): | Ber.: | C | 58.64 | H | 5.72 | N | 1.85 | S | 4.23 |
| | Gef.: | C | 58.34 | H | 5.79 | N | 1.78 | S | 4.21 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butyl ester (48)**

Durchführung nach AAV 8 und AAV 9. Mit Boc-*L*- α -Phenylglycinol 54 (0.95 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid 14 (1.45 g, 4 mmol) erhält man 48 als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 2.35 g (2.7 mmol; 67 % d. Th.)

[α]_D + 67.5° (c 1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.75, 7.64 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.59, 7.57 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.41, 7.39 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.36, 7.33 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.36, 7.34 (m, 2 H, *CH*₂-Ar-*H*), 7.32, 7.31, 7.29 (m, 3 H, *CH*₂-Ar-*H*), 5.98 (m, 1 H, NH-Asp), 5.89 (s, 1 H, NH-CH), 5.37 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 1 H, H-4), 5.16 (m, 1 H, *J* = 3.1 Hz H-2), 4.69 (m, 1 H, *CH-CH*₂-Ar), 4.59 (m, 1 H, H-1), 4.44 (m, 1 H, *CH*-Fmoc), 4.27 (m, 3 H, H-6a, O-*CH*₂-Fmoc), 4.09 (m, 1 H, H-6b), 3.99 (m, 1 H, *CH*-Asp), 3.80 (m, 1 H, H-5), 3.05 (dd, 1 H, *CH-CH*₂-COO^tBu), 2.68 (dd, 1 H, *CH-CH*₂-COO^tBu), 2.18 (m, 2 H, S-*CH*₂), 2.10, 2.08, 2.04, 1.99 (4 s, 12 H, *CH*₃-Acetyl), 1.43 (s, 9 H, [*CH*₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 195.9 (NH-CO), 170.8 (Asp-CO-CH), 170.1, 170.0, 169.9, 169.7 (*CH*₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.9, 141.6, 128.1, 127.5, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-C), 143.6, 141.4, 127.4, 125.2 (*CH*₂-Ar-C), 82.6 (C[*CH*₃]₃), 80.8 (C-1), 79.7 (C-5), 77.4 (C-3), 72.6 (C-2), 71.3 (C-4), 68.0 (O-*CH*₂-Fmoc), 62.5 (C-6), 57.8 (*CH*-Asp), 47.4 (*CH*-Fmoc), 47.3 (*CH*-Ar), 37.8 (*CH*₂-Asp), 37.6 (*CH-CH*₂-COO^tBu), 28.4 (C[*CH*₃]₃), 21.3, 21.1, 21.0, 20.9 (*CH*₃-Acetyl).

[FAB (m/z = 876.3)]: 899.3 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₅ H ₅₂ N ₂ O ₁₄ S (876.9): | Ber.: | C | 61.63 | H | 5.98 | N | 3.19 | S | 3.66 |
| | Gef.: | C | 61.38 | H | 5.89 | N | 3.00 | S | 3.48 |

Fluorenylmethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (49)

Durchführung nach AAV 8. Mit Fmoc-*L*- α -Phenylglycinol 50 (1.44 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid 14 (1.45 g, 4 mmol) erhält man 47 als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.46 g (2.7 mmol; 67 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.75, 7.64$ (m, 4 H, Fmoc-Ar-H), 7.41, 7.39 (m, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.36, 7.33 (m, 2 H, Fmoc-Ar-H), 5.34, 5.31, 5.22 (m, 3 H, H-3, H-2, H-4), 4.30 (m, 1 H, H-1, H-6a), 4.16 (m, 1 H, H-5), 4.07 (m, 1 H, H-6b), 3.21, 3.09 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.15, 2.03, 1.97, 1.94 (4 s, 12 H, $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$).

[FAB ($m/z = 542.6$): 542.1 $[\text{M}]^+$, 565.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -L-phenylglycinol (50)**

L-Phenylglycinol (0.66 g, 4.83 mmol) und *N*-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (1.25, 4.83 mmol) werden in Dioxan (200 mL) gelöst und unter starkem Rühren bei 0 °C ges. NaHCO_3 -Lsg. (150 mL) zugegeben. Nach Rühren über Nacht bei RT werden H_2O (200 mL) und EtOAc (200 mL) zugegeben. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase nochmals mit EtOAc (2 x 100 mL) extrahiert und die vereinigte org. Phasen über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Einengen wird **50** als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.71 g roh (4.76 mmol; 98.4 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.87, 7.73$ (m, 4 H, Fmoc-Ar-H), 7.42, 7.39, 7.31 (m, 9 H, Fmoc-Ar-H, Ar-H), 4.90 (bs, 1 H, NH), 4.60 (sd, 1 H, $\text{CH}_2\text{-CH-Ar}$), 4.29 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.21 (CH-Fmoc), 3.55 (m, 2 H, HO- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 156.4 (NH-COO), 142.8, 140.2, 126.8, 126.3, 125.7, 126.6, 123.9, 118.8 (m, 1 H, Fmoc-Ar-C), 64.1 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 63.4 (CH_2OH), 56.1 (CH-Fmoc), 45.5 (CH-NH).

[FAB ($m/z = 359.2$): 382.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***N-tert*-Butyloxycarbonyl- α -(L- α -phenylglycinyll)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid (52)**

Durchführung nach **AAV 8**. Mit Boc-L- α -Phenylglycinol **54** (0.95 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranose **14** (1.45 g, 4 mmol) erhält man **52** als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.66 g (2.8 mmol; 71 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.31$ (m, 5 H, Ar-H), 5.41 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 2 H, H-2, H-4), 4.67 (bd, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ar}$), 4.39, 4.34 (m, 2 H, H-1, H-6a), 4.13 (m, 1 H, H-5), 4.07 (m, 1 H, H-6b), 2.88, 2.67 (m, 2 H, S- CH_2), 2.21, 2.10, 2.09, 2.04 (4 s, 12 H, $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$), 1.46 (s, 9 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 170.1, 170.0, 169.8, 169.7$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.1 (NH-COO), 137.2, 129.4, 128.7, 126.6 ($\text{CH}_2\text{-Ar-C}$), 83.0 (C-1), 79.8 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 77.3 (C-5), 70.6 (C-3), 69.4 (C-2), 66.4 (C-4), 62.5 (C-6), 47.5 ($\text{CH}_2\text{-CH-Ar}$), 37.2 (S- CH_2), 28.5 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 ($\text{CH}_3\text{-Acetyl}$).

[FAB ($m/z = 583.2$): 584.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 606.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(L- α -PhenylglycinyI)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid (53)

Verbindung **52** (1.66 g, 2.8 mmol) werden in 50%iger TFA in CH_2Cl_2 aufgenommen und 10 min gerührt. Anschließend wurde die TFA mehrmals mit Toluol coevaporiert bis alles TFA entfernt ist. Nach trocknen am Hochvakuum bleibt Verbindung **53** als weiß-gelblicher Feststoff zurück der roh weiter zu Verbindung **54** umgesetzt wurde.

Ausbeute: 1.40 g roh (2.9 mmol; 104 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.28 (m, 5 H, Ar-*H*), 5.40 (m, 1 H, H-3), 5.32 (m, 2 H, H-2, H-4), 4.66 (bd, 1 H, CH- CH_2 -Ar), 4.39, 4.35 (m, 2 H, H-1, H-6a), 4.12 (m, 1 H, H-5), 4.09 (m, 1 H, H-6b), 3.32 (bs, 2 H, NH_2), 2.88, 2.67 (m, 2 H, S- CH_2), 2.20, 2.10, 2.09, 2.04 (4 s, 12 H, CH_3 -Acetyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 170.3, 170.1, 169.9, 169.7 (CH_3 -CO), 156.0 (NH-COO), 137.2, 129.4, 128.7, 126.5 (CH_2 -Ar-C), 82.9 (C-1), 77.2 (C-5), 70.8 (C-3), 69.3 (C-2), 66.4 (C-4), 62.4 (C-6), 49.6 (CH_2 -CH-Ar), 37.1 (S- CH_2), 21.1, 20.9, 20.8, 20.7 (CH_3 -Acetyl).

[FAB (m/z = 483.2)]: 484.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 506.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl- α -L-phenylglycinol (54)**

Durchführung nach AAV 7. Mit L-Phenylglycinol (7.0 g, 51 mmol) erhält man **54** als weißen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 8.14 g (34.3 mmol; 67.3% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.34, 7.29 (m, 5 H, Ar-*H*), 5.35 (bs, 1 H, NH), 4.76 (s, 1 H, CH_2 -CH-Ar), 3.79 (s, 1 H, CH_2 -OH), 2.60 (m, 2 H, HO), 1.48 (s, 9 H, [CH_3] $_3$ -C).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 156.3 (NH-COO), 139.6, 128.8, 127.7, 126.7 (Fmoc-Ar-C), 80.0 (C[CH_3] $_3$), 66.8 (CH_2 -CH-Ar), 56.9 (CH-NH), 28.4 (C[CH_3] $_3$).

[FAB (m/z = 237.2)]: 238.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 260.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl- α -D-phenylglycinol (55)**

Durchführung nach AAV 7. Mit D-Phenylglycinol (7.0 g, 51 mmol) erhält man **55** als weißen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 7.70 g (32.4 mmol; 63.6% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.34, 7.29 (m, 5 H, Ar-*H*), 5.35 (bs, 1 H, NH), 4.76 (s, 1 H, CH_2 -CH-Ar), 3.79 (s, 1 H, CH_2 -OH), 2.60 (m, 2 H, HO), 1.48 (s, 9 H, [CH_3] $_3$ -C).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 156.3 (NH-COO), 139.6, 128.8, 127.7, 126.7 (Fmoc-Ar-C), 80.0 (C[CH_3] $_3$), 66.8 (CH_2 -CH-Ar), 56.9 (CH-NH), 28.4 (C[CH_3] $_3$).

[FAB (m/z = 237.2)]: 238.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 260.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

***N*-tert-Butyloxycarbonyl- α -L-phenylalaninol (56)**

Durchführung nach AAV 7. Mit L-Phenylalaninol (7.71 g, 51 mmol) erhält man **56** als weißen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 8.41 g (33.5 mmol; 65.6% d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.34, 7.29$ (m, 5 H, Ar-*H*), 5.36 (bs, 1 H, *NH*), 4.63 (s, 1 H, $\text{CH}_2\text{-CH-Ar}$), 3.79 (s, 1 H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 2.87, 2.65, 2.60 (m, 4 H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ar}$, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.48 (s, 9 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 156.3 (NH-COO), 137.2, 129.5, 128.8, 126.9 (Fmoc-Ar-C), 83.0 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 66.8 ($\text{CH}_2\text{-CH-Ar}$), 50.6 (CH-NH), 35.2 ($\text{CH-CH}_2\text{-Ar}$), 28.4 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$).

[FAB ($m/z = 251.2$): 274.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (57)**

Durchführung nach AAV 8 und AAV 9. Mit Boc-*L*- α -Phenylglycinol 54 (0.95 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-glucopyranose 17 (1.45 g, 4 mmol) erhält man 57 als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 2.25 g (2.6 mmol; 64 % d. Th.)

$[\alpha]_{\text{D}} + 36.2^\circ$ (c 1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.77, 7.75$ (d, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.58, 7.56 (d, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.40 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.29, 7.28 (m, 7 H, Fmoc-Ar-*H*, Ar-*H*), 6.01 (bd, 1 H, *NH*-Asp), 5.15 (m, 2 H, H-3, H-4), 5.04 (t, 1 H, $J = 3.1$ Hz, H-2), 4.95 (t, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-Ar}$), 4.57 (d, 1 H, $J = 6.8$, CH-Fmoc), 4.40 ($\text{O-CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.33 (d, 1 H, $J = 9.9$ Hz, H-1), 4.19 (m, 3 H, H-6a, H-6b, H-5), 3.60 (bd, 1 H, $J = 9.9$ Hz, CH-Asp), 3.13, 2.97 (m, 2 H, $\text{CH-CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 2.88, 2.68 (m, 2 H, $\text{CH-CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 1.93 (m, 2 H, S- CH_2), 2.06, 2.02, 2.01, 2.04, 1.93 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.45 (s, 9 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 170.9$ (Asp-CO-CH), 170.1, 170.0, 169.9, 169.7 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.0 (NH-COO), 143.8, 140.1, 128.1, 127.5, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-C), 143.7, 141.4, 126.6, 125.2 ($\text{CH}_2\text{-Ar-C}$), 82.7 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 82.1 (C-1), 76.2 (C-5), 73.9 (C-3), 70.0 (C-2), 68.2 (C-4), 67.4 ($\text{O-CH}_2\text{-Fmoc}$), 62.0 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 49.3 (CH-Ar), 47.3 (CH-Fmoc), 37.8 ($\text{CH}_2\text{-Asp}$), 34.1 ($\text{CH-CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 28.2 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3OO).

[FAB ($m/z = 876.3$): 899.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

| | | | | | | | | | |
|--|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| $\text{C}_{45}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{S}$ (876.9): | Ber.: | C | 61.63 | H | 5.98 | N | 3.19 | S | 3.66 |
| | Gef.: | C | 61.35 | H | 5.05 | N | 3.04 | S | 3.47 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (58)**

Durchführung nach AAV 8 und AAV 9. Mit Boc-*L*- α -Phenylglycinol 54 (0.95 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-galactopyranose 15 (1.45 g, 4 mmol) erhält man 58 als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 2.42 g (2.7 mmol; 69 % d. Th.)

$[\alpha]_{\text{D}} + 5.6^\circ$ (c 1, CHCl_3)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.77, 7.75 (d, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.57, 7.55 (d, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.38 (t, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.27 (m, 7 H, Fmoc-Ar-H, Ar-H), 5.99 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.38 (m, 1 H, H-4), 5.16 (m, 2 H, Hz, H-2, H-3), 4.95 (m, 1 H, CH-CH₂-Ar), 4.57 (bs, 1 H, NH-Fmoc), 4.41 (sd, 2 H, *J* = 5.3 Hz, O-CH₂-Fmoc), 4.25 (bs, 1 H, *J* = 9.9 Hz, H-1), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.13 (m, 2 H, H-6), 3.76 (m, 1 H, H-5), 3.18, 3.00 (m, 2 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.89, 2.66 (m, 2 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.35 (s, 2 H, S-CH₂), 2.12, 2.03, 2.00, 1.96 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.44 (s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.4 (Asp-CO-CH), 170.5, 170.3, 169.9, 169.8 (CH₃-CO), 156.2 (NH-COO), 143.9, 140.0, 128.0, 127.9, 127.3, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-C), 143.7, 141.4, 126.6, 125.1 (CH₂-Ar-C), 83.1 (C-1), 82.1 (C[CH₃]₃), 77.4 (C-3), 74.6 (C-5), 71.8 (C-2), 67.4 (C-4), 67.3 (O-CH₂-Fmoc), 61.6 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 51.3 (CH-Ar), 47.2 (CH-Fmoc), 37.5 (CH₂-Asp), 35.1 (CH-CH₂-COO^tBu), 28.2 (C[CH₃]₃), 21.6, 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 876.3)]: 899.3 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₅ H ₅₂ N ₂ O ₁₄ S (876.9): | Ber.: | C | 61.63 | H | 5.98 | N | 3.19 | S | 3.66 |
| | Gef.: | C | 61.41 | H | 5.99 | N | 2.94 | S | 3.35 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-α-[(D-α-phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-α-D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure-β-*tert*-butylester (60)**

Durchführung nach AAV 8 und AAV 9. Mit Boc-D-α-Phenylglycinol 55 (0.95 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio-α-D-mannopyranose 14 (1.45 g, 4 mmol) erhält man 60 als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.68 g (1.9 mmol; 48 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.64 (m, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.59, 7.55 (m, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.41, 7.39 (m, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.35, 7.33 (m, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.36, 7.34 (m, 2 H, CH₂-Ar-H), 7.32, 7.31, 7.29 (m, 3 H, CH₂-Ar-H), 5.97 (m, 1 H, NH-Asp), 5.84 (s, 1 H, NH-CH), 5.37 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 1 H, H-4), 5.16 (m, 1 H, *J* = 3.1 Hz H-2), 4.69 (m, 1 H, CH-CH₂-Ar), 4.59 (m, 1 H, H-1), 4.45 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.27 (m, 3 H, H-6a, O-CH₂-Fmoc), 4.08 (m, 1 H, H-6b), 3.99 (m, 1 H, CH-Asp), 3.81 (m, 1 H, H-5), 3.05 (dd, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.67 (dd, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.18 (m, 2 H, S-CH₂), 2.10, 2.08, 2.04, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.43 (s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 195.9 (NH-CO), 170.7 (Asp-CO-CH), 170.0, 160.9, 169.8, 169.7 (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.9, 141.4, 128.0, 127.5, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-C), 143.6, 141.4, 127.4, 125.2 (CH₂-Ar-C), 82.9 (C[CH₃]₃), 81.0 (C-1), 79.7 (C-5), 77.4 (C-3), 72.6 (C-2), 71.3 (C-4), 68.0 (O-CH₂-Fmoc), 62.5 (C-6), 57.8 (CH-Asp), 47.4 (CH-Fmoc), 47.3 (CH-Ar), 37.7 (CH₂-Asp), 37.6 (CH-CH₂-COO^tBu), 28.4 (C[CH₃]₃), 21.3, 21.1, 21.0, 20.9 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 876.3)]: 899.5 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₅ H ₅₂ N ₂ O ₁₄ S (876.9): | Ber.: | C | 61.63 | H | 5.98 | N | 3.19 | S | 3.66 |
| | Gef.: | C | 61.48 | H | 5.84 | N | 3.10 | S | 3.45 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylalaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (61)**

Durchführung nach **AAV 8** und **AAV 9**. Mit Boc-*L*- α -Phenylalaninol **56** (1.00 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranose **14** (1.45 g, 4 mmol) erhält man **61** als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.60 g (1.8 mmol; 45 % d. Th.)

$[\alpha]_D + 59.3^\circ$ (*c* 1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.77, 7.58 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.41, 7.32 (m, 4 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.21, 7.13 (m, 5 H, CH₂-Ar-*H*), 6.43 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.65 (s, 1 H, NH-CH), 5.33 (m, 1 H, H-3), 5.30 (m, 1 H, H-4), 5.26 (st, 1 H, H-2), 4.63 (m, 1 H, CH-CH₂-Ar), 4.49 (m, 1 H, H-1), 4.41, 4.39 (m, 2 H, CH-Fmoc, CH-CH₂-COO^tBu), 4.29, 4.26 (m, 3 H, H-6a, O-CH₂-Fmoc), 4.21 (m, 1 H, H-6b), 4.01 (t, 1 H, S-CH₂-CH-NH), 3.71 (m, 1 H, H-5), 3.26, 3.07 (m, 2 H, S-CH₂), 2.87, 2.64 (m, 2 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.15, 2.05, 2.03, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.47(s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 195.9 (NH-CO), 170.8 (Asp-CO-CH), 170.1, 170.0, 169.9, 169.7 (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 136.6, 129.2, 127.0, 126.9, 125.0 (CH₂-Ar-C), 82.7 (C-1), 82.0 (C[CH₃]₃), 71.0 (C-5), 69.5 (C-3), 69.4 (C-2), 67.5 (C-4), 66.3 (O-CH₂-Fmoc), 62.5 (C-6), 51.1 (CH-Asp), 49.7 (CH-CH₂-Ar), 47.2 (CH-Fmoc), 39.4 (CH-CH₂-Ar), 35.2 (CH₂-Asp), 34.5 (CH₂-COO^tBu), 24.9 (S-CH₂), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

[FAB (*m/z* = 890.3)]: 913.3 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₂ H ₅₄ N ₂ O ₁₄ S (842.9): | Ber.: | C | 62.01 | H | 6.11 | N | 3.14 | S | 3.60 |
| | Gef.: | C | 62.00 | H | 6.33 | N | 3.19 | S | 3.28 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (62)**

Durchführung nach **AAV 8** und **AAV 9**. Mit Boc-*L*- α -Valinol **45** (0.81 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranose **14** (1.45 g, 4 mmol) erhält man **62** als farbloses Öl.

Ausbeute: 2.46 g (2.9 mmol; 73 % d. Th.)

$[\alpha]_D + 54.4^\circ$ (*c* 1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.57 (d, 2 H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.30 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.42 (bd, 1 H, NH-Val), 5.90 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.31 (m, 1 H, H-3), 5.26 (m, 1 H, *J* = 9.6 Hz, H-4), 5.22 (m, 1 H, *J* = 3.1 Hz H-2), 4.70 (bd, 1 H, H-1), 4.47 (bt, 2 H, O-CH₂-Fmoc) 4.33 (m, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 4.29 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.22, 4.10 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.97 (t, 1 H, S-CH₂-CH-NH), 3.95 (m, 1 H, H-5), 2.84 (m, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 2.62 (m, 3 H, S-CH₂-Val, CH-CH₂-COO^tBu), 2.15, 2.08, 2.04, 1.98 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.47(s, 9 H, [CH₃]₃-C), 1.26 (t, 1 H, CH-(CH₃)₂), 0.89 (m, 6 H, CH-(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.0, 170.2, 170.1, 169.9 (CH₃-CO), 156.3 (NH-COO), 143.6, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 82.1 (C[CH₃]₃), 81.9 (C-1), 70.8 (C-5), 69.5

(C-3), 69.2 (C-2), 67.6 (C-4), 66.4 (O-CH₂-Fmoc), 62.7 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc), 37.6 (CH₂-COO^tBu), 31.1 (S-CH₂), 28.1 (C[CH₃]₃), 24.9 (CH-(CH₃)₂), 21.1, 20.9, 20.8, 20.6 (CH₃OO), 19.9, 18.8 (CH-(CH₃)₂).

[(MALDI-TOF) (m/z = 842.3)]: 865.8 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₂ H ₅₄ N ₂ O ₁₄ S (842.9): | Ber.: | C | 59.84 | H | 6.46 | N | 3.32 | S | 3.80 |
| | Gef.: | C | 59.48 | H | 6.54 | N | 3.37 | S | 3.57 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (63)**

Durchführung nach AAV 8 und AAV 9. Mit Boc-*L*- α -Valinol 45 (0.81 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-glucopyranose 17 (1.45 g, 4 mmol) erhält man 63 als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 2.53 g (3 mmol; 75 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.57 (d, 2 H, J = 7.3 Hz, J = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.30 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.70 (bd, 1 H, NH-Val), 5.87 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.20 (t, 1 H, J = 9.4 Hz, H-3), 5.09 (t, 1 H, J = 9.6 Hz, H-4), 5.00 (t, 1 H, J = 9.6 Hz, H-2), 4.61 (m, 1 H, H-1), 4.54 (bt, 2 H, O-CH₂-Fmoc) 4.33 (m, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 4.29 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.22, 4.10 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.97 (t, 1 H, S-CH₂-CH-NH), 3.87 (m, 1 H, H-5), 2.99, 2.87, 2.64 (m, 4 H, m, 2 H, S-CH₂, CH-CH₂-COO^tBu), 2.15, 2.08, 2.04, 1.98 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.45 (s, 9 H, [CH₃]₃-C), 1.26 (t, 1 H, CH-(CH₃)₂), 0.89 (m, 6 H, CH-(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.0, 170.2, 170.1, 169.9 (CH₃-CO), 156.3 (NH-COO), 143.6, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 82.5 (C[CH₃]₃), 82.1 (C-1), 76.2 (C-5), 73.7 (C-3), 70.0 (C-4), 67.9 (C-2), 67.4 (O-CH₂-Fmoc), 61.7 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc), 33.4 (CH₂-COO^tBu), 31.1 (S-CH₂), 28.1 (C[CH₃]₃), 24.9 (CH-(CH₃)₂), 21.1, 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃OO), 19.9, 18.8 (CH-(CH₃)₂).

[(MALDI-TOF) (m/z = 842.3)]: 865.4 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₂ H ₅₄ N ₂ O ₁₄ S (842.9): | Ber.: | C | 59.84 | H | 6.46 | N | 3.32 | S | 3.80 |
| | Gef.: | C | 59.58 | H | 6.52 | N | 3.31 | S | 3.67 |

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -*tert*-butylester (64)**

Durchführung nach AAV 8 und AAV 9. Mit Boc-*L*- α -Valinol 45 (0.81 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-galactopyranose 15 (1.45 g, 4 mmol) erhält man 64 als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 2.43 g (2.9 mmol; 72 % d. Th.)

$[\alpha]_D - 3.7^\circ$ (c 1, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.57 (d, 2 H, J = 7.3 Hz, J = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.31 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.61 (bd, 1 H, NH-Val), 6.03 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.42 (sd, 1 H, J = 3.3 Hz, H-4), 5.19 (t, 1 H, J = 9.9 Hz, H-2), 5.07 (m, 1 H, H-3), 4.55 (d, 1 H, J = 10.1 Hz, H-1), 4.51 (bm, 1 H, CH-CH₂-COO^tBu), 4.41 (m, 2 H, O-CH₂-Fmoc), 4.22 (t, 1 H, CH-

Fmoc), 4.10 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.97 (t, 1 H, S-CH₂-CH-NH), 3.88 (m, 1 H, H-5), 2.90, 2.85, 2.79, 2.64 (m, 4 H, m, 2 H, S-CH₂, CH-CH₂-COO^tBu), 2.14, 2.05, 1.99, 1.97 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.45 (s, 9 H, [CH₃]₃-C), 1.25 (t, 1 H, CH-(CH₃)₂), 0.89 (m, 6 H, CH-(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.0, 170.5, 170.1, 169.7 (CH₃-CO), 156.3 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 83.7 (C-1), 82.0 (C[CH₃]₃), 77.4 (CH₂-C), 74.4 (C-3), 71.9 (C-5), 67.5 (C-2), 67.4 (C-4), 67.3 (CH₂-Fmoc), 61.7 (C-6), 54.7 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc), 33.8 (CH₂-COO^tBu), 32.4 (S-CH₂), 28.2 (C[CH₃]₃), 25.0 (CH-(CH₃)₂), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (CH₃OO), 19.6, 17.6 (CH-(CH₃)₂).

[(MALDI-TOF) (m/z = 842.3)]: 865.3 [M+Na]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₂ H ₅₄ N ₂ O ₁₄ S (842.9): | Ber.: | C | 59.84 | H | 6.46 | N | 3.32 | S | 3.80 |
| | Gef.: | C | 59.65 | H | 6.65 | N | 3.30 | S | 3.32 |

8.3.3 Zu Kapitel 6.1.3

2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (65)

Durchführung nach **AAV 1**. Mit Mannose (20.5 g, 114 mmol) erhält man **65** als farbloses Öl.

Ausbeute: 39.6 g (101 mmol; 89 % d. Th.)

[FAB (m/z = 390.1)]: 413.1 [M+Na]⁺.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosylbromid (66)

Durchführung nach **AAV 3**. Mit Pentaacetylmannose **65** (31.2 g, 80 mmol) erhält man **66** als farbloses Öl.

Ausbeute: 27.6 g (67.2 mmol; 84 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.29 (s, 1 H, H-1), 5.72 (dd, 1 H, H-3), 5.40 (s, 1 H, H-2), 5.36 (t, 1 H, H-4), 4.33 (m, 2 H, H-6a), 4.23 (m, 1 H, H-5), 4.13 (m, 1 H, H-6b), 2.17, 2.10, 2.07, 2.00 (4 s, 12 H, CH₃-Acetyl).

[FAB (m/z = 410.02)]: 433.02 [M+Na]⁺.

(4-Nitrophenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid (67)

A. Über PTC

Acetobrommanose **66** (0.2 g, 0.50 mmol) und TBAHS (0.17 g, 0.50 mmol) wurden in EtOAc (2 mL) gelöst. Dazu wurde eine wässrige Lösung aus p-Nitrothiophenol (0.12 g, 0.74 mmol) in Na₂CO₃ (1 M, 2 mL) gegeben und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Produkt **67** wurde nach Säulenchromatographie (P:E-3:4) als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 97 mg (0.21 mmol; 41 % d. Th.)

B. Über BF₃-Etherat

Pentaacetylmannose **65** (0.16 g, 0.40 mmol) und p-Nitrothiophenol (78 mg, 0.50 mmol) wurden in abs. CH₂Cl₂ (3 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und BF₃-Etherat (200 μ L, 1.6 mmol, δ = 1,12 g/mL) dazu injiziert. Nach 6 h wird wie unter C. beschrieben aufgearbeitet, wobei das Produkt **67** als leicht gelblicher Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 109 mg (0.22 mmol; 55 % d. Th.)

C. Über SnCl₄

Pentaacetylmannose **65** (0.16 g, 0.40 mmol) und p-Nitrothiophenol (78 mg, 0.50 mmol) wurden in abs. CH₂Cl₂ (3 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und SnCl₄ (190 μ L, 1.6 mmol, d = 2,22 g/mL) dazu injiziert. Nach 6 h wird mit CH₂Cl₂ (10 mL) verdünnt, über Celite flitriert und mit kalter HCl (1 M, 2 mL) gewaschen. Anschließend wird nochmals mit ges. NaHCO₃-Lsg. (2 x 2 mL) und H₂O (2 x 2 mL) ausgeschüttelt, bis die org. Phase farblos war. Die org. Phase

wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel evaporiert. Nach Säulenchromatographie (P:E-3:4) wurde das Produkt **67** als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 138 mg (0.28 mmol; 71 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8.15, 8.13, 7.59, 7.57 (m, 4 H, Ar-*H*), 5.97 (s, 1 H, H-1), 5.57 (m, 1 H, H-3), 5.37 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 1 H, H-4), 4.30 (m, 2 H, H-6), 4.12 (m, 1 H, H-5), 2.16, 2.09, 2.05, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 170.6, 169.8, 169.7, 169.6 (CH₃-CO), 146.7, 142.7 (Ar-C), 129.6, 124.2 (Ar-CH), 90.1 (C-1), 77.6 (C-5), 71.4 (C-3), 67.8 (C-4), 65.4 (C-2), 61.7 (C-6), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 485.1)]: 508.1 [M+Na]⁺.

(4-Aminophenyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-α-D-mannopyranosid (68)

Verbindung **67** (49 mg, 0.1 mmol) und SnCl₂ Dihydrat (110 mg, 0.5 mmol) wurden in EtOH (3 mL) gelöst und auf 70 °C für 4 h erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf Eiswasser (10 mL) gegossen und der pH-Wert mit ges. NaHCO₃ auf 7 eingestellt. Danach wurde mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert, die org. Phase mit H₂O (2 x 10 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne eingengt. Das Produkt **68** wurde dabei als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 48.2 mg (0.11 mmol; 106 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.54, 7.25 (m, 4 H, Ar-*H*), 5.62 (s, 1 H, H-1), 5.47 (m, 1 H, H-3), 5.29 (m, 1 H, H-2), 5.22 (m, 1 H, H-4), 4.86 (s, 2 H, NH₂), 4.28 (m, 2 H, H-6), 4.12 (m, 1 H, H-5), 2.16, 2.09, 2.05, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 170.2, 169.9, 169.7, 169.6 (CH₃-CO), 136.7, 132.7 (Ar-C), 124.6, 119.2 (Ar-CH), 88.1 (C-1), 77.6 (C-5), 71.4 (C-3), 67.8 (C-4), 65.4 (C-2), 61.7 (C-6), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 455.1)]: 478.2 [M+Na]⁺.

4-(*N*-tert-Butyloxycarbonylaminoethyl)-benzylalkohol (69)

Durchführung nach **AAV 7**. Mit Aminoethylbenzylalkohol (2.37 g, 10 mmol) erhält man **69** als weißen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 1.80 g (7.6 mmol; 76 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.43, 7.26 (m, 4 H, Ar-*H*), 4.97 (bs, 1 H, NH), 4.63 (s, 2 H, CH₂-OH), 4.25 (sd, 2 H, CH₂-NH), 2.46 (bs, 1 H, OH), 1.44 (s, 9 H, CH₃-^tBu).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 156.1 (CH₃-CO), 140.2, 138.3 (Ar-C), 127.6, 127.0 (Ar-CH), 79.7 (C-^tBu), 64.9 (CH₂-OH), 44.5 (CH₂-NH), 28.4 (CH₃-^tBu).

[FAB (m/z = 237.2)]: 238.2 [M+H]⁺, 260.1 [M+Na]⁺.

[4-(*N*-*tert*-Butyloxycarbonylaminoethyl)-benzyl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosid (70)

Durchführung nach **AAV 8**. Mit Boc-Aminoethylbenzylalkohol **69** (0.95 g, 4 mmol) und Tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranose **14** (1.45 g, 4 mmol) nach Säulenchromatographie (P:E-1:1) erhält man Produkt **70** als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.68 g (2.88 mmol; 72 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.24$ (m, 4 H, Ar-*H*), 5.29 (m, 2 H, H-3, H-4), 5.07 (s, 1 H, H-2), 4.92 (bs, 1 H, *NH*), 4.35, 4.29, 4.24 (bm, 4 H, $\text{CH}_2\text{-NH}$, H-1, H-6_a), 4.12 (m, 2 H, H-5, H-6_b), 3.75 (q, 2 H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.18, 2.15, 2.05, 2.00 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.46 (s, 9 H, $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 169.0$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 138.4, 136.1 (Ar-*C*), 129.3, 127.9 (Ar-*CH*), 81.4 (*C*- ^tBu), 70.7 (*C*-4), 69.8 (*C*-3), 69.0 (*C*-2), 66.4 (*C*-5), 62.5 (*C*-6), 44.2 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 34.4 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 28.5 ($\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$).

[FAB ($m/z = 583.2$)]: 584.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 606.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(4-aminobenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -*tert*-butyl ester (72)**

Durchführung nach **AAV 9**. Mit Verbindung **70** (1.17 g, 2 mmol) erhält man Produkt **72** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 1.39 g (1.58 mmol; 79 % d. Th.)

$[\alpha]_{\text{D}} + 205.9^\circ$ (*c* 1, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.78, 7.58$ (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.43 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.31, 7.29 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.26, 7.24 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 6.83 (m, 1 H, *NH*-Asp), 6.01, 5.99 (bd, 1 H, *NH*-CH), 5.49 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 1 H, H-4), 5.25 (m, 1 H, H-2), 4.67 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$), 4.56 (bs, 1 H, *NH*), 4.47, 4.35, 4.32 (bm, 5 H, $\text{CH}_2\text{-NH}$, H-1, *CH*-Fmoc, H-6_a), 4.21, 4.12, 4.10 (bm, 4 H, O- $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, H-6_b, H-5), 3.00 (m, 1 H, $\text{CH-CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 2.18, 2.12, 2.08, 2.06 (4 s, 12 H, $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$), 2.02 (m, 2 H, S- CH_2), 1.46 (s, 9 H, $\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 169.9, 169.7$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.1 (*NH*-COO), 143.6, 141.3, 128.1, 127.5, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-*C*), 138.4, 136.1 (Ar-*C*), 129.3, 127.9 (Ar-*CH*), 81.8 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 81.5 (*C*-1), 76.4 (*C*-5), 71.8 (*C*-4), 69.7 (*C*-3), 68.1 (O- $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 67.1 (*C*-2), 62.7 (*C*-6), 62.1 (*CH*-Asp), 51.2 (*CH*-Fmoc), 43.1 (Ar- $\text{CH}_2\text{-NH}$), 37.5 ($\text{CH}_2\text{-Asp}$), 37.6 ($\text{CH-CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 34.4 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 28.5 ($\text{CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$) 21.3, 21.1, 21.0, 20.9 ($\text{CH}_3\text{-Acetyl}$).

$\text{C}_{45}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{S}$ (876.31): Ber.: C 61.63 H 5.98 N 3.19 S 3.66
Gef.: C 61.64 H 6.04 N 3.02 S 3.41

[FAB ($m/z = 876.3$)]: 877.2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 899.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

8.3.4 Zu Kapitel 6.1.4

1-Methylsulfonyl-3-(*N*-fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-butansäure-*tert*-butylester (73)

Zu Verbindung **43** (0.40 g, 1 mmol) in abs. CH₂Cl₂ (2 mL) wurden DIPEA (257 μL, 1.5 mmol) und bei 0 °C Methansulfochlorid (116 μL, 1.5 mmol) injiziert. Nach 3 h wurde mit CH₂Cl₂ (30 mL) verdünnt und mit ges. NaCl-Lsg (4 x 5 mL), KHSO₄-Lsg (1 M, 5 mL), ges. NaCl-Lsg (5 mL), ges. NaHCO₃-Lsg (5 mL), ges. NaCl-Lsg (5 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt wird nach Säulenchromatographie (P:E-2:1) als weißer Feststoff erhalten

Ausbeute: 95 mg (0.2 mmol; 20 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.76, 7.59 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.39, 7.30 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.53 (bd, 1 H, *J* = 6.6 Hz, NH), 4.41 (bd, 2 H, *J* = 5.8 Hz, CH₂-Fmoc), 4.38 (m, 2 H, CH₂-SO₂Me), 4.21 (t, 1 H, CH-Fmoc), 4.14 (m, 1 H, CH-Asp), 2.99 (s, 3 H, SO₂CH₃), 2.57 (bd, 2 H, CH₂-COO^tBu), 1.44 (s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 171.2 (COO^tBu), 155.7 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 81.9 (C[CH₃]₃), 69.9 (CH₂-SO₂Me), 67.0 (CH₂-Fmoc), 60.4 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc), 37.4 (CH₂-COO^tBu), 36.4 (CH₃-SO₂), 28.1 (C[CH₃]₃).

[FAB (m/z = 475.2)]: 476.1 [M+H]⁺, 498.1 [M+Na]⁺.

1-Azido-3-(*N*-fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-butansäure-*tert*-butylester (74)

A. Generieren einer HN₃ in Toluol (4%-10%)

Da Stickstoffwasserstoffsäure sehr giftig und in reiner Form hoch explosiv ist, wurde die Reaktion in einem gut ziehenden, separaten Abzug durchgeführt. Über die Gefahren und Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit HN₃ siehe Allgemeiner Teil.

In einem Dreihalskolben (100 mL) mit Tropftrichter, Innenthermometer, Magnetührstäbchen (für Suspensionen) und Gasableitungsrohr wurden NaN₃ (3.25 g, 50 mmol) mit lauwarmen H₂O (3.25 mL) übergossen. Die Suspension wurde mit Toluol (20 mL) überschichtet und auf 0 °C abgekühlt. Danach wurde unter Rühren die H₂SO₄ (2.53 g, 97%ig) tropfenweise zugegeben, so dass die Innentemperatur nicht über 10 °C anstieg. Nach dem Zutropfen wurde die Toluol-Lösung vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und auf einen Filter mit MgSO₄ getropft. Die durchgesickerte Lösung wurde direkt weiter umgesetzt. Zum bestimmen der Konzentration an HN₃, wurden 3 mL der Lösung mit 30 mL H₂O verdünnt und über Phenolphthalein mit NaOH (1 M) titriert. Dabei wurde eine 3.5%ige HN₃-Lsg. in Toluol erhalten.

B. Einführen der Azidfunktion in Aspartol **46** über Mitsunobu-Reaktion

Aspartol **46** (0.80 g, 2 mmol) und Ph₃P (0.79 g, 3 mmol) wurden in 20 mL abs. Toluol gelöst und bei 0 °C die frisch hergestellte HN₃-Lösung (14 mL, 3.5% aus A.) zugegeben. Zu der Lösung wurde DIAD (630 mL, 3.2 mmol) zugepöft und anschließend noch 30 min bei RT

gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit ges. NaHCO₃-Lösung (25 mL) neutralisiert und Ether (50 mL) zugegeben. Die org. Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 10 mL), H₂O (4 x 10 mL), über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde über Säulenchromatographie (P:E-3:1) gereinigt, wobei das Produkt **46** als weißer Feststoff erhalten wurde.

Ausbeute: 0.79 g (1.88 mmol; 94 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.76, 7.59 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.39, 7.30 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.43 (bd, 1 H, *J* = 6.6 Hz, NH), 4.39 (bd, 2 H, *J* = 5.8 Hz, CH₂-Fmoc), 4.20 (t, 1 H, CH-Fmoc), 4.12 (m, 1 H, CH-Asp), 3.51 (m, 2 H, CH₂N₃), 2.54 (sd, 2 H, CH₂-COO^tBu), 1.44 (s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7 (COO^tBu), 156.4 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 81.6 (C[CH₃]₃), 67.0 (CH₂-Fmoc), 53.8 (CH₂N₃), 48.0 (CH-NH) 47.3 (CH-Fmoc), 37.4 (CH₂-COO^tBu), 28.1 (C[CH₃]₃).

[FAB (m/z = 422.2)]: 423.2 [M+H]⁺.

Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-α-D-mannopyranosid (76)

Durchführung nach AAV 11. Mit 1-Thiomannopyranose **14** (1.46 g, 4 mmol) erhält man **76** als farbloses Öl.

Ausbeute: 1.27 g (3.2 mmol; 79 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.45, 5.38, 5.24 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4), 5.20 (d, 1 H, *J* = 6.1 Hz, H-1), 4.34 (m, 2 H, H-6), 4.10 (m, 1 H, H-5), 3.43, 3.25 (d, 2 H, *J* = 16.7 Hz, -CH₂-C), 2.26 (t, 1 H, C-CH), 2.04, 2.02, 1.98, 1.97 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7, 170.2, 169.5, 169.4 (CH₃-CO), 81.5 (C-1), 78.6 (CH₂-C), 72.0 (C-CH), 70.5 (C-5), 69.7 (C-4), 69.4 (C-2), 66.3 (C-3), 62.4 (C-6), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 (CH₃OO), 17.6 (S-CH₂).

[FAB (m/z = 402.1)]: 403.3 [M+H]⁺.

Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (77)

Durchführung nach AAV 11. Mit 1-Thiogalactopyranose **15** (1.46 g, 4 mmol) erhält man **77** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 1.22 g (3.1 mmol; 76 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 5.43 (sd, 1 H, *J* = 3.3 Hz, H-4), 5.06 (t, 1 H, *J* = 9.9 Hz, H-2), 5.06 (m, 1 H, H-3), 4.74 (d, 1 H, *J* = 10.1 Hz, H-1), 4.13 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.95 (t, 1 H, *J* = 6.6 Hz, H-5), 3.56, 3.29 (d, 2 H, *J* = 16.7 Hz, -CH₂-C), 2.29 (t, 1 H, C-CH), 2.15, 2.06, 2.02, 1.98 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.5, 170.3, 170.2, 169.8 (CH₃-CO), 82.6 (C-1), 78.8 (CH₂-C), 74.7 (C-3), 72.0 (C-CH), 71.9 (C-5), 67.3 (C-2), 67.2 (C-4), 61.4 (C-6), 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃OO), 17.7 (S-CH₂).

[FAB (m/z = 402.1)]: 403.0 [M+H]⁺.

Propargyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosid (78)

Durchführung nach AAV 11. Mit 1-Thioglucofuranose **17** (1.46 g, 4 mmol) erhält man **78** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 1.33 g (3.3 mmol; 83 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 5.22 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.06, 5.02 (m, 2 H, H-4, H-2), 4.73 (d, 1 H, $J = 10.1$ Hz, H-1), 4.22 (m, 1 H, H-6a), 4.10 (m, 1 H, H-6b), 3.71 (bm, 1 H, H-5), 3.52, 3.26 (d, 2 H, $J = 16.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-C}$), 2.25 (t, 1 H, C-CH), 2.04, 2.02, 1.98, 1.97 (4 s, 12 H, $\text{CH}_3\text{-Acetyl}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7, 170.2, 169.5, 169.4 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 82.1 (C-1), 78.7 ($\text{CH}_2\text{-C}$), 76.0 (C-5), 73.8 (C-3), 72.0 (C-CH), 69.8 (C-4), 68.3 (C-2), 62.0 (C-6), 20.8, 20.7, 20.7, 20.6 ($\text{CH}_3\text{-Acetyl}$), 17.6 (S- CH_2).

[FAB ($m/z = 402.1$): 403.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Propargyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-methyl-1-thio- β -D-fucopyranosid (79)

Durchführung nach AAV 11. Mit 1-Thiofucopyranose **32** (1.28 g, 4 mmol) erhält man **79** als farbloses Öl.

Ausbeute: 1.25 g (3.5 mmol; 87 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 5.25 (m, 1 H, H-4), 5.18 (d, 1 H, $J = 10.1$ Hz, H-2), 5.06 (dd, $J = 9.9$, $J = 3.3$ 1 H, H-3), 4.68 (d, 1 H, $J = 9.8$ Hz, H-1), 3.83 (q, 1 H, $J = 6.5$ Hz, H-5), 3.54, 3.27 (d, 2 H, $J = 16.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-C}$), 2.23 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, C-CH), 2.14, 2.03, 1.95 (4 s, 12 H, CH_3OO) 1.20 (m, 3 H, CH_3 , H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.7, 170.1, 169.8 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 82.3 (C-1), 79.1 ($\text{CH}_2\text{-C}$), 73.8 (C-3), 72.4 (C-CH), 71.7 (C-4), 70.5 (C-2), 67.3 (C-5), 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3OO), 17.5 (S- CH_2), 16.4 (C-6).

[FAB ($m/z = 358.1$): 359.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Propargyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl) (80)

Durchführung nach AAV 11. Mit 1-Thiolactopyranose **34** (2.61 g, 4 mmol) erhält man **80** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 2.24 g (3.3 mmol; 81 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 5.32 (s, 1 H, H-4'), 5.23 (t, 1 H, $J = 9.1$ Hz, H-2'), 5.08 (bt, 1 H, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 4.94 (m, 2 H, H-3, H-2), 4.74 (d, 1 H, $J = 10.1$ Hz, H-1'), 4.47 (m, 2 H, H-1, H-6a), 4.10 (m, 3 H, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.86 (bt, 1 H, $J = 6.6$, H-5'), 3.79 (bt, 1 H, $J_{3,4} = 9.6$, $J_{4,5} = 9.3$ H-4), 3.62 (bm, 1 H, H-5), 3.51, 3.24 (d, 2 H, $J = 16.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-C}$), 2.25 (t, 1 H, C-CH), 2.13, 2.10, 2.04, 2.03, 2.02, 1.94 (7 s, 21 H, CH_3OO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.4, 170.2, 170.1, 169.8, 169.2, 169.1 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 101.1 (C-1'), 81.8 (C-1), 78.8 ($\text{CH}_2\text{-C}$), 76.4 (C-4), 76.2 (C-5), 73.7 (C-3), 72.0 (C-CH), 71.0 (C-3'),

70.8 (C-2), 70.2 (C-5'), 69.0 (C-2'), 66.7 (C-4'), 62.1 (C-6'), 61.0 (C-6), 21.2, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO), 17.6 (S-CH₂).

[FAB (m/z = 690.2)]: 691.3 [M+H]⁺.

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester (81)

Durchführung nach AAV 11. Mit Propargyl-1-thiomannopyranosid **76** (242 mg, 0.6 mmol) erhält man **81** als farbloses Öl.

Ausbeute: 0.42 g (0.51 mmol; 85 % d. Th.)

$[\alpha]_D + 70.9^\circ$ (*c* 7.2, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.73, 7.55 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.41 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.37, 7.28 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.67 (bd, 1 H, *J* = 6.6 Hz, NH) 5.32 (t, 1 H, *J* = 9.4 Hz, H-2), 5.24, 5.22 (m, 2 H, Hz, H-3, H-4), 4.57 (m, 2 H, (CH₂)₂-CH-NH), 4.38, 4.36, 4.25 (m, 1 H, CH₂-Fmoc, H-1, H-6a), 4.18 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.10 (m, 1 H, H-6b), 4.09 (m, 2 H, CH₂-Triazol), 4.04, 3.84 (m, 3 H, S-CH₂), 3.69 (bm, 1 H, H-5), 2.45 (bd, 2 H, CH₂-COO^tBu), 2.06, 2.03, 1.98, 1.98 (4 s, 12 H, CH₃OO) 1.45 (s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.8, 170.2, 169.6, 169.5 (CH₃-CO), 155.7 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 144.9 (Triazol-Ar-C), 123.4 (Triazol-Ar-CH), 81.9 (C[CH₃]₃), 81.5 (C-1), 71.4 (C-5), 69.6 (C-3), 69.5 (CH₂-Fmoc), 66.3 (C-2), 62.4 (C-6), 52.3 (CH-CH₂-Triazol), 48.5 (CH-NH) 47.4 (CH-Fmoc), 36.8 (CH₂-COO^tBu), 28.2 (C[CH₃]₃), 25.0 (CH₂-S), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 824.3)]: 825.4 [M+H]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₀ H ₄₈ N ₄ O ₁₃ S (824.3): | Ber.: | C | 58.24 | H | 5.87 | N | 6.79 | S | 3.89 |
| | Gef.: | C | 57.81 | H | 5.89 | N | 6.40 | S | 3.78 |

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- β -*D*-galactopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester (82)

Durchführung nach AAV 11. Mit Propargyl-1-thiogalactopyranosid **77** (242 mg, 0.6 mmol) erhält man **82** als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 0.35 g (0.41 mmol; 69 % d. Th.)

$[\alpha]_D - 19.2^\circ$ (*c* 1.0, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.76, 7.56 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.37, 7.32 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 5.62 (bd, 1 H, *J* = 6.6 Hz, NH), 5.42 (ds, 1 H, *J* = 3.3 Hz, H-4), 5.24 (t, 1 H, *J* = 9.9 Hz, H-2), 5.04 (m, 1 H, H-3), 4.58 (m, 2 H, H-1, (CH₂)₂-CH-NH), 4.41 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.35 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.21 (m, 1 H, H-6a), 4.11 (m, 1 H, H-6b), 4.09 (m, 2 H, CH₂-Triazol), 4.04, 3.92 (m, 3 H, S-CH₂), 3.88 (m, 1 H, H-5), 2.46 (bd, 2 H, CH₂-COO^tBu), 2.15, 2.06, 2.02, 1.98 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.45 (s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.8, 170.2, 169.6 (CH₃-CO), 155.7 (NH-COO), 145.1, 143.8, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 141.4 (Triazol-Ar-C), 123.3 (Triazol-Ar-CH), 82.5 (C[CH₃]₃), 82.0 (C-1), 77.3 (CH₂-C), 73.3 (C-3), 72.3 (C-5), 70.5 (C-2), 67.6 (C-

4), 66.9 (CH₂-Fmoc), 61.4 (C-6), 52.3 (CH-CH₂-Triazol), 48.6 (CH-NH) 47.3 (CH-Fmoc), 37.0 (CH₂-COO^tBu), 28.2 (C[CH₃]₃), 24.0 (CH₂-S), 21.2, 20.8, 20.7 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 824.3)]: 825.2 [M+H]⁺

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₀ H ₄₈ N ₄ O ₁₃ S (824.3): | Ber.: | C | 58.24 | H | 5.87 | N | 6.79 | S | 3.89 |
| | Gef.: | C | 58.13 | H | 5.99 | N | 6.43 | S | 3.64 |

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio-β-*D*-glucopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester (**83**)

Durchführung nach AAV 11. Mit Propargyl-1-thioglucofuranosid **78** (242 mg, 0.6 mmol) erhält man **83** als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 0.36 g (0.43 mmol; 72 % d. Th.)

[α]_D – 19.6° (*c* 3.5, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.73, 7.55 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.41 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.37, 7.28 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.67 (bd, 1 H, *J* = 6.6 Hz, NH) 5.20 (t, 1 H, *J* = 9.4 Hz, H-3), 5.09 (t, 1 H, *J* = 9.6 Hz, H-4), 5.00 (t, 1 H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.60 (d, 1 H, *J* = 10.1 Hz, H-1), 4.57 (m, 2 H, (CH₂)₂-CH-NH), 4.38 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.20 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.22 (m, 1 H, H-6a), 4.10 (m, 1 H, H-6b), 4.09 (m, 2 H, CH₂-Triazol), 4.04, 3.84 (m, 3 H, S-CH₂), 3.69 (bm, 1 H, H-5), 2.45 (bd, 2 H, CH₂-COO^tBu), 2.06, 2.03, 1.98, 1.98 (4 s, 12 H, CH₃OO) 1.45 (s, 9 H, [CH₃]₃-C).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.8, 170.2, 169.6, 169.5 (CH₃-CO), 155.7 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 144.9 (Triazol-Ar-C), 123.4 (Triazol-Ar-CH), 82.7 (C[CH₃]₃), 82.1 (C-1), 76.0 (C-5), 73.9 (C-3), 70.2 (C-4), 68.3 (C-2), 66.9 (CH₂-Fmoc), 61.9 (C-6), 52.2 (CH-CH₂-Triazol), 48.6 (CH-NH) 47.3 (CH-Fmoc), 37.0 (CH₂-COO^tBu), 28.2 (C[CH₃]₃), 24.3 (CH₂-S), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 824.3)]: 825.2 [M+H]⁺.

| | | | | | | | | | |
|---|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| C ₄₀ H ₄₈ N ₄ O ₁₃ S (824.3): | Ber.: | C | 58.24 | H | 5.87 | N | 6.79 | S | 3.89 |
| | Gef.: | C | 58.21 | H | 5.90 | N | 6.68 | S | 3.58 |

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-methyl-1-thio-β-*D*-fucopyranosyl)]-butansäure-*tert*-butylester (**84**)

Durchführung nach AAV 11. Mit Propargyl-1-thiofucopyranosid **79** (215 mg, 0.6 mmol) erhält man **84** als farbloses Öl.

Ausbeute: 0.36 g (0.46 mmol; 76 % d. Th.)

[α]_D + 18.3° (*c* 3.2, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.76, 7.57 (d, 2 H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.38, 7.31 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.63 (bd, 1 H, *J* = 6.6 Hz, NH), 5.26 (m, 1 H, H-4), 5.18 (d, 1 H, *J* = 10.1 Hz, H-2), 5.03 (dd, *J* = 9.9, *J* = 3.3 1 H, H-3), 4.54 (d, 1 H, *J* = 9.8 Hz, H-1), 4.54 (m, 2 H, (CH₂)₂-CH-NH), 4.40 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.94 (d, 2 H, *J* = 16.6 Hz, -CH₂-S), 3.83 (q, 1 H, *J* = 6.5 Hz, H-5), 2.43 (bd, 2 H,

$\text{CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 2.17, 2.03, 1.95 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.45 (s, 9 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$), 1.20 (m, 3 H, CH_3 , H-6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.8, 170.2, 169.9 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 155.7 (NH-COO), 145.1, 143.8, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 141.4 (Triazol-Ar-C), 123.3 (Triazol-Ar-CH), 82.5 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 82.1 (C-1), 73.8 (C-3), 72.4 (C-4), 70.6 (C-2), 67.6 (C-5), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 52.3 ($\text{CH-CH}_2\text{-Triazol}$), 48.4 (CH-NH) 47.3 (CH-Fmoc), 37.0 ($\text{CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 28.2 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 24.0 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 21.2, 20.9, 20.7 (CH_3OO), 16.5 (C-6).

[FAB ($m/z = 766.3$): 767.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

| | | | | | | | | | |
|--|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S}$ (766.9): | Ber.: | C | 59.52 | H | 6.05 | N | 7.31 | S | 4.18 |
| | Gef.: | C | 59.25 | H | 6.07 | N | 7.12 | S | 3.98 |

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-{(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-[2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosyl]}-butansäure-*tert*-butylester (**85**)

Durchführung nach **AAV 11**. Mit Propargyl-1-thioglucoopyranosid **80** (415 mg, 0.6 mmol) erhält man **85** als weißen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 0.44 g (0.40 mmol; 66 % d. Th.)

$[\alpha]_{\text{D}} + 55.3^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 7.76, 7.57 (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-H), 7.40 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.38, 7.31 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-H), 5.70 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, NH), 5.33 (s, 1 H, H-4'), 5.20 (t, 1 H, $J = 9.1$ Hz, H-2'), 5.09 (bt, 1 H, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 4.92 (m, 2 H, H-3, H-2), 4.57 (m, 3 H, H-1', $(\text{CH}_2)_2\text{-CH-NH}$), 4.47 (m, 2 H, H-1, H-6a,) 4.40 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.10 (m, 3 H, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.85 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-S}$), 3.82 (m, 1 H, H-5'), 3.79 (m, 1 H, H-4), 3.62 (bm, 1 H, H-5), 2.47 (bd, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 2.15, 2.13, 2.11, 2.04, 2.02, 1.98, 1.96 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.44 (s, 9 H, $[\text{CH}_3]_3\text{-C}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.6, 170.4, 170.3, 170.2, 169.9, 169.8, 169.1 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 155.7 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 141.4 (Triazol-Ar-C), 123.3 (Triazol-Ar-CH), 101.2 (C-1'), 82.5 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 82.0 (C-1), 77.3 ($\text{CH}_2\text{-C}$), 76.6 (C-4), 76.1 (C-5), 73.8 (C-3), 72.0 (C-CH), 71.0 (C-3'), 70.8 (C-2), 70.2 (C-5'), 69.1 (C-2'), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 66.7 (C-4'), 62.0 (C-6'), 60.9 (C-6), 52.2 ($\text{CH-CH}_2\text{-Triazol}$), 48.4 (CH-NH), 47.3 (CH-Fmoc), 37.0 ($\text{CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$), 28.2 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 24.0 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 21.2, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH_3OO), 17.6 (S-CH_2).

[FAB ($m/z = 1112.4$): 1113.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

| | | | | | | | | | |
|--|-------|---|-------|---|------|---|------|---|------|
| $\text{C}_{52}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_{21}\text{S}$ (1113.14): | Ber.: | C | 56.11 | H | 5.80 | N | 5.03 | S | 2.88 |
| | Gef.: | C | 56.11 | H | 5.83 | N | 5.08 | S | 2.89 |

8.3.5 Zu Kapitel 6.1.5

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (86)**

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 29 (447 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man 86 als weißen Feststoff.

Ausbeute: 386 mg (0.41 mmol; 81 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.76, 7.58$ (d, 4 H, $J = 7.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.31 (t, 4 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.58 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 6.02 (d, 1 H, NHAc), 5.95 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.17, 5.07 (m, 2 H, H-3, H-4), 4.47, 4.43 (m, 4 H, H-2, O- CH_2 -Fmoc, CH-Asp), 4.21 (m, 2 H, H-1, CH-Fmoc), 4.12, 4.08 (m, 2 H, H-6), 3.64 (bm, 1 H, H-5), 3.22 (m, 2 H, NH- CH_2 -Alkyl), 2.87 (m, 1 H, CH- CH_2 -COOPfp), 2.65 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl, CH- CH_2 -COOPfp), 2.06, 2.02, 2.01, 1.94 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.58 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.37 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.2, 170.9, 170.6, 169.5$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.1 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 83.7 (C-1), 75.9 (C-3), 73.9 (C-5), 68.4 (C-2), 68.2 (C-4), 67.3 (O- CH_2 -Fmoc), 62.4 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc) 39.5 (NH- CH_2 -Alkyl), 37.6 (CH- CH_2 -COOPfp), 29.9, 28.9, 25.7 (CH_2 -Alkyl), 23.3 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 20.9, 20.7, 20.6, (CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 952.3$): 975.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (87)**

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 37 (444 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man 87 als weißen Feststoff.

Ausbeute: 376 mg (0.40 mmol; 79 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.77, 7.56$ (d, 2 H, $J = 7.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.35, 7.28 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.49 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.95 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.40 (bd, 1 H, H-3), 5.20 (t, 1 H, $J = 9.6$ Hz, H-4), 5.03 (dd, 1 H, $J = 3.1$ Hz H-2), 4.42 (m, 4 H, H-1, O- CH_2 -Fmoc, CH-Asp), 4.23 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.11 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.88 (m, 1 H, H-5), 3.23 (bd, 2 H, NH- CH_2 -Alkyl), 2.87 (m, 1 H, CH- CH_2 -COOPfp), 2.64 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl, CH- CH_2 -COOPfp), 2.15, 2.13, 2.04, 2.01 (4 s, 12 H, CH_3 -Acetyl), 1.57 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.47, 1.37 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.0, 170.4, 170.3, 169.7$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.1 (NH-COO), 143.7, 141.9, 127.9, 127.1, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 84.2 (C-1), 74.3 (C-5), 72.0 (C-3), 67.3 (C-2), 67.2 (C-4), 67.6 (O- CH_2 -Fmoc), 61.6 (C-6), 51.2 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc) 39.4 (NH- CH_2 -Alkyl), 37.6 (CH- CH_2 -COOPfp), 31.0, 29.9, 25.9 (CH_2 -Alkyl), 21.1, 20.9, 20.8, 20.6 (CH_3 -Acetyl).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 952.3$): 975.5 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (88)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **38** (445 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **88** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 367 mg (0.39 mmol; 77 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.75, 7.55$ (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.38, 7.28 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.52 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.96 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, NH-Asp), 5.39 (s, 1 H, H-4), 5.19 (t, 1 H, $J = 9.9$ Hz, H-2), 5.02 (m, 1 H, H-3), 4.40 (m, 4 H, H-1, O- CH_2 -Fmoc, CH-Asp), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.09 (m, 2 H, H-6b, H-6a), 3.89 (m, 1 H, H-5), 3.24 (bd, 2 H, NH- CH_2 -Alkyl), 2.85 (bm, 1 H, CH- CH_2 -COOPfp), 2.62 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl, CH- CH_2 -COOPfp), 2.11, 2.03, 2.00, 1.95 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.58 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.42 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.2, 170.4, 170.1, 169.4$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.2 (NH-COO), 143.7, 141.3, 127.8, 127.1, 125.0, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 84.1 (C-1), 74.4 (C-3), 71.9 (C-5), 67.3 (C-2), 67.2 (C-4), 67.6 (O- CH_2 -Fmoc), 62.5 (C-6), 51.2 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc) 39.4 (NH- CH_2 -Alkyl), 37.5 (CH- CH_2 -COOPfp), 29.9, 29.0, 25.9 (CH_2 -Alkyl), 22.9, 22.4, 20.9, 20.7 (CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 952.3$): 975.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2-acetamido-3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (89)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **39** (443 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent E) erhält man **89** als weißer Feststoff.

Ausbeute: 205 mg (0.22 mmol; 43 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.76, 7.58$ (d, 4 H, $J = 7.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.30 (t, 4 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.55 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 6.01 (d, 1 H, NHAc), 5.95 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.19, 5.07 (m, 2 H, H-3, H-4), 4.48, 4.43 (m, 4 H, H-2, O- CH_2 -Fmoc, CH-Asp), 4.22 (m, 2 H, H-1, CH-Fmoc), 4.12, 4.08 (m, 2 H, H-6), 3.64 (bm, 1 H, H-5), 3.21 (m, 2 H, NH- CH_2 -Alkyl), 2.88 (m, 1 H, CH- CH_2 -COOPfp), 2.66 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl, CH- CH_2 -COOPfp), 2.06, 2.02, 2.01, 1.94 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.58 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.37 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.1, 170.9, 170.6, 169.4$ ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 156.3 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.1, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 83.8 (C-1), 76.0 (C-3), 73.9 (C-5), 68.4 (C-2), 68.3 (C-4), 67.3 (O- CH_2 -Fmoc), 62.5 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 47.3 (CH-Fmoc) 39.5 (NH- CH_2 -Alkyl), 37.7 (CH- CH_2 -COOPfp), 29.9, 28.9, 25.7 (CH_2 -Alkyl), 23.3 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 20.9, 20.7, 20.6, (CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 951.3$): 952.4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 974.2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-rahmnopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (90)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **40** (401 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent E) erhält man **90** als farbloses Öl.

Ausbeute: 101 mg (0.11 mmol; 22 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.77, 7.76$ (d, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.61 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.39 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.30 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 6.10 (bs, 1 H, *NH*-Pentyl), 5.85 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, *NH*-Asp), $5.31, 5.25$ (m, 2 H, H-3, H-2), 5.12 (m, 1 H, H-4), 4.76 (m, 1 H, H-5), 4.46 (m, 1 H, H-1), 4.37 (t, 2 H, *O-CH*₂-Fmoc), 4.26 (m, 1 H, *CH*-Fmoc), 3.89 (m, 2 H, *NH-CH*₂-Alkyl), $3.01, 2.83$ (m, 2 H, *CH-CH*₂-COOPfp), $2.15, 2.05, 1.97$ (3 s, 9 H, *CH*₃OO), 1.68 (m, 2 H, *CH*₂-Alkyl), 1.41 (m, 2 H, *CH*₂-Alkyl), 1.25 (m, 2 H, *CH*₂-Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 170.1, 169.9, 169.9, 168.9$ (*CH*₃-CO), 156.1 (*NH*-COO), $144.1, 141.4, 127.8, 128.2, 125.4, 120.1$ (Fmoc-Ar-*C*), 91.8 (C-1), 77.3 (C-3), 71.4 (C-4), 70.4 (C-2), 69.5 (C-5), 69.1 (*O-CH*₂-Fmoc), 50.7 (*CH*-Asp), 47.2 (*CH*-Fmoc) 39.4 (*NH-CH*₂-Alkyl), 37.5 (*CH-CH*₂-COOPfp), $29.9, 29.1, 25.9$ (*CH*₂-Alkyl), $20.9, 20.8, 20.7$, (*CH*₃OO), 17.6 (*CH*₃, C-6).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 908.3$): 931.3 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (91)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **41** (567 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **91** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 422 mg (0.34 mmol; 68 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.75, 7.57$ (d, Fmoc-Ar-*H*), $7.36, 7.28$ (m, Fmoc-Ar-*H*), 6.48 (bs, 1 H, *NH*-Pentyl), 5.92 (bs, 1 H, *NH*-Asp), 5.14 (m, 2 H, H-3, H-3'), 5.05 (m, 1 H, H-4'), 4.89 (m, 2 H, H-2', H-2), $4.49, 4.41, 4.35$ (bm, 7 H, H-1', H-1, H-6a, H-6a', *O-CH*₂-Fmoc, *CH*-Asp), 4.21 (m, 1 H, H-6b), $4.08, 4.03$ (m, 2 H, H-6b', *CH*-Fmoc), 3.74 (t, 1 H, $J = 10.0$ H-4), 3.63 (bd, 1 H, H-5), 3.56 (bs, 1 H, H-5'), 3.21 (bs, 2 H, *NH-CH*₂-Alkyl), 2.85 (d, 1 H, *CH-CH*₂-COOPfp), 2.59 (m, 3 H, *S-CH*₂-Alkyl, *CH-CH*₂-COOPfp), $2.09, 2.06, 2.02, 2.00, 1.99, 1.95$ (7 s, 21 H, *CH*₃OO), 1.57 (m, 2 H, *CH*₂-Alkyl), 1.54 (m, 2 H, *CH*₂-Alkyl), $1.37, 1.24$ (m, 2 H, *CH*₂-Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.1, 170.2, 170.0, 169.3, 169.2, 169.1, 168.8$ (*CH*₃-CO), 155.8 (*NH*-COO), $143.3, 141.1, 127.5, 126.7, 124.8, 119.8$ (Fmoc-Ar-*C*), 100.8 (C-1'), 83.2 (C-1), 76.2 (C-4), 73.0 (C-5), 72.7 (C-3'), 71.8 (C-5'), 71.3 (2 C, C-3, C-2'), 69.9 (C-2), 67.5 (*O-CH*₂-Fmoc), 66.8 (C-4'), 61.8 (C-6), 61.2 (C-6'), 50.9 (*CH*-Asp), 46.9 (*CH*-Fmoc) 39.1 (*NH-CH*₂-Alkyl), 37.5 (*CH-CH*₂-COOPfp), $29.6, 28.8, 25.5$ (*CH*₂-Alkyl), $20.6, 20.5, 20.4, 20.3$ (1 C, 1 C, 1 C, 4 C, *CH*₃OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 1240.3$): 1264.4 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (92)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **42** (565 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **92** als weißer Feststoff.

Ausbeute: 441 mg (0.36 mmol; 71 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.76, 7.55$ (bd, Fmoc-Ar-*H*), 7.37, 7.28 (m, Fmoc-Ar-*H*), 6.56 (bs, 1 H, *NH*-Pentyl), 6.03 (bs, 1 H, *NH*-Asp), 5.32 (s, 1 H, H-4'), 5.18 (bt, 1 H, $J = 8.8$ Hz, H-2'), 5.08 (bt, 1 H, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 4.92 (m, 2 H, H-3, H-2), 4.43 (m, 6 H, H-1, H-1', H-6a, O- CH_2 -Fmoc, *CH*-Asp), 4.19 (m, 1 H, *CH*-Fmoc), 4.09 (m, 3 H, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.85 (bm, 1 H, H-5'), 3.74 (bt, 1 H, $J_{3-4} = 9.4, J_{4-5} = 9.1$ Hz, H-4), 3.57 (m, b, 1 H, H-5), 3.19 (bs, 2 H, *NH*- CH_2 -Alkyl), 2.82 (m, 1 H, *CH*- CH_2 -COOPfp), 2.59 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl, *CH*- CH_2 -COOPfp), 2.13, 2.07, 2.01, 1.94 (4 s, 21 H, CH_3OO), 1.55 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.36, 1.22 (m, 2H, CH_2 -Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.1, 170.1, 170.3, 170.1, 170.0, 169.6, 169.0$ (CH_3 -CO), 156.0 (*NH*-COO), 143.4, 141.2, 127.8, 127.0, 125.0, 120.0 (Fmoc-Ar-*C*), 101.0 (C-1'), 83.3 (C-1), 76.6 (C-4), 76.2 (C-5), 73.7 (C-3), 71.0 (C-3'), 70.6 (C-2), 70.7 (C-5'), 67.4 (O- CH_2 -Fmoc), 67.0 (C-2'), 66.7 (C-4'), 62.3 (C-6'), 61.2 (C-6), 51.1 (*CH*-Asp), 47.1 (*CH*-Fmoc) 39.3 (*NH*- CH_2 -Alkyl), 37.4 (*CH*- CH_2 -COOPfp), 29.8, 28.8, 25.7 (CH_2 -Alkyl), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (1 C, 1 C, 1 C, 1 C, 2 C, 1 C, CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 1240.3$): 1264.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (93)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **43** (567 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **93** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 459 mg (0.37 mmol; 74 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.77, 7.57$ (d, Fmoc-Ar-*H*), 7.41, 7.32 (m, Fmoc-Ar-*H*), 6.51 (bs, 1 H, *NH*-Pentyl), 5.95 (bs, 1 H, *NH*-Asp), 5.39 (d, 1 H, $J = 3.3$ Hz, H-1'), 5.35 (m, 1 H, H-3'), 5.26 (t, 1 H, $J = 9.0$ Hz H-3), 5.04 (t, 1 H, $J = 10.0$ Hz, H-4'), 4.87 (m, 1 H, H-2), 4.84 (m, 1 H, H-2'), 4.49, 4.45, 4.42 (bm, 4 H, H-1, H-6a, O- CH_2 -Fmoc, *CH*-Asp), 4.25 (m, 1 H, H-6b), 4.23 (m, 1 H, H-6a'), 4.13 (m, 1 H, H-6b'), 4.06 (m, 1 H, *CH*-Fmoc), 4.02 (m, 1 H, H-4), 3.95 (m, 1 H, H-5'), 3.95 (m, 1 H, H-5) 3.22 (bs, 2 H, *NH*- CH_2 -Alkyl), 2.87 (d, 1 H, *CH*- CH_2 -COOPfp), 2.60 (m, 3 H, S- CH_2 -Alkyl, *CH*- CH_2 -COOPfp), 2.14, 2.12, 2.09, 2.04, 2.01 1.99 (4 s, 21 H, CH_3OO), 1.57 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl), 1.37, 1.24 (m, 2 H, CH_2 -Alkyl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.3, 170.9, 170.7, 170.4, 170.2, 170.0, 169.7$ (CH_3 -CO), 156.0 (*NH*-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.3, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-*C*), 95.7 (C-1'), 83.3 (C-1), 72.9 (C-3), 70.9 (C-5), 70.1 (C-4), 69.5 (C-2), 68.6 (C-2'), 68.3 (C-3'), 68.1 (C-5'), 67.4 (O- CH_2 -Fmoc), 66.7 (C-4'), 63.1 (C-6), 61.6 (C-6'), 51.3 (*CH*-Asp), 47.3 (*CH*-Fmoc) 39.5 (*NH*-

CH₂-Alkyl), 37.6 (CH-CH₂-COOPfp), 29.9, 29.3, 25.9 (CH₂-Alkyl), 21.1, 20.9, 20.8, 20.7, 20.5 (1 C, 1 C, 2 C, 2 C, 1 C, CH₃OO).

[(MALDI-TOF) (m/z = 1240.3)]: 1264.4 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(5-aminopentyl)-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (94)**

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 44 (567 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man 94 als weißen Feststoff.

Ausbeute: 391 mg (0.32 mmol; 63 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.59 (bd, Fmoc-Ar-H), 7.40, 7.31 (m, Fmoc-Ar-H), 6.55 (bs, 1 H, NH-Pentyl), 5.96 (bs, 1 H, NH-Asp), 5.45 (s, 1 H, H-3), 5.32 (m, 1 H, H-4'), 5.20 (m, 2 H, H-4', H-3), 5.07 (m, 2 H, H-2', H-2), 4.95 (t, 1 H, H-1'), 4.44 (m, 4 H, O-CH₂-Fmoc, CH-Asp, H-6'), 4.22 (m, 2 H, CH-Fmoc, H-1), 4.07 (m, 1 H, H-5), 3.70, 3.57 (m, 3 H, H-6a, H-6b, H-5'), 3.23 (bs, 2 H, NH-CH₂-Alkyl), 2.87 (m, 1 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.62 (m, 3 H, S-CH₂-Alkyl, CH-CH₂-COOPfp), 2.12, 2.04, 1.99, 1.97 (4 s, 21 H, CH₃OO), 1.62 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.39 (m, 2 H, CH₂-Alkyl), 1.22 (m, 2 H, CH₂-Alkyl).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 170.8, 170.6, 170.3, 170.2, 169.9, 169.7, 169.4, 168.9 (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.6, 141.2, 127.7, 127.0, 125.0, 120.0 (Fmoc-Ar-C), 96.1 (C-1'), 90.3 (C-1), 78.4 (C-4), 73.6 (C-5), 73.6 (C-3), 70.5 (C-3'), 69.9 (C-2), 69.4 (C-5'), 68.7 (C-2'), 68.5 (C-4'), 67.4 (O-CH₂-Fmoc), 66.1 (C-6'), 61.7 (C-6), 51.1 (CH-Asp), 47.1 (CH-Fmoc), 39.3 (NH-CH₂-Alkyl), 37.4 (CH-CH₂-COOPfp), 29.8, 28.8, 25.7 (CH₂-Alkyl), 21.1, 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (5 s, 21 H, CH₃OO).

[(MALDI-TOF) (m/z = 1240.3)]: 1264.5 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(L- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (95)**

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 57 (438 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man 95 als weißen Feststoff.

Ausbeute: 314 mg (0.32 mmol; 64 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.77, 7.75 (d, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.56, 7.54 (d, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.41 (t, 2 H, Fmoc-Ar-H), 7.29, 7.28 (m, 7 H, Fmoc-Ar-H, Ar-H), 6.01 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.15 (m, 2 H, H-3, H-4), 5.03 (t, 1 H, J = 3.1 Hz, H-2), 4.96 (t, 1 H, CH-CH₂-Ar), 4.57 (d, 1 H, J = 6.8, CH-Fmoc), 4.42 (O-CH₂-Fmoc), 4.33 (d, 1 H, J = 9.9 Hz, H-1), 4.19 (m, 3 H, H-6a, H-6b, H-5), 3.61 (bd, 1 H, J = 9.9 Hz, CH-Asp), 3.13, 2.97 (m, 2 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.89, 2.68 (m, 2 H, CH-CH₂-COOPfp), 1.93 (m, 2 H, S-CH₂), 2.06, 2.02, 2.01, 2.04, 1.93 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.0 (Asp-CO-CH), 170.2, 170.0, 169.8, 169.7 (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.7, 140.1, 128.1, 127.5, 125.4, 120.4 (Fmoc-Ar-C), 143.7, 141.4, 126.6, 125.3 (CH₂-Ar-C), 82.2 (C-1), 76.2 (C-5), 73.9 (C-3), 70.1 (C-2), 68.2 (C-4), 67.4 (O-CH₂-

Fmoc), 62.0 (C-6), 53.2 (CH-Asp), 49.2 (CH-Ar), 47.3 (CH-Fmoc), 37.8 (CH₂-Asp), 34.1 (CH-CH₂-COOPfp), 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

[(MALDI-TOF) (m/z = 986.2)]: 1009.0 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (96)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **48** (438 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **96** als farbloses Öl.

Ausbeute: 330 mg (0.34 mmol; 67 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.75, 7.63 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.59, 7.56 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.41, 7.38 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.35, 7.33 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.32, 7.31, 7.29 (m, 3 H, CH₂-Ar-*H*), 5.98 (m, 1 H, NH-Asp), 5.90 (s, 1 H, NH-CH), 5.37 (m, 1 H, H-3), 5.33 (m, 1 H, H-4), 5.15 (m, 1 H, *J* = 3.1 Hz H-2), 4.69 (m, 1 H, CH-CH₂-Ar), 4.59 (m, 1 H, H-1), 4.44 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.26 (m, 3 H, H-6a, O-CH₂-Fmoc), 4.09 (m, 1 H, H-6b), 3.99 (m, 1 H, CH-Asp), 3.81 (m, 1 H, H-5), 3.05 (dd, 1 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.68 (dd, 1 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.16 (m, 2 H, S-CH₂), 2.10, 2.08, 2.04, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 195.9 (NH-CO), 170.9 (Asp-CO-CH), 170.1, 170.0, 169.9, 169.7 (CH₃-CO), 156.0 (NH-COO), 143.9, 141.6, 128.1, 127.5, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-C), 143.6, 141.3, 127.4, 125.2 (CH₂-Ar-C), 80.8 (C-1), 79.8 (C-5), 77.4 (C-3), 72.6 (C-2), 71.3 (C-4), 68.1 (O-CH₂-Fmoc), 62.5 (C-6), 57.8 (CH-Asp), 47.6 (CH-Fmoc), 47.3 (CH-Ar), 37.8 (CH₂-Asp), 37.6 (CH-CH₂-COOPfp), 21.3, 21.1, 21.0, 20.9 (CH₃OO).

[(MALDI-TOF) (m/z = 986.2)]: 1009.0 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (97)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **58** (436 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **97** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 341 mg (0.35 mmol; 69 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.74 (d, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.57, 7.55 (d, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.38 (t, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.28 (m, 7 H, Fmoc-Ar-*H*, Ar-*H*), 5.99 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.38 (m, 1 H, H-4), 5.17 (m, 2 H, Hz, H-2, H-3), 4.96 (m, 1 H, CH-CH₂-Ar), 4.57 (bs, 1 H, NH-Fmoc), 4.42 (sd, 2 H, *J* = 5.3 Hz, O-CH₂-Fmoc), 4.24 (bs, 1 H, *J* = 9.9 Hz, H-1), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.13 (m, 2 H, H-6), 3.76 (m, 1 H, H-5), 3.18, 3.00 (m, 2 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.89, 2.67 (m, 2 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.35 (s, 2 H, S-CH₂), 2.12, 2.03, 2.00, 1.96 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.4 (Asp-CO-CH), 170.5, 170.3, 169.9, 169.8 (CH₃-CO), 156.2 (NH-COO), 143.9, 140.0, 128.0, 127.9, 127.3, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-C), 143.7, 141.4, 126.6, 125.1 (CH₂-Ar-C), 83.1 (C-1), 77.3 (C-3), 74.6 (C-5), 71.8 (C-2), 67.4 (C-4), 67.3 (O-CH₂-Fmoc), 61.6 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 51.2 (CH-Ar), 47.2 (CH-Fmoc), 37.5 (CH₂-Asp), 35.4 (CH-CH₂-COOPfp), 21.6, 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃OO).

[(MALDI-TOF) (m/z = 986.2)]: 1009.2 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -phenylalaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (98)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **61** (447 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **98** als farbloses Öl.

Ausbeute: 321 mg (0.32 mmol; 64 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.77, 7.58 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.42, 7.32 (m, 4 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.21, 7.12 (m, 5 H, CH₂-Ar-*H*), 6.43 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.66 (s, 1 H, NH-CH), 5.33 (m, 1 H, H-3), 5.31 (m, 1 H, H-4), 5.26 (st, 1 H, H-2), 4.63 (m, 1 H, CH-CH₂-Ar), 4.49 (m, 1 H, H-1), 4.41, 4.38 (m, 2 H, CH-Fmoc, CH-CH₂-COOPfp), 4.29, 4.26 (m, 3 H, H-6a, O-CH₂-Fmoc), 4.22 (m, 1 H, H-6b), 4.01 (t, 1 H, S-CH₂-CH-NH), 3.71 (m, 1 H, H-5), 3.26, 3.07 (m, 2 H, S-CH₂), 2.87, 2.65 (m, 2 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.15, 2.05, 2.03, 1.99 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 195.9 (NH-CO), 171.8 (Asp-CO-CH), 170.1, 170.0, 169.9, 169.7 (CH₃-CO), 156.2 (NH-COO), 143.8, 141.4, 128.0, 127.2, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 136.6, 129.2, 127.0, 127.0, 125.0 (CH₂-Ar-C), 82.7 (C-1), 71.0 (C-5), 69.5 (C-3), 69.4 (C-2), 67.5 (C-4), 66.2 (O-CH₂-Fmoc), 62.5 (C-6), 51.3 (CH-Asp), 49.7 (CH-CH₂-Ar), 47.3 (CH-Fmoc), 39.5 (CH-CH₂-Ar), 35.2 (CH₂-Asp), 34.7 (CH₂-COOPfp), 24.9 (S-CH₂), 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO).

[FAB (m/z = 1000.3)]: 1023.7 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (99)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **63** (424 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **99** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 343 mg (0.36 mmol; 72 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.76, 7.57 (d, 2 H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.30 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.42 (bd, 1 H, NH-Val), 5.90 (bd, 1 H, NH-Asp), 5.20 (t, 1 H, *J* = 9.4 Hz, H-3), 5.09 (t, 1 H, *J* = 9.6 Hz, H-4), 5.00 (t, 1 H, *J* = 9.6 Hz, H-2), 4.61 (m, 1 H, H-1), 4.47 (m, 2 H, O-CH₂-Fmoc) 4.33 (m, 1 H, CH-CH₂-COOPfp), 4.29 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.20, 4.11 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.97 (t, 1 H, S-CH₂-CH-NH), 3.95 (m, 1 H, H-5), 3.22, 3.15 (m, 2 H, S-CH₂), 2.87, 2.64 (m, 2 H, CH-CH₂-COOPfp), 2.15, 2.08, 2.04, 1.98 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.26 (t, 1 H, CH-(CH₃)₂), 0.89 (m, 6 H, CH-(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 171.0, 170.2, 170.1, 169.9 (CH₃-CO), 156.3 (NH-COO), 143.6, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 82.5 (C-1), 76.2 (C-5), 73.7 (C-3), 70.0 (C-4), 67.9 (C-2), 67.4 (O-CH₂-Fmoc), 61.7 (C-6), 53.3 (CH-Asp), 47.2 (CH-Fmoc), 33.4 (CH₂-COOPfp), 31.1 (S-CH₂), 24.9 (CH-(CH₃)₂), 21.1, 20.9, 20.8, 20.6 (CH₃OO), 19.9, 18.8 (CH-(CH₃)₂).

[(MALDI-TOF) (m/z = 952.3)]: 975.2 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (100)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **62** (421 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **100** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 353 mg (0.37 mmol; 74 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.76, 7.57$ (d, 2 H, $J = 7.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.30 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.42 (bd, 1 H, *NH*-Val), 5.90 (bd, 1 H, *NH*-Asp), 5.31 (m, 1 H, H-3), 5.26 (m, 1 H, $J = 9.6$ Hz, H-4), 5.22 (m, 1 H, $J = 3.1$ Hz H-2), 4.70 (bd, 1 H, H-1), 4.47 (bt, 2 H, O- CH_2 -Fmoc) 4.33 (m, 1 H, *CH*- CH_2 -COOPfp), 4.29 (m, 1 H, *CH*-Fmoc), 4.22, 4.10 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.97 (t, 1 H, S- CH_2 -*CH*-NH), 3.95 (m, 1 H, H-5), 3.22, 3.15 (m, 2 H, S- CH_2), 2.87, 2.64 (m, 2 H, *CH*- CH_2 -COOPfp), 2.15, 2.08, 2.04, 1.98 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.26 (t, 1 H, *CH*- $(\text{CH}_3)_2$), 0.89 (m, 6 H, *CH*- $(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.0, 170.2, 170.1, 169.9$ (CH_3 -CO), 156.3 (*NH*-COO), 143.6, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-*C*), 81.9 (C-1), 70.8 (C-5), 69.5 (C-3), 69.2 (C-2), 67.6 (C-4), 66.4 (O- CH_2 -Fmoc), 62.7 (C-6), 53.3 (*CH*-Asp), 47.2 (*CH*-Fmoc), 33.4 (CH_2 -COOPfp), 31.1 (S- CH_2), 24.9 (*CH*- $(\text{CH}_3)_2$), 21.1, 20.9, 20.8, 20.6 (CH_3OO), 19.9, 18.8 (*CH*- $(\text{CH}_3)_2$).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 952.3$): 975.4 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*L*- α -valaninyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (101)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **64** (422 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **101** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 334 mg (0.35 mmol; 70 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.76, 7.57$ (d, 2 H, $J = 7.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40, 7.31 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 6.61 (bd, 1 H, *NH*-Val), 6.03 (bd, 1 H, *NH*-Asp), 5.42 (sd, 1 H, $J = 3.3$ Hz, H-4), 5.19 (t, 1 H, $J = 9.9$ Hz, H-2), 5.07 (m, 1 H, H-3), 4.55 (d, 1 H, $J = 10.1$ Hz, H-1), 4.47 (m, 2 H, O- CH_2 -Fmoc) 4.33 (m, 1 H, *CH*- CH_2 -COOPfp), 4.29 (m, 1 H, *CH*-Fmoc), 4.20, 4.11 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.97 (t, 1 H, S- CH_2 -*CH*-NH), 3.88 (m, 1 H, H-5), 3.22, 3.15 (m, 2 H, S- CH_2), 2.87, 2.64 (m, 2 H, *CH*- CH_2 -COOPfp), 2.15, 2.08, 2.04, 1.98 (4 s, 12 H, CH_3OO), 1.26 (t, 1 H, *CH*- $(\text{CH}_3)_2$), 0.89 (m, 6 H, *CH*- $(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 171.0, 170.5, 170.1, 169.7$ (CH_3 -CO), 156.3 (*NH*-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-*C*), 83.7 (C-1), 77.4 (CH_2 -C), 74.4 (C-3), 71.9 (C-5), 67.5 (C-2), 67.4 (C-4), 67.3 (CH_2 -Fmoc), 61.7 (C-6), 53.3 (*CH*-Asp), 47.2 (*CH*-Fmoc), 33.4 (CH_2 -COOPfp), 31.1 (S- CH_2), 24.9 (*CH*- $(\text{CH}_3)_2$), 21.1, 20.9, 20.8, 20.6 (CH_3OO), 19.9, 18.8 (*CH*- $(\text{CH}_3)_2$).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 952.3$): 975.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(4-Aminobenzyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -D-mannopyranosyl]-L-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (102)**

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 72 (439 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man 102 als weißer Feststoff.

Ausbeute: 410 mg (0.42 mmol; 83 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.78, 7.57$ (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.41 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.31, 7.29 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.26, 7.24 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 6.83 (m, 1 H, *NH*-Asp), 6.01, 5.99 (bd, 1 H, *NH*-CH), 5.48 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 1 H, H-4), 5.25 (m, 1 H, H-2), 4.67 (s, 2 H, CH_2 -NHCO), 4.57 (bs, 1 H, *NH*), 4.47, 4.35, 4.32 (bm, 5 H, CH_2 -NH, H-1, *CH*-Fmoc, H-6_a), 4.21, 4.12, 4.10 (bm, 4 H, *O-CH}_2*-Fmoc, H-6_b, H-5), 3.00 (m, 1 H,), 2.71 (dd, 2 H, CH-CH_2 -COOPfp), 2.18, 2.12, 2.08, 2.06 (4 s, 12 H, CH_3OO), 2.02 (m, 2 H, S- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 169.9, 169.7$ (CH_3 -CO), 156.1 (*NH*-COO), 143.6, 141.3, 128.1, 127.5, 125.3, 120.3 (Fmoc-Ar-*C*), 138.4, 136.1 (Ar-*C*), 129.3, 127.9 (Ar-*CH*), 81.5 (C-1), 76.4 (C-5), 71.8 (C-4), 69.7 (C-3), 68.1 (*O-CH}_2*-Fmoc), 67.1 (C-2), 62.7 (C-6), 62.1 (*CH*-Asp), 51.1 (*CH*-Fmoc), 43.1 (Ar- CH_2 -NH), 37.5 (CH_2 -Asp), 37.6 (CH-CH_2 -COOPfp), 34.4 (CH_2 -S), 21.3, 21.1, 21.0, 20.9 (CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 986.24$): 1009.9 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

***3*-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- β -D-glucopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester (103)**

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 83 (434 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:2) erhält man 103 als weißen Feststoff.

Ausbeute: 313 mg (0.32 mmol; 64 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 7.75, 7.54 (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40 (s, 1 H, *CH*-Triazol), 7.37, 7.27 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.67 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, *NH*) 5.20 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-3), 5.08 (t, 1 H, $J = 9.6$ Hz, H-4), 5.00 (t, 1 H, $J = 9.6$ Hz, H-2), 4.60 (d, 1 H, $J = 10.1$ Hz, H-1), 4.58 (m, 2 H, $(\text{CH}_2)_2$ -*CH*-NH), 4.38 (m, 2 H, CH_2 -Fmoc), 4.20 (m, 1 H, *CH*-Fmoc), 4.21 (m, 1 H, H-6_a), 4.10 (m, 1 H, H-6_b), 4.09 (m, 2 H, CH_2 -Triazol), 4.04, 3.84 (m, 3 H, S- CH_2), 3.69 (bm, 1 H, H-5), 2.45 (bd, 2 H, CH_2 -COO^tBu), 2.06, 2.03, 1.98, 1.98 (4 s, 12 H, CH_3OO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.8, 170.2, 169.6, 169.5 (CH_3 -CO), 155.8 (*NH*-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-*C*), 144.9 (Triazol-Ar-*C*), 123.4 (Triazol-Ar-*CH*), 82.2 (C-1), 76.0 (C-5), 73.9 (C-3), 70.2 (C-4), 68.3 (C-2), 66.9 (CH_2 -Fmoc), 61.9 (C-6), 52.2 (CH-CH_2 -Triazol), 48.6 (*CH*-NH) 47.3 (*CH*-Fmoc), 37.0 (CH_2 -COOPfp), 24.3 (CH_2 -S), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 977.2$): 1000.6 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester (104)

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 81 (434 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:2) erhält man 104 als farbloses Öl.

Ausbeute: 313 mg (0.32 mmol; 68 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 7.74, 7.55 (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.41 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.37, 7.28 (t, 2 H, $J = 7.3$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.67 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, NH) 5.32 (t, 1 H, $J = 9.4$ Hz, H-2), 5.24, 5.22 (m, 2 H, Hz, H-3, H-4), 4.57 (m, 2 H, $(\text{CH}_2)_2\text{-CH-NH}$), 4.38, 4.36, 4.25 (m, 1 H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, H-1, H-6a), 4.18 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.10 (m, 1 H, H-6b), 4.10 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Triazol}$), 4.04, 3.84 (m, 3 H, S- CH_2), 3.69 (bm, 1 H, H-5), 2.45 (bd, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOPfp}$), 2.06, 2.03, 1.98, 1.98 (4 s, 12 H, CH_3OO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.9, 170.2, 169.7, 169.5 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 155.7 (NH-COO), 143.7, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.1 (Fmoc-Ar-C), 145.0 (Triazol-Ar-C), 123.4 (Triazol-Ar-CH), 81.5 (C-1), 71.4 (C-5), 69.7 (C-3), 69.5 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 66.3 (C-2), 62.4 (C-6), 52.2 (CH- $\text{CH}_2\text{-Triazol}$), 48.5 (CH-NH) 47.4 (CH-Fmoc), 36.8 ($\text{CH}_2\text{-COOPfp}$), 25.0 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 20.9, 20.8, 20.7, 20.7 (CH_3OO).

[FAB ($m/z = 824.3$): 825.4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$].

[(MALDI-TOF) ($m/z = 977.2$): 1000.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-methyl-1-thio- β -*D*-galactopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester (105)

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 82 (434 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:2) erhält man 105 als farbloses Öl.

Ausbeute: 365 mg (0.37 mmol; 73 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 7.76, 7.56 (d, 2 H, $J = 7.1$ Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.41 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.37, 7.32 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 5.62 (bd, 1 H, $J = 6.6$ Hz, NH), 5.42 (ds, 1 H, $J = 3.3$ Hz, H-4), 5.23 (t, 1 H, $J = 9.9$ Hz, H-2), 5.04 (m, 1 H, H-3), 4.58 (m, 2 H, H-1, $(\text{CH}_2)_2\text{-CH-NH}$), 4.41 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.37 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.21 (m, 1 H, H-6a), 4.11 (m, 1 H, H-6b), 4.08 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Triazol}$), 4.04, 3.92 (m, 3 H, S- CH_2), 3.88 (m, 1 H, H-5), 2.45 (bd, 2 H, $\text{CH}_2\text{-COOPfp}$), 2.15, 2.06, 2.02, 1.98 (4 s, 12 H, CH_3OO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 170.9, 170.2, 169.6 ($\text{CH}_3\text{-CO}$), 155.7 (NH-COO), 145.1, 143.8, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 141.4 (Triazol-Ar-C), 123.3 (Triazol-Ar-CH), 82.0 (C-1), 77.3 ($\text{CH}_2\text{-C}$), 73.4 (C-3), 72.3 (C-5), 70.6 (C-2), 67.6 (C-4), 66.9 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 61.5 (C-6), 52.3 (CH- $\text{CH}_2\text{-Triazol}$), 48.6 (CH-NH) 47.3 (CH-Fmoc), 37.0 ($\text{CH}_2\text{-COOPfp}$), 24.1 ($\text{CH}_2\text{-S}$), 21.2, 20.8, 20.7 (CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 977.2$): 1000.1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$].

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-methyl-1-thio- β -*D*-fucopyranosyl)]-butansäure-pentafluorphenolester (106)

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 84 (412 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:2) erhält man 106 als farbloses Öl.

Ausbeute: 346 mg (0.37 mmol; 73 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.77, 7.57 (d, 2 H, J = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.39, 7.31 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.63 (bd, 1 H, J = 6.6 Hz, NH), 5.27 (m, 1 H, H-4), 5.18 (d, 1 H, J = 10.1 Hz, H-2), 5.03 (dd, J = 9.9, J = 3.3 1 H, H-3), 4.54 (d, 1 H, J = 9.8 Hz, H-1), 4.54 (m, 2 H, (CH₂)₂-CH-NH), 4.40 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.18 (m, 1 H, CH-Fmoc), 3.94 (d, 2 H, J = 16.6 Hz, -CH₂-S), 3.82 (q, 1 H, J = 6.5 Hz, H-5), 2.43 (bd, 2 H, CH₂-COOPfp), 2.17, 2.03, 1.95 (4 s, 12 H, CH₃OO), 1.20 (m, 3 H, CH₃, H-6).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.9, 170.2, 169.9 (CH₃-CO), 155.7 (NH-COO), 145.2, 143.8, 127.9, 127.1, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 141.4 (Triazol-Ar-C), 123.3 (Triazol-Ar-CH), 82.6 (C[CH₃]₃), 82.1 (C-1), 73.8 (C-3), 72.4 (C-4), 70.6 (C-2), 67.6 (C-5), 66.9 (CH₂-Fmoc), 52.2 (CH-CH₂-Triazol), 48.4 (CH-NH) 47.3 (CH-Fmoc), 37.0 (CH₂-COOPfp), 24.2 (CH₂-S), 21.2, 20.9, 20.7 (CH₃OO), 16.5 (C-6).

[(MALDI-TOF) (m/z = 933.2)]: 956.2 [M+Na]⁺.

3-(*N*-Fluorenylmethoxycarbonyl-(*S*)-amino)-4-[(1*H*-1,2,3-triazoyl)-4-[2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl- β -*D*-galactopyranosyl(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-1-thio- β -*D*-glucopyranosyl]]-butansäure-pentafluorphenolester (107)

Durchführung nach AAV 12. Mit Verbindung 85 (576 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:2) erhält man 107 als farbloses Öl.

Ausbeute: 475 mg (0.38 mmol; 75 % d. Th.)

¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 7.77, 7.57 (d, 2 H, J = 7.1 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 7.40 (s, 1 H, CH-Triazol), 7.39, 7.31 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, Fmoc-Ar-*H*), 5.70 (bd, 1 H, J = 6.6 Hz, NH), 5.34 (s, 1 H, H-4'), 5.20 (t, 1 H, J = 9.1 Hz, H-2'), 5.09 (bt, 1 H, J = 8.8 Hz, H-3'), 4.92 (m, 2 H, H-3, H-2), 4.57 (m, 3 H, H-1', (CH₂)₂-CH-NH), 4.48 (m, 2 H, H-1, H-6a,) 4.40 (m, 2 H, CH₂-Fmoc), 4.19 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.10 (m, 3 H, H-6a', H-6b, H-6b'), 3.85 (m, 2 H, -CH₂-S), 3.83 (m, 1 H, H-5'), 3.79 (m, 1 H, H-4), 3.62 (bm, 1 H, H-5), 2.47 (bd, 2 H, CH₂-COOPfp), 2.15, 2.12, 2.11, 2.04, 2.02, 1.98, 1.96 (4 s, 12 H, CH₃OO).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ (ppm) = 170.7, 170.4, 170.3, 170.1, 169.9, 169.8, 169.1 (CH₃-CO), 155.7 (NH-COO), 143.8, 141.4, 127.9, 127.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-Ar-C), 141.4 (Triazol-Ar-C), 123.2 (Triazol-Ar-CH), 101.2 (C-1'), 82.4 (C[CH₃]₃), 82.0 (C-1), 77.3 (CH₂-C), 76.6 (C-4), 76.1 (C-5), 73.8 (C-3), 72.0 (C-CH), 71.0 (C-3'), 70.8 (C-2), 70.2 (C-5'), 69.2 (C-2'), 66.9 (CH₂-Fmoc), 66.7 (C-4'), 62.2 (C-6'), 60.9 (C-6), 52.2 (CH-CH₂-Triazol), 48.4 (CH-NH), 47.3 (CH-Fmoc), 37.1 (CH₂-COOPfp), 24.0 (CH₂-S), 21.2, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃OO), 17.6 (S-CH₂)

[(MALDI-TOF) (m/z = 1266.1)]: 1289.2 [M+Na]⁺.

***N*-Fluorenylmethoxycarbonyl- α -[(*D*- α -phenylglyciny)]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- α -*D*-mannopyranosyl]-*L*-asparaginsäure- β -pentafluorphenolester (111)**

Durchführung nach **AAV 12**. Mit Verbindung **48** (438 mg, 0.5 mmol) nach Säulenchromatographie (Eluent P:E-1:1) erhält man **96** als farbloses Öl.

Ausbeute: 330 mg (0.34 mmol; 68 % d. Th.)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 7.76, 7.63$ (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.58, 7.54 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.41, 7.39 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.35, 7.33 (m, 2 H, Fmoc-Ar-*H*), 7.36, 7.34 (m, 2 H, CH_2 -Ar-*H*), 7.32, 7.31, 7.29 (m, 3 H, CH_2 -Ar-*H*), 5.98 (m, 1 H, NH-Asp), 5.84 (s, 1 H, NH-CH), 5.37 (m, 1 H, H-3), 5.34 (m, 1 H, H-4), 5.16 (m, 1 H, $J = 3.1$ Hz H-2), 4.69 (m, 1 H, CH- CH_2 -Ar), 4.59 (m, 1 H, H-1), 4.46 (m, 1 H, CH-Fmoc), 4.27 (m, 3 H, H-6a, O- CH_2 -Fmoc), 4.08 (m, 1 H, H-6b), 3.99 (m, 1 H, CH-Asp), 3.81 (m, 1 H, H-5), 3.05 (dd, 1 H, CH- CH_2 -COOPfp), 2.68 (dd, 1 H, CH- CH_2 -COOPfp), 2.18 (m, 2 H, S- CH_2), 2.10, 2.08, 2.03, 1.99 (4 s, 12 H, CH_3OO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 195.9$ (NH-CO), 170.8 (Asp-CO-CH), 170.0, 160.9, 169.8, 169.7 (CH_3 -CO), 156.0 (NH-COO), 143.9, 141.4, 128.0, 127.5, 125.4, 120.3 (Fmoc-Ar-C), 143.6, 141.4, 127.4, 125.1 (CH_2 -Ar-C), 81.0 (C-1), 79.8 (C-5), 77.4 (C-3), 72.6 (C-2), 71.3 (C-4), 68.0 (O- CH_2 -Fmoc), 62.4 (C-6), 57.8 (CH-Asp), 47.4 (CH-Fmoc), 47.3 (CH-Ar), 37.7 (CH_2 -Asp), 37.7 (CH- CH_2 -COOPfp), 21.3, 21.1, 21.0, 20.9 (CH_3OO).

[(MALDI-TOF) ($m/z = 986.2$): 1009.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$].

8.4 SPOT-Synthese

8.4.3 Zu Kapitel 6.2.3

Aminoderivatisierte Zellulose: (3[3-{2-(2-[3-Aminoproxyl]-ethoxy)-ethoxy}-propylamino]-2-hydroxy-propyl-Zellulose)

A. Vorbereiten der Membranen

Das Whatmann (CH 1; Nr. 1001917) Filterpapier wird auf 10 cm x 14 cm große Zellulosemembranen zugeschnitten und an die Befestigungsvorrichtung des SPOT-Roboters durch Ausstanzen der Ecken mit der Lochzange angepasst. Anschließend werden die Membranen mit Dioxan (2 x 10 min) und EtOH (2 x 10 min) gereinigt und mit dem Fön bei Kaltstufe getrocknet.

Je nach Anwendung kann eine niedrige oder hohe Aminofunktionalisierung der Membran durchgeführt werden. Die niedrige Funktionalisierung eignet sich hauptsächlich als Membranen für ein Lectin-Screening, die hohe für eine präparative SPOT-Synthese.

B. Niedrigbeladungsprotokoll (400 – 600 nmol/cm²)

Die vorgereinigten Membranen werden in eine große Petrischale gelegt und pro Papier mit einer Lösung (10%ig) aus Epibromhydrin (300 µL), Perchlorsäure (60%ige, 30 µL) und Dioxan (3 mL) vollständig benetzt und das Gefäß abgedeckt. Nach 2 h werden die Membranen mit Dioxan (3 x 5 min mit 20 mL je Papier) gewaschen und im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Anschließend werden die Membranen mit einer Lösung (20%ig) aus 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **51** (4 mL je Papier) in DMF (20 mL je Papier) getränkt und mehrmals gewendet. Nach 2 h wird die Reaktionslösung dekaniert und die Papiere mit MeONa-Lösung in MeOH (5 M, 20 mL je Papier) überschichtet. Nach 30 min wird mehrmals gründlich mit MeOH (7 x 20 mL je Papier) gewaschen, dabei müssen die Papiere mehrmals gewendet werden. Nach dem Trocken sind die Membranen für den nächsten Schritt einsatzbereit. Der Funktionalisierungsgrad mit freien Aminen lässt sich wie weiter unten beschrieben bestimmen.

C. Hochbeladungsprotokoll (600 – 1400 nmol/cm²)

Die Präparation erfolgt wie unter A.) beschrieben mit folgenden Abweichungen:

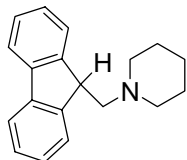
Die Inkubationszeit mit Epibromhydrin wird von 2 h auf 3 h erhöht

4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin wird auf 80 °C erwärmt und unverdünnt zugegeben (20 mL)

D. Bestimmung des Derivatisierungsgrads der Membran

Der Derivatisierungsgrad lässt zuverlässig durch Messung der UV-Absorption des Dibenbenzofulven-Piperidin Adduktes nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe bestimmen.

Piperidin-DBF Addukt



$$B = E \frac{V \cdot f}{\epsilon \cdot d \cdot A} \cdot 10^6$$

$\epsilon_{301\text{nm}} = 7800$ [mL/mmol cm]

B: Beladung [nmol/cm²]

E: Extinktion

V: Abspaltvolumen [mL]

f : Verdünnungsfaktor

ϵ : Extinktionskoeffizient [mL/mmol cm]

d: Schichtdicke Küvette [cm]

A: Papierfläche [cm²]

Methode A: Quantifizierung freier Aminofunktionen auf der ganzen Membranfläche:

Zu einer aminoderivatisierten Membran (10 cm x 14 cm) gibt man eine Lösung aus Fmoc-Cl (50 mg), DIPEA (70 μ L) in Dioxan (25 mL) und schwenkt die Papiere für 4 h auf dem Orbitalschüttler. Danach wäscht man gründlich mit Dioxan (4 x 5 min mit 20 mL), MeOH (3 x 5 min 20 mL) und trocknet das Papier anschließend im Exsikkator unter Vakuum. Für die Fmoc-Abspaltung werden genau 50 mL einer 20%igen Piperidin-Lösung in DMF auf die Membran gegeben und 1 h geschwenkt. Danach wird ein Aliquot von 1 mL auf 10 mL verdünnt und bei 301 nm ($\epsilon = 7800$) UV-Spektroskopisch vermessen. Bei hohen Derivatisierungsgraden (Extinktion > 1) muss die Messlösung verdünnt werden. Die Berechnung erfolgt nach obiger Formel (Papierfläche = Vorder- und Rückseite).

Methode B: Quantifizierung freier Aminofunktionen einzelner Spots:

Der Derivatisierungsgrad wird durch Inkubieren von drei Spots (jeweils 0,23 cm²) mit einer Lösung von Fmoc-Gly-OPfp (0,6 M, 30 min) in DMF versetzt, mit DMF gewaschen (3 x 2,0 ml), die Spots werden getrenntem mit 20%igem Piperidin in DMF versetzten und die Absorbtion des DBF-Piperidin Adduktes bei 301 nm ($\epsilon = 7800$) bestimmt.

Ein Spot (0,23 cm²) wird ausgestanzt und in einer Eppendorf-Spitze mit 50 μ l Fmoc-Gly-OPfp (0,6 M in DMF) versetzt. Nach 30 Minuten wird die Lösung entfernt und der SPOT mit DMF (5 x 1,0 ml) gewaschen. In einem zweiten Eppendorf-Spitze wird der SPOT mit 1,0 ml Piperidin (20%ig in DMF) versetzt. Nach 20 Minuten wird die UV-Absorption der unverdünnten Lösung bei $\lambda = 301$ nm bestimmt.

Methode C: Quantifizierung einer membrangebundenen Fmoc-Aminosäure:

Ein Spot (0,23 cm²) wird ausgestanzt und in einer Eppendorf-Spitze mit 1,0 ml Piperidin (20%ig in DMF) versetzt. Zur Quantifizierung wird wie unter Methode A beschrieben verfahren.

8.4.2 Zu Kapitel 6.2.4

Aufbringen der Linker auf die aminoderivatisierte Zellulosemembran

Kurz vor jeder Derivatisierung werden die freien Säurefunktionen der Linker aktiviert. Die aktivierten Linkerlösungen sollten nicht länger als 2-3 Tage verwendet werden und möglichst immer frisch hergestellt werden. Zum Aufbringen der Linker kann die aktivierte Lösung aufgespottet (**A.**) oder die Membranen mit der Lösung getränkt (**B.**) werden.

A. Aufspotten des Linkers auf die Membran:

Beim Aufspotten des Linkers wird das spätere Array für eine folgende SPOT-Synthese festgelegt und sollte deshalb sorgfältig beim Durchführen einer manuellen Synthese geplant werden.

Fmoc-Rink-Amid-Linker 75

Zu einer frisch hergestellten Lösung von Pentafluorphenol (46 mg, 0.25 mmol) in NMP (1 mL) mit DIC (40 μ L, 0.26 mmol) wird der Rink-Amid-Linker **75** (135 mg, 0.25 mmol) unter kurzem aufschütteln der Eppendorfspitze gelöst. Nach ca. 30 min ist die Umsetzung zum Pentafluorphenylester beendet und die Lösung zum Aufspotten einsatzbereit.

Fmoc-Foto-Linker 59

Zu einer frisch hergestellten Lösung des Foto-Linkers **59** (130 mg, 0.25 mmol) in NMP (1 mL) werden HATU (190 mg, 0.50 mmol) und DIPEA (85 μ L, 0.50 mmol) gegeben. Nach kurzem Aufschütteln der Eppendorfspitze ist die Reaktionslösung sofort zum Einsatz bereit und kann auf die Membran aufgespottet werden. Da direktes Tageslicht geringfügig UV-Licht enthält, sollte die Derivatisierung und alle folgenden Schritte in einem abgedunkelten Bereich erfolgen (Plexiglasbox mit UV-Lichtschutzfolie abgeklebt). Die derivatisierten Membranen sind in einer lichtundurchlässigen Plastiktüte aufzubewahren.

Die Auftragung der aktivierten Linkerlösung auf die aminoderivatisierte Zellulosemembran erfolgt durch Auftüpfeln mit dem SPOT-Roboter oder durch manuelles Aufspotten.

Für die manuelle Auftragung werden mit einem weichen Bleistift kleine Punkte auf der Papieroberfläche aufgezeichnet, die als Markierungen zum Aufspotten der Linkerlösung dienen. Durch das dabei erzeugte Raster wird das spätere Arrayformat festgelegt. Zum Auftragen wird eine Eppendorfpipette (0.1-10 μ L) verwendet mit der zwischen 0.3 bis 2 μ L Linkerlösung auf dem Raster verteilt werden. Die Auftragungsmenge sollte dabei 10% größer als bei der späteren SPOT-Synthese gewählt werden, da durch chromatographische Effekte die Konzentration

an Reagenzlösung an der Randzone kleiner ist und die Derivatisierung des Linkers damit geringer ist.

Mit dem SPOT-Roboter erfolgt die Auftragung durch Aufrufen der Seq.-Datei in der Steuersoftware. Dabei wird die gleiche Datei ausgewählt, die für die spätere SPOT-Synthese dient. Im Fenster der Steuersoftware wird "Generate Grid" angekreuzt. Beim starten der Software wird somit automatisch das Array für die vorgegebene Synthesesequenz auf der aminoderivatisierten Zellulosemembran erzeugt. Aufgrund der präzisen Auftragung des Roboters entfällt eine Markierung der Spots und auch das Spot-Volumen (0.1 μL) wird gleich wie bei der späteren Synthese gewählt.

Das Aufspotten der aktivierten Linkerlösungen wird in einem Abstand von 20 Minuten einmal wiederholt und nach weiteren 20 min zu Punkt C. übergegangen.

B. Aufbringen des Linkers durch Tränken der Membran mit der Linker-Lösung:

Für die Synthese von einzelnen *S*-Glycopeptids in größerer Menge (μmol Bereich) kann die ganze Membranoberfläche mit dem Linker derivatisiert werden. Dabei wird die Synthese durch Tränken der Membranen durchgeführt.

Rink-Amid-Linker 75

Zu einer frisch hergestellten Lösung des Rink-Amid-Linker **75** (130 mg, 0.25 mmol) in NMP (25 mL) werden HATU (190 mg, 0.50 mmol) und DIPEA (85 μL , 0.50 mmol) gegeben. Nach dem Vermischen der Reaktionslösung ist diese einsatzbereit und kann auf eine aminoderivatisierte Zellulosemembran gegossen werden. Dabei ist auf eine gleichmäßige Durchtränkung des Papiers zu achten und Luftblasen zwischen Membran und Gefäßboden werden durch langsame Bewegung auf einem Schütteltisch vermieden. Nach 7 h wird die Reaktionslösung abdekantiert und zu Punkt C. übergegangen.

C. Vorbereiten der Fmoc-Linker derivatisierten Membran für die SPOT-Synthese:

Nach abgeschlossener Derivatisierung mit dem Linker werden die freien Aminofunktionen acetyliert (1 x 30 min, Lösung aus 2 mL Ac_2O , 4 mL DIPEA in 20 mL DMF) und überschüssiges Reagenz durch Waschen (4 x 2 min mit 20 mL DMF) entfernt. Anschließend werden die Fmoc-Schutzgruppen des Linkers mit Piperidin (1 x 8 min mit 5 mL Piperidin in 20 mL DMF) entfernt und ausgiebig mit DMF (4 x 2 min mit 20 mL) und EtOH (4 x 2 min mit 20 mL) gewaschen. Die freien Aminofunktionen der aufgespotteten Linker können über Bromphenolblau (200 μL einer 1 %igen Lösung in EtOH) durch Zugabe zur EtOH-Waschlösung (20 mL) sichtbar gemacht werden. Findet keine Anfärbung der Spots sondern der Waschlösung statt, muss noch mehrmals mit EtOH gewaschen werden, bis die Waschlösung farblos bleibt. Nach dem letzten Waschschrift werden die Membranen mit dem Fön (Kaltluftstufe) getrocknet und sind für die SPOT-Synthese einsatzbereit. Ansonsten werden die Membranen mit Bleistift beschriftet und im Exsikkator eingelagert.

8.4.3 Zu Kapitel 6.2.5

Aus sterischen Gründen sollte nach der Derivatisierung mit dem spaltbaren Linker als erstes eine Aminosäure auf die Membran aufgespottet werden. Je nach späterem Verwendungszweck der *S*-Glycopeptide kommen dafür einfache Fmoc-geschützte Aminosäuren wie Glycin oder β -Alanin oder Aminosäuren mit Boc-geschützter Seitenfunktion wie Lysin in Frage, die bei der Spaltung des Linkers eine reaktive Seitenfunktion freisetzen (Amin).

Aufspotten der ersten Aminosäure

Zur Aktivierung können die Aminosäuren mit Pentafluorphenol über DIC vor dem Auftüpfeln aktiviert werden oder fertige Pentafluorphenolester der Aminosäuren als Lösung in NMP verwendet werden.

A. Aktivieren der Aminosäuren mit Pentafluorphenol über DIC

Die Aminosäure (0.25 mmol) wird mit einer Lösung aus Pentafluorphenol (46 mg, 0.25 mmol), DIC (40 μ L, 0.26 mmol) in NMP (1 mL) unter Schütteln der Eppendorfspitze gelöst. Nach ca. 30 min ist die Umsetzung zum Pentafluorphenylester beendet und die Lösung ist zum Aufspotten einsatzbereit. Ein eventueller Niederschlag wird durch zentrifugieren abgetrennt. Anschließend wird wie unter C. beschrieben weiter verfahren.

B. Vorbereiten von fertigen Pentafluorphenolestern

Die fertigen Pentafluorphenolester der Aminosäuren (0.25 mmol) werden in NMP (1 mL) gelöst und sind sofort einsatzbereit. Anschließend wird wie unter C. beschrieben weiter verfahren.

Aktivierung der *S*-Glycopeptid-Bausteine

Mit den Pentafluorphenol aktivierten *S*-Glycopeptid-Bausteine (Kapitel 6.1.5) wird kurz vor ihrer Verwendung eine 0.1 M Lösung in NMP hergestellt, der innerhalb von 2-3 Tagen aufzubreuchen ist. Zu der Lösung werden 50 Mol% HODhbt (3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one) als Base zugesetzt und gelöst. Anschließend wird wie unter C. beschrieben weiter verfahren.

C. Aufspotten der vorbereiteten Lösungen und Vorbereitung des nächsten Schritts

Die Auftragung der aktivierten Aminosäurelösung auf die aminoderivatisierte Zellulosemembran erfolgt durch Auftüpfeln mit dem SPOT-Roboter oder durch manuelles Aufspotten. Das Aufspotten der aktivierten Linkerlösungen wird in einem Abstand von 20 Minuten einmal wiederholt. Nach abgeschlossener Derivatisierung mit dem Linker werden die freien Aminofunktionen acetyliert (1 x 30 min, Lösung aus 2 mL Ac₂O, 4 mL DIPEA in 20 mL DMF) und überschüssiges Reagenz durch Waschen (4 x 2 min mit 20 mL DMF) entfernt.

Anschließend werden die Fmoc-Schutzgruppen des Linkers mit Piperidin (1 x 8 min mit 5 mL Piperidin in 20 mL DMF) entfernt und ausgiebig mit DMF (4 x 2 min mit 20 mL) und EtOH (4 x 2 min mit 20 mL) gewaschen. Die freien Aminofunktionen der aufgespotteten Linker können über Bromphenolblau (200 μ L einer 1 %igen Lösung in EtOH) durch Zugabe zur EtOH-Waschlösung (20 mL) sichtbar gemacht werden. Findet keine Anfärbung der Spots sondern der Waschlösung statt, muss noch mehrmals mit EtOH gewaschen werden, bis die Waschlösung farblos bleibt. Nach dem letzten Waschschrift werden die Membranen mit dem Fön (Kaltluftstufe) getrocknet und sind für die SPOT-Synthese einsatzbereit. Ansonsten werden die Membranen mit Bleistift beschriftet und im Exsikkator eingelagert.

Eine Kontrolle des Derivatisierungsgrads kann über UV-Messung (Kapitel 8.3.1) nach der Fmoc-Abspaltung erfolgen.

8.4.4 Zu Kapitel 6.2.6

Nachfolgend sind alle notwendigen Schritte zur Durchführung der SPOT-Synthese in Kurzform erläutert. Eine detaillierte Beschreibung zur Derivatisierung der Zellulosemembranen sind den Kapiteln 8.4.1 und 8.4.2 zu entnehmen. Die Aktivierung der S-Glycopeptid-Bausteine erfolgt wie im Kapitel 8.4.3 beschrieben.

Ablaufplan für die SPOT-Synthese auf Zellulosemembranen:

1.) Vorbereiten der Membranen:

Whatmann Cellulosepapier CH 1 (Nr. 1001 917) auf 10 x 14 cm zuschneiden und für Haltevorrichtung des SPOT-Roboters lochen und mit Bleistift beschriften.

A.) Vorreinigung:

2 x 10 min mit Dioxan (20 mL) waschen

2 x 10 min mit EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder im Vakuum trocknen (Membran einlagern)

B.) Derivatisierung mit Safetycatch-Linker:

1 x 2 h 10% Epibromhydrin / 1% Perchlorsäure in Dioxan
→ 300 µL Epibromhydrin / 30 µL Perchlorsäure in 3 mL Dioxan (pro Membran)
Membranen müssen mit der Reaktionslösung 2 h vollständig benetzt sein

3 x 5 min mit dest. Dioxan (20 mL) waschen, danach im Vakuum trocknen

1 x 2 h 20% 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **51** in DMF
→ 4 mL von Verbindung **51** in 20 mL DMF (pro Membran)
Membran muss mit der Reaktionslösung 2 h vollständig benetzt sein

1 x 30 min mit 5M Natriummethanolatlösung (20 mL) waschen

7 x 2 min mit MeOH (20 mL) waschen, danach fönen oder im Vakuum trocknen (Membran einlagern)

C.) Derivatisierung mit Fmoc-Rink-Amid-Linker:

1 x 7 h Membran mit Reaktionslösung benetzen
→ 135 mg (0.25 mmol) Rink-Amid-Linker, 190 mg (0.50 mmol) HATU in 25 mL NMP lösen und 85 µL (0.50 mmol) DIPEA zugeben.
oder als Spots auftragen

- 46 mg (0.25 mmol) Pfp, 135 mg (0.25 mmol) Rink-Amid-Linker in 1 mL NMP lösen, dazu 40 µL (0.26 mmol) DIC zugeben. Nach 30 min einsatzbereit.
- 1 x 30 min 10% Ac₂O, 20% DIPEA in abs. DMF
→ 2 mL Ac₂O / 4 mL DIPEA in 20 mL DMF
- 4 x 2 min mit DMF (20 mL) waschen
Nächster Punkt Fmoc-Abspaltung
- oder
- 2 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder
im Vakuum trocknen (Membran einlagern)
- 1 x 8 min mit Fmoc-Abspaltlösung; 20% Piperidin in DMF (25 mL) waschen,
→ 5 mL Piperidin in 20 mL DMF
UV-Quantifizierung von DBF-Piperidin Addukt möglich
- 4 x 2 min mit abs. DMF (20 mL) waschen
4 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen
- 1 x 5 min bei Bedarf Spots anfärben
→ 20 mL DMF + 200 µL Bromphenolblau (1 % ige Lösung in EtOH)
- 2 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder
im Vakuum trocknen (Membran Einlagern)

D.) Derivatisierung mit Pfp-Fmoc-Glycin oder HO-Lysin(^tBu)Fmoc:

- 1 x 7 h Membran mit Reaktionslösung benetzen
→ 116 mg (0.25 mmol) Pfp-Fmoc-Glycin in 25 mL NMP lösen + 0.125 mmol HODhbt
→ 47 mg (0.10 mmol) HO-Lysin(^tBu)Fmoc, 76 mg (0.20 mmol) HATU, 34 µL DIPEA (0.2 mmol) in 25 mL NMP lösen.
- oder als Spots auftragen
→ 116 mg (0.25 mmol) Pfp-Fmoc-Glycin in 1 mL NMP lösen.
→ 46 mg (0.25 mmol) Pfp, 117 mg HO-Lysin(^tBu)Fmoc (0.25 mmol) in 1 mL NMP lösen, dazu 40 µL (0.26 mmol) DIC zugeben. Nach 30 min einsatzbereit.
- 3 x 2 min 4% Ac₂O in abs. DMF
→ 0.8 mL Ac₂O in 20 mL DMF
Nächster Punkt Fmoc-Abspaltung
- oder
- 2 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder
im Vakuum trocknen (Membran einlagern)
- 1 x 8 min mit Abspaltlösung 20% Piperidin in DMF (25 mL) waschen,
→ 5 mL Piperidin in 20 mL DMF

UV-Quantifizierung von DBF-Piperidin Addukt möglich

- 4 x 2 min mit abs. DMF (20 mL) waschen
4 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen
- 1 x 5 min bei Bedarf SPOTS anfärben
→ 20 mL DMF + 200 µL Bromphenolblau (1 % ige Lösung in EtOH)
- 2 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder
im Vakuum trocknen

2.) Spotten der Building-Blocks:

- 2 x 25 min Pfp-Bausteine spotten (Pfp aktivierte S-Glycopeptid-Bausteine)
→ 0.1 mmol Pfp-Bausteine (nach Bedarf) in 1 mL HODhbt-Lösung
aufnehmen (0.06 mmol/mL in NMP).
- 3 x 2 min mit 4% Ac₂O in abs. DMF
→ 0.8 mL Ac₂O in 20 mL abs. DMF
- 4 x 2 min mit DMF (20 mL) waschen
Nächster Punkt Fmoc-Abspaltung
- oder
- 2 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder
im Vakuum trocknen (Membran einlagern)
- 1 x 8 min mit Abspalllösung 20% Piperidin in DMF (25 mL) waschen,
→ 5 mL Piperidin in 20 mL DMF
UV-Quantifizierung von DBF-Piperidin Addukt möglich
- 4 x 2 min mit abs. DMF (20 mL) waschen
4 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen
- 1 x 5 min bei Bedarf SPOTS anfärben
→ 20 mL DMF + 200 µL Bromphenolblau (1 % ige Lösung in EtOH)
- 2 x 2 min mit dest. EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder
im Vakuum trocknen
- mit Spotten des nächsten Zyklus beginnen → Punkt 2.) wiederholen oder
zu Punkt 3.) übergehen

3.) Deacetylierung der Building-Blocks:

- 16 h mit 7N NH₃/MeOH (50 mL) im geschlossenen Gefäß über Nacht
schwenken
- 2 x 2 min mit EtOH (20 mL) waschen, danach fönen oder

im Vakuum trocknen (Screening der *S*-Glycopeptide Kapitel 8.4.1
oder zu Punkt 4.)

4.) Spaltung des Rink-Amid-Linkers:

Abzuspaltender Spot ausschneiden und in Eppendorfspitze geben
2 x 45 min 90% TFA in DCM (100 μ L) + 3% TIS + 3% H₂O
→ 90 μ L TFA mit 10 μ L DCM verdünnen und
3 μ L TIS, 3 μ L H₂O zugeben
oder
Membran in Exsikkator mit TFA Dampf 30 min einwirken lassen
→ Dampfsättigung mit 90%-iger TFA Lösung in Exsikkator erzeugen
und Membran in TFA Dampf legen (2 h mit 3 mL TFA + 300 μ L DCM)
→ Spot ausschneiden und auswaschen
für MALDI-TOF in 20 μ L EtOH:H₂O/1:1 aufnehmen siehe Kapitel 8.3.6

5.) Bemerkungen:

Lösungsmittel:

DMF und NMP müssen frei von Aminen sein.

Für MeOH, EtOH, DCM, Dioxan, Ac₂O reicht eine Destillation der Lösungsmittel.

Durchführung der Waschschritte:

Zur Reinigung der Membranen wurde eine große Petrischale verwendet. Dazu dient ein Orbitalschüttler oder Wipptisch auf dem die Petrischale mit den Membranen platziert wurde. Durch Zu- und Abgießen des Lösungsmittels wird unter leichter Schwenkbewegung die Membran gereinigt. Unter Zuhilfenahme eines Kaltluft-Föns können die Membranen direkt in der Petrischale getrocknet werden oder durch Anlegen eines Vakuums im Exsikkator. Zum Entfernen der Membranen aus dem Waschgefäß sollte eine Pinzette verwendet werden und ein direkter Kontakt mit den Membranen vermieden werden.

Reaktionslösungen:

Reaktionslösungen sollten frisch hergestellt werden und sind innerhalb von 2-3 Tage aufzubrauchen. Um eine genaue Dossierung der *S*-Glycopeptid-Bausteinen zu ermöglichen, wurden mit den Pfp-*S*-Glycopeptid-Bausteinen 0.1 M Lösungen in DCM (0.5 mL) hergestellt, die sich im Kühlschrank längere Zeit lagern lassen (1-2 Monate). Zur Herstellung der Reaktionslösungen wurde mit einer Pipette ein definiertes Volumen der DCM-Lösung in die Eppendorfspitze überführt und mit der gleichen Menge an NMP aufgenommen. Danach wurden 50 Mol% an HODhbt zugegeben und durch schütteln gelöst.

Aufbewahren der Membranen:

Die Membranen wurden in einer geschlossenen Petrischale oder im Exsikkator aufbewahrt. Zur längeren Aufbewahrung (mehrere Monate) können die Membranen in einer Plastiktüte bei -20 °C eingefroren werden. Nach der Entnahme aus dem Tiefkühlschrank wurden die Membranen mit EtOH mehrmals dehydratisiert und nach dem Trocknen normal weiterverwendet.

Reaktionskontrolle:

Die Anfärbung mit Bromphenolblau reicht als Standard-Reaktionskontrolle aus und kann durch Waschen mit DMF von der Membran beseitigt werden. Der Farbstoff ist nur adsorptiv auf der Zelluloseoberfläche gebunden und stört die Peptidkupplungsreaktion nicht. Eine UV-Kontrolle der Fmoc-Abspaltung sollte hauptsächlich zur Bestimmung des Derivatisierungsgrads verwendet werden.

Durchführung:

Bei jeder SPOT-Synthese sollte jeder Syntheseabschnitt mit Bleistift auf der Membran dokumentiert werden, um Verwechslungen mit anderen Membranen oder bei längerer Lagerung zu vermeiden. Bei der Derivatisierung sollten die Membranen nicht ohne Handschuhe angefasst werden.

8.4.5 Zu Kapitel 6.2.8

Analytik der *S*-Glycopeptide über MALDI-TOF

Über Rink-Amid-Linker **75**:

Die Abspaltung der *S*-Glycopeptide kann mit TFA-Dampf (A.) oder mit 90%iger TFA (B.) erfolgen. Mit TFA-Dampf können alle auf der Membran befindlichen *S*-Glycopeptide unter milden Bedingungen gleichzeitig abgespalten werden, ohne dass eine Durchmischung einzelner Spots stattfindet.

A. Abspaltung der *S*-Glycopeptide mit TFA-Dampf (Rink-Amid-Linker)

Zum Spalten des Rink-Amid-Linkers wird die Membran 30 min in einen Exsikkator der mit TFA-Dampf gesättigt ist gelegt. Zur Dampfsättigung wird der Exsikkator 2 h vorher mit einer 90%igen TFA-Lösung (3 mL TFA + 300 µL DCM) befüllt. Nach dem Einwirken mit TFA-Dampf sind die *S*-Glycopeptide adhäsiv (hellrote SPOTs) auf der Membranoberfläche gebunden und werden für die Analytik ausgestanzt (Lochzange) und auf beschriftete Eppendorfspitzen verteilt. Durch Zugabe von EtOH:H₂O-1:1 (20 µL) werden die abgespaltenen *S*-Glycopeptide aufgenommen und wie unter C. weiterverfahren.

B. Abspaltung der *S*-Glycopeptide mit 90%iger TFA

Der Spot mit den abzuspaltenen *S*-Glycopeptiden wird ausgestanzt und in eine Eppendorfspitze gegeben. Dazu wird 90%ige TFA (45 µL TFA mit 5 µL DCM verdünnen und 2 µL TIS, 2 µL H₂O zugeben) pipettiert und man lässt 45 min einwirken. Danach wird der SPOT in eine weitere Eppendorfspitze überführt und nochmals 45 min mit 90%iger TFA (45 µL TFA mit 5 µL DCM verdünnen und 2 µL TIS, 2 µL H₂O zugeben) überschichtet. Die beiden Abspalllösungen werden in einer Eppendorfspitze vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Nach dem vollständigen verdampfen werden die *S*-Glycopeptide durch Zugabe von EtOH:H₂O-1:1 (20 µL) gelöst und wie unter C. weiterverfahren.

Über Foto Linker **59**:

Zum Spalten des Foto-Linkers wird die Membran 1 h unter eine UV-Lampe (365 nm, 7mW / cm²) zum Betrachten von DC-Platten gelegt. Danach wird die Membran gewendet und eine weitere 1 h belichtet. Die adhäsiv gebundenen *S*-Glycopeptide werden für die Analytik ausgestanzt (Lochzange) und auf beschriftete Eppendorfspitzen verteilt. Durch Zugabe von EtOH:H₂O-1:1 (20 µL) werden die *S*-Glycopeptide gelöst und wie unter C. weiterverfahren.

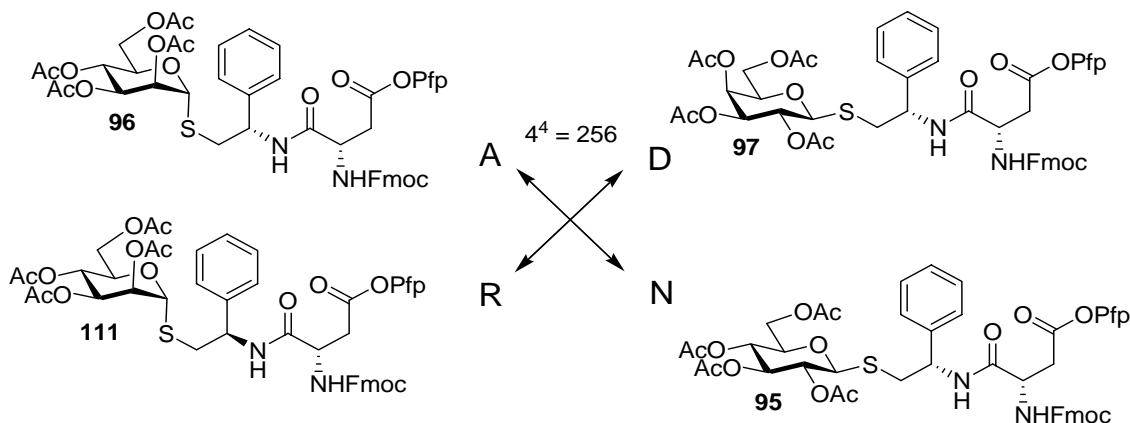
C. Probenpräparation für MALDI-TOF Messung:

Auf die Markierungen eines MALDI-Targets wird eine ges. vorbereitete HABA-Lösung (1 µL) aufgetragen. Auf die Matrix werden die gelösten *S*-Glycopeptide (1 µL) aufgetragen und an der Luft getrocknet. Danach können die einzelnen *S*-Glycopeptide am MALDI-TOF vermessen werden.

8.5 Lectin-Screening

8.5.1 Zu Kapitel 7.3

Aufbau der tetrameren S-Glycopeptid-Bibliothek (A, R, N, D):



Über die Spot Nummer (1-256) kann jedem Spot eindeutig die Sequenz der S-Glycopeptide zugeordnet werden.

Definition der tetrameren S-Glycopeptide (A, R, N, D) nach SPOT-Nummer:

| | | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 A A A A | 33 A N A A | 65 R A A A | 97 R N A A | 129 N A A A | 161 N N A A | 193 D A A A | 225 D N A A |
| 2 A A A R | 34 A N A R | 66 R A A R | 98 R N A R | 130 N A A R | 162 N N A R | 194 D A A R | 226 D N A R |
| 3 A A A N | 35 A N A N | 67 R A A N | 99 R N A N | 131 N A A N | 163 N N A N | 195 D A A N | 227 D N A N |
| 4 A A A D | 36 A N A D | 68 R A A D | 100 R N A D | 132 N A A D | 164 N N A D | 196 D A A D | 228 D N A D |
| 5 A A R A | 37 A N A R | 69 R A R A | 101 R N R A | 133 N A R A | 165 N N R A | 197 D A R A | 229 D N R A |
| 6 A A R R | 38 A N R R | 70 R A R R | 102 R N R R | 134 N A R R | 166 N N R R | 198 D A R R | 230 D N R R |
| 7 A A R N | 39 A N R N | 71 R A R N | 103 R N R N | 135 N A R N | 167 N N R N | 199 D A R N | 231 D N R N |
| 8 A A R D | 40 A N R D | 72 R A R D | 104 R N R D | 136 N A R D | 168 N N R D | 200 D A R D | 232 D N R D |
| 9 A A N A | 41 A N N A | 73 R A N A | 105 R N N A | 137 N A N A | 169 N N N A | 201 D A N A | 233 D N N A |
| 10 A A N R | 42 A N N R | 74 R A N R | 106 R N N R | 138 N A N R | 170 N N N R | 202 D A N R | 234 D N N R |
| 11 A A N N | 43 A N N N | 75 R A N N | 107 R N N N | 139 N A N N | 171 N N N N | 203 D A N N | 235 D N N N |
| 12 A A N D | 44 A N N D | 76 R A N D | 108 R N N D | 140 N A N D | 172 N N N D | 204 D A N D | 236 D N N D |
| 13 A A D A | 45 A N D A | 77 R A D A | 109 R N D A | 141 N A D A | 173 N N D A | 205 D A D A | 237 D N D A |
| 14 A A D R | 46 A N D R | 78 R A D R | 110 R N D R | 142 N A D R | 174 N N D R | 206 D A D R | 238 D N D R |
| 15 A A D N | 47 A N D N | 79 R A D N | 111 R N D N | 143 N A D N | 175 N N D N | 207 D A D N | 239 D N D N |
| 16 A A D D | 48 A N D D | 80 R A D D | 112 R N D D | 144 N A D D | 176 N N D D | 208 D A D D | 240 D N D D |
| 17 A R A A | 49 A D A A | 81 R R A A | 113 R D A A | 145 N R A A | 177 N D A A | 209 D R A A | 241 D D A A |
| 18 A R A R | 50 A D A R | 82 R R A R | 114 R D A R | 146 N R A R | 178 N D A R | 210 D R A R | 242 D D A R |
| 19 A R A N | 51 A D A N | 83 R R A N | 115 R D A N | 147 N R A N | 179 N D A N | 211 D R A N | 243 D D A N |
| 20 A R A D | 52 A D A D | 84 R R A D | 116 R D A D | 148 N R A D | 180 N D A D | 212 D R A D | 244 D D A D |
| 21 A R R A | 53 A D R A | 85 R R R A | 117 R D R A | 149 N R R A | 181 N D R A | 213 D R R A | 245 D D R A |
| 22 A R R R | 54 A D R R | 86 R R R R | 118 R D R R | 150 N R R R | 182 N D R R | 214 D R R R | 246 D D R R |
| 23 A R R N | 55 A D R N | 87 R R R N | 119 R D R N | 151 N R R N | 183 N D R N | 215 D R R N | 247 D D R N |
| 24 A R R D | 56 A D R D | 88 R R R D | 120 R D R D | 152 N R R D | 184 N D R D | 216 D R R D | 248 D D R D |
| 25 A R N A | 57 A D N A | 89 R R N A | 121 R D N A | 153 N R N A | 185 N D N A | 217 D R N A | 249 D D N A |
| 26 A R N R | 58 A D N R | 90 R R N R | 122 R D N R | 154 N R N R | 186 N D N R | 218 D R N R | 250 D D N R |
| 27 A R N N | 59 A D N N | 91 R R N N | 123 R D N N | 155 N R N N | 187 N D N N | 219 D R N N | 251 D D N N |
| 28 A R N D | 60 A D N D | 92 R R N D | 124 R D N D | 156 N R N D | 188 N D N D | 220 D R N D | 252 D D N D |
| 29 A R D A | 61 A D D A | 93 R R D A | 125 R D D A | 157 N R D A | 189 N D D A | 221 D R D A | 253 D D D A |
| 30 A R D R | 62 A D D R | 94 R R D R | 126 R D D R | 158 N R D R | 190 N D D R | 222 D R D R | 254 D D D R |
| 31 A R D N | 63 A D D N | 95 R R D N | 127 R D D N | 159 N R D N | 191 N D D N | 223 D R D N | 255 D D D N |
| 32 A R D D | 64 A D D D | 96 R R D D | 128 R D D D | 160 N R D D | 192 N D D D | 224 D R D D | 256 D D D D |

8.5.2 Zu Kapitel 7.4

Bei der Durchführung des Lectin-Screenings müssen die Zucker auf der Membran zuvor deacetyliert werden (Kapitel 8.3.4). Die Membranen können ohne Blockierung der Oberfläche direkt für das Lectin-Screening verwendet.

Pufferlösungen und Lectin-Lösungen:

A. Puffer-Lösungen:

Als Pufferlösungen werden Stammlösungen hergestellt, die bei Bedarf auf die Gebrauchslösungen verdünnt werden.

1.) Spülpuffer TBS (pH 7.5):

1 M Stammlösung von TBS (pH 7.5)

→ 121.14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan auf 1 L dd H₂O
mit 1 N HCl auf pH 7.5 einstellen

1 M Stammlösung von TBS (pH 7.5) und Tween (2.5%)

→ 121.14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan, 2.5 g Tween 20 auf 1 L dd H₂O
mit 1 N HCl auf pH 7.5 einstellen

Gebrauchspuffer 20 mM

→ 20 mL Stammlösung (1 M) mit 1 L dd H₂O verdünnen

B. Färbepuffer:

Acetatpuffer (pH 5.0):

Gebrauchspuffer 50 mM

→ 4.10 g NaAc werden in 900 mL dd H₂O gelöst und
mit konz. HCl auf pH 5.0 eingestellt

TBS-Puffer (pH 9.5):

→ 2.42 g Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan in 1 L dd H₂O lösen und
mit 1 N NaOH auf pH 9.5 einstellen

3.) Lectin-Lösungen (0.05 µM):

Die Konzentrationen der Lectin-Lösungen sollten in der Regel bei 5 nmol pro 100 mL liegen (0.05 µM). Je nach Aktivität des Lectins müssen die Lösungen noch weiter verdünnt werden oder konzentriertere Lösungen sind zu verwenden.

→ 5 nmol Lectin werden in 100 mL TBS (pH 7.5) gelöst und 10 μ L CaCl_2 (100 mM), 10 μ L MnCl_2 (100 mM) zugegeben.

Bei Phosphatase-Nachweisreaktionen können 50 μ L NaN_3 (1M) zugegeben werden, um die Lectin-Lösungen haltbarzumachen. Bei Peroxidase-Nachweisreaktionen wurde wegen der inhibierenden Wirkung von NaN_3 auf ein Vergiften der Lectin-Lösungen verzichtet.

Lectin-Screening der deacetylierten S-Glycopeptide

Wie im Allgemeinen Teil beschrieben eignet sich die Lectin-POD/AEC-Farbreaktion besonders gut für das Lectin-Screening. Dazu müssen die Schritte 1.) - 3.) unter Punkt A. durchgeführt werden.

A. Protokoll für Lectin-POD/AEC Test:

1.) Vorbereiten der Membran:

1 x 30 s, 2 x 5 min mit 25 mL TBS-Puffer (pH 7.5) spülen
1 x 5 min mit 25 mL TBS/Tween spülen

2.) Lectin-POD (Peroxidase) Inkubation:

1 x 1 h Membran mit 25 mL Lectin-POD Lösung inkubieren
→ danach Lectin-POD Lösung ins Vorratsgefäß zurückgeben
(Lösung ist wieder verwertbar)

1 x 30 s, 2 x 5 min mit 25 mL TBS-Puffer (pH 7.5) spülen
1 x 5 min mit 25 mL TBS/Tween spülen

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

5-15 min mit 50 mL H_2O_2 /AEC/Acetatpuffer-Färbelösung schwenken
→ Färbelösung vorher frisch ansetzen 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, dazu 25 μ L H_2O_2 geben und sofort verwenden

Bei Erreichen der gewünschten Färbungsintensität Farbreaktion durch Zugabe von 20 mL ddH_2O stoppen und Membran zur Dokumentation fotografieren, einscannen.

B. Protokoll für Lectin-Biotin/Avidin-AP-Test:

Der Lectin-Biotin/Avidin-AP-Färbetest ist bei Mannose *S*-Glycopeptiden mit Vorsicht zu genießen, da durch Anbindung von Avidin an Mannose das Ergebnis verfälscht wird. Ein Screening mit POD-Lectinen ist deshalb vorzuziehen.

1.) Vorbereiten der Membran:

1 x 30 s, 2 x 5 min mit 25 mL TBS-Puffer (pH 7.5) spülen
1 x 5 min mit 25 mL TBS/Tween spülen

2.) Lectin-Biotin Inkubation:

1 x 2 h Membran mit 25 mL Lectin-Biotin Lösung inkubieren
→ danach Lectin-Biotin Lösung ins Vorratsgefäß zurückgeben
(Lösung ist wieder verwendbar)
1 x 30 s, 2 x 5 min mit 25 mL TBS-Puffer (pH 7.5) spülen
1 x 5 min mit 25 mL TBS/Tween spülen

3.) Avidin-AP Inkubation:

1 x 1.5 h mit 25 mL Avidin-AP-Lösung inkubieren
→ danach Lectin-Biotin Lösung ins Vorratsgefäß zurückgeben
(Lösung ist wieder verwendbar)
1 x 30 s, 2 x 5 min mit 25 mL TBS-Puffer (pH 7.5) spülen
1 x 5 min mit 25 mL TBS/Tween spülen

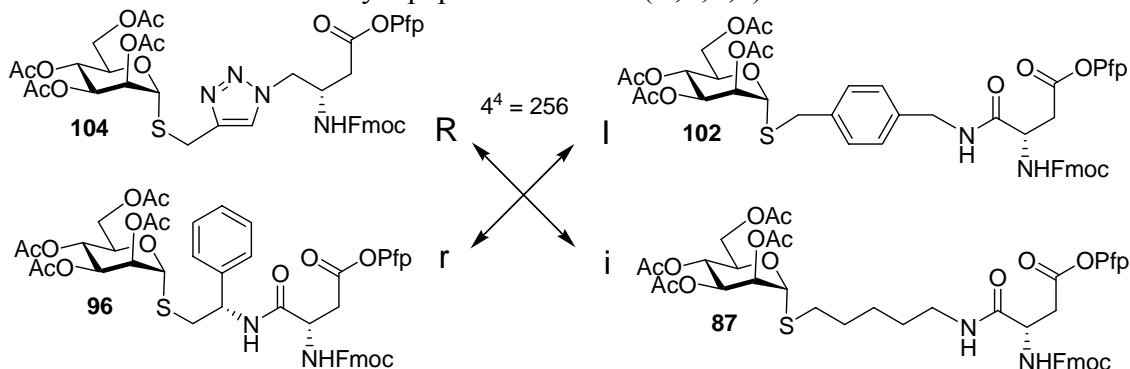
4.) Färbungsreaktion:

1 x 2 min mit 25 mL Färbepuffer (pH 9.5) spülen
5-15 min mit 10 mL NBT/BCIP-Färbelösung in der Dunkelkammer
schwenken
→ Färbelösung vorher frisch ansetzen (200µL NBT/BCIP-
Stammlösung in einem separaten Gefäß zu 10 mL Färbepuffer
geben, schütteln und auf die Membran geben

Bei Erreichen der gewünschten Färbungsintensität Farbreaktion durch Zugabe von 20 mL ddH₂O stoppen und Membran zur Dokumentation fotografieren oder einscannen.

8.5.3 Zu Kapitel 7.5

Aufbau der tetrameren S-Glycopeptid-Bibliothek (R, r, I, i):

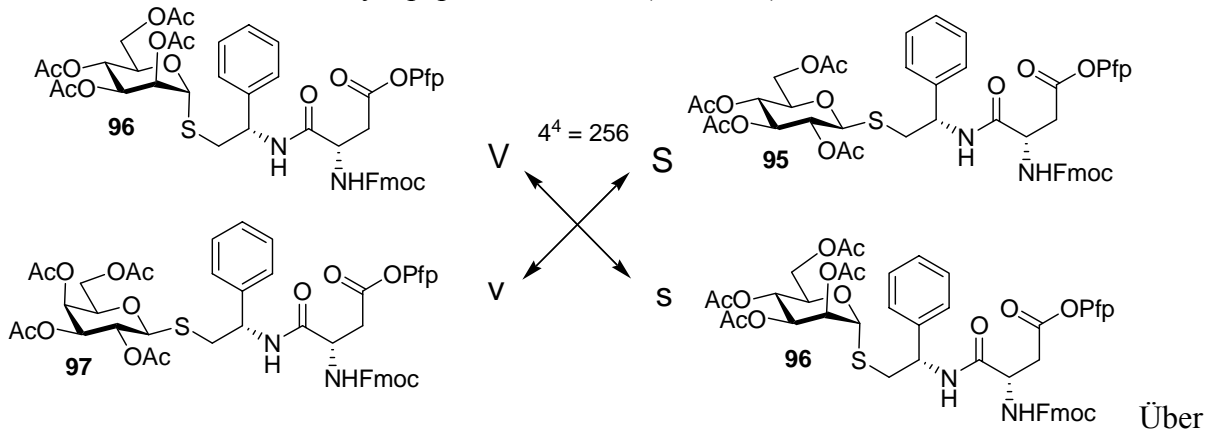


Über die Spot Nummer (1-256) kann jedem SPOT eindeutig die Sequenz der S-Glycopeptide zugeordnet werden.

Definition der tetrameren S-Glycopeptide (R, r, I, i) nach SPOT-Nummer:

| | | | | | | | |
|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 1 RRRR | 33 RIRR | 65 rRRR | 97 rIRR | 129 IRRR | 161 IIRR | 193 iRRR | 225 iIRR |
| 2 RRRr | 34 RIRr | 66 rRRr | 98 rIRr | 130 IRRr | 162 IIRr | 194 iRRr | 226 iIRr |
| 3 RRRl | 35 RIRl | 67 rRRl | 99 rIRl | 131 IRRl | 163 IIRl | 195 iRRl | 227 iIRl |
| 4 RRRi | 36 RIRi | 68 rRRi | 100 rIRi | 132 IRRi | 164 IIRi | 196 iRRi | 228 iIRi |
| 5 RRRrR | 37 RIRrR | 69 rRRrR | 101 rIRrR | 133 IRRrR | 165 IIRrR | 197 iRRrR | 229 iIRrR |
| 6 RRRrr | 38 RIRrr | 70 rRRrr | 102 rIRrr | 134 IRRrr | 166 IIRrr | 198 iRRrr | 230 iIRrr |
| 7 RRRrl | 39 RIRrl | 71 rRRrl | 103 rIRrl | 135 IRRrl | 167 IIRrl | 199 iRRrl | 231 iIRrl |
| 8 RRRri | 40 RIRri | 72 rRRri | 104 rIRri | 136 IRRri | 168 IIRri | 200 iRRri | 232 iIRri |
| 9 RRRIR | 41 RIRIR | 73 rRRIR | 105 rIRIR | 137 IRRIR | 169 IIRIR | 201 iRRIR | 233 iIRIR |
| 10 RRRIr | 42 RIRIr | 74 rRRIr | 106 rIRIr | 138 IRRIr | 170 IIRIr | 202 iRRIr | 234 iIRIr |
| 11 RRRIl | 43 RIRIl | 75 rRRIl | 107 rIRIl | 139 IRRIl | 171 IIRIl | 203 iRRIl | 235 iIRIl |
| 12 RRRli | 44 RIRli | 76 rRRli | 108 rIRli | 140 IRRli | 172 IIRli | 204 iRRli | 236 iIRli |
| 13 RRRiR | 45 RIRiR | 77 rRRiR | 109 rIRiR | 141 IRRiR | 173 IIRiR | 205 iRRiR | 237 iIRiR |
| 14 RRRir | 46 RIRir | 78 rRRir | 110 rIRir | 142 IRRir | 174 IIRir | 206 iRRir | 238 iIRir |
| 15 RRRil | 47 RIRil | 79 rRRil | 111 rIRil | 143 IRRil | 175 IIRil | 207 iRRil | 239 iIRil |
| 16 RRRii | 48 RIRii | 80 rRRii | 112 rIRii | 144 IRRii | 176 IIRii | 208 iRRii | 240 iIRii |
| 17 RrRRR | 49 RrRRR | 81 rrRRR | 113 riRRR | 145 IrRRR | 177 IiRRR | 209 irRRR | 241 iiRRR |
| 18 RrRRr | 50 RrRRr | 82 rrRRr | 114 riRRr | 146 IrRRr | 178 IiRRr | 210 irRRr | 242 iiRRr |
| 19 RrRRl | 51 RrRRl | 83 rrRRl | 115 riRRl | 147 IrRRl | 179 IiRRl | 211 irRRl | 243 iiRRl |
| 20 RrRRi | 52 RrRRi | 84 rrRRi | 116 riRRi | 148 IrRRi | 180 IiRRi | 212 irRRi | 244 iiRRi |
| 21 RrrRR | 53 RrrRR | 85 rrrRR | 117 rirRR | 149 IrrRR | 181 IirRR | 213 irrRR | 245 iirRR |
| 22 Rrrrr | 54 Rrrrr | 86 rrrrr | 118 rirrr | 150 Irrrr | 182 Iirrr | 214 irrrr | 246 iirrr |
| 23 Rrrrl | 55 Rrrrl | 87 rrrrl | 119 rirrl | 151 Irrrl | 183 Iirrl | 215 irrrl | 247 iirrl |
| 24 Rrrri | 56 Rrrri | 88 rrrri | 120 rirri | 152 Irrri | 184 Iirri | 216 irrri | 248 iirri |
| 25 RrIRR | 57 RrIRR | 89 rrrIR | 121 riIRR | 153 IrIRR | 185 IiIRR | 217 irIRR | 249 iiIRR |
| 26 RrIRr | 58 RrIRr | 90 rrrIr | 122 riIRr | 154 IrIRr | 186 IiIRr | 218 irIRr | 250 iiIRr |
| 27 RrIRl | 59 RrIRl | 91 rrrIl | 123 riIRl | 155 IrIRl | 187 IiIRl | 219 irIRl | 251 iiIRl |
| 28 RrIRi | 60 RrIRi | 92 rrrIi | 124 riIRi | 156 IrIRi | 188 IiIRi | 220 irIRi | 252 iiIRi |
| 29 RriRR | 61 RriRR | 93 rriRR | 125 riRR | 157 IriRR | 189 IriRR | 221 iriRR | 253 iiriRR |
| 30 RriRr | 62 RriRr | 94 rriRr | 126 riRRr | 158 IriRr | 190 IriRr | 222 iriRr | 254 iiriRr |
| 31 RriRl | 63 RriRl | 95 rriRl | 127 riRRl | 159 IriRl | 191 IriRl | 223 iriRl | 255 iiriRl |
| 32 RriRi | 64 RriRi | 96 rriRi | 128 riRRi | 160 IriRi | 192 IriRi | 224 iriRi | 256 iiriRi |

Aufbau der tetrameren S-Glycopeptid-Bibliothek (V, v, S, s):



Über die Spot Nummer (513 bis 768) kann jedem SPOT eindeutig die Sequenz der S-Glycopeptide zugeordnet werden.

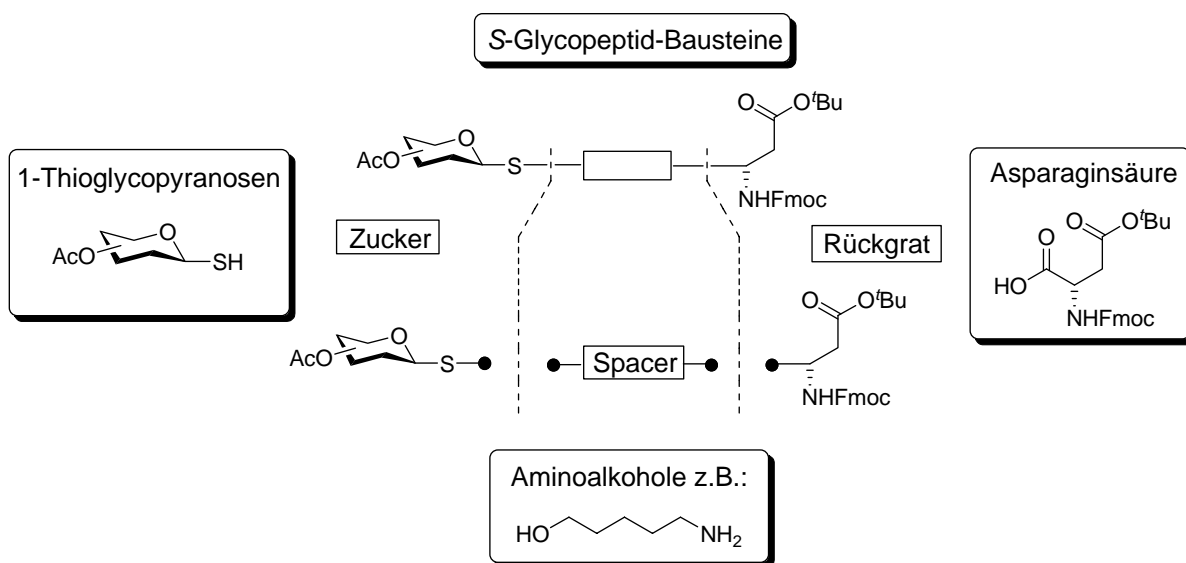
Definition der tetrameren S-Glycopeptide (V, v, S, s) nach SPOT-Nummer:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|
| 513 | V V V V | 545 | V S V V | 577 | v V V V | 609 | v S V V | 641 | S V V V | 673 | S S V V | 705 | s V V V | 737 | s S V V |
| 514 | V V V v | 546 | V S V v | 578 | v V V v | 610 | v S V v | 642 | S V V v | 674 | S S V v | 706 | s V V v | 738 | s S V v |
| 515 | V V V S | 547 | V S V S | 579 | v V V S | 611 | v S V S | 643 | S V V S | 675 | S S V S | 707 | s V V S | 739 | s S V S |
| 516 | V V V s | 548 | V S V s | 580 | v V V s | 612 | v S V s | 644 | S V V s | 676 | S S V s | 708 | s V V s | 740 | s S V s |
| 517 | V V v V | 549 | V S v V | 581 | v V v V | 613 | v S v V | 645 | S v v V | 677 | S S v V | 709 | s v v V | 741 | s S v V |
| 518 | V V v v | 550 | V S v v | 582 | v V v v | 614 | v S v v | 646 | S v v v | 678 | S S v v | 710 | s v v v | 742 | s S v v |
| 519 | V V v S | 551 | V S v S | 583 | v V v S | 615 | v S v S | 647 | S v v S | 679 | S S v S | 711 | s v v S | 743 | s S v S |
| 520 | V V v s | 552 | V S v s | 584 | v V v s | 616 | v S v s | 648 | S v v s | 680 | S S v s | 712 | s v v s | 744 | s S v s |
| 521 | V V S V | 553 | V S S V | 585 | v V S V | 617 | v S S V | 649 | S S V V | 681 | S S S V | 713 | s V S V | 745 | s S S V |
| 522 | V V S v | 554 | V S S v | 586 | v V S v | 618 | v S S v | 650 | S S V v | 682 | S S S v | 714 | s V S v | 746 | s S S v |
| 523 | V V S S | 555 | V S S S | 587 | v V S S | 619 | v S S S | 651 | S S V S | 683 | S S S S | 715 | s V S S | 747 | s S S S |
| 524 | V V s V | 556 | V S s V | 588 | v V s V | 620 | v S s V | 652 | S S V s | 684 | S S S s | 716 | s V s V | 748 | s S S s |
| 525 | V V s v | 557 | V S s v | 589 | v V s v | 621 | v S s v | 653 | S S V v | 685 | S S S v | 717 | s V s v | 749 | s S S v |
| 526 | V V s S | 558 | V S s S | 590 | v V s S | 622 | v S s S | 654 | S S V S | 686 | S S S s | 718 | s V s S | 750 | s S S s |
| 527 | V V s s | 559 | V S s s | 591 | v V s s | 623 | v S s s | 655 | S S V s | 687 | S S S s | 719 | s V s s | 751 | s S S s |
| 528 | V v V S | 560 | V S s S | 592 | v v V S | 624 | v S s s | 656 | S v S S | 688 | S S s s | 720 | s v S s | 752 | s s S s |
| 529 | V v V v | 561 | V S v V | 593 | v v V v | 625 | v s V V | 657 | S v V V | 689 | S s V V | 721 | s v V V | 753 | s s V V |
| 530 | V v V V | 562 | V s V v | 594 | v v V v | 626 | v s V v | 658 | S v V v | 690 | S s V v | 722 | s v V v | 754 | s s V v |
| 531 | V v V S | 563 | V s V S | 595 | v v V S | 627 | v s V S | 659 | S v V S | 691 | S s V S | 723 | s v V S | 755 | s s V S |
| 532 | V v V s | 564 | V s V s | 596 | v v V s | 628 | v s V s | 660 | S v V s | 692 | S s V s | 724 | s v V s | 756 | s s V s |
| 533 | V v v V | 565 | V s v V | 597 | v v v V | 629 | v s v V | 661 | S v v V | 693 | S s v V | 725 | s v v V | 757 | s s v V |
| 534 | V v v v | 566 | V s v v | 598 | v v v v | 630 | v s v v | 662 | S v v v | 694 | S s v v | 726 | s v v v | 758 | s s v v |
| 535 | V v v S | 567 | V s v S | 599 | v v v S | 631 | v s v S | 663 | S v v S | 695 | S s v S | 727 | s v v S | 759 | s s v S |
| 536 | V v v s | 568 | V s v s | 600 | v v v s | 632 | v s v s | 664 | S v v s | 696 | S s v s | 728 | s v v s | 760 | s s v s |
| 537 | V v S V | 569 | V s S V | 601 | v v S V | 633 | v s S V | 665 | S v S V | 697 | S s S V | 729 | s v S V | 761 | s s S V |
| 538 | V v S v | 570 | V s S v | 602 | v v S v | 634 | v s S v | 666 | S v S v | 698 | S s S v | 730 | s v S v | 762 | s s S v |
| 539 | V v S S | 571 | V s S S | 603 | v v S S | 635 | v s S S | 667 | S v S S | 699 | S s S S | 731 | s v S S | 763 | s s S S |
| 540 | V v S s | 572 | V s S s | 604 | v v S s | 636 | v s S s | 668 | S v S s | 700 | S s S s | 732 | s v S s | 764 | s s S s |
| 541 | V v s V | 573 | V s s V | 605 | v v s V | 637 | v s s V | 669 | S v s V | 701 | S s s V | 733 | s v s V | 765 | s s s V |
| 542 | V v s v | 574 | V s s v | 606 | v v s v | 638 | v s s v | 670 | S v s v | 702 | S s s v | 734 | s v s v | 766 | s s s v |
| 543 | V v s S | 575 | V s s S | 607 | v v s S | 639 | v s s S | 671 | S v s S | 703 | S s s S | 735 | s v s S | 767 | s s s S |
| 544 | V v s s | 576 | V s s s | 608 | v v s s | 640 | v s s s | 672 | S v s s | 704 | S s s s | 736 | s v s s | 768 | s s s s |

9 ZUSAMMENFASSUNG

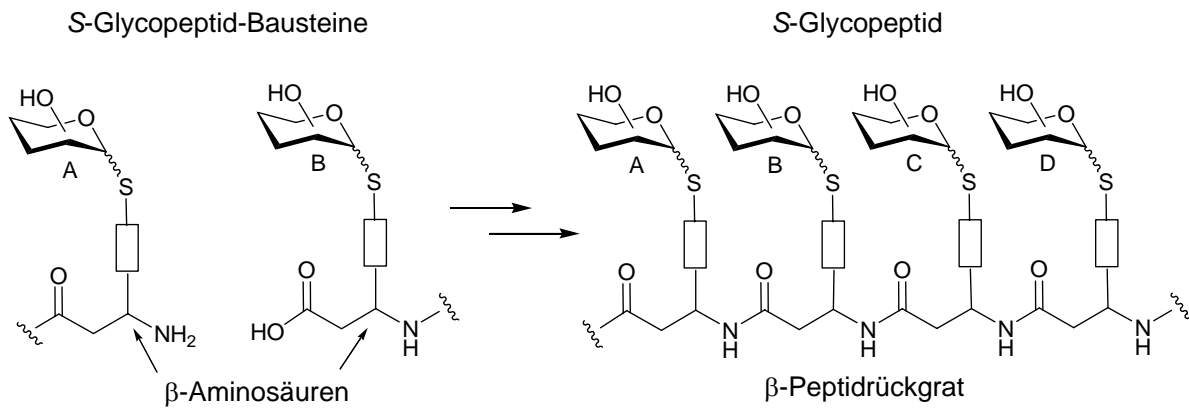
In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues sehr effizientes Verfahren zur Synthese neuer *S*-Glycopeptide entwickelt, das sich ausgezeichnet zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen eignet und einen hohen Glycosylierungsanteil unterschiedlichster Zucker aufweist.

Bei dem Synthesekonzept wurde auf eine große Diversität einzelner *S*-Glycopeptid-Bausteine Wert gelegt, die aus einem Zuckerrest über einen Spacerteil mit einer β -Rückgrataminosäure verknüpft sind. Für die Bausteinsynthese wurden leicht zugängliche 1-Thioglycopyranosen über eine Mitsunobu-Reaktion mit Aminoalkoholen zu Thioethern verknüpft und die freie Aminofunktion mit einer Fmoc-geschützten Asparaginsäure peptidisch gekoppelt. Da Aminoalkohole leicht aus den Aminosäuren und andern Naturstoffen zugänglich sind, ist eine breite Variation der *S*-Glycopeptid-Bausteine unter sehr milden Reaktionsbedingungen möglich. Eine weitere Variante über eine 1,3-dipolare Cycloaddition ermöglichte die Synthese von Bausteinen mit 1,2,3-Triazol-Spacern. Durch Optimierung einzelner Syntheseschritte konnten die *S*-Glycopeptid-Bausteine mit geringem Aufwand und guten Ausbeuten (50-90%) hergestellt werden.

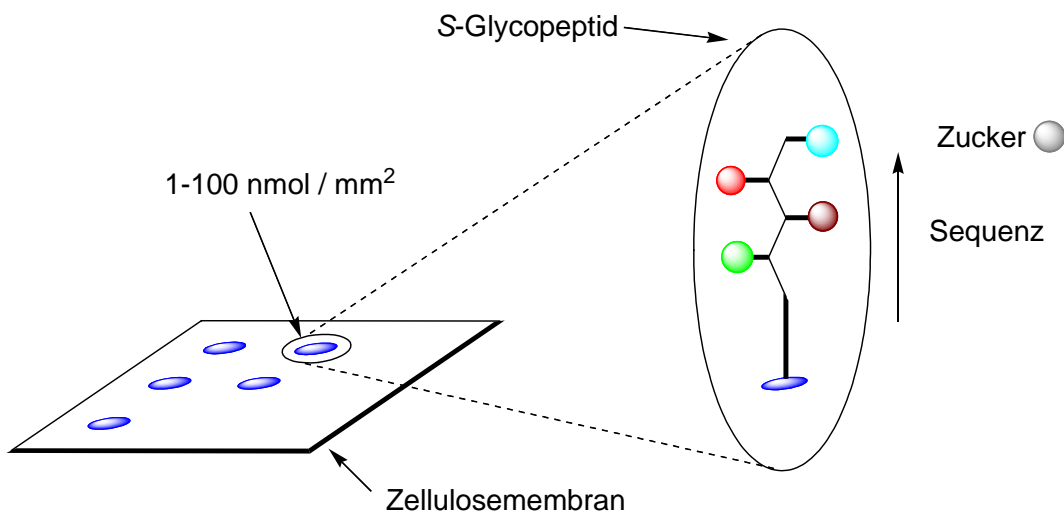


Zur Synthese der *S*-Glycopeptide wurde eine SPOT-Synthese über eine Fmoc-Strategie auf Zellulosemembranen ausgearbeitet. Dazu wurden verschiedene Linkersysteme und Aktivierungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit untersucht. Dabei zeigte ein sauer spaltbarer Rink-Amid-Linker optimale Eigenschaften. Über MALDI-TOF konnte gezeigt werden, dass pentafluorphenolaktivierte *S*-Glycopeptid-Bausteine unter Zugabe von katalytischen Mengen an Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-on (HODhbt) zu einem quantitativen Umsatz der Bausteine führte und reine *S*-Glycopeptide erhalten wurden. Durch einen schrittweisen Aufbau über

die β -Asparaginsäure der *S*-Glycopeptid-Bausteine konnte ein lineares *S*-Glycopeptid aufgebaut werden.

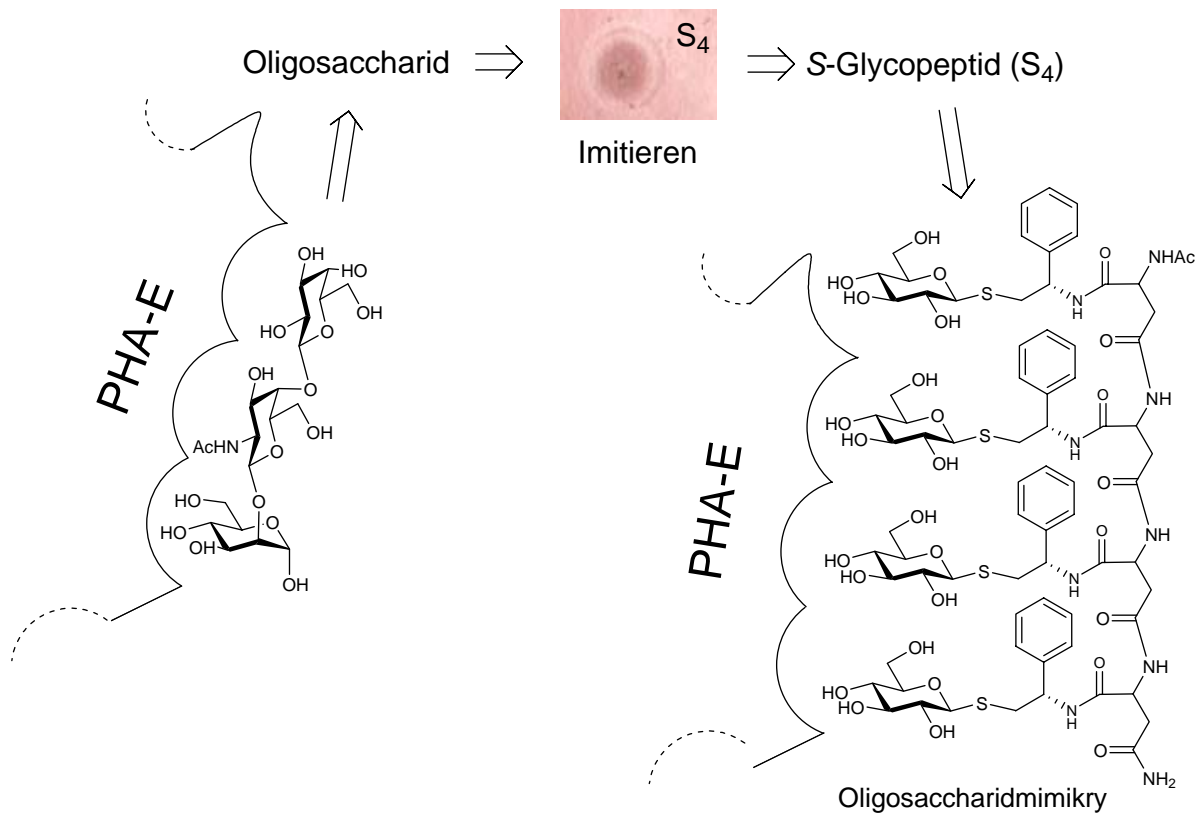


Mit 4 *S*-Glycopeptid-Bausteinen wurden über eine kombinatorische Parallelsynthese mit einem SPOT-Roboter 256 neue *S*-Glycopeptide auf einer Zellulosemembran synthetisiert. Dabei waren pro Bibliothek ungefähr 10 mg Ausgangssubstanz an Baustein notwendig, so dass eine Erzeugung größerer Bibliotheken gut durchführbar ist. Die Automatisierung und die Verwendung der festen Phase reduzierten den Syntheseaufwand, und die parallele Anordnung der *S*-Glycopeptide auf der Membran erleichterte eine schnelle Zuordnung der *S*-Glycopeptid-Sequenz zu jedem SPOT.



Um ein Screening mit Lectinen durchzuführen, wurden die Zucker der *S*-Glycopeptide auf der Zellulosemembran deacetyliert und in einer Pufferlösung kurz konditioniert, so dass die *S*-Glycopeptide vollständig hydratisiert vorlagen. Um die Anbindung der Lectine sichtbar zu machen, wurde ein Färbereassay auf der Basis eines enzymatischen ELISA-Tests entwickelt. Dabei zeigte die Verwendung von peroxidasemarkierten Lectinen in Verbindung von 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) als Färbereagenz eine gut reproduzierbare, spezifische Anfärbung der Spots auf den Zellulosemembranen.

Über das Screening einer 256er Bibliothek mit dem Lectin *Galanthus nivalis* (GNA) konnte gezeigt werden, dass die Spacer auf die molekulare Erkennung des Lectins Einfluss haben. Dabei können die Spacer selbst aktiv an der Erkennung teilnehmen oder durch eine Konformationsänderung des Glycopeptids zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Erkennung führen. Sicher kann auch gesagt werden dass *S*-Glycopeptide mit aromatischen Spacern zu einer höheren Affinität geführt haben, aber der Spacer alleine von den Lectinen nicht erkannt wurde. So ist es wichtig, in der Zukunft zu untersuchen, welchen Einfluss die Spacer und die Rückgrataminosäure auf die gesamte Konformation des Glycopeptids haben und wie sich die einzelnen Zucker um das Rückgrat anordnen. Bei einem weiteren Lectin-Screening mit *Phaseolus vulgaris* E (PHA-E), das nur Oligosaccharide mit der kleinsten Struktureinheit GalNAc β (1,2)Man erkennt, konnte ein tetrameres *S*-Glycopeptid mit hoher Affinität identifiziert werden.



Somit konnte gezeigt werden, dass die *S*-Glycopeptide in der Lage sind Oligosaccharide zu imitieren und eine neue Klasse an Oligosaccharidmimetika darstellen, die folgende Eigenschaften aufweisen:

- Einfache Synthese über Peptidrückgrat bei milden Fmoc-Bedingungen
- Sehr gute Variabilität der Zuckerreste im *S*-Glycopeptid durch die Bausteine
- Große Vielfalt an neuen *S*-Glycopeptiden über kombinatorische Parallelsynthese
- Gute Modellierung der *S*-Glycopeptide über Strukturänderung der Bausteine

- Reagenzien- und Zeitersparnis durch automatisierte SPOT-Synthese
- Hohe Reinheit der *S*-Glycopeptide über Festphasensynthese
- Beständigkeit gegen enzymatischen Abbau für *in vivo*-Tests
- Abspaltung der *S*-Glycopeptide vom Träger für weitere Anwendungen
- Direktes Lectin-Screening großer Bibliotheken in Array-Anordnung

Der hohe Glycosylierungsanteil durch unterschiedlichste Zucker und ihre leichte Zugänglichkeit eröffnen damit für die neuen *S*-Glycopeptide vielseitige Anwendungen als Oligosaccharidmimetika. Durch Kenntnis der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen zwischen den Bausteinen und der Struktur des Glycopeptids könnten die neuen *S*-Glycopeptide ein sehr nützliches Werkzeug bei der Suche nach neuen Lectin-Rezeptoren sein.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. K. Lindhorst "Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry" Wiley-VCH: Weinheim, Deutschland **2000**, Kap.6.1, 152.
- [2] R. A. Laine, *Glycobiology* **1994**, *4*, 759.
- [3] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740-764.
- [4] O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214-246.
- [5] R. C. Bertozzi, *PNAS* **2001**, *98*, 12870-12871.
- [6] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, *291*, 2370-2376.
- [7] N. Sharon, H. Lis, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- [8] J. S. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-911.
- [9] P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446-2471.
- [10] T. K. Lindhorst, *Chemie in Unserer Zeit* **2000**, *34*, 38-52.
- [11] P. H. Seeberder, W.-C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349-4393.
- [12] T. Ziegler, D. Rösseling, L. R. Subramanian, *Tetrahedron Assym.* **2002**, *13*, 911-914.
- [13] C. R. Bertozzi, L. L. Kieseling, *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.
- [14] N. Jenkins, R. B. Parekh, D. C. James, *Nature Biotechnol.* **1996**, *14*, 975.
- [15] A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2364-2369.
- [16] S. Hase, N. Nishimura, S. Kawabata, S. Iwanaga, T. Ikenaka, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 872-883.
- [17] H. Schachter, I. Brockhausen "Glycoconjugates" Marcel Dekker: New York 1992, H. J. Allen, 163-332.
- [18] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-634.
- [19] E. G. Berger, E. Buddecke, J. P. Kammerling, A. Kobata, J. C. Paulson, J. F. G. Vliegthart, *Experimenta* **1982**, *38*, 1129-1139.
- [20] G. J. Boons, *Contemp. Org. Synth.* **1996**, *3*, 173.
- [21] G. J. Boons, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1095.
- [22] K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1503.
- [23] D. M. Whitfield, S. P. Douglas, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 5.
- [24] H. Paulsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 155.
- [25] R. Geurtsen, D. S. Holmes, G.-J. Boons, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8145-8154.
- [26] S. Meththa, B. M. Pinto, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3269-3276.
- [27] H. M. I. Osborn "Carbohydrates: Best Synthetic Methods" Academic Press: England **2003**, 1-427.
- [28] S. H. Khan, R. A. O'Neill "Modern Methods in Carbohydrate Synthesis" Harwood Academic: Amsterdam **1996**.
- [29] F. Barresi, O. Hindsgaul "Modern Synthetic Methods" Helvetica Chimica Acta: Basel **1995**, 281-330.
- [30] J.-P. Praly, R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 213-223.
- [31] E. Juaristi, G. Cuevas, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5019-5087.
- [32] F. Barresi, O. Hindsgaul, *Front. Nat. Res.* **1996**, *1*, 251.
- [33] T. Ziegler, G. Lemanski, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3367-3369.
- [34] R. R. Schmidt, J. Michael, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 731-732.
- [35] P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem* **1997**, *52*, 179.

- [36] K. Igarashi, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1977**, *34*, 243-283.
- [37] D. R. Mootoo, P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5583-5584.
- [38] G. J. Boons, T. Stauch, *Synlett* **1996**, 906.
- [39] J. C. McAuliffe, O. Hindsgaul, *Synlett* **1998**, 307.
- [40] T. K. Lindhorst "Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry" Wiley-VCH: Weinheim **2000**, Kap 4.5, 91.
- [41] B. G. Davis, *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **2000**, 2137-2160.
- [42] C. H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521.
- [43] V. Kren, J. Thiem, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 463.
- [44] H. M. I. Osborn, T. H. Khan, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1807.
- [45] P. H. Seeberger, W.-C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349-4349.
- [46] C.-H. Wong "Carbohydrate-based Drug Discovery" Wiley-VCH: Weinheim **2003**, 1-904.
- [47] Y. Chapleur "Carbohydrate mimics" Wiley-VCH: Weinheim **1998**, Kap. 4, F. Nicotra, 67-83.
- [48] L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1384-1390.
- [49] B. G. Davis, *J. Chem. Soc.: Perkin Trans. 1* **1999**, 3215-3237.
- [50] T. K. Lindhorst, *Topics in Curr. Chem.* **2002**, *218*, 201-235.
- [51] B. K. Brandley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivasatava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology* **1993**, *3*, 633-636.
- [52] J. Y. Ramphal, Z. L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S. A. DeFrees, F. C. J. Gaeta, *Med. Chem.* **1994**, *37*, 3459-3463.
- [53] W. Stahl, U. G. Kretschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2186-2188.
- [54] V. Kamath, J. Sadowska, S. Nilar, D. R. Bundel, O. Hindsgaul, *Synlett* **2003**, *9*, 1323-1326.
- [55] R. Banteli et al., *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2893.
- [56] C.-Y. Tsai, X. Huang, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9499.
- [57] R. Roy, *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21*, 769-798.
- [58] E. Y.-L. Kim, C. Gronewold, A. Chatterjee, C.-W. von der Lieth, C. Klien, B. Schmauser, M. Wiessler, E. Frei, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 422-431.
- [59] S. Hakomori, *Acta Anat.* **1998**, *161*, 79-90.
- [60] A. W. Gruner, E. Locardi, E. Lohof, H. Kessler, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491-514.
- [61] Y. Suhara, M. Izumi, M. Ichikawa, M. Penno, Y. Ichikawa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7167.
- [62] J. M. Kim, R. Roy, *Carbohydr. Res.* **1997**, *298*, 173.
- [63] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvery, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
- [64] J. Holmgren, A. M. Svennerholm, *Gastroenterology Clinics of North America* **1992**, *21*, 283-302.
- [65] E. A. Merretti, W. G. J. Hol, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 165-171.
- [66] A. A. Lindberg, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1779-1785.
- [67] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754.
- [68] H. Ling et al., *Biochemistry* **1998**, *37*, 1777-1788.
- [69] C. M. Taylor, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11317.
- [70] H. Paulsen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 823.

- [71] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron Asym.* **1999**, *10*, 3045.
- [72] R.R. Herr, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2444-2447.
- [73] J. B. Weiss, C. J. Lote, H. Bobinski, *Nature New Biology* **1971**, *234*, 25-26.
- [74] G. R. Fenwick, R. K. Heaney, W. J. Mullin, *CRC Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **1983**, *18*, 123-201.
- [75] W. P. Burmeister, S. Cottaz, H. Driguez, R. Iori, S. Palmieri, B. Henrissat, *Structure* **1997**, *5*, 663-675.
- [76] D. Horton, J. D. Wander "Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry", Academic Press: New York, **1990**, Vol. 4B, 799.
- [77] H. Driguez, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 311-318.
- [78] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay "Carbohydrates in Chemistry and Biology" **2000**, Wiley-VCH: Weinheim, Kap. 21.1, 531-564.
- [79] S. B. Cohen, R. L. Halcomb, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6145-6152.
- [80] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay "Carbohydrates in Chemistry and Biology" **2000**, Wiley-VCH: Weinheim, Kap. 4.1, 91-134.
- [81] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202.
- [82] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay "Carbohydrates in Chemistry and Biology" **2000**, Wiley-VCH: Weinheim, Kap. 21.9.1, 558-564.
- [83] K. Mazeau, I. Tvaroska, *Carbohydr. Res.* **1992**, *225*, 27-41.
- [84] K. Bock, J. O. Duus, J. Refn, *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 51-67.
- [85] U. Nilsson, R. Johansson, G. Magnusson, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 295-302.
- [86] B. Aguilera, J. Jiménez-Barbero, Fernandez-Mayoralas, *Carbohydr. Res.* **1998**, *308*, 19-27.
- [87] K. Bock, J. Defaye, H. Driguez, E. Bar-Guillox, *Eur. J. Biochem.* **1983**, *131*, 595-600.
- [88] A. Geyer, G. Hummel, T. Eisele, S. Reinhardt, R. R. Schmidt, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 981-988.
- [89] S. Pérez, C. Vegelati, *Acta Crystallogr. Sect. B*, **1984**, *40*, 294-299.
- [90] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-601.
- [91] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495-4537.
- [92] E. Bousquet, A. Spadaro, M. S. Pappalardo, R. Bernardini, R. Romeo, L. Panza, G. Ronisvalle, *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 527-541.
- [93] P. C. Ho, D. A. Mutch, K. D. Winkel, *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 477-483.
- [94] S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 1623.
- [95] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, *4*, 525-542.
- [96] P. L. Nguyen, G. A. Niehans, D. L. Cherwitz, Y. S. Kim, S. B. Ho, *Tumor Biol.* **1996**, *17*, 176.
- [97] S. Ogata, H. Uehara, A. Chen, S. H. Itzkowitz, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5971.
- [98] M. A. Hollingsworth, J. M. Strawhecker, T. C. Caffrey, D. R. Mack, *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 198.
- [99] M. D. Walsh, M. A. McGuckin, P. L. Devine, B. G. Hohn, R. G. Wright, *J. Clin. Pathol.* **1993**, *46*, 922.
- [100] N. Porchet et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *175*, 414.
- [101] T. F. Orntoft, N. Harving, N. C. Langkilde, *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 666.
- [102] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366.
- [103] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-911.
- [104] L. Käsbeck, H. Kessler, *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 165-167.
- [105] D. P. Galonić, W. A. van der Donk, D. Y. Gin, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5997-6006.

- [106] S. Knapp, D. S. Myers, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2995-2999.
- [107] X. Zuh, K. Pachamuthu, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5641-5651.
- [108] R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotech* **1996**, *8*, 79.
- [109] R. Roy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2571-2573..
- [110] R. Roy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1058.
- [111] S.-I. Nishimura, K. B. Lee, K. Matsuoka, Y. C. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *199*, 249.
- [112] N. V. Bovin, H. J. Gabius, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 413-421.
- [113] N. V. Bovin, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 431-446.
- [114] D. Rösling, *Dissertation*, Universität Köln, **2001**.
- [115] T. Ziegler, D. Rösling, L. R. Subramanian, *Tetrahedron Assym.* **2002**, *13*, 911-914.
- [116] D. F. Hook, F. Gesier, C. Noti, P. Kast, D. Seebach, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 691-706.
- [117] P. Chakraborty, U. Diederichsen, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3207-3216.
- [118] V. Gil, A. J. MacLeod, *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2071.
- [119] R. R. Herr, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2444.
- [120] R. J. Ferrier, R. H. Furneaux, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 63.
- [121] V. Pedretti, A. Veyrières, P. Sinaÿ, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 77.
- [122] R. R. Schmidt, M. Stumpp, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1249.
- [123] M. J. Camarasa, P. Fernández-Resa, M. T. G. López, F. G. Heras, P. P. Méndez-Castrillón, A. S. Felix, *Synthesis* **1984**, 509.
- [124] P. Fügedi, P. J. Garegg, S. Oscarson, G. Rosén, B. A. Silwanis, *Carbohydr. Res.* **1991**, *211*, 157.
- [125] D. Horton, *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 433-437.
- [126] N. J. Leonard, W. C. Wildman, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3101.
- [127] R. T. Bibart, K. W. Vogel, D. G. Drucekkammer, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2903-2909.
- [128] T. Sumi, *Jpn. Kokai. Tokkyo Itho JPN.* **1983**, *5849*, 359.
- [129] E. Beretta, M. Ciquini, S. Colonna, R. Fornasier, *Synthesis* **1974**, 425-426.
- [130] K. Mori, Y. Nakamura, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 4170-4172.
- [131] M. Elofsson, B. Walse, J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7613-7616.
- [132] L. A. Salvador, M. E. Elofsson, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5623-5656.
- [133] C. Kallus, T. Opatz, T. Wunberg, W. Schmidt, S. Henke, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7783-7786.
- [134] K. N. Gurudutt, L. J. M. Rao, S. Rao, S. Srinivas, *Carbohydr. Res.* **1996**, *285*, 159-165.
- [135] F. Takayoshi, C. Mitsutaka, K. Haruo, T. Toshio, S. Manabu, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2002**, *21*, 287-292.
- [136] K. L. Matta, R. N. Girotra, J. J. Barlow, *Carbohydrate Research* **1975**, *43*, 101-109.
- [137] D. Horton, M. L. Wolfrom, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 1794-1800.
- [138] M. Cerny, J. Stanek, J. Pacak, *Mh. Chem.* **1962**, *94*, 290-294.
- [139] S. Knapp, D. S. Myers, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2995-2999.
- [140] P. L. Durette, T. Y. Shen, *Carbohydr. Res.* **1980**, *81*, 261-274.
- [141] Vogel „*Textbook of Practical Organic Chemistry*”, British Library, Grosbritannien, **1989**, Kap. 5.17, 789.
- [142] L. Jobron, G. Hummel, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2265-2267.

- [143] J. M. Lacombe, N. Rakotomanomana, A. A. Pavia, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4293-4296.
- [144] W. Pilleiderer, E. Bühler, *Chem. Ber.* **1966**, 89,3022.
- [145] F. M. Idatullin, K. A. Shabalin, *Synthetic Commun.* **2000**, 30, 2819-2823.
- [146] D. Francois, F. O. Andersson, S. Braun, R. Roy, *Synthesis* **1992**, 618-621.
- [147] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-4.
- [148] J.H. Hillhouse, Jr. Valentine, H. Donald, *Synthesis* **2003**, 317-334.
- [149] T. Tsunoda, Y. Yamamiya, S. Ito, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1639-1642.
- [150] J. R. Falk, J. Lai, S. Cho, J. Yu, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2903-2906.
- [151] J. Lai, J. Yu, R. D. Hawkins, J. R. Falk, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5691-5694.
- [152] J. A. Dodge, J. I. Trujillo, M. Presnell, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 234-236.
- [153] P. Lan, J. A. Porco, Jr. M. S. South, J. J. Parlow, *J. Combi. Chem.* **2003**,
- [154] R. A. Falconer, I. Jablonkai, I. Toth, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 8663-8666.
- [155] D. L Huges, *Org. React.* **1992**, 42, 335-656.
- [156] W. R. Roush, X. Lin, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5740-5742.
- [157] D. L Huges, R. A. Reamer, J. J. Bergan, E. J. J. Grabowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6487-6491.
- [158] T. K. Lindhorst „*Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*”, Weinheim Wiley-VCH, **2000**, Kap. 6.2.1, 156.
- [159] A. M. Jansson, P. M. ST. Hilaire, M. Meldal „*Naturally Occurring Carbohydrate Peptide Linkages*”, Houben-Weyl, Volume E 22b, **2002**, Kap. 6.3.1, 235.
- [160] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1-27.
- [161] G. Kokotos, *Synthesis* **1990**, 299-301.
- [162] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Maienhofer, E. O. Lundell, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, 15, 59.
- [163] D. A. Thayer, H. N. Yu. M. C. Galan, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 4672-4675.
- [164] F. Z. Dörwald „*Organic Synthesis on Solid Phase*” Wiley-VCH: Weinheim **2002**, Kap. 10.1, 291.
- [165] J. Podlech „*tert-Butoxycarbonyl Group*”, Houben-Weyl, Volume E 22a, **2002**, Kap. 2.1.1.1.3.1.1.6, 93.
- [166] P. S. Chen, H. K. Mitchell, M. Neuweg, *Insect Biochem.* **1978**, 8, 279.
- [167] K. J. Kramer, T. L. Hopkins, R. F. Ahmed, D. Mueller, G. Lookhart, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 205, 146.
- [168] D. H. Williams, V. Rajananda, M. P. Williamson, G. Bojesen, *Top. Antibiot. Chem.* **1980**, 5, 123.
- [169] P. Messner, R. Christian, J. Kolbe, G. Schultz, U. B. Steytr, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 2236.
- [170] P. Messner, U. B. Steytr, *Glycobiology* **1991**, 1, 545.
- [171] I. R. Rodriguez, W. J. Whelan, *J. Biochem. Biophys.* **1985**, 132, 829.
- [172] G. D. Campbell, P. Cohen, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 200, 625.
- [173] C. Smythe, P. Cohen, *Int. J. Biochem.* **1991**, 23, 1335.
- [174] S. Cao, F. Hernández-Matéo, R. Roy, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, 17, 609-631.
- [175] S. Cao, S. J. Meunier, F. O. Anderson, M. L. Roy and R. Roy, *Tetrahedron Asym.* **1994**, 5, 2303-2312.
- [176] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5401.
- [177] M. Goodman, W. J. McGahren, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3028.
- [178] J. Maier, *Dissertation*, Universität Tübingen, voraussichtlich **2006**.

- [179] W.-Q. Fan, A. R. Katritzky „*Comprehensive heterocyclic chemistry II*“ Elsevier Science: Oxford, **1996**, 4, 1-126.
- [180] M. J. Genin et al., *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 953-970.
- [181] A. Brik, J. Alexandratos, Y-C. Lin, J. H. Elder, A. J. Olson, A. Wlodawer, D. S. Goodsell, C-H. Wong, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1167-1169.
- [182] R. Alvarez, S. Velazquez, F. San, S. Aquaro, C. De, C. F. Perno, A. Karlsson, M. J. Camarasa, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 4185-4194.
- [183] S. Velazquez, R. Alvarez, C. Perez, F. Gago, C. De, C. F. Perno, J Balzarini, M. J. Camarasa, *Anivir. Chem. Chemother.* **1998**, 9, 481-489.
- [184] Brockunier et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2111-2114.
- [185] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. F. Valery, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708-2711.
- [186] R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 613-628.
- [187] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2494-2507.
- [188] B. H. M. Kuijpers, S. Grootuys, A. R. Keereweer, P. J. L. M. Quaeflieg, R. H. Blaauw, F. L. Van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Org. Lett.* **2004**, 6, 3123-3126.
- [189] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007-2010.
- [190] P. Zanirato, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2789-2796.
- [191] D. J. Hlasta, J. A. Ackerman, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6184-6189.
- [192] N. Spencer, D. Philp, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4945-4954.
- [193] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [194] F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Organic Lett.* **2003**, 5, 1951-1954.
- [195] C. W. Tornøe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 314-324.
- [196] T. Markidis, G. Kokotos, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 1919-1923.
- [197] H. Wolff „*Organic Reactions*“, John Wiley & Sons: New York, **1947**, Volume III, 327-328.
- [198] Braun, *Liebigs A. Chem.* **1931**, 490, 125.
- [199] Gmelin Handbook „*Hydrogen Azide*“ B2, Kap:2.3.1, 87.
- [200] D. Klamann „*Organische Stickstoff-Verbindungen*“, Houben-Weyl, Band E 16a, **1990**, 1244.
- [201] E. Müller „*Methoden der Organischen Chemie – Stickstoffverbindungen I*“, Houben-Weyl, Band X/3, **1965**, 781-785.
- [202] F. E. Ziegler, K. W. Fowler, W. B. Rodgers, R. T. Wester „*Organic Synthesis*“ Wiley: New York, **1993**, Collect. Vol. VIII, 586.
- [203] R. B. Merrifield, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161-214.
- [204] B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 501.
- [205] N. Sewald, H.-D. Jakubke „*Peptides: Chemistry and Biology*“ Wiley-VCH: Weinheim **2002**, Kap.: 4.5, 209.
- [206] H. M. Geysen, S. J. Bartling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 3998-4002.
- [207] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 82, 5133-5135.
- [208] A. R. Brown, P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Synlett* **1998**, 817-827.
- [209] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 37, 487-493.
- [210] R. Frank, R. Döring, *Tetrahedron* **1988**, 44, 6031-6040.

- [211] J. Eicher, M. Beyermann, M. Bienert, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1989**, *54*, 1746-1752.
- [212] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- [213] M.-r. Lee, I. Shin, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2941-2944.
- [214] K.-y. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 782-799.
- [215] H.-J. Müller, T. Röder "Der Experimentator Microarrays" Spektrum: Elsevier, **2004**, Kap. 1, 2.
- [216] P. H. Seeberger, W.-C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349-4393.
- [217] A. Prabhat, B. Angela, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 555-563.
- [218] Kanie, F. Barresi, Y. Ding, J. Labbe, A. Otter, L. S. Forsberg, B. Ernst, O. Hindsgaul, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2720-2722.
- [219] R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, *274*, 1520-1522.
- [220] M. Meldal, K. Bock, *Tetrahedron Lett.* 1990, *31*, 6987-6990.
- [221] P. M. St. Hilaire, M. Meldal, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1210-1228.
- [222] P. M. St. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320.
- [223] R. Frank, *J. Immun. Met.* **2002**, *267*, 13-26.
- [224] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217-9232.
- [225] R. Frank, *J. Biotechnol* **1995**, *41*, 259-272.
- [226] R. Frank, S. Hoffmann, M. Kiss, H. Lahmann, W. Tegge, C. Behn, H. Gausephol "Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries" VCH: Weinheim Deutschland, **1996**, 363-386.
- [227] A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 25-39.
- [228] J. Koch, M. Mahler "Peptide Arrays on Membran Supports: Synthesis and Applications" Springer: Berlin Heidelberg, **2002**, Kap. 2, 23-41.
- [229] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375-391.
- [230] F. Toepert, T. Knaute, S. Guffler, J. R. Pirés, T. Matzdorf, H. Oschkinat, J. Schneider-Mergener, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1168-1172.
- [231] U. Reineke, A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *243*, 23-36.
- [232] J. Schultz, U. Hoffmüller, G. Krause, J. Ashurst, M. J. Macias, P. Schmieder, *Nal. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 19-24.
- [233] G. Cestra, L. Castagnoli, L. Dente, Minenkova, A. Petrelli, N. Magone, U. Hoffmüller, J. Schneider-Mergener, G. Cesarei, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32001-32007.
- [234] K. Niebuhr, F. Ebel, R. Frank, M. Reinhard, E. Domann, D. U. Carl, U. Walter, F. B. Gertler, J. Wehland, T. Chakraborty, *EMBO J.* **1997**, *16*, 5433-5444.
- [235] L. J. Ball, R. Kühne, B. Hoffmann, A. Häfner, P. Schmieder, R. Volkmer-Engert, M. Hof, M. Wahl, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4903-4914.
- [236] W. J. Tegge, R. Frank, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 99-106.
- [237] J. Weiler, H. Gausephol, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2792-2799.
- [238] S. Matysiak, N. C. Hauser, S. Würtz, J. D. Hoheisel, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1289-1291.

- [239] N. Heine, T. Ast, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, L. Germeroth, H. Wenschuh, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9919-9930.
- [240] D. Scharn, H. Wenschuh, U. Reineke, J. Schneider-Mergener, L. Germeroth, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 361-370.
- [241] D. Scharn, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 507-513.
- [242] N. Heine, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 227-230.
- [243] J. Laurence, G. Hummel, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1704-1707.
- [244] M. D. Bowman, R. C. Jeske, H. E. Blackwell, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2019-2022.
- [245] D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 403-473.
- [246] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, W. Wagenknecht "Comprehensive Cellulose Chemistry" Wiley-VCH **1998**, Vol. 1.
- [247] J. Koch, M. Mahler "Peptide Arrays on Membran Supports: Synthesis and Applications" Springer: Berlin-Heidelberg **2002**, Kap. 2, 31.
- [248] R. Volkmer-Engert, B. Hoffmann, J. Schneider-Mergener, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1029-1032.
- [249] K. Licha, S. Bahargava, C. Rheinländer, A. Becker, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1711-1715.
- [250] T. Ast, N. Heine, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4317-4318.
- [251] A. W. Czarnik "Solid-Phase Organic Synthesis" John Wiley & Sons: USA, **2001**, Vol. 1, Kap.3, S.17.
- [252] www.rapp-polymere.com
- [253] www.poly-an.de
- [254] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [255] E. Atherton, W. Hübscher, R. C. Sheppard, V. Wolley, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 833-839.
- [256] J. Jones "The Chemical Synthesis of Peptides" Oxford University Press: Oxford, **1994**.
- [257] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 125-142.
- [258] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1575.
- [259] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Am. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 610.
- [260] A. Ajayaghosh, V. N. R. Pillai, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6661.
- [261] C. P. Holmes, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370.
- [262] C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318-2319.
- [263] L. Jobron, G. Hummel, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1704-1707.
- [264] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645-4648.
- [265] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [266] M. Goodman, A. Felix, C. Toniolo, Houben-Weyl "Synthesis of Peptides and Peptidomimetics" Thieme: Stuttgart **2002**, Kap. 3, E 22 a, 425.
- [267] H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 189.
- [268] J. Izdebski, D. Kuncce, *J. Peptide Sci.* **1997**, *3*, 141.
- [269] P. Rovero, S. Pegoraro, F. Bonelli, A. Triolo, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2199.
- [270] A. El-Faham, *Chemistry Lett.* **1998**, 671-672.
- [271] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.

- [272] M. Meldal, K. Bock, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6987.
- [273] I. Christiansen-Brams, M. Meldal, K. Bock, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3315.
- [274] T. Ziegler, D. Rösling, L. R. Subramanian, *Tetrahedron: Asym.* **2002**, *13*, 911-914.
- [275] S. T. Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5560.
- [276] J. Koch, M. Mahler "Peptide Arrays on Membrane Support" Springer Lab Manual: Berlin Heidelberg **2002**, G. Petersen, Kap. 3.
- [277] J. Koch, M. Mahler "Peptide Arrays on Membrane Support" Springer Lab Manual: Berlin Heidelberg **2002**, N. Zander, H. Gausephol, Kap. 2.
- [278] Pure. Appl. Chem. 1977, *49*, 885.
- [279] C. Schmuck, H. Wennemers "Highlights in Bioorganic Chemistry" Wiley-VCH: Weinheim **2004**, Kap. 6.2, 485-500.
- [280] H.-J. Müller, T. Röder "Microarrays" Spektrum Elsevier GmbH: München **2004**, Kap.2.1, 7.
- [281] C. M. Perou, *Nature* **2000**, *406*, 747.
- [282] J. L. DeRisi, V. R. Lyer, P. O. Brown, *Science* **1997**, *278*, 680.
- [283] M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vöhringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 160.
- [284] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *289*, 1760.
- [285] T. P. Kanoelani, L. Krishnamoorthy, D. Slawek, L. K. Mahal, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 985-989.
- [286] S.-Y. Seong, C.-Y. Choi, *Proteomics* **2003**, *3*, 2176-2189.
- [287] M. Kleinert, N. Röckendorf, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3931-3940.
- [288] H.-J. Müller, T. Röder "Microarrays" Spektrum Elsevier GmbH: München **2004**, Kap.8, 186.
- [289] D. Kambhampati "Protein Microarray Technologie" Wiley-VCH: Weinheim **2004**, Kap. 1, 5.
- [290] R. D. Kensinger, B. C. Yowler, A. J. Benesi, C. L. Schengrund, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 349.
- [291] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotech.* **2002**, *20*, 275.
- [292] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 443.
- [293] S. Park, I. Shin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3180.
- [294] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O'Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 379.
- [295] I. Shin, S. Park, M.-r. Lee, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2894-2901.
- [296] D. M. Ratner, E. W. Adams, M. D. Disney, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1375.
- [297] S. Park, M.-r. Lee, S.-J. Pyo, I. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4812-4819.
- [298] D. B. Werz, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2194-3206.
- [299] User's Guide "Auto-Spot Robot ASP 222" Intavis AG **2001**.
- [300] Thomas Schreiner, Universität Tübingen, **2003**.
- [301] N. Heine, T. Ast, J. Schneider-mergener, U. Reineke, L. Germeroth, H. Wenschuh, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9919-9930.
- [302] C. O. Mellet, J. M. G. Fernández, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 819-822.
- [303] D. B. Werz, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3194-3206.
- [304] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.

- [305] J. M. de la Fuente, S. Penadés, *Tetrahedron: Assym.* **2005**, *16*, 387-391.
- [306] A. C. de Souza, K. M. Halkes, J. D. Meeldijk, A. J. Verkleij, J. F. G. Vliegthart, J. P. Kamerling, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 828-831.
- [307] D. Beccati, K. M. Halkes, G. D. Batema, G. Guillena, A. C. de Souza, G. van Kotten, J. P. Kamerling, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1196-1203.
- [308] S. Dziadek, H. Kunz, *The Chemical Record* **2004**, *3*, 308-321.
- [309] P. M. Rendle, A. Seger, J. Rodrigues, N. J. Oldham, R. R. Bott, J. B. Jones, M. M. Cowan, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4750-4751.
- [310] K. Benzouška, *Rev. in Mol. Biotech.* **2002**, *90*, 269-290.
- [311] D. Lagnoux, T. Darbre, M. L. Schmitz, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3941-3950.
- [312] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-911.
- [313] J. Rojo, V. Díaz, J. M. de la Fuente, I. Segura, A. G. Barrientos, H. H. Riese, A. Bernad, S. Penadés, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 291-297.
- [314] A. Dell, H. R. Morris, *Science* **2001**, *291*, 2351-2356.
- [315] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Commun.* **1981**, 325-327.
- [316] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37.
- [317] M. Karas, A. Ingendoh, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Mass Spectrom.* **1989**, *18*, 841.
- [318] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3281-3287.
- [319] R. Zenobi, R. Knochenmuss "Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry" *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 337-366.
- [320] Y. Dai, R. M. Whittall, L. Li, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2494-2500.
- [321] B. Spengler, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *J. of Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6502.
- [322] D. A. Allwood, P. E. Dyer, R. W. Dreyfus, *Rapid Commun. In Mass Spec.* **1997**, *11*, 499-503.
- [323] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Rapid Commun. In Mass Spec.* **1997**, *11*, 1483-1492.
- [324] F. Dubois, R. Knochenmuss, R. J. J. M. Steenvoorden, K. Breuker, R. Zenobi, *Eur. Mass Spec.* **1996**, *2*, 167-172.
- [325] M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby, *Rapid Commun. In Mass Spec.* **1997**, *11*, 951-962.
- [326] M. Kussmann et al., *J. of Mass Spec.* **1997**, *32*, 593-601.
- [327] N. Sharon, H. Lis, *Science* **1989**, *246*, 227-233.
- [328] N. Sharon, H. Lis "Lectins" Kluwer Academic Publisher: Niederlande **2003**, 1-441.
- [329] N. Sharon, H. Lis, *Scientific American* **1993**, *268*, 74-81.
- [330] J. M. Van Damme "Handbook of Plant Lectins" Wiley: England **1998**, 1-465.
- [331] N. Sharon, H. Lis, *Glycobiology* **2004**, *11*, 53R-62R.
- [332] D. C. Kilpatrick "Handbook of Animal Lectins" Wiley: England **2000**, 1-466.
- [333] P. R. Crocker "Mammalian Carbohydrate Recognition Systems" Springer: Heidelberg **2001**, 1-249.
- [334] C. M. Isacke, M. A. Horton "The Adhesion Molekule" Academic Press: England, Californien **2000**, 1-309.
- [335] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 441-473.
- [336] I. Hecht "Bioorganic Chemistry: I Carbohydrates" Oxford University Press: New York **1999**, Kap. 11, F. A. Quiocho, N. K. Vyas, 441-457.

- [337] M. E. Taylor, K. Drickamer "Glycobiology" Oxford University Press: England **2003**, Kap. 10, 153-166.
- [338] E. J. Toone, *Cur. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 622-635.
- [339] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 555-578.
- [340] P. W. Wang, C. R. Bertozzi "Glycochemistry" Marcel Dekker: New York **2001**, Kap. 8, D. A. Mann, L. L. Kiesseling, 221-276.
- [341] C.-H. Wong "Carbohydrate-based Drug Discovery" Wiley-VCH: Weinheim **2003**, Kap. 22, L. L. Kiesseling, J. K. Pontrello, M. C. Schuster, 575-607.
- [342] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14922-14933.
- [343] W. J. Lees, A. Spaltenstein, W. J. E. Kingery, G. W. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3419-3433.
- [344] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4179-4190.
- [345] T. L. Lentz, *J. Gen. Virol.* **1990**, 71, 751-766.
- [346] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908-2953.
- [347] D. Voet, J. G. Voet "Biochemistry" John Wiley & Sons: New York **1995**.
- [348] L. V. Mochalova et al., *Antiviral. Res.* **1994**, 23, 179-190.
- [349] M. N. Matrosovich, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova, N. V. Bovin, *FEBS Lett.* **1990**, 272, 209-212.
- [350] R. Roy, C. A. Laferriere, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C1-C4.
- [351] R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 213-217.
- [352] A. Gamina, H. J. Jennings, C. A. Laferriere, R. Roy, *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, 6, 161-165.
- [353] S. Sabesan, J. O. Duus, S. Neira, P. Domaille, S. Kelm, J. C. Paulson, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8363-8375.
- [354] S. M. Hecht "Bioorganic Chemistry: Carbohydrates" Oxford University Press: New York **1999**, F. Tropper, M. Bednarski, Kap. 9, 335-369.
- [355] I. D. Severian "Polysaccharides" Marcel Dekker: New York **1998**, Kap 15, S.-I. Nishimura, Y. C. Lee, 523-537.
- [356] S. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3789-3800.
- [357] H. Ari, *Science* **2004**, 304, 237-242.
- [358] N. Sharon, *CMLS* **2002**, 59, 1666-1667.
- [359] C.-W. Lieth, M. Frank, T. K. Lindhorst, *Rev. in Mol. Biotech.* **2002**, 90, 311-337.
- [360] P. W. Wang, C. R. Bertozzi "Glycochemistry" Marcel Dekker: New York **2001**, Kap. 9, R. Roy, 277-305.
- [361] Y. Chapleur "Carbohydrate mimics" Wiley-VCH, Weinheim **1998**, Kap. 20, D. Zanini, R. Roy, 386-415.
- [362] A. Patel, T. K. Lindhorst, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2674-2680.
- [363] C. Kieburg, M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Synlett* **1997**, 12, 1447-1449.
- [364] K. Sadalpure, T. K. Lindhorst, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2010-2013.
- [365] W. B. Turnbull, J. F. Stoddart, *Rev. in Mol. Biotech.* **2002**, 90, 231-255.
- [366] K. Bezouška, *Rev. in Mol. Biotech.* **2002**, 90, 269-290.
- [367] R. Roy, M.-G. Baek, *Rev. in Mol. Biotech.* **2002**, 90, 291-309.
- [368] K. Sadler, J. P. Tam, *Rev. in Mol. Biotech.* **2002**, 90, 195-229.
- [369] V. Wittmann, S. Seeberger, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 918-921.

- [370] X.-L. Sun, W. Cui, C. Haller, E. L. Chaikof, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1593-1596.
- [371] J. M. Van Damme "Handbook of Plant Lectins" John Wiley & Sons: England **1998**, 1-445.
- [372] N. Sharon, H. Lis, *FASEB* **1990**, *4*, 3198-3208.
- [373] I. J. Goldstein, R.D. Poretz "The Lectins: Properties, Funktionen, and Applications in Biology and Medicine" Academic Press: Orlando USA **1986**, 33-247.
- [374] J. H. Naismith, R. A. Field, *J. of Biol. Chem.* **1996**, *271*, 972-976.
- [375] J. Petryniak, M. E. Pereira, Kabat, *Arch. of Biochem. and Biophys.* **1977**, *178*, 118-134.
- [376] E. J. M. Van Damme, A. K. Allen, W. J. Peumans, *FEBS Letters* **1987**, *215*, 140-144.
- [377] K. Kornfeld, M. L. Reitman, R. Kornfeld, *J. of Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6633-6640.
- [378] R. Kaifu, T. Osawa, *Carbohdr. Res.* **1976**, *52*, 179-185.
- [379] T. Matsuda, E. A. Kabat, A. Surolia, *Molecular Immun.* **1989**, *26*, 189-195.
- [380] D. J. Barrett, J. R. Edwards, B. A. Pietrantuono, E. M. Ayoub, *Cell. Immun.* **1983**, *81*, 287-297.
- [381] G. Richter "Praktische Biochemie" Georg Thieme Verlag: Stuttgart **2003**, *Kap. 10*, 237-258.
- [382] K. E. Geckeler, H. Eckstein "Bioanalytische und biochemische Labormethoden" Vieweg Verlag: Deutschland **2000**, *Kap 5*, 473-475.
- [383] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek "Der Experimentator: Immunologie" Spektrum / Elsevier GmbH: München **2004**, *Kap 1.4.2*, 39-49.
- [384] J. P. Tresca, R. Ricoux, M. Pontet, R. Engler, *Ann. Biol. Clin.* **1995**, *53*, 227-231.
- [385] E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, *J. Immunoassay* **1983**, *4*, 209-327.
- [386] E. A. Bayer, M. Wilchek, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 138-160.
- [387] J. L. Guesdon, T. Ternynck, *J. Histochem. Cytochem.* **1979**, *27*, 1131-1139.
- [388] T. Ternynck, S. Avrameas, *Methods Enzymol.* **1990**, *184*, 469-481.
- [389] T. Meier, F. Fahrenholz "A Laboratory Guide to Biotin-labeling in Biomolecule Analysis" Birkhäuser Verlag: Basel, Schweiz **1996**, 1-213.
- [390] J. A. Brand, C. W. V. Tsang, W. Zhou, S. B. Shukla, *BioTechniques* **1990**, *8*, 58-60.
- [391] A. Frey, B. Meckelein, D. Externest, M. A. Schmidt, *J. of Immun. Methodes* **2000**, *233*, 47-56.
- [392] R. Artuch, I. Ferrer, J. Pineda, J. Moreno, C. Busquets, P. Briones, M. A. Vilaseca, *J. of Neuroscience Methods* **2003**, *125*, 167-171.
- [393] K. Koretz, J. Leman, I. Brandt, P. Möller, *Histochem.* **1987**, *86*, 471-478.
- [394] M. L. Poor, P. F. Santa, G. S. Sittampalam, *Analytical Biochem.* **1988**, *175*, 191-195.
- [395] R. Kobayashi, Y. Tashima, *Analytical Biochem.* **1989**, *183*, 9-12.
- [396] Wolf, P. L. et al, *Enzymologia (Enzyas)* **1968**, *35*, 154.
- [397] P. R. Young, *J. of Immun. Methodes* **1989**, *121*, 295-296.
- [398] E. J. M. Van Damme, A. K. Allen, W. J. Peumans, *FEBS Letters* **1987**, *215*, 140-144.
- [399] N. Shibuya, I. J. Goldstein, E. J. M. Van Damme, *J. of Biol. Chem.* **1988**, *263*, 728-734.
- [400] E. J. M. Van Damme, H. Kaku, I. J. Goldsein, B. Peeters, F. Yagi, B. Decock, W. J. Peumans, *Eur. J. of Biochem.* **1991**, *202*, 23-30.

- [401] G. Hester, H. Kaku, I. J. Goldstein, *Nature Struct. Biology* **1995**, 2, 472-479.
- [402] N. Mahmood, A. J. Hay, *J. of Immun. Methods* **1992**, 151, 9-13.
- [403] J. Hinkula, M. Gidlund, C. Persson, A. Osterhaus, B. Wahren, *J. of Immun. Methods* **1994**, 175, 37-46.
- [404] B. A. Sela, H. Lis, N. Sharon, L. Sachs, *Biophysica Acta* **1973**, 310, 273-277.
- [405] A. Pusztai, J. C. Stewart, *Biochim. Et Biophysica Acta* **1978**, 536, 38-49.
- [406] R. D. Leavitt, R. L. Felsted, N. R. Bachur, *J. of Biolog. Chem.* **1977**, 252, 2961-2966.
- [407] J. B. Miller, C. Noyes, R. Henrikson, H. S. Kingdon, S. Yachin, *J. of Exper. Med.* **1973**, 138, 939-951.
- [408] W. P. Li, C. Zuber, *Histochemistry* **1993**, 100, 347-356.
- [409] S. Laferte, H. C. Loh, *Biochem. J.* **1992**, 283, 193-201.
- [410] W. P. Li, C. Zuber, P. U. Heitz, *American J. of Pathology* **1994**, 145, 470-480.
- [411] Y. Taeda, M. Nose, S. Hiraizumi, N. Ohuchi, *Breast Cancer Res. and Treatment* **1996**, 38, 323-324.
- [412] T. W. Hamelryck, M. H. Dao-Thi, F. Poortmans, M. J. Chrispeels, L. Wyns, R. Loris, *J. of Biolog. Chem.* **1996**, 271, 20 479-20 485.
- [413] M. H. Dao-Thi, T. W. Hamelryck, F. Poortmanns, T. A. Voelker, M. J. Chrispeels, L. Wyns, *Structure Function and Genetics* **1996**, 24, 134-137.
- [414] R. Kaifu, T. Osawa, *Carbohydr. Res.* **1976**, 52, 179-185.
- [415] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683-720.
- [416] R. A. Dwek, *Biochemistry* **2001**, 40, 3759-3766.
- [417] A. Imberty, S. Pérez, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4567-4588.
- [418] J. P. Caver, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 763-770.
- [419] Gabius et al., *Acta Anat.* **1998**, 161, 91-109.
- [420] J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, F. J. Cañada, A. Povera, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 549-555.
- [421] M. R. Wormald, A. J. Petrescu, Y.-L. Pao, A. Glithero, T. Elliott, R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 371-386.
- [422] J. Jiménez-Barbero, T. Peters "NMR Spektroskopie of Glycoconjugates" Wiley-VCH: Weinheim **2003**, T. Weimar, R. J. Woods, 111-144.
- [423] N. Aboitiz, M. Vila-Perelló, P. Groves, J. L. Asenio, D. Andreu, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1245-1255.
- [424] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem* **2004**, 5, 740-764.
- [425] H.-J. Gabius, S. Gabius "Glycoscience: Status and Perspectives" Chapman and Hall: London **1997**, R. A. Laine, 1-14.
- [426] N. Sharon, H. Lis "Lectins" Kluwer Academic Press: Niederlande **2003**, Kap. 4.3, 89-91.
- [427] H. Driguez, *ChemBioChem* **2001**, 2, 311-318.
- [428] J. Ø. Duus, C. H. Gotfredsen, K. Bock, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4589-4614.
- [429] W. C. von der Lieth, M. Frank, T. K. Lindhorst, *J. of Biotechnol.* **2002**, 90, 311-337.
- [430] N. Sharon, *Acta Anat.* **1998**, 161, 7-17.

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Oligosaccharidmimetika in Form von *S*-Glycopeptiden über eine kombinatorische SPOT-Synthese mit *S*-Glycopeptid-Bausteinen dargestellt. Dazu wurden 1-Thioglycopyranosen über eine Mitsunobureaktion mit Aminoalkoholen (Spacer) und Asparaginsäure (Peptidrückgrataminosäure) zu den *S*-Glycopeptid-Bausteinen verknüpft. Dadurch konnten die Zucker (Monosaccharide, Disaccharide) und der Spacer (n-Pentyl-, Aminosäure-, Aromat-Spacer) über die Knüpfung von enzymatisch stabilen Thioethern gut variiert werden. Eine weitere Variante über eine 1,3-dipolare Cycloaddition ermöglichte die Synthese von Bausteinen mit 1,2,3-Triazol-Spacern. Anschließend erfolgte die Synthese der *S*-Glycopeptide über quantitative Peptidkupplungsreaktionen über ein β -Asparaginsäurerückgrat einzelner *S*-Glycopeptid-Bausteine. Dafür wurde die Asparaginsäure der *S*-Glycopeptid-Bausteine mit Pentafluorphenol unter Zugabe von Hydroxy-1,2,3-benzotriazol-4-(3*H*)-on aktiviert und das *S*-Glycopeptid vom N- zum C-Terminus stufenweise über eine Fmoc-Strategie aufgebaut. Durch Automatisierung mit einem SPOT-Roboter wurden aus 4 *S*-Glycopeptid-Bausteinen 256 neue *S*-Glycopeptide auf einer Zellulosemembran (9 cm x 13 cm) synthetisiert mit denen anschließend ein Lectin-Screening durchgeführt wurde. Dazu waren die Lectine mit Peroxidase (POD) markiert und konnten über eine Farbreaktion mit 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) auf der Membran sichtbar gemacht werden. Versuche mit dem Lectin Galentus nivalis (GNA) zeigten, dass die Spacer in den *S*-Glycopeptiden einen Einfluß auf die molekulare Erkennung haben. Bei einem weiteren Screening mit Phaseolus vulgaris E (PHA-E), konnte ein tetrameres *S*-Glycopeptid mit hoher Affinität identifiziert werden. Da PHA-E laut Literatur nur GalNAc β (1,2)Man als kleinste Zucker-Einheit erkennt, wurde dadurch gezeigt, dass die neuen *S*-Glycopeptid in der Lage sind Oligosaccharide zu imitieren. Der hohe Glycosylierungsanteil mit unterschiedlichen Zuckern, ihre leichte Zugänglichkeit über die *S*-Glycopeptid-Bausteine und ihre enzymatische Beständigkeit machen die neuen *S*-Glycopeptide zu einem idealen Werkzeug zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen.

Summary

The present work describes the combinatorial SPOT synthesis of glycopeptides designed as mimics for oligosaccharides from S-glycosyl amino acid building blocks. To this extent, 1-thioglycopyranoses were condensed with aminoalcohols (spacers) and asparaginic acid (amino acid for the peptide backbone) via Mitsunobu-Reactions to afford S-glycopeptide building blocks. Sugar (mono- and disaccharides) and spacer moiety (n-pentyl-, amino acid and aromatic spacers) were varied and coupled to asparaginic acid in order to form a thioether bond stable toward enzymatic cleavage. An additional variation of the spacer moiety was established by a 1,3-dipolar cycloaddition reaction affording 1,2,3-triazole spacers. Next, S-Glycopeptides were synthesized by peptide coupling procedures in quantitative yield. For this purpose, the asparaginic moiety of the S-glycopeptide building blocks was activated by means of pentafluorophenol and 1-hydroxy-1,2,3-benzotriazole-4-(3H)-on. S-Glycopeptides were constructed stepwise starting at the N-terminus using a Fmoc strategy. Automated SPOT synthesis on cellulose membranes afforded 256 novel S-Glycopeptides from 4 S-glycopeptide building blocks followed by a screening with lectins. The lectins were labeled with peroxidase (POD) in order to enable detection of their binding through a color reaction with 3-amino-9-ethyl-carbazole (AEC) directly on the membrane. Binding studies with the lectin Galentus nivalis (GNA) showed that the spacers of the S-glycopeptides play a role in the molecular recognition of the peptides. Yet another binding screening with lectin Phaseolus vulgaris E (PHA-E) which is known to only bind to GalNAc β (1,2)Man as the smallest recognized epitope revealed that the novel S-glycopeptides can indeed mimic oligosaccharides. Thus, the highly glycosylated S-glycopeptides described here are ideal tools for studying carbohydrate-protein interactions due to their simple accessibility from suitable S-glycopeptide building blocks.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

H.-H. Brintzinger, J. Strähle, E. Lindner, G. Jung, M. Hanack, D. Oelkrug, F. F. Seelig, M. E. Maier, D. Krug, V. Hoffmann, H. Oberhammer, P. M. Selzer, N. Kuhn, H. Pommer, H.-J. Meyer, U. Nagel, V. Schurig, K. Albert, H. Eckstein, H. Kneifel, E. Schweda, H. Schott, W. Voelter, K.-P. Zeller, D. Hoffmann, W. Göpel, D. Christen, G. Gauglitz, K.-H. Wiesmüller, G. Reinhardt, U. Weimar, G. Häfelinger, Th. Ziegler.

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

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

Teilpublikationen:

- 1.) C. Schips, Th. Ziegler, *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, in Druck.
- 2.) Universität Tübingen **2004** (Erf. C. Schips, Th. Ziegler) Deutsches Patent mit der Nummer 10 2004 046 01

