

Untersuchung zur
konvergenten Synthese von
festphasengebundenen
N-Typ Glycopeptiden
durch Seitenkettenglycosylierung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Florian Ende
aus Hamburg

Januar 2001



Universität Hamburg

für meine Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis Dezember 2000 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Überlassung des Themas und seine stets freundliche und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Tag der letzten mündlichen Prüfung: Rosenmontag, 26.02.2001

fortitudine vincimus – durch Ausdauer zum Sieg
Sir Ernest Shackleton, Familienmotto

Abkürzungen

Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung		Seitenketten-Schutzgruppe
Alanin	Ala	A	-
Arginin	Arg	R	Pbf
Asparagin	Asn	N	Trt
Asparaginsäure	Asp	D	<i>t</i> Bu oder* Al, Dmab
Cystein	Cys	C	Trt
Glutamin	Glu	Q	Trt
Glutaminsäure	Gln	E	<i>t</i> Bu
Glycin	Gly	G	-
Histidin	His	H	Trt
Isoleucin	Ile	I	-
Leucin	Leu	L	-
Lysin	Lys	K	Boc
Methionin	Met	M	-
Phenylalanin	Phe	F	-
Prolin	Pro	P	-
Sarcosin	Sar		-
Serin	Ser	S	<i>t</i> Bu
Threonin	Thr	T	<i>t</i> Bu
Tryptophan	Trp	W	Boc
Tyrosin	Tyr	Y	<i>t</i> Bu
Valin	Val	V	-

* an den Glycosylierungsstellen

Weitere Abkürzungen

1D, 2D	ein-, zweidimensional
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AS	Aminosäure
Asn _{NHmb}	N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-N ^β -trityl-L-asparagin
Asp _{OAl}	L-Asparaginsäure-4-allylester
Asp _{ODmab}	L-Asparaginsäure-4-{4-[N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl)amino]benzyl}ester
AU	Absorptionseinheit

bez.	bezogen
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
d	Tag
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dhbt	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
DIC	1,3-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N'-Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonucleinsäure
D _{OAI}	N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-allylester
D _{ODmab}	N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-{4-[N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl)amino]benzyl}ester
eq	Äquivalent
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FFDNB	1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol
Fmoc	Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
Fmoc-Cl	9-Fluorenylmethylchlorformiat
Fmoc-ONSu	9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat
ges.	gesättigt
GlcNAc	N-Acetyl-2-amino-2-desoxy-D-glucose
GP	Glycoprotein
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMPB	4-Hydroxymethylphenoxybutyryl
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
M	molar, mol/l
Maldi-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekülmasse (<i>molecular weight</i>)
NMM	4-Methylmorpholin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

N_{NHmb}	N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- N^β -trityl-L-asparagin
NOESY	<i>nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
OAI	Allylester
ODmab	4-[N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl)amino]benzylester
OtBu	<i>t</i> -Butylester
PAL	Peptidamid-Linker
Pbf	2,2,5,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEG	Polyethylenglycol
Pfp	Pentafluorphenyl
pot.	potentiell
($\Psi^{R,R}$)pro	Pseudoprolin
PPTS	Pyridinium-4-toluolsulfonat
PS	<i>polystyrene support</i>
PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat
RNA	Ribonucleinsäure
ROESY	<i>rotating frame nuclear overhauser and exchange</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
SBA	Sojabohnen Agglutinin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser $_{NHmb}$	N^α -(2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)- O^β - <i>tert</i> -butyl-L-serin
S_{NHmb}	N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)- O^β - <i>tert</i> -butyl-L-serin
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> – Festphasen-Peptidsynthese
<i>t</i> Bu	<i>t</i> -Butyl
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
TFFH	Tetramethylfluoroformamidiniumhexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Trt	Trityl
δ	chemische Verschiebung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	13
2	Glycoproteine	14
2.1	Vorkommen und Biosynthese.....	14
2.2	Funktionelle Bedeutung.....	17
3	AIDS.....	18
3.1	Die Krankheit.....	18
3.2	Der Infektionsmechanismus.....	19
3.3	Das GP120	20
3.4	Die funktionelle Bedeutung der Glycosylierungen am GP120	22
3.5	Mögliche Inhibierung einer HIV-Infektion	23
4	Synthese von N-Typ Glycopeptiden.....	23
4.1	Fmoc/ <i>t</i> Bu-SPPS, die Peptid-Festphasensynthese	24
4.2	Die Baustein-Methode.....	28
4.3	Die Glycosylierung am Harz – konvergente Synthese.....	30
4.4	Die Hmb-Schutzgruppe	33
4.5	Aminierung der Zucker	35
5	Aufgabenstellung.....	36
6	Synthesergebnisse und Diskussion	37
6.1	Untersuchungen zur Darstellung und Einsetzbarkeit von N ^α -geschützten Aminosäurederivaten in der Festphasenpeptidsynthese	37
6.1.1	Darstellung von N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin	37
6.1.2	Versuche zur Synthese von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxy-carbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (11).....	38
6.1.3	Alternativschutzgruppen zu Hmb	39
6.1.4	Selektiver Schutz der α-Carboxylfunktion.....	41
6.1.5	Darstellung der Hmb-geschützten Aminosäurederivate am Harz	43
6.1.6	Darstellung von N ^α -Fmoc-geschützten N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-aminosäurederivaten in Lösung.....	46

6.1.7	Überprüfung der Enantiomerenreinheit der einfach N ^α -Fmoc-geschützten N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-L-aminosäurederivate	49
6.1.8	Untersuchung zum Einsatz einfach N ^α -Fmoc-geschützten N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-L-aminosäurederivate in einer Peptidsynthese.....	52
6.1.9	Untersuchung zur Kupplung von Asp _{OAl} an ein Festphasen-gebundenes und Hmb-geschütztes Aminosäurederivat.....	59
6.1.10	Untersuchung zur Kupplung der weiteren Aminosäuren	60
6.2	Darstellung der aminierten Kohlenhydrate.....	61
6.3	Die orthogonal selektiven Schutzgruppen an den Glycosylierungsstellen	63
6.4	Die Seitenkettenglycosylierung	68
6.4.1	Wahl eines geeigneten Aktivators.....	69
6.4.2	Überschuß an aminierten Zucker	71
6.4.3	Vergleich der Glycosylierungsausbeuten neben Sarcosin und Hmb-geschützten Aminosäuren	72
6.5	Abspaltung vom Harz und anschließende Aufarbeitung	73
6.6	Glycopeptidsynthesen.....	74
6.6.1	Synthese des Glycopeptids SVN(β-D-GlcNAc)FTDNAKT	75
6.6.2	Synthese des Glycopeptids WGSN(β-D-GlcNAc)NTE	76
6.6.3	Glycosylierung mit dem 1-β-Aminodecasaccharid 6	77
6.6.4	Zweifachglycosylierungen	78
6.6.5	Synthese der V3-Loop	82
6.7	Versuch der Seitenkettenglycosylierung neben Pseudoprolin	85
7	Zusammenfassung.....	87
8	Summary	89
9	Experimenteller Teil	91
9.1	Allgemeines	91
9.1.1	HPLC.....	91
9.1.2	Maldi-TOF-MS.....	91
9.1.3	ESI-MS	91
9.1.4	NMR.....	92
9.1.5	Weitere chromatographische Methoden	92
9.1.6	Verschiedenes.....	93

9.2	Darstellung der Aminosäurederivate	94
9.2.1	Darstellung von N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin (7).....	94
9.2.2	Darstellung von N ^α -(2,4-Dimethoxybenzyl)-L-alanin (12)	95
9.2.3	Darstellung von N ^α -(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-L-alanin (14)	96
9.2.4	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -(2,4-dimethoxybenzyl)-L-alanin (13)	97
9.2.5	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -(2,4,6-trimethoxybenzyl)-L-alanin (15)	99
9.2.6	Versuch zur Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxybenzyl]-L-.....	100
9.2.6	alanin (11) über temporären Dmab-Schutz an der α-Carboxylfunktion .	100
9.2.7	Darstellung von N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O ^β -tert-butyl-L-serin (18).....	103
9.2.8	Darstellung von N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O ^β -tert-butyl-D,L-serin (18)	105
9.2.9	Darstellung von N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O ^β -tert-butyl-L-serin (18).....	105
9.2.10	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-O ^β -tert-butyl-L-serin (19).....	106
9.2.11	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-O ^β -tert-butyl-L-serin (19)	108
9.2.12	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxybenzyl]-O ^β -tert-butyl-L-serin (20)	108
9.2.13	Darstellung von N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (21).....	110
9.2.14	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (22).....	111
9.2.15	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-N ^β -trityl-L-asparagin (25)	112
9.2.16	Darstellung von N ^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-glycin (27).....	113

9.2.17	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-glycin (28).....	113
9.2.18	Darstellung von N ^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N ^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (11) an der Festphase	115
9.2.19	Untersuchung zur Bildung von 4,5-Dihydro-8-methoxy-1,4-benzoxazepin-2(3H)-on.....	117
9.2.20	Methode nach Marfey ⁷¹	119
9.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften und Standardverfahren	123
9.3.1	Peptidsynthese	123
9.3.2	Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen mit 1.8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU).....	125
9.3.3	Entschützen der Glycosylierungsstellen	125
9.3.4	Glycosylierung	132
9.3.5	Abspaltung vom Harz.....	139
9.3.6	Aufarbeitung nach Peptidabspaltung vom Harz.....	140
9.3.7	Farbtests zur Überprüfung auf freie, nicht umgesetzte Amino-Funktionen am Harz.....	141
9.4	Untersuchung zum Kupplungsverhalten von α-N-geschützten Aminosäurederivaten in einer Peptidsynthese am Harz.....	144
9.4.1	Kupplung von Dmb- und Tmb-geschützten Aminosäurederivaten.....	144
9.4.2	Untersuchung zur Kupplung von Hmb-geschützten Aminosäurederivaten.....	146
9.4.3	Untersuchung zur Kupplung von Asp _{OAl} an ein Festphasen-gebundenes und Hmb-geschütztes Aminosäurederivat.....	148
9.4.4	Untersuchung zur Kupplung weiterer Aminosäure-Derivate.....	150
9.5	Glycopeptidsynthesen.....	151
9.5.1	Vergleich der Ausbeuten nach Glycosylierung von Asp direkt N-terminal neben N _{NHmb} und Sar	151
9.5.2	Synthese von SVN(β-D-GlcNAc)FTDNAKT (68).....	153
9.5.3	Synthese von WGSN(β-D-GlcNAc)NTE (73)	156
9.5.4	Synthese von LFN(komplex-Typ-Decasaccharid)SarT (75).....	158
9.5.5	Versuch zur Synthese von LFN(komplex-Typ Decasaccharid)GT (77) ...	159

9.5.6	Synthese von LFN(β -D-GlcNAc)STWGSN(β -D-GlcNAc)NTE (80)	160
9.5.7	Synthese von LFN(1- β -Amino-chitobiose)SarTW- GSN(β -D-GlcNAc)SarTE (86)	163
9.5.8	Darstellung der V3-Loop aus dem GP120	166
9.6	Untersuchung zum Einsatz von Pseudoprolin	169
9.6.1	Darstellung von N ^{α} -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4- allylester-1-pentafluorphenylester (36)	169
9.6.2	Darstellung des Dipeptids 37	169
9.6.3	Darstellung des Pseudoprolins 38	170
9.6.4	Darstellung von FD _{OAI} S($\Psi^{Me,Me}$)proT (39)	171
10	Sicherheitshinweise	173
11	Literaturverzeichnis	176

1 Einleitung

Wesentliches Ziel der Forschung ist in der Vergangenheit ebenso wie in unserer Gegenwart die Erforschung des menschlichen Körpers und seiner Erkrankungen.

Heute wissen wir, daß ein umfangreiches Verständnis für die Ursachen und über den Verlauf menschlicher Krankheiten essentiell für die Entwicklung wirksamer Therapeutika ist und daß es darüber hinaus ein Zusammenwirken verschiedener wissenschaftlicher Fachrichtungen erfordert. Dem organischen Chemiker fällt hier neben der Aufklärung von Struktur- und Wirkungsprinzipien auch immer wieder die zentrale Aufgabe der Entwicklung geeigneter Synthesestrategien zur Darstellung potentieller Wirkstoffe zu.

Die Erforschung der Krankheit AIDS ist ein klassisches Beispiel für die interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener naturwissenschaftlicher Fachgebiete geworden. Während sich vor allem Mediziner und Molekularbiologen im bisherigen Vorankommen verdient gemacht haben, wird immer wieder deutlich, daß der organischen Synthese zur Bereitstellung potentieller Wirkstoffe, oder an den Infektionsmechanismen beteiligter Naturstoffe zur weiteren Aufklärung ihrer Funktion und Bedeutung eine zunehmend wichtige Rolle zukommt. Dieses hohe Maß an Bedeutung wird an den begrenzten Möglichkeiten zur Isolierung homogener Naturstoffe aus natürlichen Ressourcen oder durch rekombinante Verfahren noch verstärkt. Glycoproteine beispielsweise, die am Infektionsmechanismus der menschlichen T-Zellen mit HIV maßgeblich beteiligt sind, lassen sich nur in kleinstmengen und unter erschwerten Bedingungen isolieren und aufgrund ihrer erst posttranslational erfolgenden Glycosylierung im Golgi-Apparat auch nur schwierig kontrolliert rekombinant herstellen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit präparativen Untersuchungen zur Synthese von N-Typ-Glycopeptiden. Sie versucht dabei zunächst auf deren Vorkommen und Biosynthese, sowie Struktur einzugehen, um dem Leser so ihre Bedeutung und mannigfaltigen Funktionen besser verständlich zu machen. Anschließend soll der virale Infektionsmechanismus, der zur Krankheit AIDS führt und die Beteiligung von Glycopeptiden des N-Typs beschrieben werden. Es wird darüber hinaus auf grundlegende Synthesestrategien zur Darstellung von N-Typ-Glycopeptiden verwiesen und auf die allgemein zur Darstellung erforderlichen

Methoden eingegangen, um dann schließlich auf die durchgeführten Untersuchungen zur Glycosylierung harzgebundener Peptide und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten, aber auch Probleme überzuleiten, die im Ergebnisteil dieser Arbeit dann ausgiebig diskutiert werden sollen.

2 Glycoproteine

2.1 Vorkommen und Biosynthese

Glycoproteine sind in höheren Zellen weit verbreitete Naturstoffe, in denen Kohlenhydratteil und Proteinrest kovalent miteinander verbunden sind. Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Typen dieser glycosidischen Bindung, den N-Typ, in dem der Zuckerrest am Amidstickstoff einer Asparagin-Seitenkette gebunden ist und den wesentlich häufiger auftretenden O-Typ, bei dem die Bindung am Sauerstoffatom einer Serin- oder Threoninseitenkette erfolgt.¹

Glycopeptide des N-Typs weisen bemerkenswerterweise als einheitliches Grundbauprinzip in ihrem Kohlenhydratteil ein Pentasaccharid auf, das als Core-Struktur² bezeichnet wird.

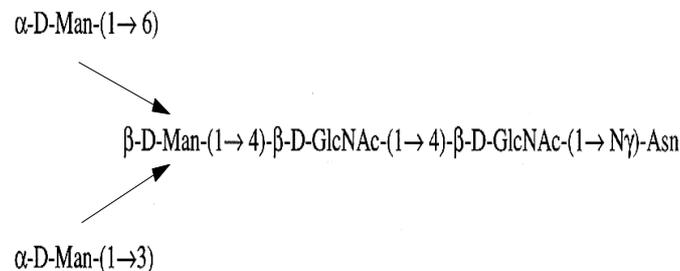


Abbildung 1: Core-Struktur N-glycosidisch gebundener Oligosaccharide.

In dieser Core-Struktur ist eine Mannose β -glycosidisch mit zwei β -glycosidisch verknüpften N-Acetyl-glucosamineinheiten verbunden, an der wiederum zwei weitere Mannoseeinheiten diesmal α -glycosidisch verknüpft sind. An diesen Mannoseeinheiten hängen je nach biologischer Funktion des Glycopeptids noch weitere Oligosaccharide, die man auch als Antennen bezeichnet. Man unterscheidet wiederum drei Haupttypen: Erstens den ausschließlich in höheren Lebewesen vorkommenden Komplex-Typ, in dem je nach Verzweigungsgrad zwei bis sechs Antennen aus (Sialyl-)(Fucosyl-)Lactosamin-Sequenzen gebunden sind, zweitens den

auch in primitiveren Organismen wie Pilzen vorzufindenden High-Mannose-Typ, der sich durch weitere, mindestens zwei, α -glycosidisch gebundene Mannose-Einheiten auszeichnet und drittens den Hybrid-Typ, der die Strukturmerkmale der beiden vorangegangenen Typen in sich vereint.

Auf dieses einheitliche Grundbauprinzip, die Core-Struktur mit ihren zwei β -glycosidisch verknüpften N-Acetyl-glucosamineinheiten ist die Wahl der für die in den Untersuchungen zur N-Typ-Glycopeptidsynthese eingesetzten einfachen Zuckerderivate GlcNAc und Chitobiose zurückzuführen.

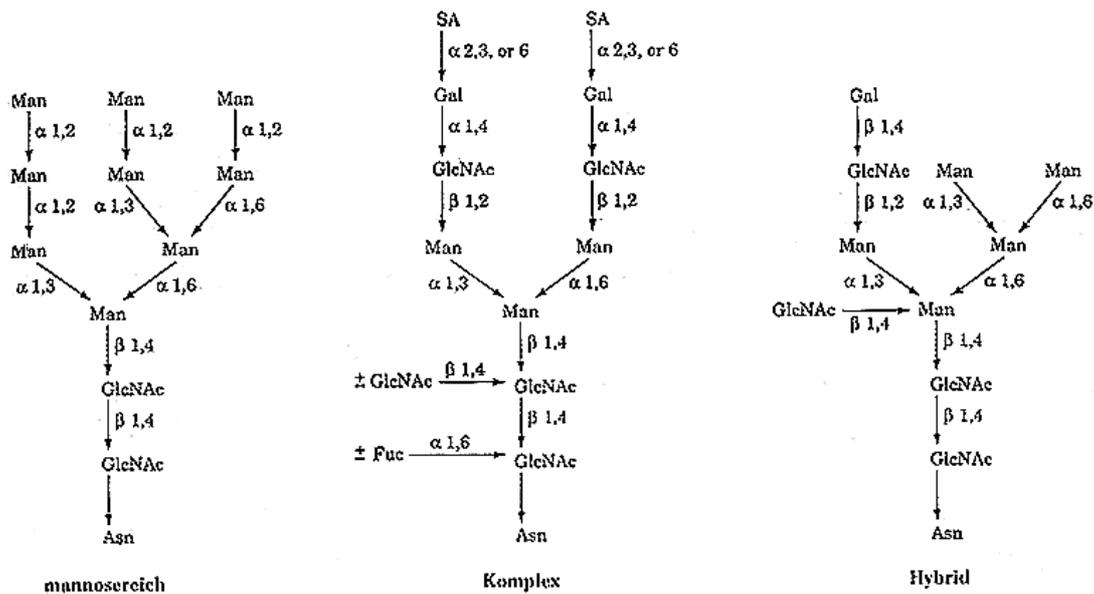


Abbildung 2: Die drei Haupttypen der N-Typ-Glycoproteine.

Für die im allgemeinen große Vielfalt an Glycosylierungsmustern sind die Vorgänge im Verlauf der Biosynthese von Glycoproteinen verantwortlich.³ Während die ersten Schritte der Biosynthese noch uniform verlaufen, kommt es im späteren Verlauf zu einer sogenannten Mikroheterogenität, d.h. zur Bildung einer Vielzahl teils sehr unterschiedlicher Glycane mit sehr differierten physikalischen und biologischen Eigenschaften.

Zunächst bildet sich eine biosynthetische Vorstufe, bestehend aus dem ribosomal synthetisierten Proteinanteil und einem Tetradasaccharid, das gebunden an ein Dolicholphosphat im endoplasmatischen Retikulum auf einen Asparagin-Rest im Protein übertragen wird. In den cis-, medial- und trans-Zisternen des Golgi-Apparates kommt es anschließend zu sogenannten Trimm- oder Modifikationsprozessen, in denen durch verschiedene Enzyme, wie Glycosyltransferasen und Glycosidasen, die Glycoprotein-Vorstufen prozessiert werden. Man hat gezeigt, daß

die so entstandenen Oligosaccharidseitenketten zumindest teilweise auch gleich als Erkennungssignale für einen anschließenden Sortierungs- und Transportprozeß dienen, durch die die Glycoproteine ihre Bestimmungs- und Einsatzorte erreichen.

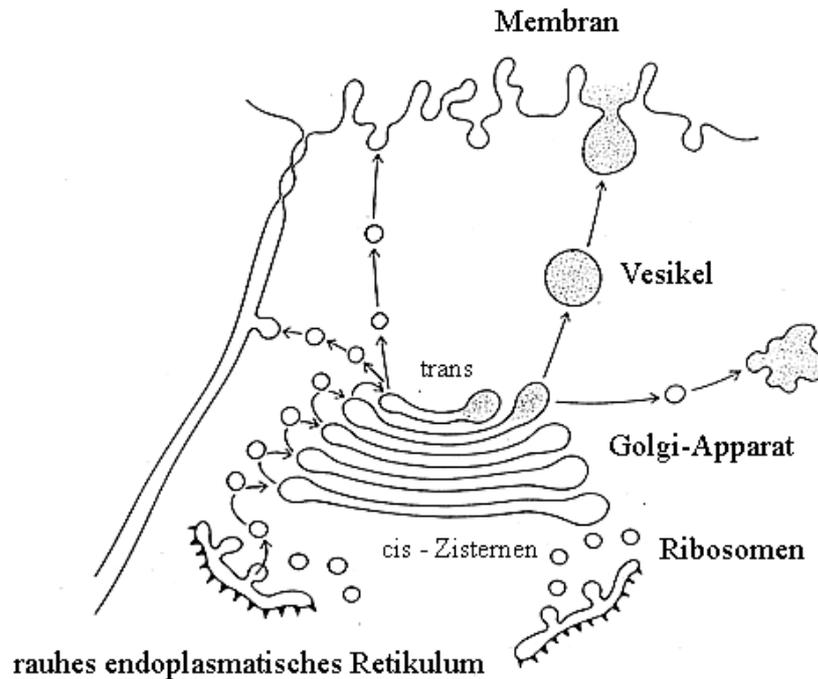


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Biosynthese von Glycopeptiden. Die Proteinanteile werden an den Ribosomen, die am rauhen endoplasmatischem Retikulum anhaften, synthetisiert. Dort werden sie vorläufig prozessiert und in Vesikeln, die sich aus der ER-Membran lösen, eingekapselt zu den cis-Zisternen des Golgi-Apparats transportiert, wo sie mit diesen verschmelzen. Nach weiterer Prozessierung werden die Glycoproteine in den trans-Zisternen nach ihrem endgültigen Bestimmungsort (z.B. Membranen) sortiert.³

Unvollständige Glycosylierungen und ein Mangel an absoluter Spezifität der Glycosyltransferasen und Glycosidasen führen dann zu der zuvor genannten Mikroheterogenität.

Selbstverständlich hat aber auch die dreidimensionale Struktur des Proteinteils einen direkten Einfluß auf die Glycosylierung. Ist der Zugang zu den Glycosylierungsstellen sterisch durch die lokale Proteinstruktur, z.B. durch Faltung oder auch aufgrund von Wechselwirkungen verschiedener Subeinheiten untereinander behindert oder aufgrund von Interaktionen des Oligosaccharids mit der Proteinoberfläche der Zuckerbestandteil nur noch eingeschränkt beweglich und somit für die Glycosyltransferase weniger effektiv als Substrat einsetzbar, kommt es zu Variationen in der Glycosylierung. Auch das Prozessieren ist von der Proteinstruktur, der Lokalisation und dem Transportweg abhängig.

2.2 Funktionelle Bedeutung

Während die für den lebenden Organismus bedeutenden biologischen Funktionen von Kohlenhydraten als Gerüstbaustoffe, Energiespeicher und Schutzgruppen und die der Proteine unter anderem als Enzyme und somit Träger spezifischer Funktionen bis heute schon weitgehend aufgeklärt sind, ist die Frage nach der speziellen Funktion der Glycoproteine noch ungeklärt.

Mit zunehmender Anzahl strukturell aufgeklärter Verbindungen werden immer mehr Formen des Mitwirkens von Glycoproteinen an verschiedensten biologischen Vorgängen festgestellt. So wissen wir heute, daß Glycoproteine in hohem Maße an zellulären Erkennungsmechanismen beteiligt sind.^{4,5}

Die ausgeprägte Fähigkeit von Zellen und zwar sowohl körpereigener, als auch körperfremder, einander zu erkennen, belegen zahlreiche Experimente. 1952 beispielsweise beobachtete Moscona erstmals, wie sich Zellen eines Hühnerembryos, die durch Inkubation in einer speziellen Enzymlösung getrennt wurden, schon nach kurzer Zeit wieder zu einem Aggregat zusammen lagern.⁵ Auch Spermien können Eizellen der eigenen von denen einer anderen Art unterscheiden,⁵ und bestimmte Bakterien haften sich bevorzugt auch nur an einen bestimmten Gewebetyp, z.B. den Darm, die Harn- oder Atemwege.⁵

Nach allgemein akzeptierter Vorstellung erkennen sich zwei Zellen über komplementäre Strukturen auf ihrer Außenseite, analog einem Schlüssel-Schloß-Prinzip, das 1897 von Emil Fischer formuliert wurde. Daß Saccharidstrukturen für diese Wechselwirkungen zuständig sind, wurde schon frühzeitig vorgeschlagen und diskutiert, aber erst mit Beginn der 60er Jahre allgemein ernstgenommen, als man erkannte, daß alle Zellen von einem Mantel aus Kohlenhydraten umgeben sind.⁵

In Zellmembranen finden wir neben Glycoproteinen auch noch weitere Glycokonjugate, bestehend aus Kohlenhydrat und Lipid, Phospholipid oder Sphingolipid, in denen der Kohlenhydratanteil als das aus der Membran weisende Segment, Hauptträger der biologischen Funktion ist.⁶ Außerdem beeinflußt der Glycoanteil die Löslichkeit des Peptids maßgeblich und ist somit auch für die Ausrichtung der glycosylierten Moleküle in der Membran verantwortlich.

Das Immunsystem, welches der Überwachung und Erkennung von körperfremden Strukturen dient, reagiert, wenn die spezifischen Toleranzgrenzen an körperfremden Oberflächenstrukturen, z.B. Glycoproteinen, überschritten werden. Somit wird deutlich, wie Glycokonjugate, hier als Bestandteil von Membranen, an der Zell-Zell-Erkennung und -Wechselwirkung beteiligt sein können. Sie können antigen oder rezeptiv wirken und Giftstoffe, Viren, Bakterien oder eben ganze Zellen binden.⁵

Aber auch bei der Zellwachstumskontrolle und der Wechselwirkung mit bioaktiven Faktoren wie Enzymen und Hormonen spielen sie eine gleichermaßen bedeutende Rolle.⁷ Darüber hinaus bilden sie durch ihre Fähigkeit Wasser zu binden, feste Gele, die wichtig für das Stützgewebe sind und können die Konformationen der Glycoproteine beeinflussen, was z.B. Enzymaktivitäten regulieren kann. Außerdem steuern Glycostrukturen auch Regulationskaskaden und Prozesse bei der Signaltransduktion.^{8,9}

Kohlenhydrate zeichnen sich in ihrer Stoffklasse dadurch aus, daß sie ein außerordentlich vielfältiges Repertoire an Oberflächenstrukturen ermöglichen. Dies wird von der Zelle auch unbedingt gefordert, da sich die Zelloberflächen während Entwicklung, Differenzierung oder Erkrankung in charakteristischer Weise ändern. Diese Vielfalt ist in den außergewöhnlich komplexen Verknüpfungsmöglichkeiten der einzelnen Zuckerbausteine begründet. So können schon vier verschiedene einfache Monosaccharide theoretisch ca. 10^8 unterschiedliche Tetrasaccharide bilden, obwohl anzumerken ist, daß nicht jede Kombination realisiert ist. Dieses Potential struktureller Diversität der Kohlenhydrate ist unter den Naturstoffen einzigartig und macht Zuckeroligomere zu unübertroffen effizienten Informationsträgern. Sie vermögen deutlich mehr Informationen pro Gewichtseinheit zu beinhalten als Nucleinsäuren oder Proteine.

3 AIDS

3.1 Die Krankheit

Bereits 1981, als erste Todesopfer durch sonst sehr seltene Infektionskrankheiten auftraten, die eigentlich vom menschlichen Immunsystem bekämpft werden können, diagnostizierte man eine neue Krankheit, die als AIDS (*acquired immune deficiency syndrome* = erworbene Immunschwäche) bezeichnet wurde. Ihre Opfer kamen an ihrem stark geschwächten, bzw. vollständig lahmgelegten Immunsystem zu Tode. 1983 dann entdeckten Luc Montagnier und Robert Gallo¹⁰ einen für diese Schwächung verantwortlichen Retrovirus, das HIV (*human immunodeficiency virus*), von dem bislang zwei Arten bekannt sind. Die Übertragung findet sowohl durch Sexualkontakt, als auch direkt über die Blutbahn, durch z.B. infektiöse Blutkonserven oder -derivate statt. Die Inkubationszeit von AIDS beträgt mehrere Jahre. Alle bislang entwickelten Therapeutika können zwar die Lebenszeit der Erkrankten verlängern, sind aber nicht in der Lage, die Krankheit zu heilen.

3.2 Der Infektionsmechanismus

Als Retrovirus enthält HIV ein Einzelstrang-RNA-Genom (ssRNA), das über ein doppelsträngiges DNA-Zwischenprodukt unter Zuhilfenahme einer Reversen Transkriptase repliziert wird. Es wird in das Wirtsgenom eingebaut und dort transkribiert. Die Lipiddoppelschichtmembran des HI-Virion wird von einem Glycoprotein, dem GP41 durchspannt, welches mit einem weiteren Glycopeptid, dem GP120, assoziiert ist, das auf diese Weise als Tri- oder Tetramer an der Oberfläche des Virion haftet.¹¹ Bevor Virusmembran und T-Zell- oder Makrophagen-Membran verschmelzen und der Inhalt des viralen Kerns in das Cytoplasma der Wirtszelle entlassen wird, binden die GP120-Moleküle an in der T-Zell- oder Makrophagen-Oberfläche verankerte Proteinmoleküle, den CD4-Molekülen. Die Bindungs epitope sind diskontinuierlich über das gesamte GP120 verteilt. Involvierte Bereiche sind die konservierten Regionen C1, C2, C3, C4, C5 und die V5-Loop (siehe Abbildung 5). Ihre Wechselwirkung mit dem CD4 führt zu einer Konformationsveränderung im GP120 und damit zur Exposition der V3-Loop. Darauf folgt eine Wechselwirkung der V3-Loop mit den Chemokin-Rezeptoren (z.B. CXCR4 auf T-Zellen oder CCR5 auf Makrophagen), die sich ebenfalls an der Oberfläche der T-Zellen oder Makrophagen befinden.¹²

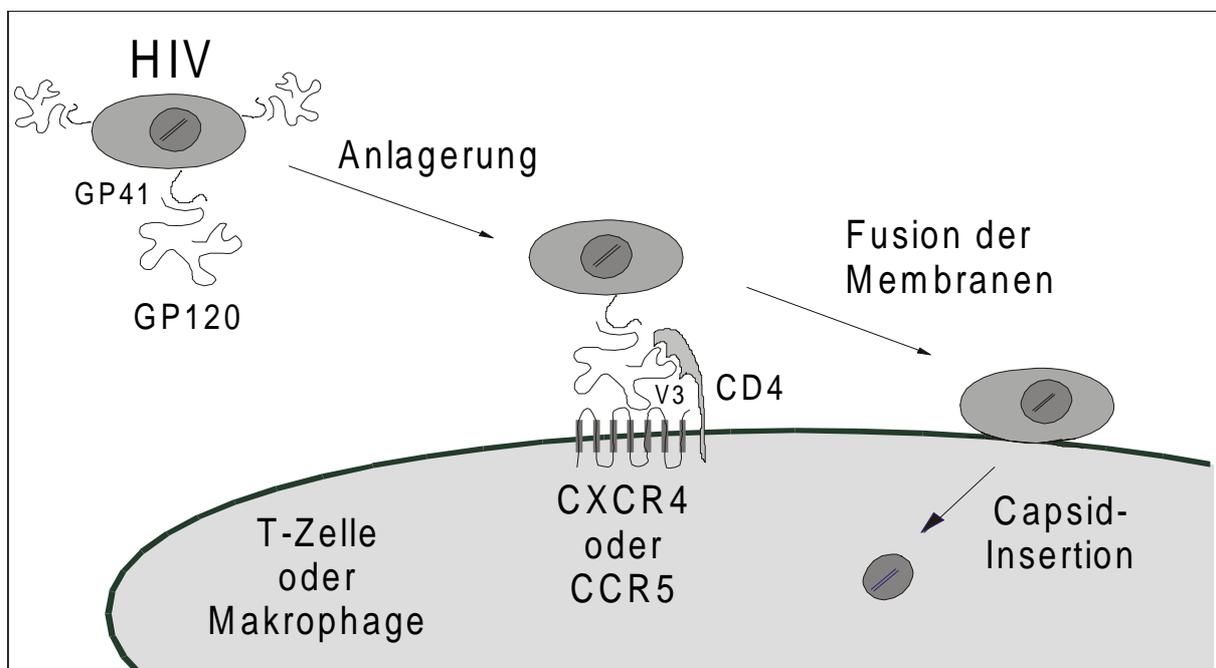


Abbildung 4: Modell für die Infektion einer humanen T-Helferzelle oder eines Makrophagen durch HIV.

Die Infektion durch HIV führt zunächst zur starken Vermehrung der HI-Viren und später dann zur osmotischen Lyse der Wirtszelle, weil die Insertion von Glycoproteinen und Knospung von Viruspartikeln die Permeabilität der Wirtszellmembran so stark erhöhen, daß Ionen und Wasser einströmen können, was die natürliche Ionenbalance der Zelle zerstört. Außerdem steigt der cytoplasmatische Calciumspiegel abnorm an und die Transkription der Wirtszelle kann durch die virale mRNA gestört werden. Infizierte Zellen können mit vielen weiteren gesunden CD4-tragenden Zellen zu riesigen vielkernigen Zellhaufen verschmelzen, was die Anzahl der T-Helferzellen stark verringert. Aber auch die Funktion der T-Helferzellen wird gestört. So ist es von GP120 blockierten CD4-Molekülen nicht mehr möglich, mit Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexen wechselzuwirken, also ihrer eigentlichen Aufgabe nachzugehen.

Da die Mutationsrate von HIV außergewöhnlich hoch ist (ca. 65mal höher als beim Influenzavirus) und sich die Hüllproteine GP120 und GP41 fortwährend verändern, also Antigendiversität vorliegt, ist es außerordentlich schwierig, einen geeigneten Impfstoff gegen AIDS zu finden.

3.3 Das GP120

Das Glycopeptid GP120 hat eine Molmasse von ca. 120 kDa, die sich zur Hälfte auf den Kohlenhydratanteil und zur anderen Hälfte auf den Proteinanteil verteilt. Das GP120 weist ca. 24 mögliche Glycosylierungsstellen auf, wovon typischerweise 13 mit komplexen- und 11 mit hoch-mannosidischen-Typ besetzt sind. Aus der Aminosäuresequenz des Peptidteils ergibt sich eine Sekundärstruktur, die von insgesamt 9 Disulfidbrücken strukturiert, 5 hypervariable Loops beinhaltet, die vom N-Terminus aus durchnummeriert werden. Die für die Bindung an CXCR4 oder CCR5 verantwortliche V3-Loop ist in ihrer Sequenz hypervariabel. Ausgenommen davon ist ein hochkonservierter Teil in ihrer Mitte, der auch als prinzipiell neutralisierende Domäne bezeichnet wird, da gegen ihn Antikörper gebildet werden können (z.B. GPGRAF-Motiv in *clade B*-Viren). Diese sind jedoch außerstande, die T-Zellen langfristig vor Infektion zu schützen.

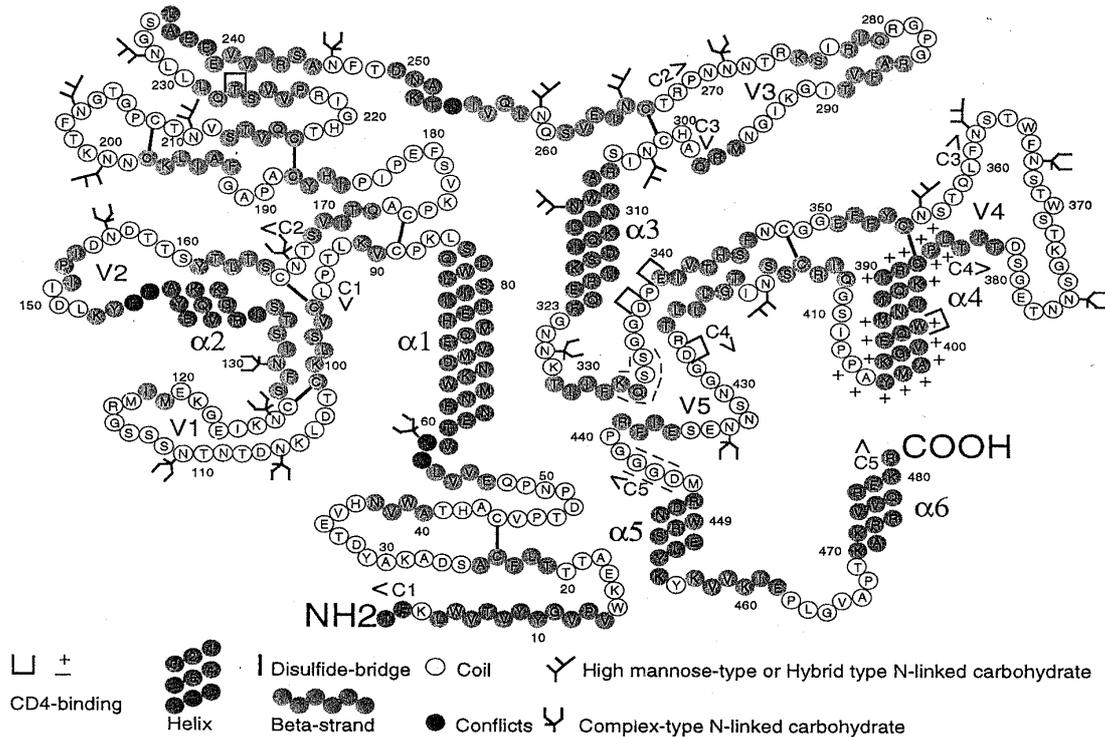


Abbildung 5: Schematische Zeichnung des GP120 mit den potentiellen Glycosylierungsstellen, den hypervariablen Loops V1-V5, den CD4-Bindungsstellen sowie der prinzipiell neutralisierenden Domäne V3. Außerdem sind berechnete Struktur motive abgebildet.¹³

Die V4-Loop weist nach einer Vergleichsstudie von C. Seeberger eine außergewöhnlich hohe Anzahl möglicher Glycosylierungsstellen auf.¹⁴ Aus einer Datenbank wurden 701 Aminosäuresequenzen mit dem Endstück TLPC und einer Länge von 34 Aminosäuren ausgewählt und auf potentielle Glycosylierungsstellen untersucht. Da alle GP120-Glycosylierungsstellen das gleiche Sequenzmerkmal NXS oder NXT aufweisen,¹⁵ wobei X für eine beliebig andere Aminosäure steht, wurde nach vorkommenden N, S oder T gesucht. Wie die folgende Graphik (Abbildung 6) zeigt, ergab die Studie eine Vielzahl sehr wahrscheinlicher Glycosylierungsstellen, was darauf schließen läßt, daß die V4-Loop hochglycosyliert vorliegt.

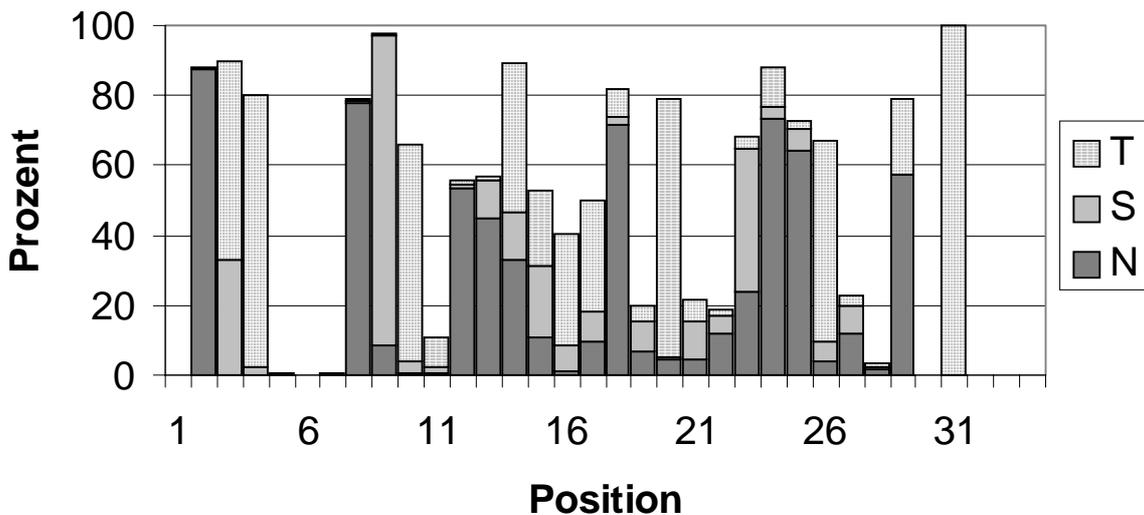


Abbildung 6: Potentielle Glycosylierungsstellen mit dem Sequenzmerkmal NXS oder NXT (siehe oben) in der V4-Loop. Ausgewertet wurden 701 Aminosäuresequenzen aus einer internen Datenbank (=100 %) mit dem Endstück TLPC und einer Länge von 34 Aminosäuren.

3.4 Die funktionelle Bedeutung der Glycosylierungen am GP120

Über die Rolle des Kohlenhydratanteils im GP120 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einige Arbeiten den Zuckerteil als für die Infektion essentiell einschätzen, schreiben andere Arbeiten ihm nur eine Bedeutung bei der Proteinfaltung zu.¹⁶ Grundsätzlich läßt sich aber festhalten, daß die Glycosylierungen für den Erhalt und die Ausbildung der Funktion des Proteins notwendig sind, dies zeigt die Expression in einem nicht glycosylierenden System, welche zu einem Protein führt, das nicht an CD4 bindet.¹⁷ Auch wenn andere Arbeiten diesen Befund wiederum einzuschränken suchen und beschreiben, daß die meisten der N-Typ Glycosylierungen für die virale Infektiosität entbehrlich sind, weil einzelne Mutationen an einem Teil der Glycosylierungsstellen nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf die virale Infektiosität besitzen.¹⁸

Bislang konnte gezeigt werden, daß eine Langzeitbehandlung mit Desoxyojirimycin zu weitgehend inaktiven Molekülen¹⁸ und die Abspaltung der Neuraminsäuren zu einer reduzierten Bildung von Anti-V3-Antikörpern führt. Gleichermäßen sind mannosespezifische Lektine in der Lage, die Infektion von CD4⁺-T-Zellen vollständig zu inhibieren.¹⁹ Das Abspalten aller N-Typ-Oligosaccharide mit Hilfe der Endo-H und PNGase-F führt hingegen nur zu einer Verminderung der Aktivität um 0 bis

90%. Bei diesem Experiment wurde jedoch die Vollständigkeit der Oligosaccharidabspaltung nicht überprüft.¹⁹ Während die Entfernung der Glycosylierungen zueinander die Infektiosität des Virus nicht beeinflussen soll, hat das Fehlen von drei Glycosylierungen innerhalb CD4-bindener Bereiche eine Verringerung der Bindungsstärke zur Folge.²⁰ Entfernt man einen N-glycosidisch gebundenen Zucker aus der V3-Region des GP120, führt dies zu einem veränderten Verhalten der infizierten T-Zelle gegenüber seinesgleichen und der Makrophagen.²¹ Die Neutralisation durch Antikörper wird bei Fehlen des Zuckers um das 100-fache erhöht,^{21,22} was für eine Maskierung der V3-Loop durch den Saccharidanteil sprechen könnte.

Wie diese Auflistung verschiedener, teils widersprüchlicher Arbeiten zur Aufklärung der Funktion des Kohlenhydrateil im GP120 verdeutlicht, ist noch viel Forschungsarbeit insbesondere im Bereich der Strukturaufklärung und der Bindungsstudien an den betreffenden Zentren zu leisten, für die die Synthese von Modellpeptiden und Glycopeptiden unerlässlich ist.

3.5 Mögliche Inhibierung einer HIV-Infektion

Nachweislich können einige Peptide aus der V3-Loop des GP120 die Infektion menschlicher T-Zellen durch das HIV *in vitro* um bis zu 97% (gemessen an der Aktivität der reversen Transkriptase) inhibieren. Diese müssen, um eine nennenswerte Aktivität zu zeigen, das GPGRAF-Motiv beinhalten und sowohl C- als auch N-terminal noch mindestens vier weitere Aminosäuren tragen. Es wird vermutet, daß die Peptidbruchstücke kompetitiv an der Bindungsstelle für die V3-Loop binden und so die Infektion verhindern.²³ Darüber hinaus ruft die V3-Loop genau wie die CD4-Bindungsregionen, das Capsidprotein und das Transmembranprotein GP41 neutralisierende Antikörper hervor.²⁴ Einen weiteren Ansatz zur Bekämpfung von AIDS stellen die HIV spezifischen Enzyme, wie z.B. die Reverse-Transkriptase des HIV dar.^{25,26,27}

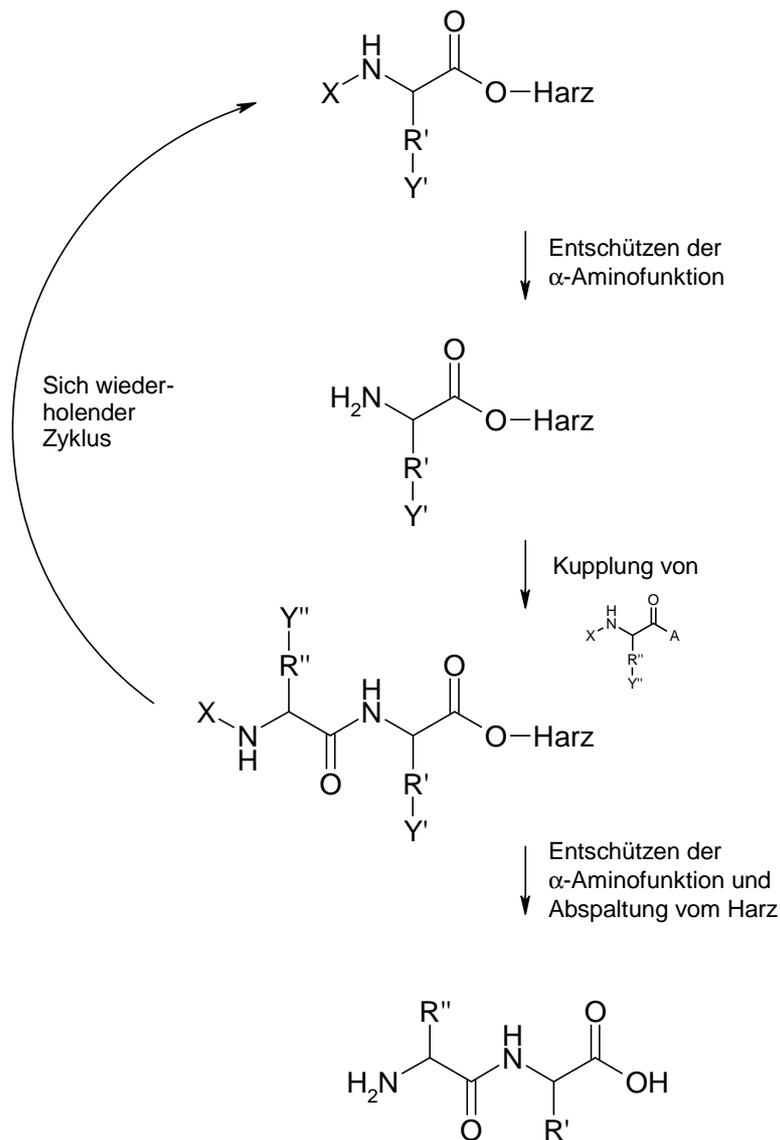
4 Synthese von N-Typ Glycopeptiden

Die Synthese von N-Typ-Glycopeptiden ist im wesentlichen²⁸ auf zwei verschiedenen Wegen möglich. Das erste Verfahren geht von glycosylierten Aminosäurebausteinen aus, die vorrangig aus Aspartat und dem an Position 1 aminierten Saccharid

dargestellt werden.⁸ Diese Bausteine sind sowohl in Lösung, als auch in der Festphasensynthese einsetzbar^{8,28,29}, und zwar neben der sequentiellen Synthese auch in der sogenannten Blocksynthese. Im zweiten Verfahren wird versucht, den aminierten Zucker erst nach vollständig abgeschlossener Peptidsynthese am Harz an einen freien Aspartat-Seitenrest anzuknüpfen. Mit diesem Verfahren, in dem die Glycosylierung also erst im letzten Syntheseschritt erfolgt, setzt sich die vorliegende Arbeit auseinander.

4.1 Fmoc/*t*Bu-SPPS, die Peptid-Festphasensynthese

Das Prinzip der Peptid-Festphasensynthese ist in Abbildung 7 illustriert. Die C-terminal im Zielpeptid angeordnete Aminosäure wird über ihre α -Carboxylfunktion an einem mit einer unlöslichen festen Matrix verknüpften Linker gebunden. Dieser Linker ist sowohl Abstandhalter, als auch Bruchstelle zur späteren Abspaltung des Zielpeptides vom Harz, wobei die Abspaltbedingungen von der Art des verwendeten Linkers abhängen. Es besteht also durch die Wahl des entsprechenden Linkers ein freier Spielraum in den Abspaltbedingungen vom Harz. Während die Seitenketten-Funktionen der eingesetzten Aminosäuren über den gesamten Syntheseverlauf stabil geschützt sein müssen, wird für die α -Aminogruppen nur ein temporärer Schutz in Form einer basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe³⁰ gewählt. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Knüpfung von Peptidbindungen in Form eines zyklischen Verfahrens. Ein solcher Syntheseyklus besteht aus der Abspaltung der Aminoschutzgruppe am Harz, d.h im ersten Zyklus vom Linker und in den folgenden Zyklen von der jeweils N-terminalen Aminosäure am Harz, der Anknüpfung der nächstfolgenden, in Form eines Aktivesters aktivierten Aminosäure und der anschließenden Blockierung durch Acetylierung (*capping*) aller nicht umgesetzten, noch freien Aminofunktionen. Die anzuknüpfenden Aminosäure-derivate können in großen Überschüssen eingesetzt werden und alle nicht abreagierten Komponenten und Beiprodukte werden durch Waschschriffe vom Zielpeptid entfernt. Abschließend wird das Zielpeptid vom Harz abgespalten und dabei seine Schutzgruppen entfernt. Nachfolgend wird das Rohprodukt aufgereinigt, wobei in den meisten Fällen auf die Methode der RP-HPLC zurückgegriffen wird.



X=Temporäre Schutzgruppe an der α-Aminofunktion
 Y=Permanente Seitenketten-Schutzgruppe
 A=Aktivierte Carboxylfunktion

Abbildung 7: Das Prinzip der Peptid-Festphasensynthese (SPPS).

Diese Methode unterscheidet sich im Grundprinzip nicht von der ursprünglichen Variante nach Merrifield, in der aber mit HF ein äußerst schwierig zu handhabendes und aggressives Reagenz eingesetzt wurde. Als Aktivatoren zur Bildung der erforderlichen Aminosäureaktivester haben sich HATU³¹ und TBTU³² etabliert. Als sogenannte Permanentschutzgruppen kommen in dieser Arbeit ausschließlich die Trityl-, Pbf-, *t*Bu und Boc-Schutzgruppen zum Einsatz, die sich in feuchter TFA unter Zusatz von Triisopropylsilan³³ als *scavenger* ("Abfänger", siehe auch 4.3) problemlos abspalten lassen.

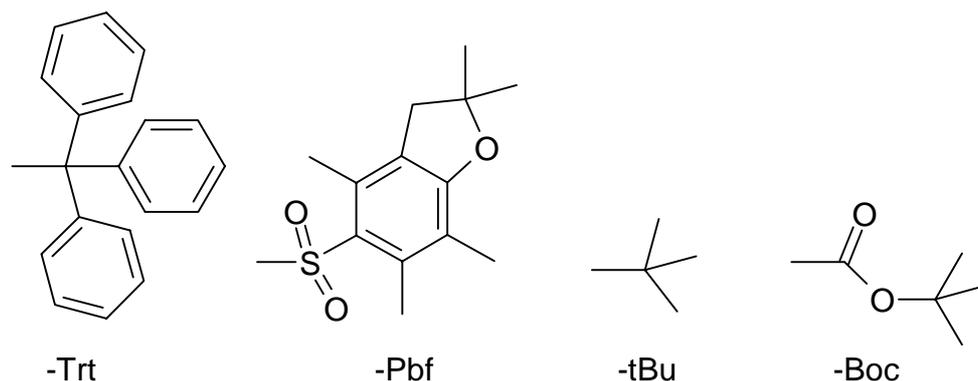
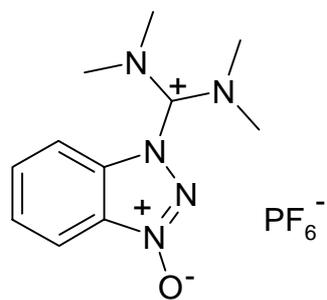
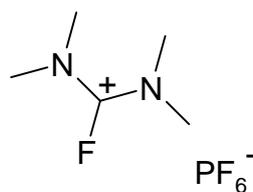


Abbildung 8: In dieser Arbeit zur SPPS eingesetzte Permanentschutzgruppen.

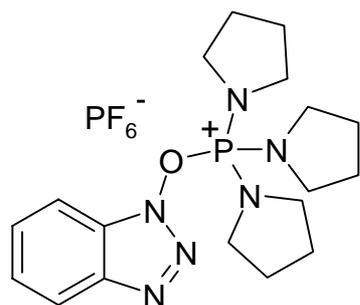
Unter der Vielzahl möglicher Aktivierungsvarianten unterscheidet man im wesentlichen sechs Gruppen. Die Pfp-Aktivester, in denen der nucleophile Angriff des freien Elektronenpaares am Aminostickstoff durch negativen induktiven Effekt vom perfluorierten Phenylring begünstigt wird, sind Hauptvertreter der Gruppe der vorgeformten Aktivester. Die zweite Gruppe stellen die *in situ* gebildeten symmetrischen Anhydride da, mit denen aufgrund ihrer hohen Labilität nur schwer umzugehen ist. Sie sind als hochaktiv einzustufen und kommen nur in besonderen Fällen zum Einsatz. Als dritte Gruppe versteht man die, ebenfalls spontan gebildeten Phosphoniumester aus PyAOP³⁴ und PyBOP³⁵, die sehr ähnlich funktionieren wie die Vertreter der vierten Gruppe, der Aminiumester. Zu diesen zählen neben HATU und TBTU auch HBTU³⁶. Als fünfte Gruppe bezeichnet man die Harnstoffderivate DCC oder das DIC, mit dem keine unlöslichen Dicyclohexylharnstoff-Rückstände entstehen. Und schließlich ist noch die Gruppe der halogenierten Aktivsauren zu nennen, wobei es sowohl die mit Hilfe von Thionylchlorid vorgeformten, äußerst reaktiven Säurechloride, als auch die durch Tetramethylfluoroformamidinium-hexafluoro-phosphat (TFFH)^{37,38} *in situ* gebildeten Säurefluoride gibt. Beide Varianten kommen allerdings nur in besonderen Fällen zum Einsatz, auf die im Falle von TFFH im späteren Verlauf dieser Arbeit noch eingegangen werden wird (siehe 6.1.9).



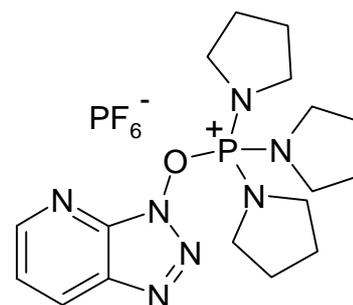
HBTU



TFFH



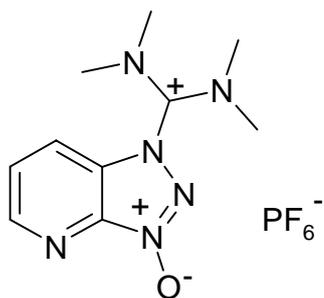
PyBOP



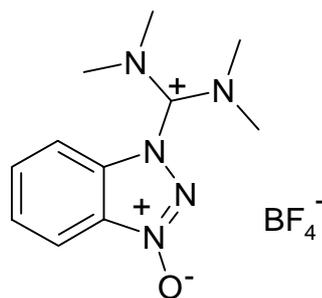
PyAOP

Abbildung 9: Die Aktivatoren HBTU, TFFH, PyBOP und PyAOP.

Etabliert haben sich, wie zuvor schon erwähnt, nicht zuletzt aufgrund der bei ihrem Einsatz verringerten Racemisierungsgefahr,³⁹ HATU und TBTU.



HATU



TBTU

Abbildung 10: Die Aktivatoren HATU und TBTU.

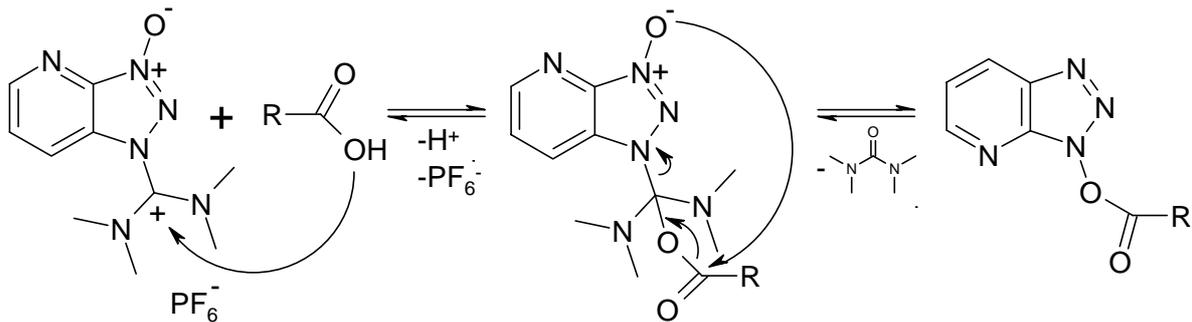


Abbildung 11: Vorgeschlagener Mechanismus zur Aktivierung einer Säurefunktion durch HATU.

Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten können sowohl am Harz, als auch nach Abspaltung in Lösung gebildet werden. Die Lösung wird dann in großem Volumen und hoch verdünnt angesetzt, um zu gewährleisten, daß die Disulfidbrücken nur intramolekular geknüpft werden. Des weiteren stehen verschiedene Oxidantien zur Verfügung.^{40,41} In dieser Arbeit wird jedoch nur die sehr milde Variante der Luftoxidation im basischen Reaktionsmilieu einer verdünnten Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung durchgeführt.

4.2 Die Baustein-Methode⁴²

Die glycosylierten Aminosäurebausteine lassen sich auf verschiedene Weise darstellen, wobei stets die zuvor aminierte Form des zu verknüpfenden Zuckers eingesetzt wird. Unterschiede gibt es hingegen in der Wahl der Schutzgruppen und der Aktivierung der γ -Carboxylfunktion am Aspartat. Während frühere Arbeiten vom zweifach aktivierten, z.B. Fmoc-Asp(Cl)-OPfp ausgingen und somit nach Glycosylierung ein unmittelbar in der SPPS einsetzbares Derivat erhielten, gehen neuere Arbeiten von einem freien γ -Säurerest aus, der mit Hilfe von klassischen Aktivierungsreagenzien wie HATU, TBTU oder HBTU zunächst noch aktiviert werden muß, bevor die Verknüpfung der glycosidischen Bindung erfolgt. Die Zucker werden an ihren OH-Gruppen ungeschützt eingesetzt, da die geschützten, also z.B. acetylierten Zucker in ihrer aminierte Form weniger nucleophil sind, als die ungeschützten. Die α -Carboxylfunktion ist durch Allyl- oder *t*Bu-Gruppen geschützt, die vor Einbringen des Bausteins in die laufende Peptidsynthese noch abgespalten werden. Wird der Zucker dann anschließend in seinen OH-Gruppen durch Acetylierung geschützt, kann im Syntheseverlauf weiterhin unter Verwendung von Aktivierungsreagenzien gearbeitet werden, andernfalls muß auf

Pfp-Ester-Chemie ausgewichen werden, um unerwünschte Nebenreaktionen durch Veresterungen an den freien saccharidischen OH-Gruppen auszuschliessen.²⁸

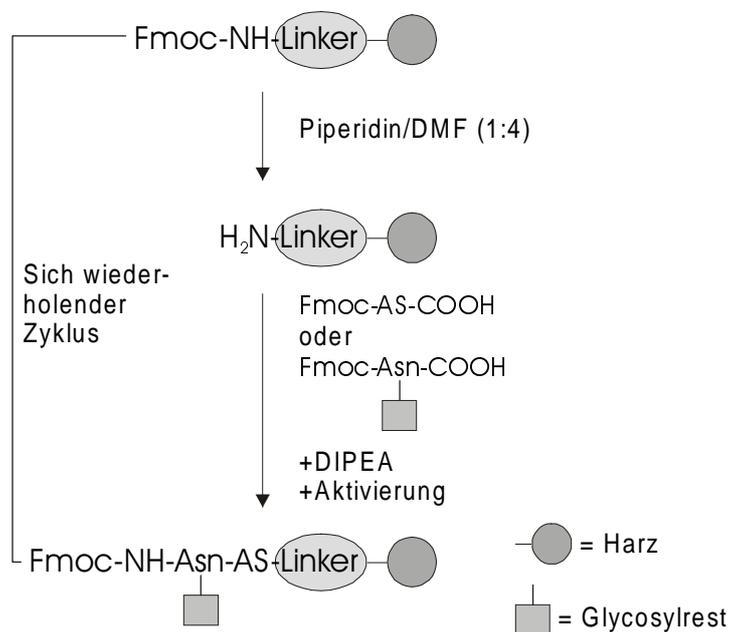


Abbildung 12: Schematischer Verlauf der sequentiellen Glycopeptid-Festphasensynthese.

Ein großer Nachteil der Bausteinmethode liegt in den unumgänglichen Ausbeuteverlusten nach Einbau des Glycosylbausteins, die zum einen durch nicht quantitativen Umsatz aller noch folgender Aminosäurekupplungen und zum anderen bei Entschützen der z.B. peracetylierten Kohlenhydrate entstehen. Außerdem erhält man je nach Aminosäuresequenz eine Vielzahl von glycosylierten Abbruchpeptiden, die sich dann nur sehr schwierig voneinander trennen lassen.

Die glycosylierten Asparaginbausteine lassen sich neben der gängigen sequentiellen SPPS auch in Blocksynthesen einsetzen, in denen zunächst geschützte Peptidblöcke hergestellt werden, die dann miteinander und dem glycosylierten Baustein verknüpft werden. Vorteil dieser Variante ist natürlich, daß dem Einbau der Glycosylierungsstelle nicht viele weitere Syntheseschritte folgen. Der große Nachteil liegt aber in dem Löslichkeitsverhalten der geschützten Peptidblöcke und einer erhöhten Epimerisierungsgefahr am C-terminalen Ende der Blöcke.⁴³

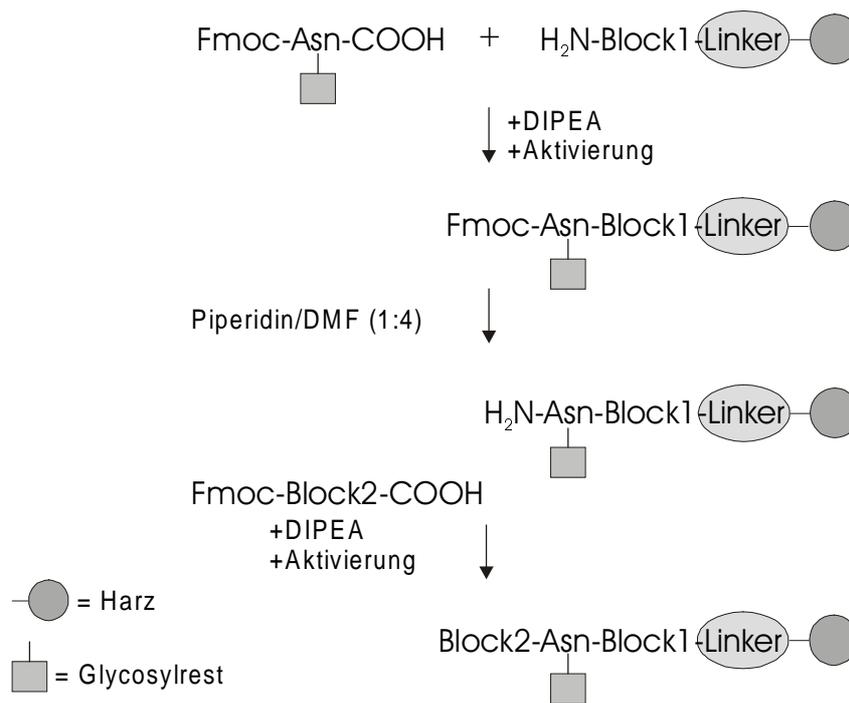


Abbildung 13: Schematischer Verlauf der Blocksynthese von Glycopeptiden an der festen Phase.

4.3 Die Glycosylierung am Harz – konvergente Synthese

In der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Methode zur Synthese von N-Typ-Glycopeptiden wird zunächst eine selektiv an ihrer Seitenkettencarboxylfunktion geschützte Asparaginsäure in das Peptid eingefügt. Nach vollständiger Peptidsynthese wird diese Schutzgruppe dann selektiv entschützt, die γ -Säurefunktion aktiviert und mit dem zu verknüpfenden, aminierten Zucker glycosyliert. Aufgrund dieses konvergenten Vorgehens bezeichnet man diese Methode auch als konvergente N-Typ-Glycopeptidsynthese. Vorteil dieser Glycosylierungsvariante ist der späte Einsatz des hochwertigen Kohlenhydratrestes im letzten Syntheseschritt. Dies spart und schont wertvolles Reagenz, das im Falle der Oligomere meist nur in kleinstmengen zur Verfügung steht. Außerdem erhält man am Ende der Synthese nur ein oder wenige glycosylierte Produkte, die sich sehr gut und in wenigen Arbeitsschritten (z.B. affinitätschromatographisch) von allen nicht-glycosylierten Produkten (Abbruchpeptide, Schutzgruppen, etc.) abtrennen und isolieren läßt.

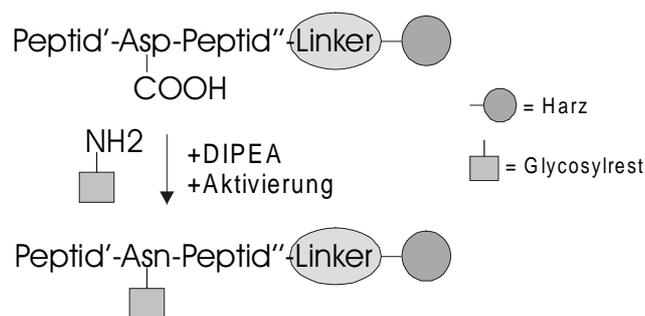


Abbildung 14: Schematischer Verlauf der konvergenten Glycopeptidsynthese an der festen Phase.

Die Abspaltung des so dargestellten Glycopeptids erfolgt neben allen Schutzgruppen mit Standardabspaltgemischen. Es ist nur darauf zu achten, daß die sogenannten *scavenger*-Zusätze in dem stark sauren Abspalt-Milieu die glycosidische Bindung unberührt lassen. Derartige *scavenger*-Zusätze werden gemacht, um die bei der Abspaltung der Schutzgruppen entstehenden Carbokationen, die zu zahlreichen postsynthetischen Modifikationen am Peptid führen können, abzufangen.⁴⁴ Im Falle der Zusätze Ethandithiol⁴⁵ und Thioanisol konnte z.B. gezeigt werden, daß es bei ihrer Anwendung zur Spaltung der glycosidischen Bindung kommen kann.⁹³

Unerfreulicherweise kommt es im Verlauf der konvergenten N-Typ-Glycopeptidsynthese aber zu einer Ringschlußreaktion und zwar unmittelbar nach der Seitenkettenaktivierung am Aspartat, aus der ein stabiles Imid hervorgeht.

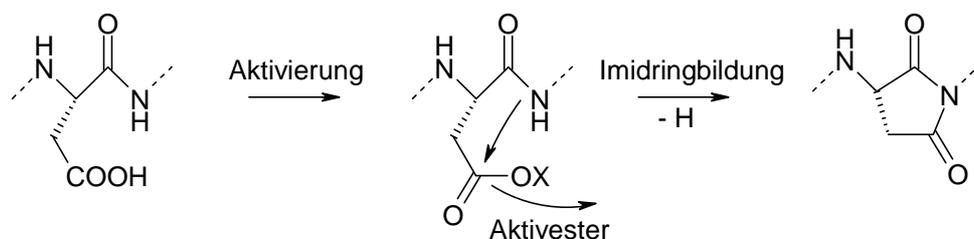


Abbildung 15: Mechanismus der Succinimid-Ringbildung

Unter basischen Bedingungen kommt es zur Abstraktion des Amidprotons der C-terminal benachbarten Peptidbindung, dem ein nucleophiler Angriff an der β -Carboxy-Gruppe folgt. Diese Nebenreaktion ist in der Peptidchemie hinreichend bekannt und wird als Aspartimidbildung bezeichnet. Sie tritt sowohl an fester Phase, als auch in Lösung auf.⁴⁶ Das Ausmaß dieser unerwünschten Nebenreaktion ist abhängig von der verwendeten Base und dem C-terminalen Rest an der Aspartylbindung. Eine besonders hohe Neigung zur Succinimid-Bildung zeigen hier Glycin, Serin, Threonin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Glutaminsäure.⁴⁷

Nach zahlreichen erfolglosen Versuchen die Imidbildung durch Veränderung der Reaktionsbedingungen, also Wahl verschiedener Basen oder Aktivatorreagenzien, zu unterdrücken, bleibt nur der Ersatz des am Ringschluß beteiligten Protons in der zur Glycosylierungsstelle C-terminal benachbarten Peptidbindung. Da keine irreversible Veränderung am Peptid-*backbone* vorgenommen werden soll, kann dies nur durch Wahl einer geeigneten Schutzgruppe erfolgen. Bei der Wahl dieser Schutzgruppe wurde auf Erfahrungen aus dem Bereich der Synthese sogenannter schwieriger Peptidsequenzen zurückgegriffen. Dort liegt das zentrale Syntheseproblem in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die an unterschiedlichen Stellen und variierender Anzahl zu Aggregationen und Sekundärstrukturen führen, die den Reagenzienzugang zum Peptid⁴⁸ oder sein Löslichkeitsverhalten nachteilig beeinflussen. Dies führt zu unvollständigen Aminoacylierungen und unvollständiger Fmoc-Abspaltung, detektierbar an der deutlich verlangsamten Entschützungsrate.⁴⁹

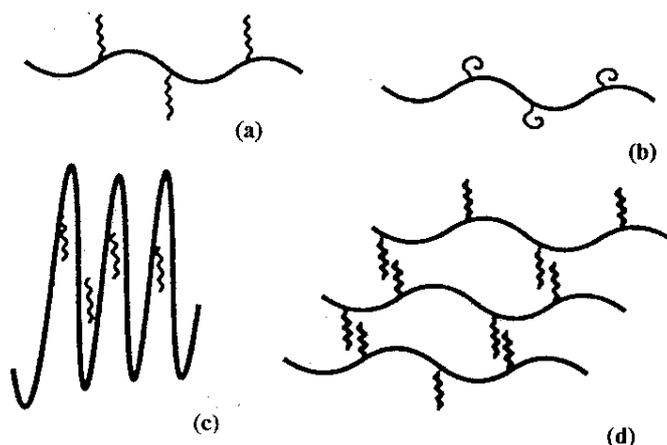


Abbildung 16: Potentielle Formen der Aggregation unter Verringerung der Löslichkeit durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen: a) optimaler Fall, d.h. keine Wechselwirkungen, b) nur das Polymer ist solvatisiert, Peptid unterliegt intramolekularer Aggregation, c) umgekehrter Fall zu b) und d) Wasserstoffbrückenbildung der Peptide untereinander.

Zur Abhilfe werden hier in Abständen von ca. 6 Aminosäureresten die Amidprotonen der Peptidbindungen im *backbone* durch Schutzgruppen ersetzt, was die Ausbildung von Wasserstoffbrücken maßgeblich beeinträchtigt. Als besonders erfolgreiche Schutzgruppe kommt hier,⁵⁰ genau wie im Bereich der Blocksynthesen, in denen aus der Bildung derartiger Wasserstoffbrücken, Peptidblöcke schwerer Löslichkeit resultieren⁵¹, die 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl-gruppe zum Einsatz, kurz Hmb.⁵² Hmb-Schutzgruppen sind auch mit Phosphopetidsynthesen⁵³ kompatibel, verstehen sich also als durchaus universelle Schutzgruppen.

4.4 Die Hmb-Schutzgruppe

Da ein gezieltes Anbringen von Schutzgruppen an bestimmte, ausgewählte Peptidbindungen eines Peptides nach dessen vollständiger Synthese am Harz unmöglich erscheint, muß der Schutz vor der Synthese an der einzusetzenden Aminosäure erfolgen und über den gesamten Syntheseverlauf im Sinne einer Permanentschutzgruppe stabil sein. Gleichzeitig soll die Schutzgruppe aber auch mit dem Harz, also in feuchter TFA abspaltbar sein. Aus diesen Anforderungen wurden nun, nach anfänglichen Versuchen an den schwer zugänglichen Furfuryl- und Thiophenylmethyl-Systemen, methoxylierte Benzylgruppen kreiert, welche auf den ersten Blick allen zu erfüllenden Kriterien entsprachen und darüber hinaus auch leicht an den entsprechenden Aminosäurederivaten anzubringen waren.

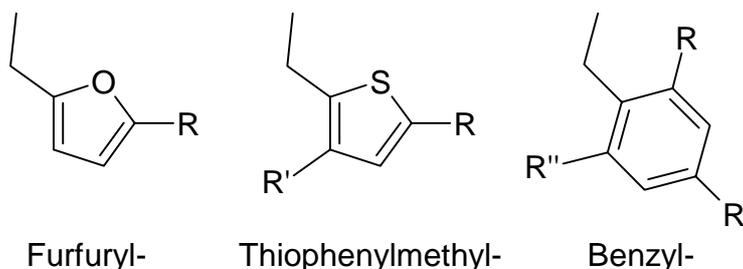


Abbildung 17: Potentielle Schutzgruppen am Stickstoff einer Peptidbindung.

Zu diesen Methoxy-benzyl-Gruppen zählte auch eine an Position 2 im Ring hydroxylierte 4-Methoxybenzylgruppe, welche eine besondere Eigenschaft aufwies. Nach Einbau des mit ihr geschützten Aminosäurederivates, ließ sich die nächstfolgende Aminosäure im Verhältnis zu allen bis dahin untersuchten Schutzgruppen außergewöhnlich schnell ankuppeln, woraufhin der sogenannte O→N-Acylshift postuliert wurde. Wie Abbildung 18 zeigt, kann die α -Aminofunktion als interner basischer Katalysator fungieren. Die phenolische OH-Gruppe ist, weil nun sterisch relativ ungehindert, leichter veresterbar und darüber hinaus aktiviert.

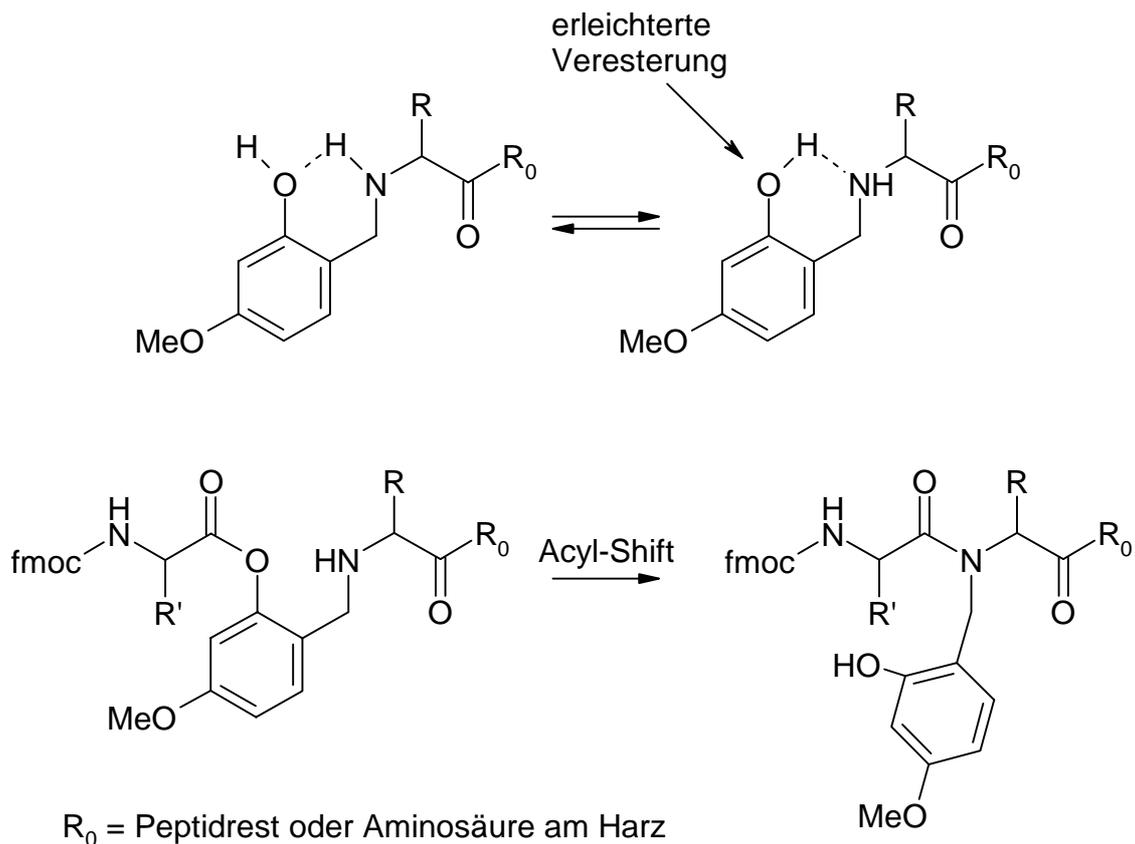


Abbildung 18: Postulierter O→N-Acylshift.

Untersuchungen an 2-Hydroxybenzylschutzgruppen⁵⁴, also unter Verzicht auf jegliche Methoxy-Funktion, führten nicht nur zu einer veränderten Abspaltbarkeit der Gruppe in Gegenwart feuchter TFA, sondern auch zu einem deutlich verlangsamten Kupplungsverhalten des entsprechend geschützten Derivates, so daß auf die 4-Methoxy-Gruppe nicht verzichtet werden kann.⁵⁵

Die von dort an in zahlreichen Synthesen schwieriger Sequenzen mehr oder weniger⁵⁶ erfolgreich eingesetzte Hmb-Gruppe wird als Ihr zweifach Fmoc-geschütztes Derivat in die laufende Peptidsynthese eingefügt. Dieses ist jedoch nur für einige wenige, einfache und vorrangig in ihren Seitenketten ungeschützte Aminosäuren in vertretbaren Ausbeuten synthetisierbar und somit auch kommerziell erhältlich.

Für den Einsatz der Hmb-Schutzgruppe neben Glycosylierungsstellen ist es jedoch erforderlich, auf alle natürlichen Aminosäuren zurückgreifen zu können. Für die möglichen Glycosylierungen in der V4-Loop des GP120 z.B. werden Ser(*t*Bu) und Asn(Trt) benötigt, deren Hmb-geschützte Formen bislang noch nicht zugänglich waren.

4.5 Aminierung der Zucker

Die aminierte Saccharide werden nach einer einfachen Vorschrift von Kochetkov *et al.*⁵⁷ synthetisiert nach der die Aminierung des ungeschützten Zuckers in einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung erfolgt.

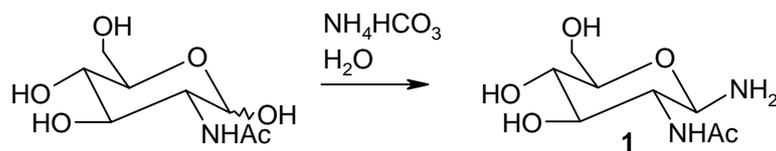


Abbildung 19: Synthese weg zum 2-N-Acetyl-D-glucosaminylamin (**1**).

Der große Nachteil dieser Variante liegt in der anschließenden Aufreinigung durch Gefriertrocknung. Diese stellt eine Gradwanderung zwischen dem Entfernen des überschüssigen Ammoniumhydrogencarbonats durch Überführen in Ammoniak, Kohlendioxid und Wasser und der Labilität des aminierte Produktes und seinem Übergang in die nicht-amierte Ausgangsform dar. Ein wesentlicher Anteil des Ammoniaks, der während der Glycosylierung zugegen ist und zum Asparagin führt, geht aus dem Produkt selbst hervor. Daher erscheint ein Wechsel zu einem alternativen Syntheseweg, der beispielsweise über das Glycosylazid^{58,59,60} geht, wenig praktikabel. Das Ausmaß der Verunreinigung an Ammoniak läßt sich quantitativ über temporäre Kupplung an Fmoc-Asp-OtBu und anschließende HPLC-Analytik bestimmen,⁶¹ kann aber aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des aminierte Saccharids nur eine Momentaufnahme sein.

5 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll die konvergente Synthese von N-Typ-Glycopeptiden optimiert werden. Dabei war es geplant, fertige Peptide an den jeweiligen Seitenketten durch Glycosylaminosucker zu glycosylieren. Aufgrund der bei Durchführung dieser Methode auftretenden Nebenreaktion einer Imidbildung an der Glycosylierungsstelle ist es zunächst nötig, eine geeignete Schutzgruppe zur Unterdrückung dieser Ringbildung zu etablieren. Dazu muß ein Syntheseweg gefunden werden, der es ermöglicht, alle natürlichen Aminosäuren entsprechend zu schützen und in Derivate zu überführen, die sich in der Fmoc/*t*Bu-SPPS einsetzen lassen.

Mit dem weiteren Ziel, die bislang auf nur eine Glycosylierungsstelle eingeschränkte Anwendbarkeit der konvergenten Methodik zu erweitern, sollen an zwei verschiedenen Glycosylierungsstellen zwei β -aminierte, ungeschützte Saccharide unterschiedlichen sterischen Anspruchs verknüpft werden. Hierzu ist der Einsatz eines orthogonal selektiven Schutzgruppen-Paares erforderlich, das zunächst zusammengestellt und auf seine Verwendbarkeit hin untersucht werden muß. Des weiteren soll die Einsetzbarkeit von aminierten Oligosacchariden geprüft werden.

Als Beispielsequenz wurden Teile aus dem GP120 des HIV gewählt. Es handelt sich aufgrund ihres hohen Glycosylierungsgrades¹⁴ um Teile aus der V4-Loop aus dem NL43-Clone eines europäischen Patienten⁶² und um die V3-Loop einer Patientensequenz (EB1), die im Tropeninstitut Hamburg sequenziert wurde.⁹³ An letzterer soll auch die Anwendbarkeit der konvergenten Methodik auf längere Peptidfragmente, die bereits zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen, untersucht werden.

6 Syntheseresultate und Diskussion

6.1 Untersuchungen zur Darstellung und Einsetzbarkeit von N^α -geschützten Aminosäurederivaten in der Festphasenpeptidsynthese

6.1.1 Darstellung von N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin

N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin (7) wurde nach einer leicht modifizierten Vorschrift von Johnson *et al.* mit einer Ausbeute von 45% dargestellt.⁵² Dabei wurde die freie α -Aminogruppe des Alanins mit einem 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd zur Schiffschen Base umgesetzt und diese dann im Anschluß reduziert.

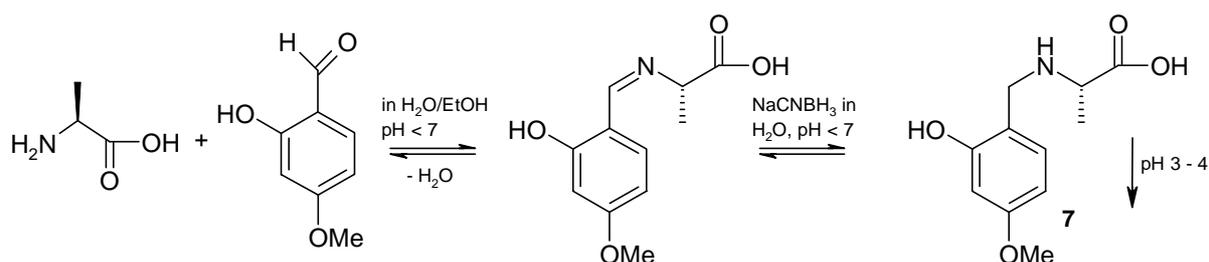


Abbildung 20: Syntheseweg zum N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin (7).

Wie bereits zuvor im Rahmen einer Diplomarbeit gezeigt werden konnte, ist die direkte Reproduktion der Originalvorschrift nicht möglich.⁷⁰

Die anfänglich schwachen Ausbeuten wurden auf das in wässrigem Medium zersetzungs-labile Reduktionsmittel Natriumborhydrid zurückgeführt, welches daraufhin gegen das wesentlich beständigere Natriumcyanoborhydrid ersetzt wurde. Als ebenso falsch wurde die Anweisung interpretiert, die Aminosäure in einer 1 M Kalilauge zu lösen. Es wurde zunächst vermutet und im späteren Teil dieser Arbeit (siehe 9.2.8) noch bewiesen, daß bei derart extrem basischen Bedingungen um $\text{pH} > 11$ Racemisierung auftritt, d.h. ein D-,L-konfiguriertes Produktgemisch entsteht. Sowohl die Aminosäure, als auch das Reduktionsmittel wurden also in reinem Wasser gelöst, der pH-Wert der Reaktionslösung auf pH 6 eingestellt und nach Zugabe des Reduktionsmittels konstant auf pH 6 reguliert.

6.1.2 Versuche zur Synthese von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-[2-(fluoren-9-ylmethoxy-carbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (11) in Lösung

Wie am N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-asparaginsäure-4-*tert*-butylester bereits ausgiebig gezeigt wurde, führt der Umsatz Hmb-geschützter Aminosäurederivate mit 9-Fluorenylmethylchlorformiat (Fmoc-Cl) zu zahlreichen Produkten.⁷⁰ Neben dem am N-Terminus einfach Fmoc-geschützten Derivat wird sowohl das gewünschte zweifach geschützte Produkt, als auch das dreifach, also zusätzlich an der dritten freien funktionellen Gruppe, der α -Carboxy-Funktion, substituierte Derivat gewonnen. Dies kommt vermutlich durch eine sogenannte Chlorid-Übertragungsreaktion zustande.⁷⁸ Der nach Freiwerden von Kohlendioxid aus Fmoc-Cl entstehende Alkohol verestert hierbei mit der durch das Chloratom aktivierten α -Carboxy-Funktion zum 1-Fluoren-9-ylmethylester.

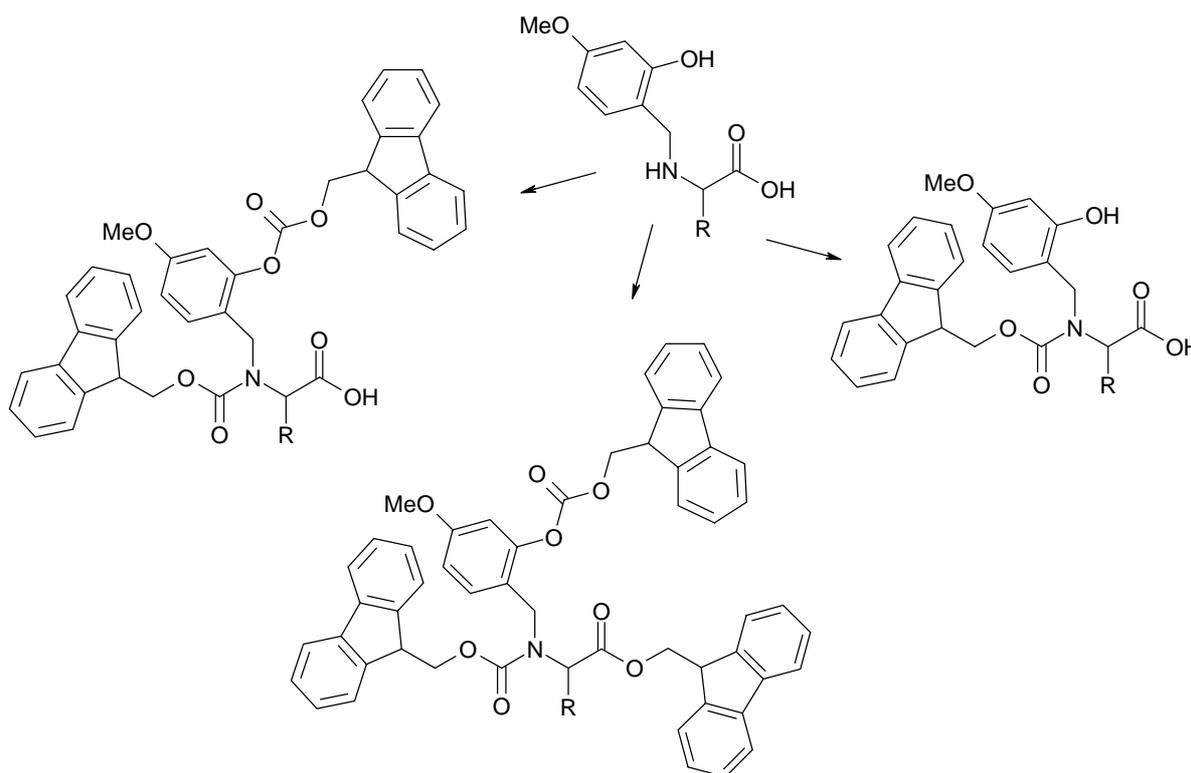


Abbildung 21: Auftrende Produktvielfalt nach Versuch ein Hmb-geschütztes Aminosäurederivat mit Fmoc-Gruppen zu schützen.

Versuche mit Fmoc-N₃⁶³ und 9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat (Fmoc-ONSu) als Fmoc-einführende Reagenzien ergaben aufgrund hoher Zerfallsstabilität und geringerer Aktivität keine oder nur einfach Fmoc-geschützte Produkte.

Der Versuch N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (**11**) aus N^α-(2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-L-alanin (**7**) durch Umsatz mit Fmoc-Cl im basischen Reaktionsmedium darzustellen, führte, wie erwartet, zu einer hohen Produktvielfalt, die nicht weiter aufgetrennt und analysiert wurde, da auf eine zu geringe Ausbeute geschlossen wurde.

Die so gewonnene Erkenntnis an dem in seiner Seitenkette wesentlich einfacheren und ungeschützten L-Alanin bestätigten also die früheren Ergebnisse am Beispiel des L-Asparaginsäure-4-*tert*-butylester und führten zu der Entscheidung, zwei weitere Untersuchungen durchzuführen: Erstens sollte nach einer Alternativschutzgruppe zu Hmb gesucht werden, die keine freie Hydroxygruppe trägt, so daß sie von vornherein nur einfach am N-Terminus geschützt werden muß und zweitens sollte durch selektiven Schutz der α -Carboxylfunktion versucht werden, die Produktvielfalt auf zwei Produkte (das einfach und zweifach geschützte Derivat) einzuschränken, um dann durch Verschärfen der Reaktionsbedingungen, den Anteil des gewünschten, zweifach geschützten Produktes im Gemisch deutlich zu erhöhen.

6.1.3 Alternativschutzgruppen zu Hmb

1.1.1.1 Darstellung von N^α-(2,4-Dimethoxybenzyl)-L-alanin (**12**) und N^α-(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-L-alanin (**14**)

In der Arbeitsgruppe von Johnsen *et al.*⁵² wurden bereits zahlreiche Alternativschutzgruppen synthetisiert, an einfache Aminosäurederivate angebracht und auf ihre Einsetzbarkeit in der SPPS nach Fmoc/*t*Bu-Variante hin untersucht. Neben verschiedenen Furfuryl- und Thiophenylmethyl-Derivaten, deren Nachteil größtenteils in der Synthese entsprechend für die SPPS verwendbarer Bausteine lag, wurden auch die Di- und Trimethoxy-Analoga von Hmb untersucht, welche für weitere Betrachtungen im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt wurden. Nach der bereits für Hmb erfolgreich eingesetzten modifizierten Synthese nach Johnson *et al.*, in der bei pH 6 mit Natriumcyanoborhydrid umgesetzt wird, konnten sowohl das N^α-(2,4-Dimethoxybenzyl)-L-alanin (**12**), als auch das N^α-(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-

L-alanin (**14**) in Ausbeuten von 20% und 6% synthetisiert werden. Der Fmoc-Schutz erfolgte durch Umsatz mit Fmoc-Cl selektiv am N-Terminus und führte in Ausbeuten von 41% und 31% zu einsetzbaren Derivaten.

Um die mögliche Veresterung am C-Terminus durch die Überreaktion mit dem Fmoc-Cl auszuschließen, wurde zuvor der Versuch unternommen, N^α-(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-L-alanin (**14**) mit Hilfe von Fmoc-ONSu zu schützen. Hierbei konnte kein Umsatz registriert werden, was vermutlich auf den hohen sterischen Anspruch des dreifach methoxylierten Benzylsystems zurückzuführen ist.

Die gewonnenen Synthesebausteine wurden nun auf ihre Verwendbarkeit in der SPPS hin überprüft.

6.1.3.2 Untersuchung zur Einsetzbarkeit der Dmb- und Tmb-geschützten Alanin-Derivate in der SPPS

In einer einfachen, manuell durchgeführten Peptidsynthese wurde überprüft, ob sich die an ihrer Amid-Funktion aufwendig geschützten Alanin-Derivate ebensogut in die laufende Peptidsynthese einführen lassen wie entsprechend ungeschützte Alanin-Derivate. Es wurde die Sequenz LFDATW ausgewählt und durch jeweils zweifache Kupplung der Aminosäurederivate in einem 1.5 fachen Überschuß dargestellt. Die Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte wurden, wie allgemein üblich, durch Messung der UV-Absorption des in der Abspaltung enthaltenen Metylenfluorens bei 301 nm im Photometer bestimmt. Man spricht vom sogenannten Fmoc-Wert. Es zeigte sich, daß die Ausbeuten der aufeinander folgenden Syntheseschritte im Bereich zwischen 82% und 100% den Erwartungen entsprachen und als normal eingestuft werden konnten. Anders verhielt es sich dagegen mit den Ausbeuten der Kupplungen unmittelbar hinter den eingefügten N-terminal geschützten Alaninderivaten. Hier fielen die Ausbeuten im Falle des Dmb-geschützten Derivats auf 12% und im Falle des Tmb-geschützten Derivates auf 25% ab. Es bestätigte sich also die Aussage von Sheppard *et al.*⁵², daß der hohe sterische Anspruch der Schutzgruppen am N-Terminus die Kupplung einer Folgeaminoäure schwierig bis fast unmöglich macht.

Der postulierte O → N-Acyl-Shift an Hmb ist also essentiell für die fortlaufende Peptidsynthese und damit die freie Hydroxy-Funktion am Benzylgerüst der Schutzgruppe unumgänglich.

6.1.4 Selektiver Schutz der α -Carboxylfunktion

Versuche, die α -Carboxylfunktion mit einer Allylschutzgruppe zu versehen,⁶⁴ scheiterten an der Vielfalt funktioneller Gruppen im Edukt. Nach einer Vorschrift von Bochnitschek *et al.*⁶⁴ wurden nur zweifachallylierte Produkte in ökonomisch vertretbarer Ausbeute erhalten.⁷⁰ Darüber hinaus ist fraglich, ob die stark reduktiven Reaktionsbedingungen bei Einführen der Hmb-Schutzgruppe (bei Reduktion der Schiffschens Base) den Allylschutz nicht zum Propylester reduzieren und dieser so nicht mehr an Paladium(0) selektiv abgespalten werden kann. Es wurde daher auf eine weitere Verfolgung dieses Ansatzes verzichtet und der Versuch unternommen, die α -Carboxylfunktion mit Dmab zu schützen. Diese Schutzgruppe läßt sich selektiv in Gegenwart einer 2%igen Hydrazin-Lösung abspalten (siehe Abbildung 22).

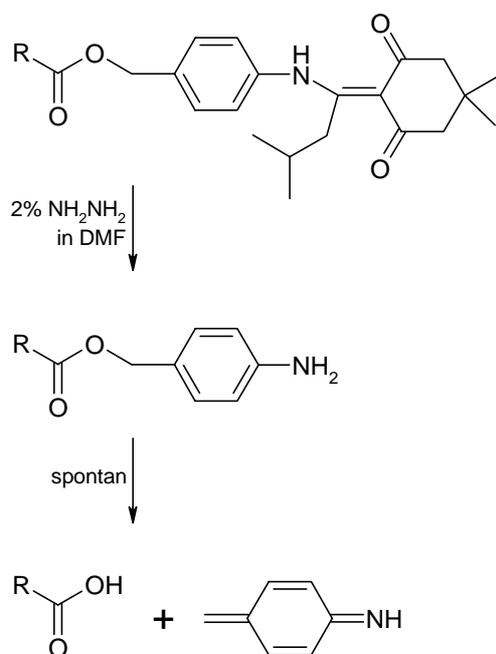


Abbildung 22: Abspaltung einer 4-[N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl)-amino]benzyl-Schutzgruppe.

Um sicherzugehen, daß die Dmab-Schutzgruppe die reduktiven Bedingungen des weiteren Syntheseverlaufes unbeschadet überdauert, wurde zunächst die Reduktionsbeständigkeit in Lösung überprüft. Hierzu wurde eine kleine Menge Fmoc-L-Asp(ODmab)-OH in DMF mit Natriumcyanoborhydrid in a) 25% MeOH/DMF, b) 1% essigsäurem DMF und c) Wasser versetzt und sein Zerfall in das Dmab freie Adukt per DC überwacht. Das Ergebnis dieser Voruntersuchung zeigte,

daß Dmab-Schutzgruppen zumindest über mehrere Stunden und im Fall c sogar über mehrer Tage stabil sind.

Mit einer Ausbeute von 92% wurde die Dmab-Schutzgruppe durch Veresterung der zuvor mit DCC aktivierten α -Carboxylfunktion mit Dmab-OH erfolgreich und selektiv eingeführt. Die anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte in einer Ausbeute von nur noch 51%, wobei der Produktverlust vor allem auf die Dmab-Labilität gegenüber 25%iger Piperidin/Chloroform-Lösung zurückzuführen ist.

Im Folgenden wurde nun in nicht pH-kontrolliertem Medium versucht, die Aminosäure mit 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd zur Schiffsbasis umzusetzen und diese im Anschluß mit Natriumborhydrid zu reduzieren. Da nach Ansäuern auf pH 3 keinerlei Produkt ausfiel, wurde der gesamte Reaktionsansatz gefriergetrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt. Neben N^{α} -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin (7) konnten nur die Dmab-Schutzgruppe und ihre Zerfallsprodukte identifiziert werden.

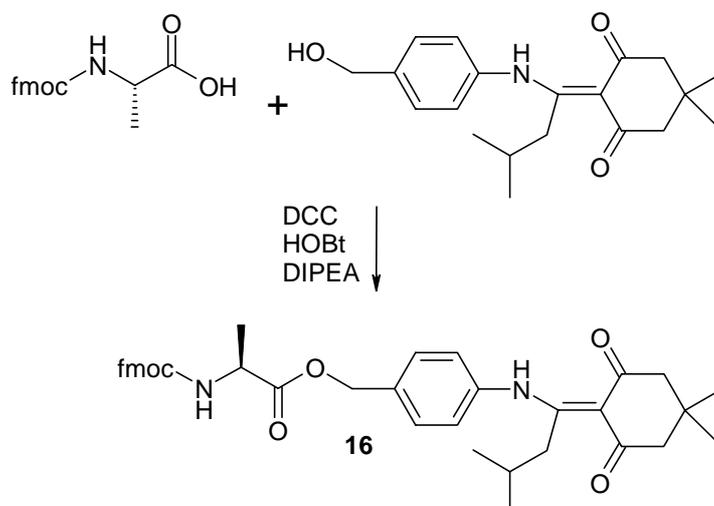


Abbildung 23: Anbringen einer Dmab-Schutzgruppe an Fmoc-L-Ala-OH.

Aufgrund des kompletten Fehlschlages an dieser Stelle des Syntheseweges wurde auf eine tiefgreifende Analyse des Reaktionsverlaufes verzichtet. Außerdem läßt die überraschend hohe Piperidinlabilität und der damit verbundene hohe Ausbeuteverlust bei Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe ohnehin keine ökonomisch vertretbaren Gesamtausbeuten über die Gesamtsynthese erhoffen.

Als außerordentlich vielversprechend wurde die im Folgenden beschriebene Untersuchung zur Synthese von Hmb-geschützten Aminosäurederivaten am Harz eingestuft. Neben dem vollständigen Schutz der α -Carboxylfunktion über den gesamten Syntheseverlauf ermöglicht die Festphasensynthese neue Reaktionsbedingungen, wie das Arbeiten mit größeren Reagenzüberschüssen und das Einführen von Waschschrinen zwischen den verschiedenen Syntheseteilen.⁶⁵ Darüber hinaus sollte der Nebenproduktanteil deutlich kleiner ausfallen als bei den Syntheseversuchen in Lösung.

6.1.5 Darstellung der Hmb-geschützten Aminosäurederivate am Harz

Nach Kuppeln von Fmoc-L-alanin an eine säurelabile Festphase sollte die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten, mit 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd zur Schiffchen Base umgesetzt und schließlich mit Natriumcyanoborhydrid reduziert werden. Abschließend sollte die freie α -Aminofunktion und die phenolische OH-Gruppe an Hmb mit Fmoc-Schutzgruppen versehen und unter Erhalt der Hmb-Gruppe schwach sauer vom Harz abgespalten werden.

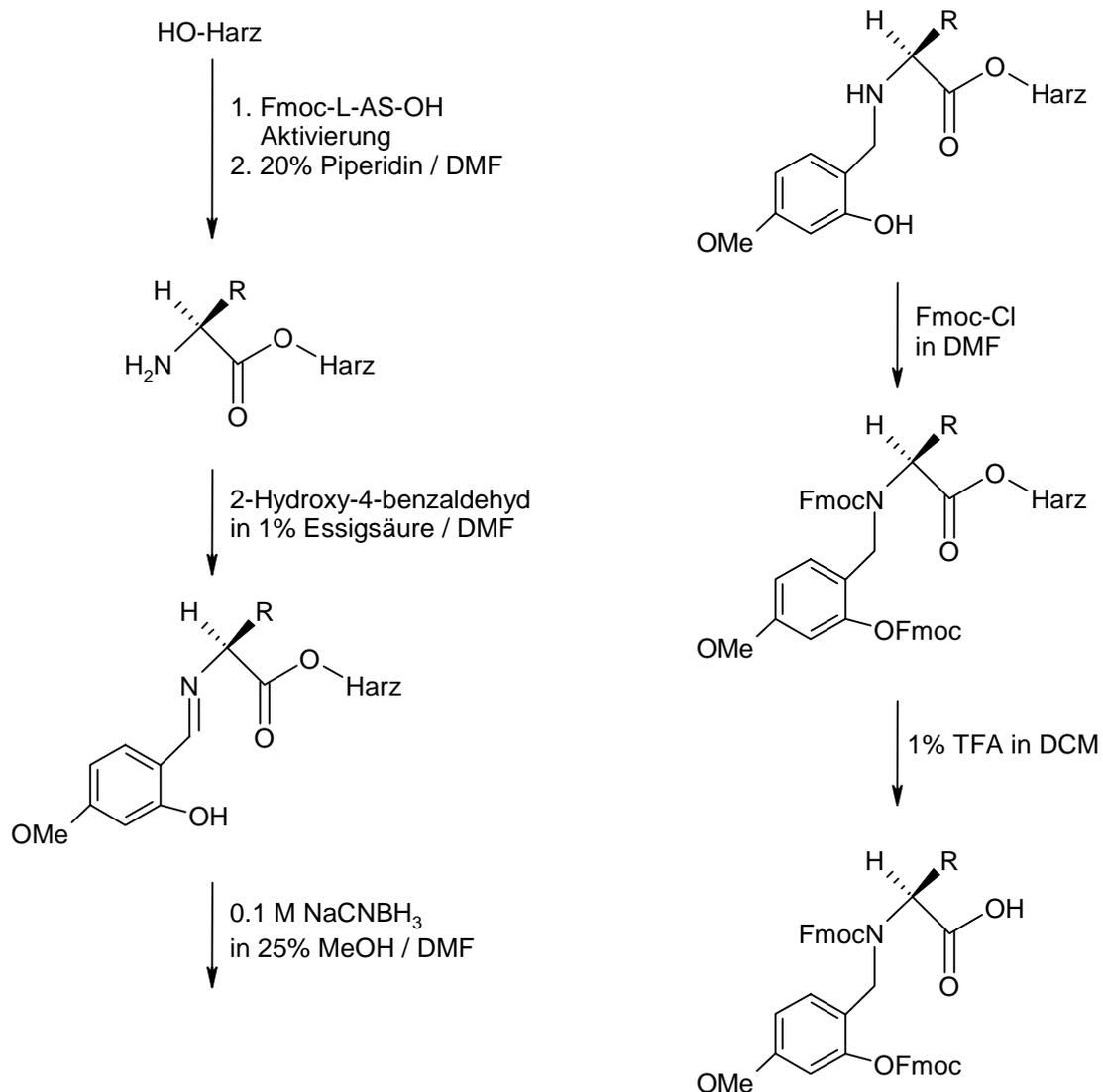


Abbildung 24: Synthesepfad zur Darstellung von Hmb-geschützten Aminosäurederivaten am Harz.

Als säurelabile Linker, bzw. Harze wurden Sasrin⁶⁶, Tritylchlorid⁶⁷ und HMPB¹⁰⁷ unterschiedlicher Belegung verwendet.

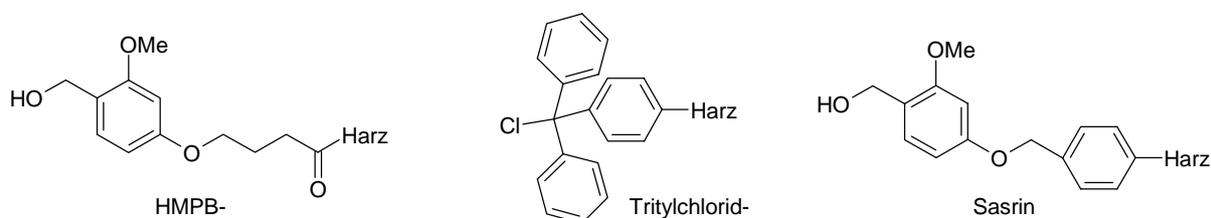


Abbildung 25: In 9.2.18.2 verwendete Linker, bzw. säurelabile Harze.

In der folgenden Tabelle 1 sind die verschiedenen Reaktionsansätze unter Angabe ihrer wesentlichen Unterschiede beschrieben.

	Harz / Linker	Belegung in $\mu\text{mol} / \text{g}$	Überschuß zu Aminosäure / Reaktionsdauer			Ausbeute
			Hmb-aldehyd	NaCNBH_3	Fmoc-Cl	
1	HMPB	71.70	5.3 fach/1x30'	26.5 fach/1x60'	10.6 fach/2x60'	15%
2	HMPB	142.90	¹ 2.7 fach/1x30'	26.6 fach/1x60'	5.3 fach/2x60'	<10%
3	HMPB	150.94	3.8 fach/1x30'	19 fach/1x60'	50.6 fach/2x60'	<10%
4	HMPB	180.63	^{1,2} 2.1 fach/2x60'	² 7.9 fach/2x60'	² 2.1 fach/2x60'	<10%
5	Sasrin	750.40	3.4 fach/1x30'	11.3 fach/1x80'	4.52 fach/2x60'	<5%
6	Trityl-Cl	331.56	¹ 7.7 fach/1x60'	28.7 fach/1x60'	5.7 fach/2x60'	<5%

Tabelle 1: Reaktionsansätze zur Darstellung der Hmb-geschützten Aminosäurederivate am Harz unter Angabe ihrer wesentlichen Unterschiede

¹ in 1%essigsäurem DMF, ² unter Rühren im Rundkolben.

Es läßt sich zusammenfassend aussagen, daß alle Ansätze zum gewünschten Produkt, N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxy-carbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (**11**) führten, wenn auch in teils sehr geringer Ausbeute. Die Festphasensynthese von N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]- N^β -trityl-L-asparagin (**26**) in wesentlich größerem Ansatz zeigte, daß nach dieser Methode auch komplexere, anspruchsvoll seitenkettengeschützte Aminosäure-Derivate darstellbar sind.

Anders als erwartet, führten die zahlreichen Waschschrte und das Acetylieren noch freier, nicht umgesetzter Aminofunktionen am Harz zu keiner Verringerung der Produktvielfalt und keiner wesentlichen Vereinfachung in der Synthesedurchführung, da auf den aufwendigen Aufreinigungsprozess durch Säulenchromatographie im Anschluß an die Festphasenreaktion nicht verzichtet werden konnte. Es wird vermutet, daß es im Syntheseverlauf zu unerwünschten Wechselwirkungen der eingesetzten Reagenzien mit der festen Phase kommt, bzw. daß die räumliche Nähe der teilweise sterisch anspruchsvollen Derivate einen störenden Einfluß haben könnte. Möglicherweise ist es sinnvoll, langkettigere Linker einzusetzen und noch weitere Harzarten auf ihre Verwendbarkeit hin zu überprüfen.

6.1.6 Darstellung von N^α-Fmoc-geschützten N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-aminosäurederivaten in Lösung

Wie Albericio *et al.*⁷⁸ und Zeng *et al.*¹¹¹ beschreiben, können auch die nur einfach an ihrer N-Funktion Fmoc-geschützten N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-aminosäurederivate erfolgreich in laufenden Peptidsynthesen eingesetzt werden. Um diesen fragwürdigen Befund zu überprüfen, wurde zunächst am Beispiel des L-Serin der Versuch unternommen, ein entsprechend einsetzbares Derivat in ökonomisch sinnvoller Ausbeute und Reinheit zu erhalten.

6.1.6.1 O^β-*tert*-Butyl-L-serin

Wie unter 9.2.1 für Alanin beschrieben, wurde eine Hmb-Gruppe an O^β-*tert*-Butyl-L-serin angefügt. Da sich ohne mehrfaches Umkristallisieren⁶⁸ des Rohproduktes stets noch Reste des beständigen Natriumcyanoborhydrid im Rohproduktgemisch finden ließen, wurde stattdessen auf Natriumborhydrid in nur 10%igen Überschuß zurückgegriffen. Bei Ansäuern des Reaktionsgemisches mit konz. HCl werden so die nicht umgesetzten Reduktionsmittelreste vollständig unter Wasserstoffentwicklung (in Form starker Schaumbildung) zersetzt. Der daraufhin über Nacht bei konstanter Kühlung auf ca. 8°C ausfallende, bzw. auskristallisierende Feststoff muß nur noch gewaschen und nicht weiter umkristallisiert werden. Wie in einer Vorschrift von Albericio *et al.*⁷⁸ behauptet, soll sich darüber hinaus die Ausbeute merklich erhöhen, wenn die Bildung der Schiffschen Base bei kontrolliertem pH um den Wert 9 durchgeführt wird. Dies konnte in einem entsprechenden Ansatz bestätigt werden, in dem die Ausbeute von 45% auf 55% erhöht wurde. Der Versuch die Reaktion wie in der Originalvorschrift angegeben, in 1 M Kalilauge durchzuführen, endete, wie eingangs befürchtet, im D,L-Enantiomergemisch von N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**18**). Dies zeigten die begleitenden Drehwertmessungen (siehe 9.2.8).

Das Anbringen der Fmoc-Schutzgruppe am freien N-Terminus von O^β-*tert*-Butyl-L-serin erfolgte mit Fmoc-ONSu in Gegenwart von Triethylamin.¹¹¹ Die Ausbeute lag bei 38% an reinem Produkt. Die Gesamtausbeute betrug 21%. Zum selektiven Schützen der α-Amino-Gruppe ist es also nicht, wie von Albericio *et al.* beschrieben, erforderlich, die phenolische OH-Gruppe an Hmb temporär mit z.B. einer TMS-Schutzgruppe zu versehen.^{78,69} Es reicht aus, ein entsprechend schwaches Fmoc-Übertragungsreagenz in nur zweifachem Überschuß einzusetzen.

Mit Fmoc-Cl kam es sowohl in 10% Natriumcarbonat-Lösung/Dioxan, also auch in DIPEA/Chloroform wie zuvor an L-Alanin, zum ein- und zweifachgeschützten Produkt **19** und **20**. Der Anteil dreifach substituierten Produktes konnte durch Wahl eines deutlich geringeren Überschußes an Fmoc-Cl, von nur noch zwei, bzw. dreifach zu ehemals bis zu zehnfach⁷⁰, auf nicht identifizierbare Mengen reduziert werden. Dafür gab es einen eindeutig identifizier- und isolierbaren Anteil von gar nicht umgesetztem N^α-(2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**18**). Da die Ausbeute an zweifach Fmoc-geschütztem Derivat **20** jedoch außerordentlich gering blieb, wurden die weiterführenden Untersuchungen auf das einfach Fmoc-geschützte Derivat **19** fokussiert.

6.1.6.2 L-Phenylalanin

Die unter 9.2.9 beschriebene Vorschrift zur erfolgreichen Synthese von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (S_{NHmb}) (**19**) konnte in einer Gesamtausbeute von 22% ohne weitere Modifizierung auf L-Phenylalanin übertragen werden.

6.1.6.3 N^β-Trityl-L-asparagin

Die an O^β-*tert*-Butyl-L-serin gewonnenen und unter 9.2.9 beschriebenen Erkenntnisse zur Synthese einfach Fmoc-geschützten N^α-(2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serins (**19**) konnten nicht direkt auf N^β-Trityl-L-asparagin übertragen werden. Das nach Reduktion zum Abbruch der Reaktion führende starke Ansäuern der Reaktionslösung, welches neben dem Zerfall der Reduktionsmittelreste auch das Ausfallen, bzw. -kristallisieren des Produktes zur Folge hat, führt im Falle von N^β-trityl-L-asparagin zum vollständigen Verlust der stark säurelabilen Trityl-Schutzgruppe. Die Suche nach einer alternativen Schutzgruppe, die sowohl den Bedingungen einer Fmoc/*t*Bu-SPPS, als auch den hier erforderlichen Reaktionsbedingungen genügt, führte nur zu Derivaten, die entweder gar nicht oder nur zu sehr hohem Preis kommerziell erhältlich sind.

Um weitere Synthesestufen zu umgehen, wurde versucht, auf den Aufreinigungsschritt des Hmb-geschützten Derivates im stark Sauren zu verzichten. Die Umsetzung zur Schiffschen Base erfolgte in Methanol, der sich nach erfolgreicher Reduktion mit Natriumborhydrid einfach am Rotationsverdampfer abdampfen ließ. Der feste Rückstand wurde nun in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch

wiederaufgenommen und in Gegenwart von Triethylamin mit Fmoc-ONSu zum einfach Fmoc-geschützten Derivat **25** umgesetzt. Der nach Einrotieren und Gefriertrocknung erneut gewonnene Rückstand wurde in Chloroform unter Bildung einer Suspension wiederaufgenommen, wobei an dieser Stelle ungelöste Rückstände einfach abfiltriert und verworfen wurden. Das klare Filtrat konnte dann säulenchromatographisch aufgereinigt werden.

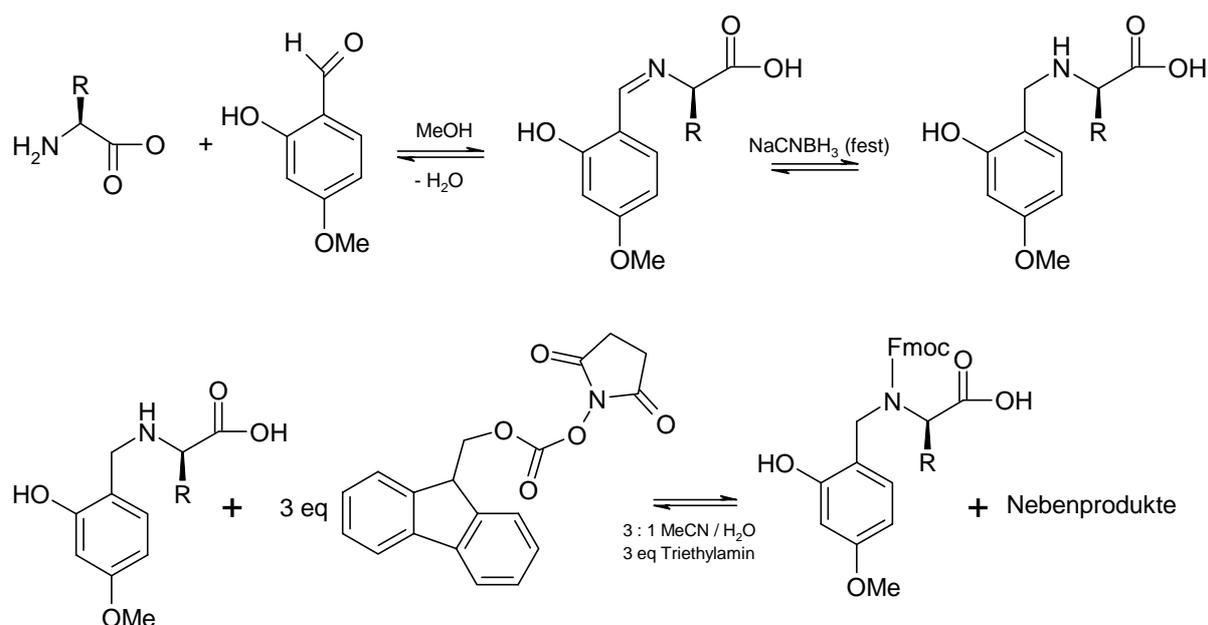


Abbildung 26: Neuer Syntheseweg zu einfach Fmoc-geschützten Hmb-AS-Derivaten.

Das Ergebnis dieser stark vereinfachten Variante war eine überraschend hohe Ausbeute an N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- N^β -trityl-L-asparagin (N_{NHmb}) (**25**) von 47% ausgehend von N^β -Trityl-L-asparagin.

Die Übertragung dieser Vorschrift auf O^β -*tert*-Butyl-L-serin ergab ein vergleichbares Ergebnis von 45%. Diese Ausbeute ist im Vergleich zu der vorher beschriebenen Variante um Faktor 2 deutlich besser und ermöglicht eine ökonomisch vertretbare Darstellung von N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-geschützten Derivaten.

Der ehemals hohe Ausbeuteverlust ist möglicherweise auf das nicht mehr wäßrige Reaktionsmedium und den eingesparten Aufreinigungsschritt nach Synthese des N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin (**18**) durch Ausfällen und Umkristallisieren zurückzuführen.

Erfreulicherweise scheinen nicht umgesetzte Reagenzien aus dem ersten Syntheseteil keinen störenden Einfluß auf die Einführung des Fmoc-Schutzes auszuüben.

6.1.6.4 Glycin

Da im Falle von Glycin keine Rücksicht auf die stereochemische Eindeutigkeit des Produktes genommen werden mußte, wurde die Hmb-Gruppe gemäß der Originalvorschrift⁵² in 1 M Kalilauge bei pH 13 eingeführt, was eine Ausbeute von 74% an N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-glycin (**27**) ergab.

6.1.7 Überprüfung der Enantiomerenreinheit der einfach N^α-Fmoc-geschützten N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-aminosäurederivate

Da in dem Direktverfahren zur Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**19**) und N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-N^β-trityl-L-asparagin (**25**) zu keinem Zeitpunkt der Synthese der pH-Wert überprüft wurde, gleichzeitig aber Gefahr der Racemisierung aufgrund möglicherweise extrem basischer Bedingungen bestand, wurde es notwendig, die stereochemische Eindeutigkeit der Reaktion zu beweisen. Da zu den synthetisierten Produkten keine entsprechenden Literaturwerte vorliegen, konnten Drehwertmessungen keine ausreichende Aussage treffen. Somit erfolgte die Überprüfung der Enantiomerenreinheit mit einer Standardmethode nach Marfey *et al.*⁷¹. Hierbei wird das möglicherweise D,L-konfigurierte Enantiomerenpaar mit einem zuvor dargestellten nach Marfey benannten Reagenz, N^α-(5-Fluoro-2,4-dinitrobenzyl)-L-alanin-amid (**31**) verknüpft.

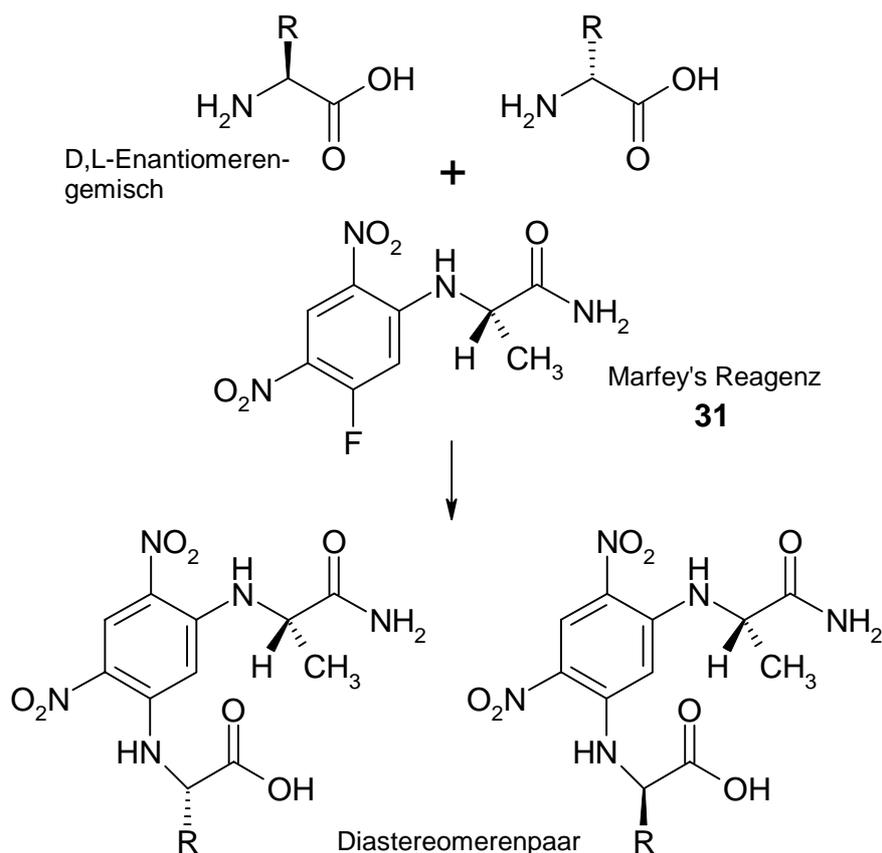


Abbildung 27: Die Methode nach Marfey zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit.

Auf diese Weise werden die Enantiomere in Diastereomere überführt, die aufgrund ihrer nun unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften mit Hilfe der RP-HPLC an einer C18-Säule aufgetrennt werden können. Die Produkte werden über Maldi-TOF-MS und Vergleich mit Literaturdaten^{72,73,74,75} identifiziert.

Mit Hilfe der Marfey Methode ließ sich durch Integration über den Peakflächen der aus einem D,L-Enantiomeregemisch gebildeten Diastereomere auch eine Aussage darüber treffen, in welchem Mengen-Verhältnis L- und D-konfiguriertes Edukt zueinander standen.

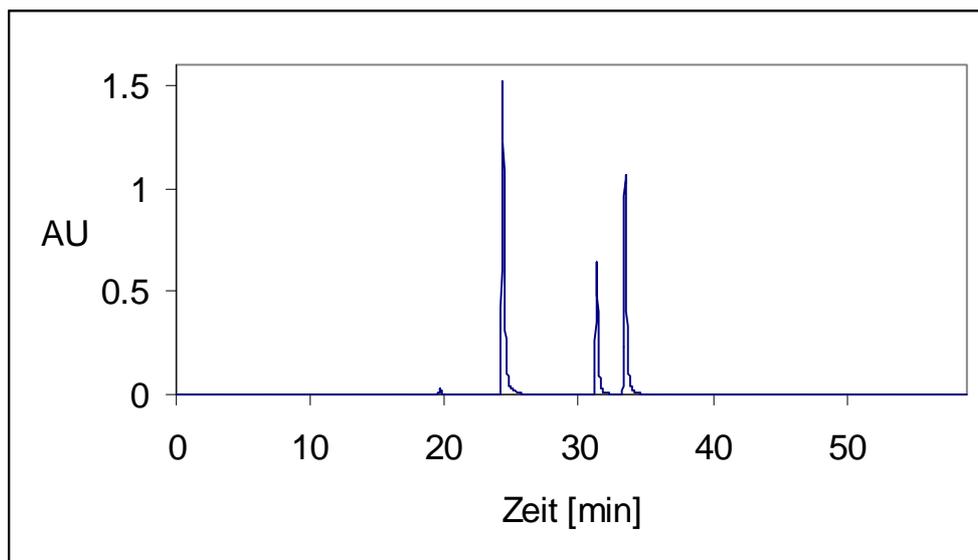


Abbildung 28: RP-HPLC-Chromatogramm nach Durchführung der Marfey-Methode am Beispiel von D- und L-Phenylalanin. Links Marfeys Reagenz, mitte D-Phenylalanin-DNB-L-Ala-NH₂ (**32**) und rechts L-Phenylalanin-DNB-L-Ala-NH₂ (**35**).

Um den Marfey-Test durchführen zu können, und Ergebnisse zu erhalten, die sich mit Literaturdaten vergleichen lassen, war es zuvor erforderlich, die dargestellten, zu überprüfenden Derivate in ihre Ausgangsverbindungen zurückzuführen, d.h. Fmoc-, Hmb- und vorhandene Seitenkettenschutzgruppen abzuspalten. Dies wurde durch aufeinanderfolgendes Behandeln der zu überprüfenden Proben mit 20% Piperidin/DMF und feuchter TFA erreicht. Im Falle von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-N^β-trityl-L-asparagin (**25**) wurde auf die Abspaltung der Hmb- und Tritylseitenkettenschutzgruppe verzichtet, da die dann freiwerdende β-Amidofunktion möglicherweise den eindeutigen Umsatz des Marfey-Reagenz mit der α-Aminogruppe verhindert hätte. Es konnte aber auch in Gegenwart der Hmb-Schutzgruppe als sek. Amin erfolgreich mit F-DNB-L-alanin-NH₂ (**31**) verknüpft werden, wenn auch in deutlich schlechterer Ausbeute.

Die Überprüfung ergab, daß über den gesamten Reaktionsverlauf keine Racemisierung erfolgt ist. Dies gilt auch für das in zwei Syntheseschritten dargestellte N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (**22**).

6.1.8 Untersuchung zum Einsatz einfach N^α-Fmoc-geschützten N^α-(2-Hydroxy-4-methoxy-benzyl)-L-aminosäurederivate in einer Peptidsynthese

Während sich die zweifach Fmoc-geschützten Derivate vergleichsweise gut an N-terminal freie, harzgebundene Peptidketten anknüpfen lassen⁵², ist bei Einsatz der einfach Fmoc-geschützten Derivate zu befürchten, daß es zu unerwünschten Veresterungen am freien phenolischen OH der Hmb-Gruppe kommt. Auf diese Weise entstehende Polyester könnten die Kupplungsausbeute deutlich verringern und es erforderlich machen, die Hmb-geschützten Derivate in hohem Überschuß einzusetzen, was aufgrund des schwierigen Zugangs zu diesen Verbindungen, ein Problem darstellen würde. Darüber hinaus müßten am phenolischen OH unkontrolliert veresterte Aminosäurederivate in weiteren Kupplungsschritten zu unerwünschten und nichtabsehbar ausufernden Peptidketten an der Seitenfunktion führen, die die laufende Peptidsynthese stören könnten und zu starken Ausbeuteverlusten führen müßten.

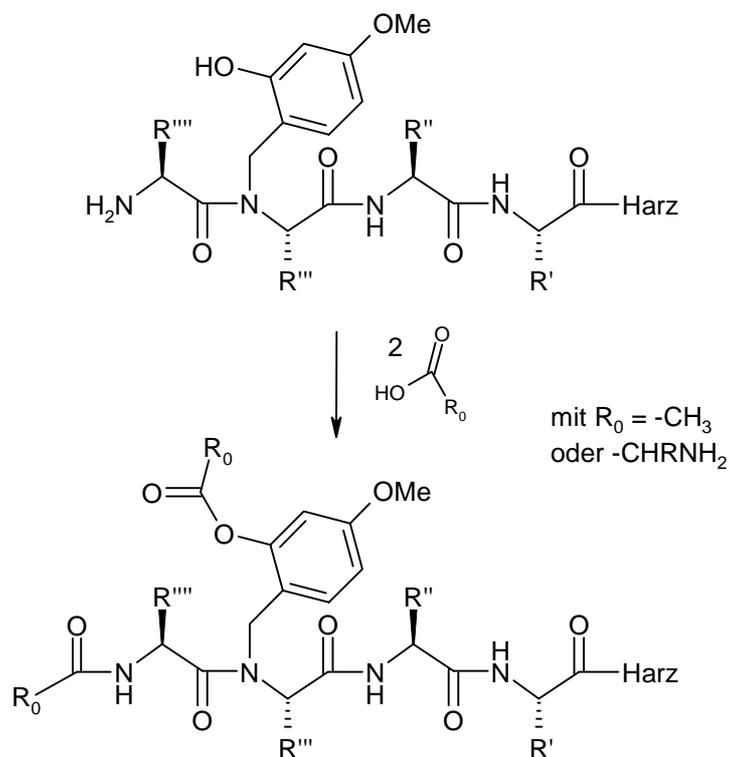


Abbildung 29: Mögliche Nebenreaktion am phenolischen OH- der Hmb-Schutzgruppe bei Acylierung mit Aminosäurederivaten oder Acetylierung bei *capping*.

Überraschenderweise traten derartige Nebenreaktionen jedoch nicht auf und die einfach Fmoc-geschützten Aminosäurederivate ließen sich, wie in 6.1.8 untersucht und beschrieben, ohne Bildung unerwünschter Nebenprodukte koppeln. Auffällig war nur, daß außergewöhnlich lange Kupplungszeiten von bis zu 3 Tagen erforderlich waren, um vertretbare Kupplungsausbeuten zu erzielen.

In 9.4.2 wurde gezeigt, daß erfolgreiche Kupplungen nicht vom hohen Überschuß an zu kuppelnder Aminosäure abhängen, sondern ausschließlich mit entsprechend langer und häufiger Kupplung einhergehen. In diesem Experiment wurde die Vollständigkeit der Kupplung durch drei Indikatoren bewertet: Erstens durch eine Farbreaktion nach Kaiser⁷⁶, in der mit einer Empfindlichkeit von > 99%, entsprechend 3 nmol/mg⁷⁶ freie nicht umgesetzte Aminogruppen durch Blaufärbung detektiert werden können, zweitens durch Bestimmung des sogenannten Fmoc-Wertes, also der abgespaltenen Menge an Fmoc-Schutzgruppen und drittens mit Hilfe des Pikrinsäureexperimentes⁷⁷. Letzteres wird erforderlich, wenn nach erfolgreicher Kupplung des Hmb-geschützten Aminosäurederivates, weitere Aminosäurederivate durch Veresterung am phenolischen OH angekuppelt werden und dann bei Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen im nächsten Syntheseschritt eine zweifache Menge Methylenfluoren frei wird (siehe Abbildung 31).

So steigt die Ausbeute auf über 100% an und der gemessene Fmoc-Wert gibt die Quantität der Kupplung nur noch bedingt wieder.

Im Pikrinsäureexperiment wird das Harz nach der Kupplung des Hmb-geschützten Derivates mit Pikrinsäure gewaschen. Es bilden sich Salze mit den noch freien, nicht umgesetzten Aminofunktionen, die anschließend im Basischen wieder heruntergewaschen werden können.

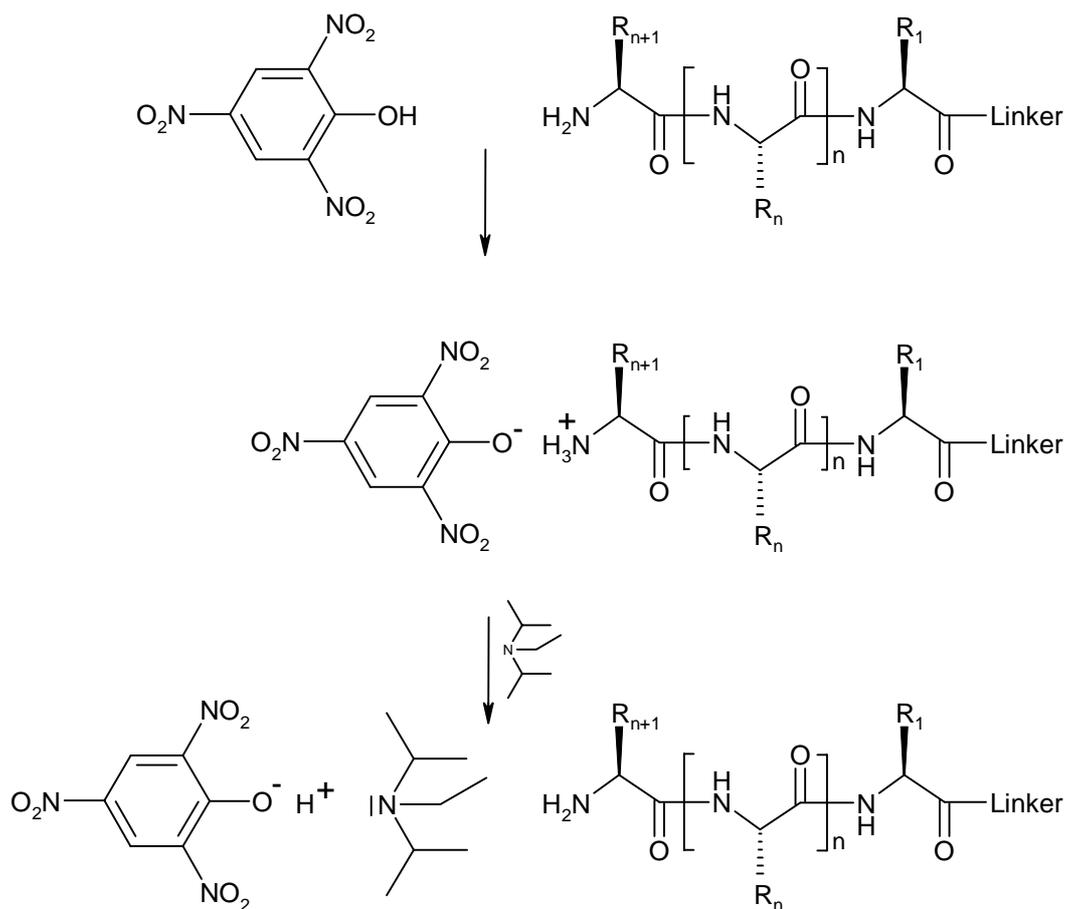


Abbildung 30: Das Pikrinsäureexperiment zur quantitativen Bestimmung freier Aminogruppen am Harz.

Wie im Falle des Methylenfluorens wird der Anteil an Pikrinsäure in der Waschlösung durch Messen seiner UV-Absorption bei 358 nm ($\epsilon = 14500$) im Photometer bestimmt. Leider ist die reproduzierbare Durchführung dieses Tests schwierig, da mit leichtflüchtigen Lösungsmitteln wie DCM und Ethanol gearbeitet wird. Außerdem kommt es zu Wechselwirkungen mit dem Harz, das sich irreversibel gelb verfärbt. Aus den Ergebnissen der Fmoc-Abspaltung und des Pikrinsäureexperimentes lassen sich in Kombination jedoch durchaus Aussagen über die Qualität der Kupplung treffen.

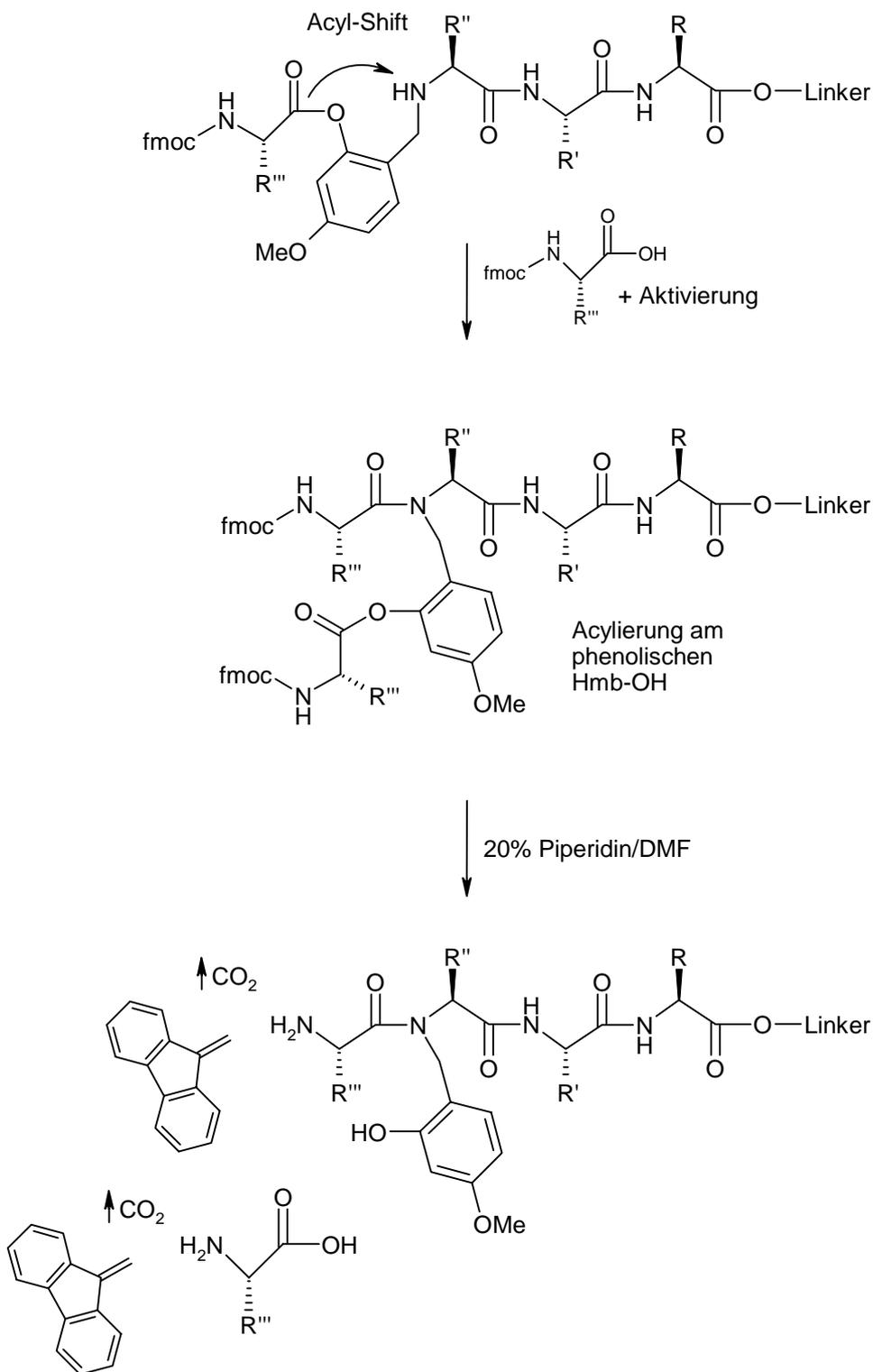


Abbildung 31: Entstehen des "doppelten" Fmoc-Wertes.

Wie die Kupplung von S_{NHmb} und N_{NHmb} zeigen (siehe die ausführliche Auflistung der Testergebnisse im Experimentellen Teil unter 9.4.2), wird eine Ausbeute von größer 80% erst nach mindestens zweifacher Kupplung über je 24 h, unabhängig vom eingesetzten Aminosäureüberschuß erreicht. Eine weitere Verlängerung der

Kupplungszeit, ebenso wie ein weiterer Kupplungsschritt über mindestens 16 h erhöhen die Ausbeute nur noch geringfügig, wohl aber den Anteil der unerwünschten Veresterungen am phenolischen OH der Hmb-Gruppe.

Um herauszufinden, warum die Kupplungszeit dieses doch in seinem sterischen Anspruch nicht ungewöhnlichen und an seiner C-Funktion unveränderten Derivates so auffällig lang ist und zu belegen, daß zum Zeitpunkt der Kupplung keine Nebenprodukte in Form "mit-sich-selbst-veresternder" Polyester etc. vorkommen, wurde das im Folgenden beschriebene Experiment (vgl. 9.2.19) unternommen.

6.1.8.1 Untersuchung zur Kupplung von N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-geschützten Aminosäurederivaten und seiner potentiellen Nebenprodukten

In einem einfachen Experiment (9.2.19) wurde per Maldi-TOF-MS gezeigt, daß bei Aktivierung von N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- N^β -trityl-L-asparagin (**25**) mit TBTU in Gegenwart von HOBT und DIPEA das nicht aktivierte Edukt vollständig in ein um die Masse von Wasser kleineres, labiles Intermediat übergeht, welches sich in begleitenden DC-Untersuchungen dokumentiert, deutlich unpolarer verhält und bereits nach mehreren Stunden wieder in sein Edukt übergeht. Wie von Albericio *et al.*⁷⁸ bereits in Anlehnung an Short *et al.*⁷⁹ beschrieben, handelt es sich bei diesem Intermediat um das 4,5-Dihydro-8-methoxy-1,4-benzoxazepin-2(3H)-on-Derivat **30** (im Folgenden 7-Ring-Derivat), welches unabhängig von seiner Aktivierung⁷⁸ und von begrenzter Haltbarkeit gebildet wird. Es kommt also auch nach längerer Reaktionszeit von mehr als 10 min zu keinen Oligomeren durch unkontrollierte Veresterung am phenolischen OH und somit zu Eduktverlust vor der Kupplung, sondern zur Bildung eines weniger aktiven Intermediats, das für die nun folgende Kupplung entsprechend mehr Reaktionszeit in Anspruch nimmt.⁸⁰

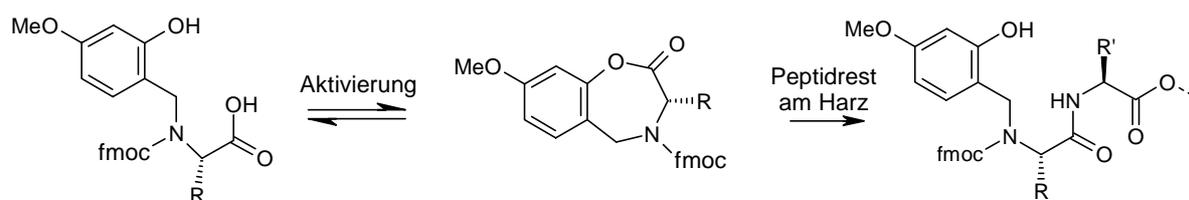


Abbildung 32: Bildung eines 7-Ring-Intermediats (vgl. **30**) nach Aktivierung eines einfach Fmoc-geschützten Hmb-AS-Derivats.

Die nächstfolgende Aufgabe war es nun, eine nähere Aussage über die Kinetik dieser Zwischenreaktion zu machen, damit gegebenenfalls durch Wahl eines entsprechenden Aktivators, bzw. Verzicht auf die Voraktivierungszeit, die Kupplungszeit durch Umgehen des 7-Ring-Intermediats herabgesetzt werden kann. Versuche von J. Offer *et al.* mit Hilfe von Modifikationen durch z.B. Einführen einer NO₂-Gruppe am Hmb-Ring die Ausbildung des 7-Ring-Intermediats zu verhindern, scheiterten an der dann merklich reduzierten Abspaltbarkeit der modifizierten Hmb-Gruppe.⁸¹

6.1.8.2 Kinetische Untersuchung zur Oxazepinbildung bei Aktivierung von einfach Fmoc-geschützten Hmb-Aminosäurederivaten

Für das folgende Experiment wurden in Minutenabständen nach 30 Sekunden Vorlaufphase ¹H-1D-NMR-Messungen vorgenommen. Ziel war es, anhand der bei der Lactonisierung auftretenden Veränderungen in den chemischen Verschiebungen aller beteiligter Protonensignale zu beobachten, in welcher Zeit die Ringbildung erfolgt. Aufgrund der starken Linienbreiten aller Signale der Protonen rund um den dreifach substituierten, tertiären Stickstoff, welche auf einen Quadrupoleffekt⁸² zurückzuführen sind, wurden zur näheren Betrachtung die aromatischen Protonen an Hmb ausgewählt, welche unter Zuhilfenahme eines HMBC-Spektrums eindeutig zugeordnet werden konnten.

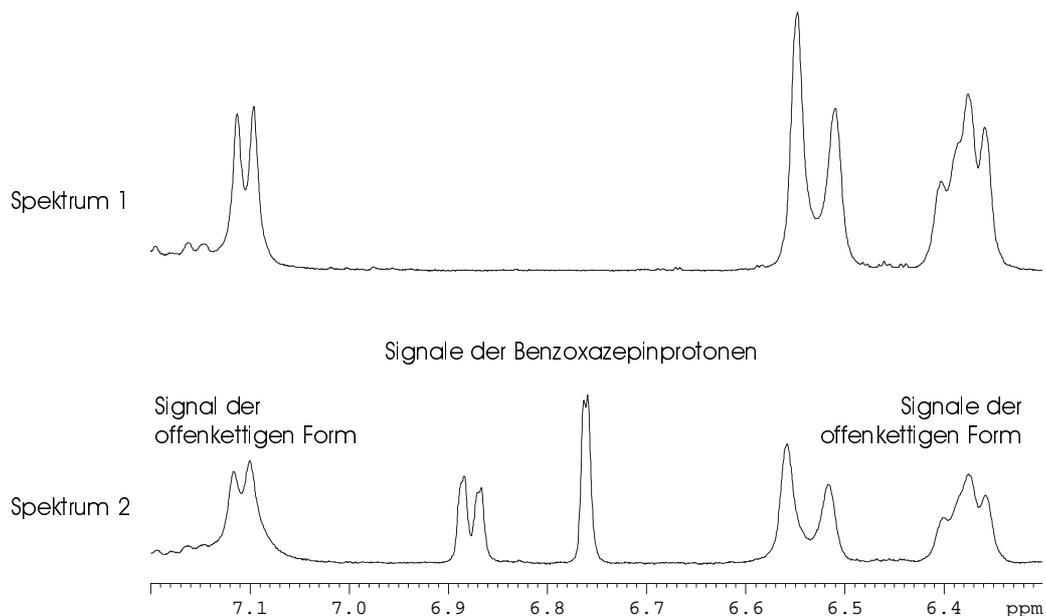


Abbildung 33: Ausschnitt aus zwei 1D ^1H -NMR-Spektren, die zur kinetischen Betrachtung der Lactonisierung herangezogen wurden. Spektrum 1 vor Zugabe des Aktivators und Spektrum 2 nach 3 min 30 s.

Es zeigte sich nun, daß die Ringbildung bereits nach 3 min 30 sec zu ca. 50% abgelaufen war.

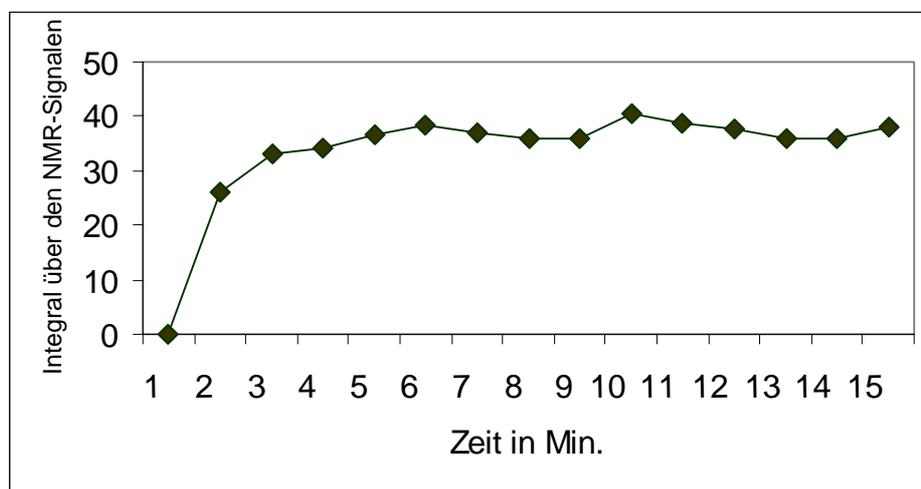


Abbildung 34: Kinetischer Verlauf der Lactonisierung.

Der abschließende Versuch, das gebildete 7-Ring-Derivat zu isolieren, um eine genaue Charakterisierung per NMR durchzuführen, schlug an seiner Labilität fehl. Während sich Edukt und 7-Ring-Derivat, diesmal am Beispiel von N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin (19)

untersucht, noch gut per HPLC auftrennen ließen, ging das isolierte 7-Ring-Derivat so schnell in sein Edukt über, daß eine genauere Charakterisierung unmöglich wurde. Möglicherweise hätten entsprechend vorsorgende Maßnahmen, wie Kühlung der HPLC-Fractionen und sofortige Messung bei tiefen Temperaturen, Abhilfe geschaffen. Das physikalisch/chemische Verhalten in RP-HPLC und an DC, sowie die Ergebnisse aus den Kinetikstudien per NMR und aus Maldi-TOF-MS identifizieren das Produkt jedoch schon ausreichend als ringgeschlossenes Intermediat.

6.1.9 Untersuchung zur Kupplung von Asp_{OAI} an ein Festphasen-gebundenes und Hmb-geschütztes Aminosäurederivat

Die Untersuchung der Kupplung von Asp_{OAI} an das Festphasen-gebundene und Hmb-geschützte Aminosäurederivat erfolgte ähnlich wie die vorangehende Untersuchung zur Kupplung der Hmb-geschützten Aminosäurederivate. Wie aus der Literatur bekannt⁸³ ist, kommt es aufgrund eines O→N-Acylshifts zu einer deutlichen Verlängerung der Kupplungszeit.

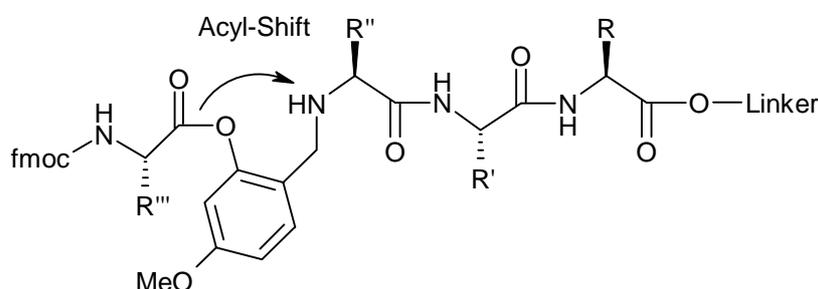


Abbildung 35: Postulierter O→N-Acylshift am Harz.

Anstelle des zuvor genutzten Kaiser-Farbttests wurde in dieser Untersuchung der ähnlich empfindliche (2.8-8.2 nmol/mg, erprobt an 12 ausgewählten Beispielen) Chloranil-Test verwendet,⁸⁴ da der Kaisertest bei Detektion sekundärer Aminofunktionen nicht funktioniert. Der Chloranil-Farbttest verläuft nach ähnlichem Prinzip und färbt die Harzkügelchen bei positivem Ergebnis ebenfalls blau.

Wie die Untersuchung zur Kupplung von Asp_{OAI} zeigt (siehe Experimentellen Teil 9.4.3), wird eine Ausbeute von größer 80% erst nach mindestens zweifacher Kupplung über 22 h und 72 h erreicht. Erst die Ausweitung des Kupplungsvorgangs

auf dreifach über 24 h, 23 h und 67 h führt zu näherungsweise quantitativem Umsatz bei ebenso starker Zunahme des Anteils der zusätzlichen Acylierung am phenolischen OH der Hmb-Gruppe. Im Ansatz 12 wurde als Aktivatorreagenz TFFH verwendet, welches laut Literaturangabe^{37,85} besonders zur Kupplung von Aminosäurederivaten an sekundären Aminofunktionen wie an Prolin geeignet ist. Dies wurde durch den experimentellen Befund bestätigt, so daß TFFH in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kupplungen von Aspartatderivaten an Hmb-geschützte Aminofunktionen als Standardaktivator eingesetzt wurde. Der Überschuß an Asp_{OAI} wurde in Anlehnung an verschiedene Literaturhinweise⁹⁷ auf fünffach eingestellt, was sich auch gut aufgrund der nach erfolgreichem O→N-Acylshift eintretenen zusätzlichen Acylierung am phenolischen OH- der Hmb-Gruppe rechtfertigen ließ. Wie zu erwarten war,⁸³ erzwingt die langsame Kinetik des O→N-Acylshifts ausgedehnte Kupplungszeiten, was die Gefahr der DMF-Zersetzung zum Dimethylamin birgt, welches zum partiellen Entschützen des zu kuppelnden Aminosäurederivates und somit zur Bildung von Poly-Aminosäure-Nebenprodukten führen kann. Zur Neutralisation des möglicherweise über den ausgedehnten Kupplungsverlauf entstehenden Dimethylamin wurde zusätzlich zum Aktivator HOBt eingesetzt.⁸⁰

Anders als bei den zuvor untersuchten Dmb- und Tmb-geschützten Aminosäurederivaten, ist die Kupplung der nächstfolgenden Aminosäure jedoch in durchaus vertretbarer Ausbeute möglich und unter Wechsel des Aktivators auf TFFH sogar mit nahezu 100% Effizienz.

6.1.10 Untersuchung zur Kupplung der weiteren Aminosäuren

Wie die durchgeführte Untersuchung (siehe 9.4.4) belegt, verlaufen die Kupplungen der weiteren Aminosäuren wieder vergleichsweise normal, d.h. es müssen keine besonderen Maßnahmen ergriffen werden, um Ausbeuten > 90% zu erreichen. Einzig die Detektion eines quantitativen Kupplungsverlaufes kann nach Einbau einer Hmb-geschützten Aminosäure in einer laufenden Peptidsynthese nicht mehr durch einfache Bestimmung des jeweiligen Fmoc-Wertes erfolgen. Aufgrund der im Verlauf der weiteren Peptidsynthese immer wiederkehrenden Acylierungen der freien Hmb-OH-Funktion und der dann bei folgenden Abspaltungen der Fmoc-Schutzgruppen verfälschten Methylenfluoren-Absorptionswerte (siehe auch Abbildung 31) wird es erforderlich, den Peptid-Syntheseverlauf mit Hilfe unterstützender Farbttests und des zusätzlichen Pikrinsäureexperimentes zu

verfolgen. Die im Syntheseverlauf am Hmb-OH auftretenden Acylierungen werden, genau wie die während des sogenannten *Cappings* bewirkten Acetylierungen durch 15-minütiges Behandeln mit Piperidin zumindest teilweise wieder verseift, d.h. aufgehoben, so daß die phenolische OH-Funktion immer wieder neu acyliert werden kann, was den Fmoc-Wert auch immer wieder neu verfälscht.

Als Farbttests kommt vor allem der allgemein gängige Kaisertest in Frage, der aber bei einzelnen Aminosäurederivaten, wie z.B. Asparaginsäure, gestört wird⁸⁶, so daß in derartigen Fällen an seiner Stelle der gleichermaßen empfindliche TNBS-Test verwendet wird.⁸⁷ Der TNBS-Farbttest verläuft nach ähnlichem Prinzip und färbt die Harzkügelchen bei positivem Ergebnis rot. Bei zu detektierenden sekundären Aminofunktionen wird, wie unter 6.1.9 bereits beschrieben, der Chloraniltest verwendet. Eine absolut genaue Aussage über die Ausbeute der Synthese Hmb-geschützter Peptide kann also letztlich nur die Auswaage der aufgereinigten Produkte geben, was aber leider den im Verlauf der Aufarbeitung nach der Synthese verlorenen Anteil nicht ausweist.

6.2 Darstellung der aminierten Kohlenhydrate

N-Acetyl-D-glucosamin wird nach einer Vorschrift von Kochetkov *et al.*⁵⁷ in einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aminiert. Um die Reaktionszeit zu reduzieren, wird das Reaktionsgemisch über den gesamten Verlauf auf ca 45°C erwärmt. Anschließend wird es dann nach vielfacher Gefriertrocknung als ungereinigtes Rohprodukt direkt zur Glycosylierung eingesetzt, da das Amin in feuchter Umgebung nicht stabil ist.

Die Darstellung von 1-β-Amino-chitobiose (**4**) erfolgt nach einer modifizierten Vorschrift von S.Meyer und J.Toast,⁸⁸ ausgehend von Chitin, welches zunächst in einer Lösung von Schwefelsäure und Acetanhydrid unter Einwirken von Ultraschall in seine Oligomere gespalten wird. Nach säulenchromatographischer Auftrennung des Produktgemisches an einer Mitteldruckanlage erhält man das α/β-Gemisch des Chitobioseoctaacetats, 2-N-Acetyl-4-(2-N-acetyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-amino-2-desoxy-β-D-glucosyl-1,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glycopyranose (**2**). Dieses wurde nach mehrfachem Umkristallisieren und Isolieren des α-Anomeren durch Behandeln mit frisch zubereitetem Natriummethanolat in Methanol deacetyliert und schließlich, genau wie im Falle des 2-N-Acetyl-D-glucosaminyamins (**1**) nach Kochetkov⁵⁷, selektiv zum 1-β-Glycosylamin **4** überführt. Die abschließende Entsalzung erfolgte

ebenfalls durch vielfache Gefriertrocknung, wobei stets die Labilität des aminierten Produktes in feuchter Umgebung beachtet werden mußte.

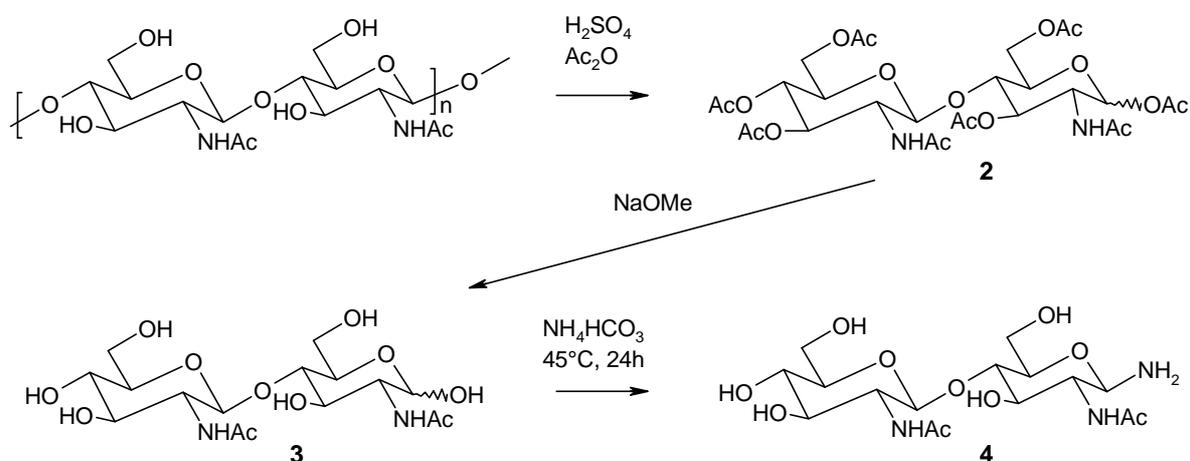


Abbildung 36: Syntheseweg zur 1-β-Amino-chitobiose.

Das Decasaccharid vom komplexen Typ wurde wegen seiner guten Zugänglichkeit ausgewählt. Es wurde mir freundlicherweise als Rohprodukt von S. Meyer zur Verfügung gestellt und nach Aufreinigung durch RP-HPLC nach Kochetkov⁵⁷ aminiert. Das Anomerengemisch des Decasaccharids 5 geht hierbei in das reine 1-β-Amino-decasaccharid 6 über. Um den empfindlichen Kohlenhydratbaustein zu schonen, wurde die Reaktionstemperatur auf 40°C beschränkt und nach 24h Reaktionszeit abgebrochen. Wie man dem 1D $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entnehmen kann, ist die Aminierung nicht quantitativ verlaufen. Die beiden Dubletts des Decasaccharids bei 5.1 ppm ($\text{H1-}\alpha\text{-OH}$) und 4.6 ppm ($\text{H1-}\beta\text{-OH}$) verschieben sich bei Übergang zum 1-β-Amino-decasaccharid zu einem Dublett bei 4.1 ppm ($\text{H1-}\beta\text{-NH}_2$). Diese Umwandlung ist nicht vollständig erfolgt.

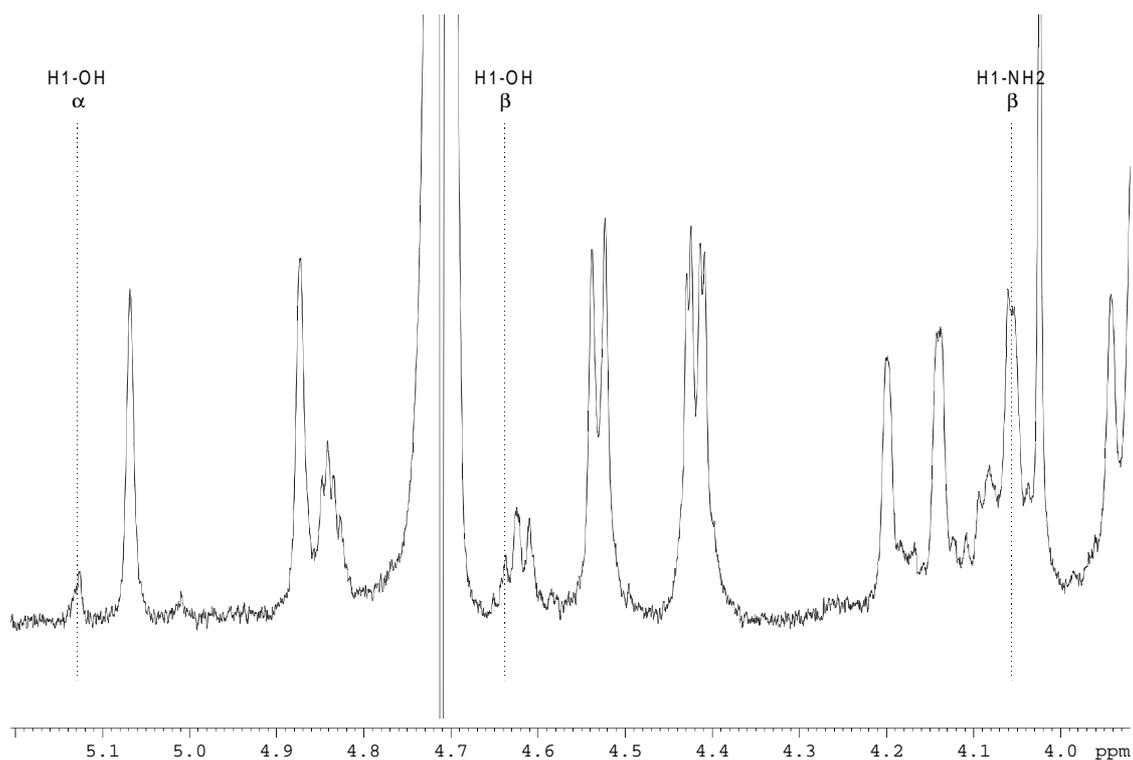


Abbildung 37: Ausschnitt aus dem 1D $^1\text{H-NMR}$ vom 1- β -Aminodecasaccharid.

6.3 Die orthogonal selektiven Schutzgruppen an den Glycosylierungsstellen

Um an zwei verschiedenen Glycosylierungsstellen eines Peptides mit zwei unterschiedlichen Zuckern glycosylieren zu können, ist es erforderlich, an den Glycosylierungsstellen im Peptid orthogonal selektive Schutzgruppen einzusetzen. Als solche wurden die Allyl-⁸⁹ und die Dmab-⁹⁰ Schutzgruppe ausgewählt. Während erstere in Gegenwart eines Pd^0 -Katalysators abgespalten und auf einen Akzeptor übertragen wird, spaltet letztere nach Behandeln mit einer nucleophilen Base ab, wobei zunächst nur ein Teil der Schutzgruppe, 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl- (ivDde) abgespalten wird und der so freiwerdende p-Aminobenzylester unter 1,6-Eliminierung dann spontan austritt (siehe Abbildung 22).⁹⁰

Dieses Schutzgruppen-Paar verhält sich orthogonal selektiv, stört sich also in seinen jeweiligen Abspaltbedingungen weder gegenseitig, noch die in der Fmoc-SPPS allgemein verwendeten permanenten Seitenkettenschutzgruppen (Pbf, Trt, *t*Bu, Boc).⁹¹

Ein zusätzlicher Vorteil ist darin zu sehen, daß gegebenenfalls auch noch eine dritte, z.B. säurelabile oder gar vierte, z.B. photochemisch abspaltbare Gruppe einsetzbar wäre.

Entscheidend für den erfolgreichen Einsatz orthogonaler Schutzgruppen ist die Reihenfolge ihre Abspaltung. So kann es nach M. Mutter *et al.*⁹¹ bei Abspaltung der Allylschutzgruppe an Pd⁰ zu unerwünschten Nebenreaktionen und Wechselwirkungen an der Dmab-Gruppe kommen. Es empfiehlt sich also, in umgekehrter Abfolge zu Entschützen. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß es im Laufe der Lagerung von Hydrazin durch Oxidation zur Bildung von Diiminen kommt, die Allylschutzgruppen reduzieren könnten, was deren spätere Abspaltung verhindern würde. Durch Zusatz von kleinen Mengen Allylalkohol kann diese Reduktionskraft jedoch umgelenkt werden.

In der Literatur werden zahlreiche Varianten zur selektiven Abspaltung der Allylschutzgruppe an Organometallkomplexen beschrieben. So werden neben verschiedenen koordinierten Pd⁰-Komplexen mit beispielsweise Chlor oder Acetaten auch Rh-Komplexe und CuLi-Salze verwendet. Da aber mit Pd(PPh₃)₄ als Katalysator stets zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden⁷⁰ und sich dieser im Bereich der Peptid- und Glycopeptidchemie als Standard etabliert hat,⁸⁹ erfolgten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Optimierung der Abspaltungsausbeute ausschließlich an Pd(PPh₃)₄.

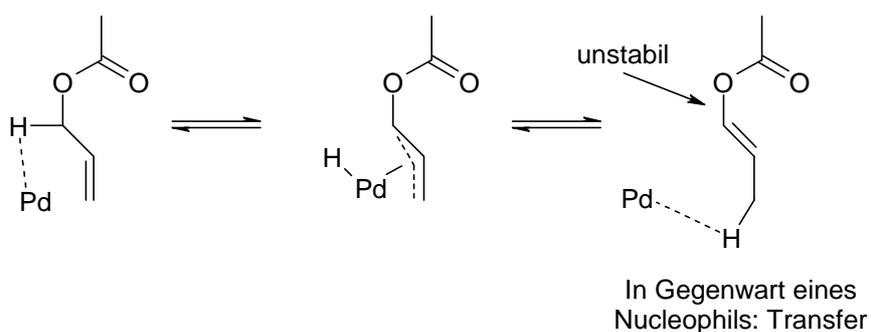


Abbildung 38: Vorgeschlagener Mechanismus zur Deallylierung an einem Pd(0)-Katalysator.

An einem einfachen Pentapeptid der Sequenz (LFDST), dessen Asparaginsäure an ihrer Seitenkette Allyl-geschützt war, sollten verschiedene Abspaltvarianten untersucht werden. Nach erfolgreicher Synthese des Pentamers wurde das Harz geteilt und in acht verschiedenen Ansätzen weiterverarbeitet. Die Aufreinigung und anschließende Analytik erfolgte mit Hilfe der RP-HPLC an einer C18 analogen Phase und per Maldi-TOF-MS. Da das entschützte Produkt und noch allylierte Edukt ein

sehr ähnliches Laufverhalten zeigten, wurde lediglich festgestellt, ob die Abspaltreaktion vollständig war oder nicht. Eine quantitative Interpretation der HPLC-Chromatogramme durch Vergleich der Integrale über den Peakflächen der Addukte wurde nicht durchgeführt. Die nun folgende Tabelle 2 zeigt die wesentlichen Unterschiede der acht Ansätze und ihre Ergebnisse. Die Angaben zu den eingesetzten Reagenzien beziehen sich alle auf einen 50 μmol aren Ansatz. Alle Reaktionen fanden unter Ausschluß von Licht und Luftsauerstoff statt.

Vorschrift	Reagenzien	Ansatz	Rkts.zeit	Abspaltung
D. Vetter ¹¹²	Pd(PPh ₃) ₄ PPh ₃ Eisessig NMM LM: DCM	133.3 μmol 637.5 μmol 275 μl 133.3 μl	2 h	quantitativ
P. Loyd-Williams ¹¹³	Pd(PPh ₃) ₄ DMSO THF 0.5 M HCl Morpholin	7.08 μmol 1.5 ml 1.5 ml 0.75 ml 75 μl	18 h	nicht quantitativ
S.A. Kates I ¹¹⁴	Pd(PPh ₃) ₄ DMSO THF 0.5 M HCl Morpholin	50 μmol 4 ml 4 ml 2 ml 200 μl	3 h	nicht quantitativ
Kates II ¹¹⁵	Pd(PPh ₃) ₄ Eisessig NMM LM: DCM	150 μmol 200 μl 100 μl	2 h	quantitativ
H. Kunz ¹¹⁶	Pd(PPh ₃) ₄ Morpholin LM: THF	5 μmol 500 μmol	30 min	gering
R. Deziel ¹¹⁷	Pd(PPh ₃) ₄ PPh ₃ Pyrrolidin LM: Acetonitril	1.25 μmol 2.5 μmol 52.5 mmol	2 h	kaum
P.D. Jeffrey ¹¹⁸	Pd(PPh ₃) ₄ PPh ₃ 2-Ethylhexansäure LM: DCM	1 μmol 5 μmol 125 μmol	2 h	gering
B.K. Handa ¹¹⁹	Pd(PPh ₃) ₄ DMSO/DMF HOBT LM: DMF	263.16 μmol 2.63 ml 526.32 μmol	18 h	nicht quantitativ

Tabelle 2: Die wesentlichen Unterschiede der acht Ansätze zur Optimierung der Deallylierung und ihre Ergebnisse.

Nur zwei der untersuchten acht Abspaltreaktionen verliefen quantitativ. Da im Ansatz nach D. Vetter¹¹² die eingesetzte Menge an Pd(PPh₃)₄ etwas kleiner ist als im Ansatz II nach S.A. Kates¹¹⁵, wurde dieses aus wirtschaftlichen Gründen für alle im Folgenden durchzuführenden Deallylierungen als Standardverfahren eingeführt. Es wurden im Verlauf dieser Arbeit an keiner Stelle, d.h. in keinem Reaktionsansatz unvollständig deallylierte Nebenprodukte identifiziert. Ebenso wie keine Reste anhaftenden, nicht abgewaschenen Palladiums vorgefunden wurden, so daß der Einsatz komplexierender Zusätze in der Waschlösung wie Diethyldithiocarbaminsäure vermieden werden konnte.⁹⁵

An der durchgeführten Untersuchungsreihe ist als interessant festzuhalten, daß offensichtlich die Menge des eingesetzten Pd(PPh₃)₄ und weniger das Lösungsmittelsystem oder die Wahl des *scavengers* (für die zu übertragende Allylschutzgruppe) für den Erfolg der Abspaltung verantwortlich ist.

Für Peptidketten am Harz, die aufgrund ihrer Länge, bzw. Sequenz zu Löslichkeitsschwierigkeiten neigen, wären die Verfahren nach Loyd-Williams¹¹³, Handa¹¹⁹ und Kates (I)¹¹⁴ durchaus denkbare Alternativen. Durch Erhöhung des Pd(PPh₃)₄-Anteils im Reaktionsgemisch, sollten auch diese Reaktionen quantitativ verlaufen.

Dmab-Schutzgruppen werden nach Literaturangabe⁹¹ durch Behandeln im kontinuierlichen Fluß mit 2%iger Hydrazin-Lösung in DMF über 10 min abgespalten. In Lösung ist diese Abspaltung bereits nach 9 min quantitativ (siehe 9.3.3.2). Am Harz jedoch war die Abspaltung unvollständig.

Es wurde eine Reihenuntersuchung mit sechs verschiedenen Varianten durchgeführt. Als Beispiel wurde das Pentapeptid LFDSarT, dessen Asparaginsäure an ihrer Seitenkette Dmab-geschützt war, gewählt. Nach erfolgreicher Synthese des Pentamers (Ausbeute 91%) wurde das Harz geteilt und in sechs verschiedenen Ansätzen weiterverarbeitet. Die Aufreinigung und anschließende Analytik erfolgte mit Hilfe der RP-HPLC an einer C18 Phase und per Maldi-TOF-MS. Auf eine genaue quantitative Interpretation der HPLC-Chromatogramme nach Integration über den Peakflächen der Addukte wurde verzichtet. Der Abspalterfolg konnte jedoch besser abgeschätzt werden als in den vorangegangenen Experimenten mit der Allyl-Schutzgruppe, da das entschützte Produkt und das noch Dmab-geschützte Edukt eine Differenz in ihrer Retentionszeit von mehr als 15 min aufwiesen.

Die nun folgende Tabelle 3 zeigt die wesentlichen Unterschiede der sechs Ansätze und ihre Ergebnisse. Es wurde stets in DMF gearbeitet und im Anschluß mit einer 5% DIPEA / DMF-Lösung gespült.

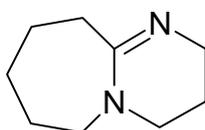
Ansatz	% ¹	Abspaltzeit	Verfahren	Ergebnis
1	2	10 min	schütteln	nicht vollständig
2	5	10 min	schütteln	nahezu quantitativ
3	2	5 min	schütteln	nicht vollständig
4	2	60 min	schütteln	nahezu quantitativ
5	2	3.5 h	schütteln	vollständig
6	2	10 min	kontinuierl. Fluß	nahezu quantitativ

¹ Hydrazin in DMF

Tabelle 3: Ansätze zur Optimierung der Abspaltung von Dmab-Schutzgruppen und ihre Ergebnisse.

Als Standardverfahren wurde für alle folgenden Dmab-Abspaltungen eine Kombination der Ansätze 2 und 6 eingeführt. Auf eine Verlängerung der Abspaltzeit, wie in Ansatz 5 auf 3.5 h wurde verzichtet, was im weiteren Verlauf dieser Arbeit dadurch bestätigt wurde, daß an keiner Stelle, d.h. in keinem Reaktionsansatz unvollständig abgespaltene, Dmab-tragende Nebenprodukte identifiziert wurden.

Weil Hydrazin auch Fmoc-Schutzgruppen abspaltet, muß stets darauf geachtet werden, daß der N-Terminus des noch am Harz befindlichen Peptides acetyliert oder Boc-geschützt ist. Umgekehrt erschien es nach den Erfahrungen mit Dmab (vgl. Experimentellen Teil 9.2.6) als ratsam, nach Einbau des Dmab-geschützten Derivates, das Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen im Verlauf der weiteren Synthese mit DBU⁹² anstelle von Piperidin durchzuführen. DBU ist aufgrund seines hohen sterischen Anspruchs weit weniger nucleophil als Piperidin und mindert die Gefahr des vorzeitigen Entschützens von Dmab. Da Piperidin aber auch *scavenger*-Funktion inne hat, wird auch bei Fmoc-Abspaltungen mit DBU Piperidin zugesetzt, allerdings nur zu einem kleinen prozentualen Anteil.



DBU

Abbildung 39: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als Alternativreagenz zu Piperidin bei der Fmoc-Gruppenabspaltung.

Es ist anzumerken, daß DBU im Gegensatz zu Piperidin und Hydrazin⁹⁶ nicht in der Lage ist, die bestehenden Acetylierungen am phenolischen OH der Hmb-Gruppe zu

spalten.⁵¹ Bis zum Einsatz von DBU, also nach Einbau des Dmab-geschützten Aspartats, acetylierte Hmb-Gruppen, verbleiben also bis zum Syntheseende acetyliert und werden nicht mehr wechselweise entschützt.

Zur Überprüfung der Orthogonalität von Allyl- und Dmab-Gruppe wurde ein Oktapeptid der Sequenz $FD_{ODmab}STGSD_{OAl}N$ synthetisiert. Es wurden nacheinander die beiden Seitenkettenschutzgruppen an den Asparaginsäuren abgespalten. Nach Abspalten der Dmab-Schutzgruppe unter Zusatz von Allylalkohol wurde eine kleine Harzprobe entnommen, abgespalten, aufgearbeitet und per RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt. Das Hauptprodukt $FDSTGSD_{OAl}N$ wurde per Maldi-TOF-MS identifiziert. Nun wurde der Harzrest deallyliert, abgespalten, aufgearbeitet und wiederum per RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt. Das Hauptprodukt $FDSTGSDN$ wurde eindeutig per Maldi-TOF-MS identifiziert. Nebenprodukte, die auf ein gegenseitiges Stören der Abspaltverfahren oder Unvollständigkeit hätten hindeuten können, wurden nicht identifiziert.

Damit war die Orthogonalität der Schutzgruppen sichergestellt. Im Verlauf der folgenden Arbeit kommt es auch zu keinen, von diesem Befund abweichenden Erkenntnissen oder Hinweisen. In Einzelfällen war ein unvollständiges Abspalten der Dmab-Schutzgruppe auf feuchtes Hydrazin zurückzuführen.

6.4 Die Seitenkettenglycosylierung

In der Peptidchemie wird vor Kupplung einer Aminosäure an den freien N-Terminus eines festphasengebundenen Peptids die Carboxylfunktion der anzuknüpfenden Säure aktiviert. Dies kann, wie in der Einleitung unter 4.1 ausführlich beschrieben, auf sehr vielfältige Art und Weise geschehen.

Die Knüpfung einer glycosidischen Bindung ist chemisch betrachtet das gleiche wie die Ausbildung einer Peptidbindung. Es handelt sich in beiden Fällen um eine Amidbindung. Somit kann also gleichermaßen aktiviert werden. Da die Bildung eines symmetrischen Anhydrids aber genau wie der Einsatz vorgeformter Pfp-Aktivester im Falle der Seitenkettenglycosylierung am Harz unmöglich ist, muß auf Aktivatorreagenzien zurückgegriffen werden.

In der nun folgenden Versuchsreihe sollte aus den momentan auf dem Gebiet der Peptidchemie gängigen und erfolgreichen Aktivatoren ein für die Seitenkettenglycosylierung am Harz geeignetes Reagenz gefunden werden.

6.4.1 Wahl eines geeigneten Aktivators

An einem einfachen Nonapeptid der Sequenz TEGSD_{OAI}SarTEG, das jeweils in einem 50 μ molaren Ansatz in Ausbeuten von 62-72% synthetisiert wurde, sollten die Ausbeuten der Glycosylierung nach Einsatz der verschiedenen Aktivatoren verglichen werden. Auf diese Weise sollte ein für die in der folgenden Arbeit durchzuführenden Glycosylierungen geeignetes Standardverfahren gefunden werden. Zur Vermeidung der Imid-Ringbildung wurde C-terminal benachbart zur Glycosylierungsstelle Sarcosin eingesetzt.

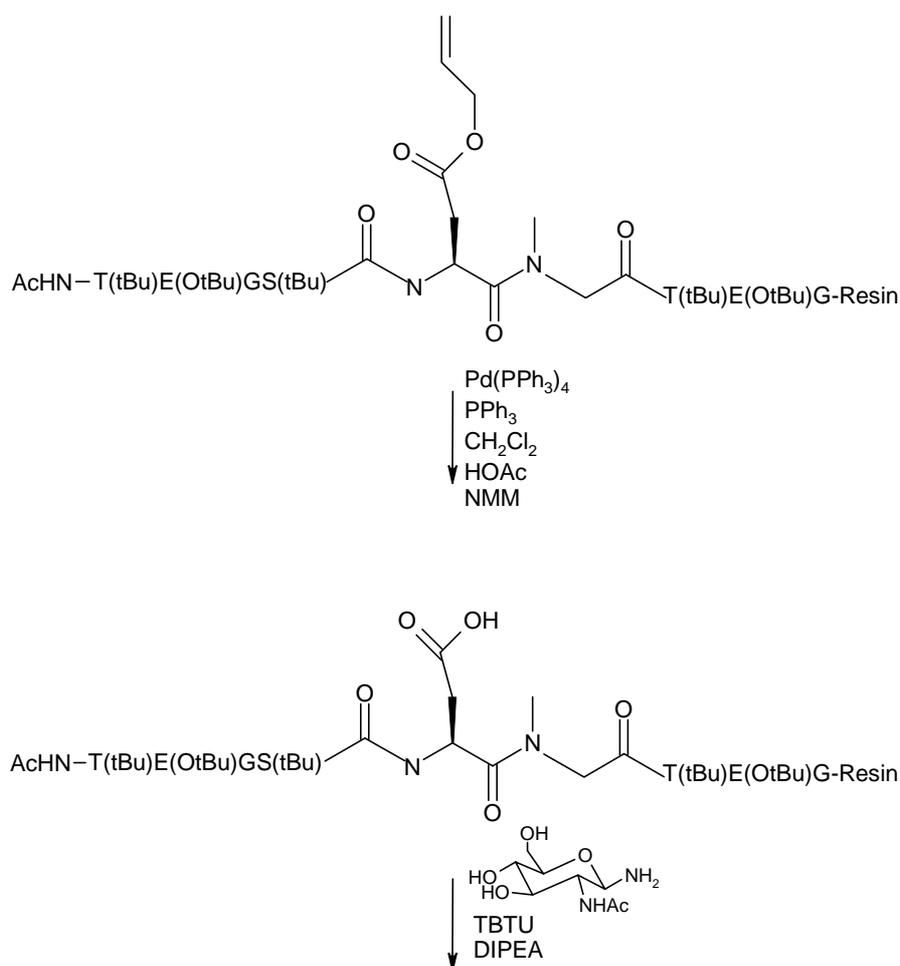


Abbildung 40: Standardmäßige Deallylierung und anschließende Glycosylierung unter Verwendung verschiedener Aktivatoren, hier am Beispiel von TBTU (siehe 9.3.4.1) gezeigt.

Es wurde standardmäßig deallyliert und im Anschluß an die Glycosylierung abgespalten, aufgereinigt und per RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt. Die Hauptprodukte TEGSN(β -D-GlcNAc)SarTEG und TEGSNSarTEG wurden per Maldi-TOF-MS eindeutig identifiziert. Das eigentliche Edukt TEGSDSArTEG ist in Nebenreaktion durch Aminierung mit Ammoniak vollständig in TEGSNSarTEG

übergegangen. Der Ammoniak wird, wie zuvor schon erwähnt, aus der Darstellung des aminierten Zuckers nach Kochetkov⁵⁷ als Verunreinigung in die Reaktionslösung eingeschleppt und entsteht als Zerfallsprodukt aus dem Übergang von aminierte in nicht-amierte Form des Zuckers. Die Aufreinigung des aminierten Zuckers muß also mit großer Sorgfalt, aber auch Vorsicht betrieben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher alle Arbeiten mit aminierten Zuckern unter Stickstoff durchgeführt, um zu verhindern, daß Luftfeuchtigkeit den Zerfallsvorgang beschleunigt. Darüber hinaus wird der aminierte Zucker im Tiefkühlschrank bei ca. -25°C aufbewahrt.

Im Falle der Untersuchung zum Aktivator TFFH wurde unter gleicher Vorgehensweise an einem Nonapeptid der Sequenz TQLFD_{OAI}SarT glycosyliert. Es wurde in einer Ausbeute von 30 µmol dargestellt und zeigte im Verlauf der Aufarbeitung ein deutlich schlechteres Löslichkeitsverhalten. So ging das Rohproduktgemisch vor Aufreinigung an HPLC trotz Zusatz von 30% Acetonitril nicht vollständig in Lösung, was die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse in diesem Fall erschwerte.

Die nun folgende Tabelle 4 zeigt die Ansätze und Ausbeuten aus den Versuchen 9.3.4.1 mit HATU, TBTU, DCC, HBTU und TFFH. Der aminierte Zucker wurde stets in dreifachem Überschuß eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde jeweils über Nacht geschüttelt. Alle Arbeiten wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Aktivator	Ansatz	eq ¹	Glycopeptid (GP) [%] ³	Peptid ² (P) [%] ³	Relation GP : P
TBTU	TBTU / DIPEA	1.2 / 1.2	65.23	5.07	12.87 : 1
DCC	DCC / HOBt	5 / 5	11.91	38.11	1 : 3.20
HATU	HATU / DIPEA	6 / 6	73.14	3.71	19.71 : 1
HBTU	HBTU / HOBt / DIPEA	6 / 6 / 12	72.01	6.85	10.51 : 1
TFFH	TFFH / HOBt / DIPEA	5 / 5 / 10	37.64	12.40	3.03 : 1 ⁴

Tabelle 4: Die Ansätze und Ausbeuten aus den Versuchen 9.3.4.1.

¹ bezogen auf die eingewogene Harzmenge, ² aminierte Form, ³ bezogen auf das synthetisierte Peptid am Harz, vor der Deallylierung, ⁴ Verhältnis möglicherweise kleiner, da Rohprodukt nach Glycosylierung zur Aufreinigung nicht vollständig in Lösung ging, was die nicht-glycosylierte Form aufgrund ihrer geringeren Polarität wahrscheinlich mehr betraf.

Wie das Verhältnis des glycosylierten Produkts zum nicht glycosylierten Nebenprodukt zeigt, erweisen sich sowohl HATU, als auch TBTU, genau wie in der Fmoc-SPPS, als besonders geeignete Aktivatoren für die Seitenkettenglycosylierung am Harz. Da es in Arbeiten von S.Meyer⁹³ und J.Tost⁹⁴ bei Aktivierung mit HATU an den vorrangig größeren Zuckern (Chitobiose, Decasaccharid vom komplexen Typ) auch zu Veresterungen mit den OH-Funktionen gekommen ist, wurde als Standardverfahren für alle folgenden Glycosylierungen die Aktivierung mit TBTU ausgewählt.

6.4.2 Überschuß an aminierten Zucker

Es sollte bestimmt werden, bis auf welchen kleinstmöglichen Überschuß der Einsatz des aminierten Zuckers beschränkt werden kann.⁹⁵ Für dieses Experiment wurde das Pentapeptid der Sequenz LFD_{OAI}SarT in einer Ausbeute von 95% dargestellt. Zur Vermeidung der Imid-Ringbildung wurde auch hier C-terminal benachbart zur Glycosylierungsstelle Sarcosin eingesetzt. Das Harz wurde standardmäßig deallyliert und in fünf genau gleiche Teile aufgeteilt, welche im Folgenden getrennt weiterverarbeitet wurden. Die Glycosylierung erfolgte nun jeweils nach Standardverfahren unter Einsatz verschiedener Anteile des aminierten Zuckers. Nach der Glycosylierung wurde abgespalten, aufgereinigt und per RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt. Die Hauptprodukte LFN(β -D-GlcNAc)SarT und LFNSarT, sowie LFDSarT wurden per Maldi-TOF-MS eindeutig identifiziert. In allen Ansätzen, in denen der Zuckeranteil kleiner als 1.5 eq gewählt wurde, trat neben dem aminierten, nicht glycosylierten Peptid auch das unveränderte Edukt LFDSarT auf. Bei der Bestimmung des Verhältnisses von glycosyliertem Produkt zu nicht-glycosyliertem Rest, wurden diese beiden Peptide zusammengefaßt.

Wie die folgende Tabelle 5 zeigt, kann der Überschuß an aminiertem Zucker bedenkenlos auf 1.5 eq reduziert werden.

Überschuß an aminiertem Zucker [eq] ¹	Verhältnis [%] von	
	Glycopeptid	Peptid ²
0.5	19	81
1.0	40	60
1.1	44	56
1.5	71	29
2.0	59	41
3.0	61	39

¹bezogen auf die eingesetzte Harzmenge, ²LFNSarT und LFDSarT zusammengefasst.

Tabelle 5: Untersuchung zum kleinstmöglichen Überschuß an aminiertem Zucker. Es ist das prozentuale Verhältnis von Glycopeptid zu Peptid² angegeben.

6.4.3 Vergleich der Glycosylierungsausbeuten neben Sarcosin und Hmb-geschützten Aminosäuren

Am Beispiel eines bekannten Sequenz-Ausschnitts (GSNNT aus TEGSNNTEG) sollte gezeigt werden, in wieweit sich die Erkenntnisse über die Glycosylierungsausbeuten von Asparaginsäure neben Sarcosin unter Verwendung verschiedener Aktivatorsysteme direkt auf analoge Hmb-geschützte Peptide übertragen lassen. Um zu beweisen, daß tatsächlich ein Hmb-geschütztes Peptid zum Einsatz kam, wurden die während des finalen *Cappings* des N-Terminus acetylierten phenolischen OH-Gruppen nicht durch Behandlung mit 20%iger Piperidin / DMF-Lösung deacetyliert, sondern geschützt belassen, so daß sie nicht abgespalten werden konnten und am Peptid, bzw. Glycopeptid verblieben.

Wie das Ausbeuteverhältnis zwischen Glycopeptid und Peptid von 12 : 1 eindrucksvoll belegt, sind Glycosylierungen von Asparaginsäure neben Hmb-geschützten Aminosäuren durchaus mit denen neben Sarcosin vergleichbar. Von einer erneuten Versuchsreihe zur Aktivierung vor Glycosylierungen neben Hmb-geschützten Aminosäuren konnte also abgesehen werden.

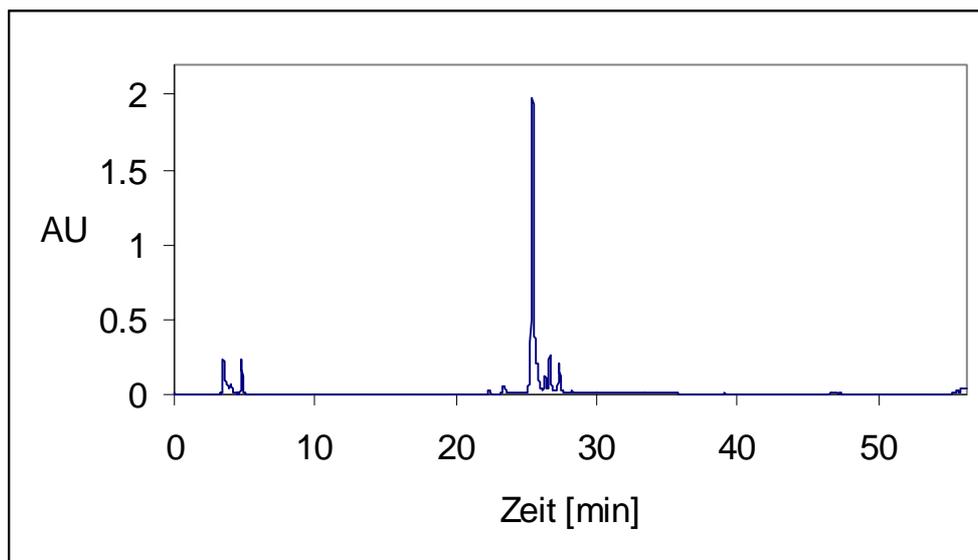


Abbildung 41: RP-HPLC-Chromatogramm nach Glycosylierung neben Hmb-geschützter Aminosäure. Der Hauptpeak gehört zum Glycopeptid, rechts daneben das Peptid.

6.5 Abspaltung vom Harz und anschließende Aufarbeitung

Die Abspaltung der am Harz synthetisierten Peptide und Glycopeptide erfolgte in allen Experimenten dieser Arbeit durch Schütteln des Harzes in einem Gemisch bestehend aus TFA:Triisopropylsilan:H₂O 95:5:2 über 60 und 90 min. Auf in der Peptidchemie allgemein üblichen Zusatz von weiteren *scavengern* wie 1,2-Ethandithiol oder Thioanisol wurde verzichtet, weil es, wie in anderen Arbeiten⁹³ beschrieben, unter den stark sauren Abspaltbedingungen zu unerwünschten Nebenreaktionen kam, die letztlich zum Verlust des Zuckers oder seiner stereochemischen Eindeutigkeit führten. Darüber hinaus wurden ausschließlich *t*Bu-, Trt-, Pbf- und Boc-Gruppen geschützte Aminosäurederivate eingesetzt, deren vollständige Abspaltung auch ohne weitere *scavenger* gewährleistet ist. Hmb-Schutzgruppen sind unter diesen Bedingungen ebenfalls vollständig abspaltbar, vorausgesetzt ihre phenolische OH-Gruppe ist frei.⁹⁶

Auch das nach Hmb-Entschützen freiwerdende Carbokation kann mit empfindlichen Aminosäureresten reagieren und muß durch *scavenger*-Zusatz "abgefangen" werden. Beobachtet wurden Reaktionen mit Trp, die jedoch vollständig durch Boc-Schutz an Trp unterdrückt werden können⁹⁷.

Bevor das abgespaltene Rohproduktgemisch per RP-HPLC aufgetrennt wird, reinigt man das Abspaltgemisch durch Aufarbeitung mit Diethyl- oder *t*-Butylmethylether

vor.⁹⁸ Dies kann sowohl durch Ausschütteln in 20%iger Essigsäure, als auch durch Ausfällung der Peptid- und Glycopeptidfragmente in reinem Ether geschehen. Um zu verhindern, daß sich hydrophobere Peptidsequenzen teilweise im Ether lösen könnten, wird dieser in eisgekühlter Form eingesetzt. Das aufgearbeitete Rohproduktgemisch läßt sich im Anschluß gut in Wasser aufnehmen und lyophilisieren, was sein Lösungsverhalten zur späteren Aufreinigung an RP-HPLC in Wasser/Acetonitril merklich verbessert.

Am Beispiel eines einfachen Pentapeptides der Sequenz TITLPS wurden diese zwei Aufarbeitungsvarianten ausgeführt und in Hinblick auf potentielle Ausbeuteverluste mit einem nicht aufgearbeiteten Ansatz verglichen (siehe Experimentellen Teil 9.3.6). Es stellte sich heraus, daß es zu keinem Produktverlust kommt.

Da es bei Ausschütteln längerer Peptidsequenzen mit hydrophobem und hydrophilem Molekülteil aber zu Emulsionsbildungen kommen kann, wird im Verlauf der folgenden Arbeit auf die Variante des Ausschüttelns vollständig verzichtet. Die Variante des Ausfällens wurde aufgrund schlechter Erfahrung mit Fällungsreaktionen im Allgemeinen ein wenig modifiziert. Das Rohproduktgemisch wird zunächst zur Trockene eingeeengt und erst dann mit Ether überschichtet, im Ultraschallbad behandelt und nach Zentrifugieren und Dekantieren aus Wasser lyophilisiert. Ein weiterer Vorteil dieser, im Folgenden als Standardvariante bezeichneten Methode, ist das frühzeitige Entfernen der TFA-Abspaltlösung, was unerwünschten Folgereaktionen vorbeugt.

6.6 Glycopeptidsynthesen

In den hier beschriebenen Glycopeptidsynthesen wurden alle zuvor gemachten Erkenntnisse zusammengeführt und auf verschiedene Beispiele angewendet. Die Aminosäuresequenzen wurden, wie schon zuvor, einer für diese Arbeit ausgewählten V4-Sequenz aus dem GP120 entnommen. Es handelt sich um die unmittelbaren Umgebungen der zwei möglichen Glycosylierungsstellen an Position 13 und 27.

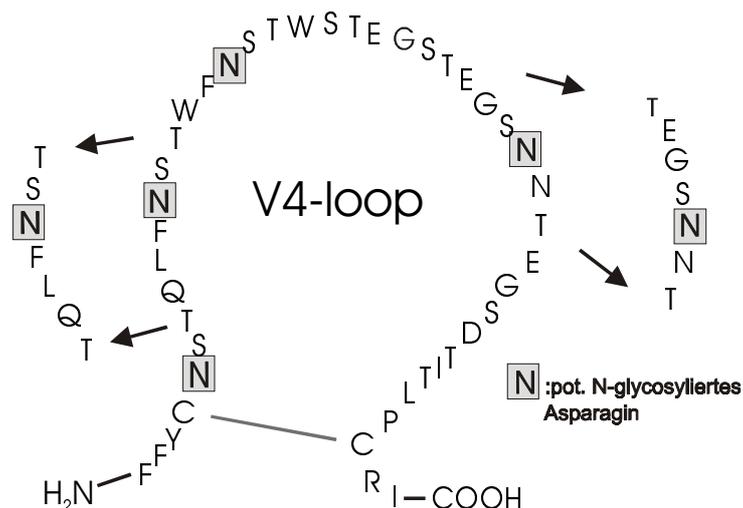


Abbildung 42: Beispiel für die Auswahl von Sequenzen aus der V4-Loop.

Als einzige Ausnahmen wurden die Decapeptidsequenz SVNFTDNAKT (siehe 6.6.1), entnommen aus der C2-Region des GP120, welche möglicherweise eine CD4-Bindungsstelle darstellt⁹⁹ und die vollständige V3-Loop des GP120 (siehe 6.6.5) synthetisiert.

6.6.1 Synthese des Glycopeptids SVN(β -D-GlcNAc)FTDNAKT

Am Beispiel des Decapeptides mit der Sequenz SVDFTDNAKT konnte gezeigt werden, daß auch neben Hmb-geschütztem Phenylalanin erfolgreich glycosyliert werden kann und dies in einer Ausbeute von 31% bezogen auf die eingewogene Harzmenge. Des weiteren wurde festgestellt, daß die zur Deacetylierung der phenolischen OH-Gruppe an Hmb angesetzte Zeit von 15 minütigem Behandeln in 20% Piperidin/DMF als zu kurz bemessen war. Neben dem erwarteten glycosylierten und nicht-glycosylierten Produkt fanden sich auch die jeweils noch Hmb-geschützten Formen, jeweils OH-acetyliert.

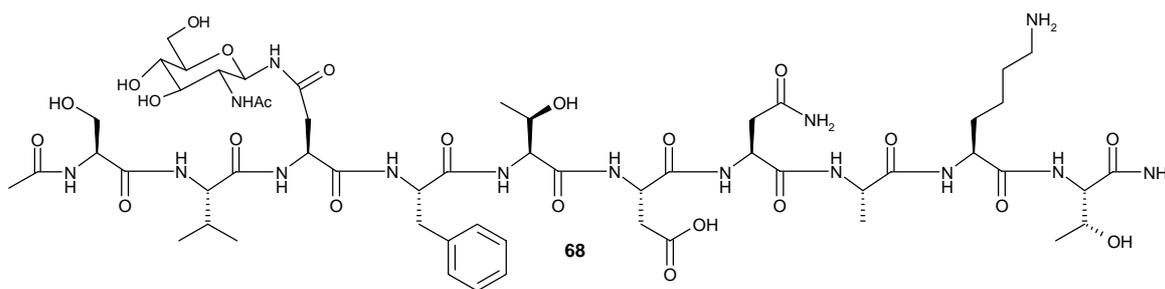


Abbildung 43: SVN(β -D-GlcNAc)FTDNAKT (**68**).

In allen folgenden Glycopeptidsequenzen wurde daher vor der Abspaltung mit TFA, halbstündig in 20% Piperidin/DMF geschüttelt.¹⁰⁰

Aus diesem Befund folgt aber offenbar auch, daß die Acetylierung stabiler ist als die im Verlauf der Peptidsynthese auftretenden Acylierungen, welche in Versuchen an säurelabilen Linkern per Maldi-TOF-MS¹⁰¹ nachgewiesen werden konnten. Um nun den Verlust an zu kuppelnden Aminosäuren durch unkontrollierte Acylierung an der freien Hmb-OH-Funktion gering zu halten, wurde angestrebt, die beständigere Acetylierung zu forcieren, damit diese sich im Verlauf der Peptidsynthese durchsetzen kann. Hierzu wurde der *Capping*-Lösung die Base DIPEA zugefügt, welche die Acetylierung an der phenolischen OH-Gruppen begünstigt.⁹⁶

6.6.2 Synthese des Glycopeptids WGSN(β -D-GlcNAc)NTE

Das Heptapeptid mit der Sequenz WGSDNTE konnte ebenfalls erfolgreich glycosyliert werden, allerdings in einem deutlich schlechteren Verhältnis zwischen Glycopeptid und Peptid als im Beispiel SVNFTDNAKT. Dies konnte auf die lange Lagerungszeit des 2-N-Acetyl-D-glucosaminyamins (**1**) zurückgeführt werden, welches schon zum Zeitpunkt der Glycosylierung zu hohem Anteil wieder in seine nicht-aminierte Form übergegangen war. Außerdem wurde die Kupplung von Asp_{OAI} nicht mit TFFH aktiviert. Die Ausbeute betrug 12% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

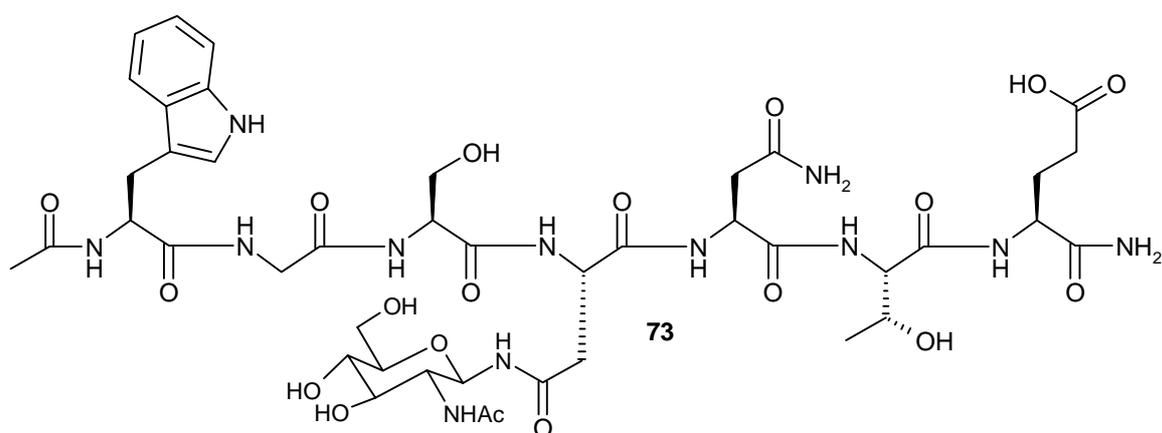


Abbildung 44: WGSN(β -D-GlcNAc)NTE (**73**).

Neben dem glycosylierten Produkt und dem aminierten Nebenprodukt wurden keine Hmb-haltigen Derivate identifiziert, so daß nun davon ausgegangen werden konnte, daß die Abspaltung der Hmb-Schutzgruppen nach halbstündiger Behandlung mit 20% Piperidin/DMF und Standardabspaltbedingungen vollständig erfolgt.

6.6.3 Glycosylierung mit dem 1- β -Aminodecasaccharid **6**

Wie Urge *et al.* berichten, ist eine Glycosylierung neben einer Hmb-Schutzgruppe mit sterisch anspruchsvolleren Oligosacchariden nicht möglich.¹⁰² Da der Hmb-, bzw. acy- oder acetylierte Hmb-Schutz jedoch im Peptidbackbone liegt und die Glycosylierung somit nicht stören sollte, wurde anhand eines einfachen Pentapeptides der Sequenz LFNSarT versucht, neben Sarcosin, der sterisch einfachsten Alternative zur Hmb-Schutzgruppe, mit einem 1- β -Aminodecasaccharid **6** zu glycosylieren, welches mir freundlicherweise von S. Meyer in kleiner Menge zur Verfügung gestellt wurde. Wie der Versuch gezeigt hat, ist diese Glycosylierung durchaus möglich, allerdings ist die gewonnene Menge an Glycopeptid so gering, daß es nur mit Hilfe eines Maldi-TOF-Spektrums identifiziert und charakterisiert werden konnte. Für NMR-analytische Untersuchungen reichten die erhaltenen Spuren selbst für Messungen in speziell für Kleinstmengen vorgesehene NMR-Röhrchen der Firma *Shigemi* nicht aus. Dies liegt zum einen an dem ohnehin als außerordentlich klein bemessenen Ansatz, als auch an der nicht vollständig gelungenen Aminierung des Decasaccharides **5** (siehe Abbildung 37). Offenbar waren die geringe Reaktionstemperatur und die verkürzte Reaktionszeit auf einen Tag, Ursache für den nicht quantitativen Verlauf der Kochetkov⁵⁷-Aminierung. Darüber hinaus zeigt das Glycopeptid keinerlei Wechselwirkung mit der zur Aufreinigung benutzten RP-Phase, sondern kommt gemeinsam mit verschiedenen ebenfalls sehr polaren Verunreinigungen mit der Laufmittelfront von der Säule. Es konnte also nicht rein isoliert werden, sondern nur eine Peakschulter in der nach Maldi-TOF-MS das Produkt enthalten war, näher untersucht werden. Möglicherweise hätte eine Affinitätschromatographische Methode, mit der das vielleicht zuvor derivatisierte Produkt (z.B. als biotinyliertes Derivat)¹⁰³ eindeutig aus dem Rohgemisch hätte isoliert werden können, zu einem eindeutigeren Befund geführt.

Ein zweiter Ansatz in dem neben Hmb-geschützten Glycin, als sterisch einfaches Pendant zu Sarcosin, ebenfalls mit dem 1- β -Aminodecasaccharid **6** glycosyliert

werden sollte, ergab kein glycosyliertes Produkt. Die Hmb-Schutzgruppe wurde in ihrer acetylierten Form am Peptid belassen, um gegebenenfalls zu beweisen, daß die Glycosylierung tatsächlich neben Hmb erfolgt ist.

Aufgrund der bereits zuvor angesprochenen Unzulänglichkeiten im Versuchsaufbau ließ dieser Befund lediglich den Rückschluß zu, daß die Glycosylierung neben Hmb-geschützten Derivaten schwieriger zu sein scheint als neben Sarcosin. Um eine Aussage über die grundsätzliche Möglichkeit zur Glycosylierung mit sterisch anspruchsvolleren Oligosacchariden treffen zu können, bedarf es weiterer Experimente, in denen erstens sichergestellt ist, daß die vorangegangene Aminierung des Oligosaccharids vollständig verläuft, zweitens die Isolierung des potentiell glycosylierten Produktes möglich ist und drittens die Durchführung der Reaktion an die Ansatzgröße angepasst werden kann. Letzteres deutet an, daß es durchaus sinnvoll sein könnte, die Durchführung auf einen Syntheseroboter zu übertragen.

6.6.4 Zweifachglycosylierungen

Das Dodecapeptid mit der Sequenz LFDSTWGSNDTE sollte nacheinander an den Positionen D-4 und D-10 mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin (**1**) glycosyliert werden. Als Hauptprodukte wurden das zweifach aminierte, nicht-glycosylierte Peptid **83**, die je einfach glycosylierten und einfach aminierten Peptide **81**, **82** und das zweifach glycosylierte Peptid **80** identifiziert und charakterisiert. Nicht aminierte Produkte wurden nicht isoliert. Die einfach an D-4 **81** oder D-10 **82** glycosylierten Peptide konnten per RP-HPLC aufgrund zu ähnlichem Laufverhaltens nicht voneinander getrennt werden. Ihre Summenausbeute wurde als die Größte mit insgesamt 12% (bezogen auf die eingewogene Harzmenge) bestimmt. Die Ausbeuten an nichtglycosyliertem Produkt **83** und dem gewünschten zweifachglycosyliertem Peptid **80** betragen 3% und 2%. Um wiederum zu beweisen, daß die Glycosylierungen neben Hmb-Schutzgruppen erfolgt sind, wurden diese in acetylierter Form an den Produkten belassen. Nur das nicht-glycosylierte Produkt wurde im Anschluß an seine Isolierung noch einmal in Lösung mit 20% Piperidin in DMF und feuchter TFA behandelt, so daß in diesem Falle das Hmb-freie Produkt **84** erhalten und charakterisiert wurde. Diese postsynthetische Abspaltung der Hmb-Schutzgruppen verlief quantitativ. Ein Ausbeuteverlust konnte nicht festgestellt werden.

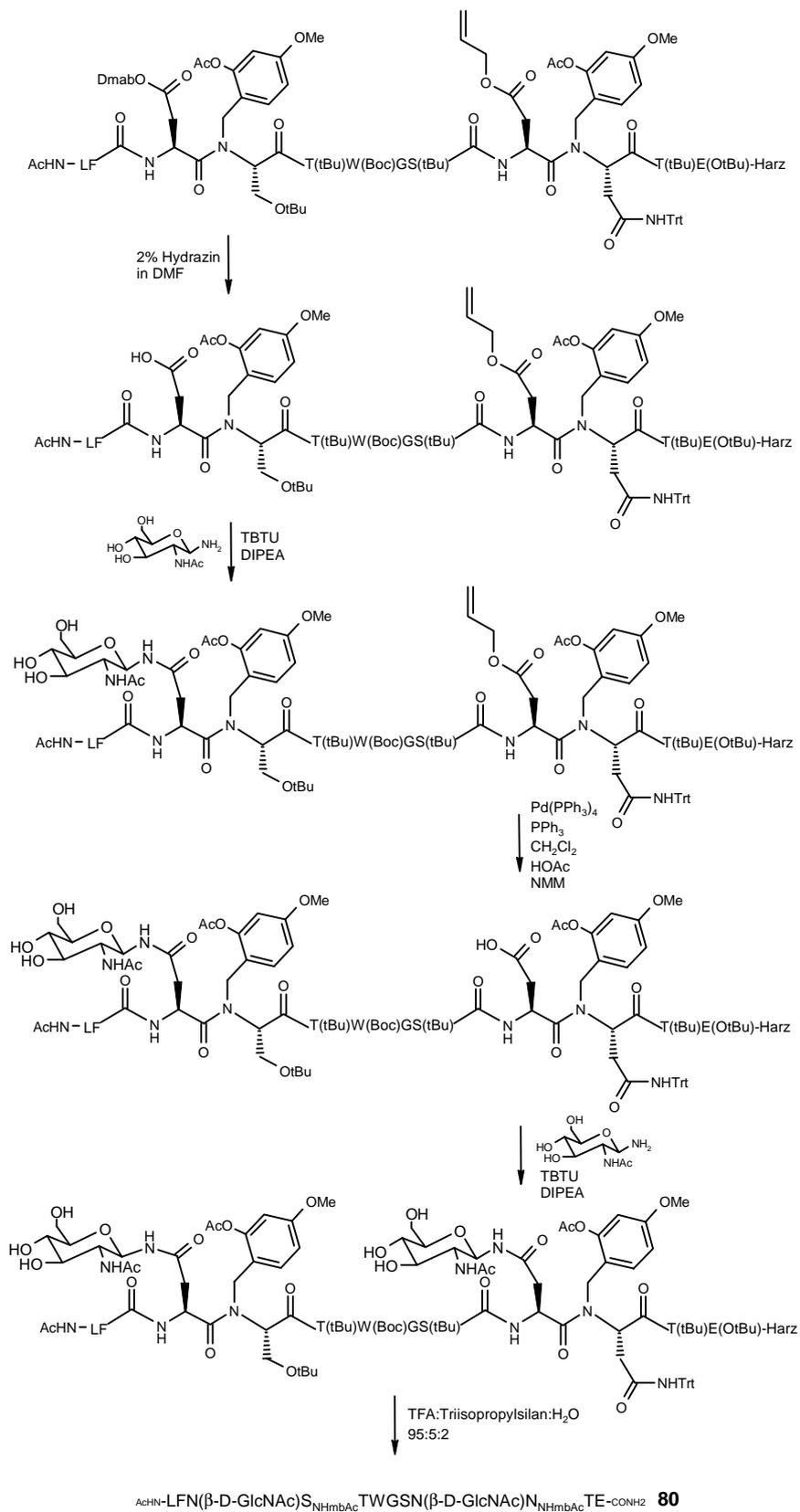
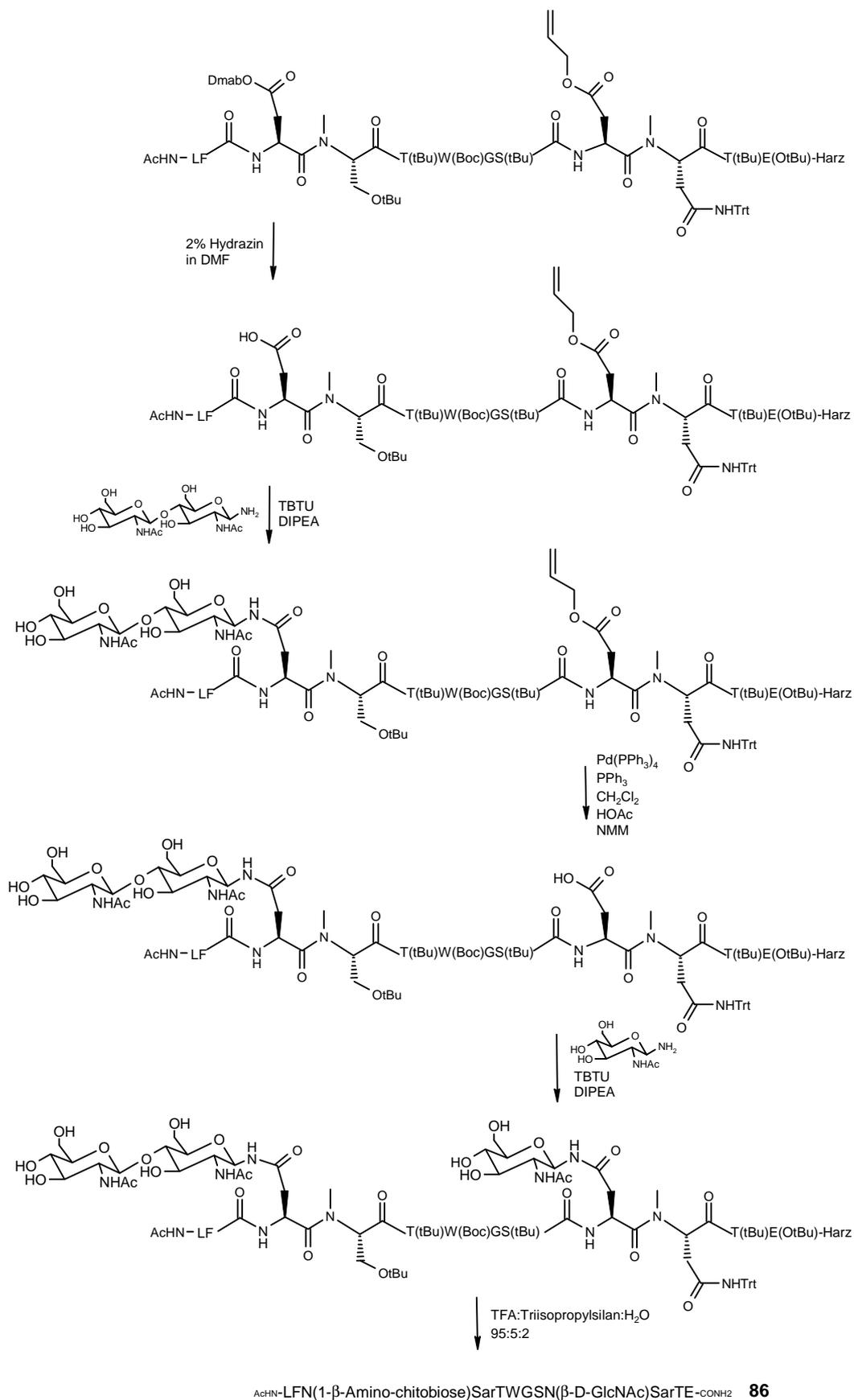


Abbildung 45: Erfolgreich durchgeführte Zweifachglycosylierung mit GlcNAc neben Hmb-Schutz.

Da der obige Ansatz aufgrund Verwendung gleicher Saccharidderivate, die aufeinander folgenden Glycosylierungen weniger eindrucksvoll dokumentiert und die einfach glycosylierten Produkte nicht isoliert und ausreichend charakterisiert werden konnten, wurde das Experiment bei gleicher Sequenz, aber diesmal mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin (**1**) und 1- β -Aminochitobiose (**4**) wiederholt. Es wurden in diesem zweiten Ansatz jedoch die Aminosäuren Serin und Asparagin durch Sarcosin ausgetauscht. Als Hauptprodukte wurden wiederum das zweifach aminierte, nicht-glycosylierte Peptid **89** (Ausbeute 15%), die einfach mit 1- β -Aminochitobiose glycosylierte und einfach aminierte Form **88** (11%), die einfach mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin glycosylierte und einfach aminierte Form **87** (4%) und das zweifach glycosylierte Peptid **86** (2%) identifiziert und charakterisiert. Nicht aminierte Produkte wurden nicht isoliert. Alle Ausbeuten beziehen sich auf die eingewogene Harzmenge und wurden durch Auswaage bestimmt. Eine Aussage über die Peptidausbeute vor der Glycosylierung konnte nicht gemacht werden, da der bei zwei Hmb-Gruppen nicht mehr aussagekräftige Fmoc-Wert nicht zur Abschätzung der Ausbeute herangezogen werden konnte. Auf Einsatz des Pikrinsäureexperimentes wurde aufgrund der ungeklärten Wechselwirkungen mit dem eingesetzten Harz (siehe 6.1.8) und des hohen Fehlers, der mit dieser Methode einhergeht, verzichtet.



AcHN-LFN(1-β-Amino-chitobiose)SarTWGSN(β-D-GlcNAc)SarTE-CONH₂ 86

Abbildung 46: Erfolgreich durchgeführte Zweifachglycosylierung mit Chitobiose und GlcNAc neben Sarcosin.

Auffällig an der Produktverteilung war, daß die zweite Glycosylierung mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin (1) in merklich schwächerer Ausbeute erfolgte und der Anteil an vollständig unglycosyliertem Peptid besonders hoch war. Über die Ursachen für diesen Umsatzeinbruch konnten auch die im Verlauf der Reaktion entnommenen Harzproben keinen Aufschluß geben. Da neben dem zweifach aminiertem Peptid auch eine einfach methylierte Form entdeckt wurde, wäre es denkbar, daß es im Verlauf des ausgiebigen Harzwaschens nach der Deallyllierung mit Methanol zu einer Veresterung an der Glycosylierungsstelle gekommen sein könnte.

Grundsätzlich ließ sich nach diesen Synthesen festhalten, daß eine zweifache Glycosylierung mit verschiedenen Saccharid-Derivaten möglich ist. Gleichzeitig entstand aber auch eine hohe Produktvielfalt, die zu Ausbeuteeinbußen an zweifach glycosyliertem Produkt führte und die Aufreinigung an RP-HPLC erschwerte.

Es zeigte sich auch, daß die unternommenen Vorversuche zur Optimierung der einzelnen Syntheseschritte, wie Abspaltung der orthogonal selektiven Schutzgruppen, Aktivierung zur Glycosylierung, Abspaltung und Aufarbeitung oder Präparation der erforderlichen Reaktanden insbesondere bei Mehrfachglycosylierungen, essentiell zu einer erfolgreichen Durchführung beitrugen. Dies galt sowohl für das Verständnis der einzelnen Synthesestufen als auch für die erforderlichen und somit zu erreichenden hohen Umsätze in den Teilschritten.

6.6.5 Synthese der V3-Loop

Wie in der Aufgabenstellung bereits beschrieben, ist es ein Ziel dieser Arbeit, die Einsetzbarkeit der untersuchten Glycosylierungsmethode auch in längeren Peptidsequenzen zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde die V3-Loop aus dem GP120 (siehe auch 3.3) in einer Sequenz gewählt, die bereits in der Arbeit von S.Meyer⁹³ untersucht und charakterisiert wurde. Neben der Ultrafiltration und RP-HPLC sollten ergänzend auch noch weitere chromatographische Methoden zur Aufreinigung des zu erwartenden großen Produktgemisches eingesetzt werden.

Wie im Experimentellen Teil unter 9.5.8 beschrieben, konnte mit Hilfe einer Harzprobe, die unmittelbar vor der Deallyllierung entnommen wurde, belegt werden, daß die Synthese der V3-Sequenz gelungen war und dies in einer Mindestausbeute von 14.15 µmol. Die anschließende Abspaltung der Allylgruppe, Glycosylierung, Abspaltung unter Disulfidbrückenbildung durch Oxidation mit Luftsauerstoff, Aufarbeitung und Aufreinigung an RP-HPLC führte zu den

erwarteten Produkten, der nichtglycosylierten, aminierten Loop **92** und der glycosylierten Loop **94**. Ein nicht disulfidverbrücktes V3-Fragment wurde weder in glycosylierter, noch in nicht-glycosylierter Form identifiziert. Neben diesen Produkten wurden aber ebenso eindeutig die Hmb-geschützten Addukte **93**, **95** und eine methylierte Form der glycosylierten Loop **96** per Maldi-TOF-MS identifiziert. Offensichtlich sind die OH-freien Hmb-Gruppen in strukturierten, längeren Peptidfragmenten aufgrund möglicherweise schwierigeren Zugangs schlechter abspaltbar. Ob die schlichte Verlängerung der Abspaltzeit ausreicht, um Abhilfe zu schaffen, müßte in einem vergleichbaren Versuchsaufbau noch geklärt werden. Gegebenenfalls müßte die Abspaltung der Hmb-Schutzgruppen wie im Falle von **84** (siehe 6.6.4) erst nach der Isolierung der Produkte in Lösung erfolgen, was quantitativ möglich ist.

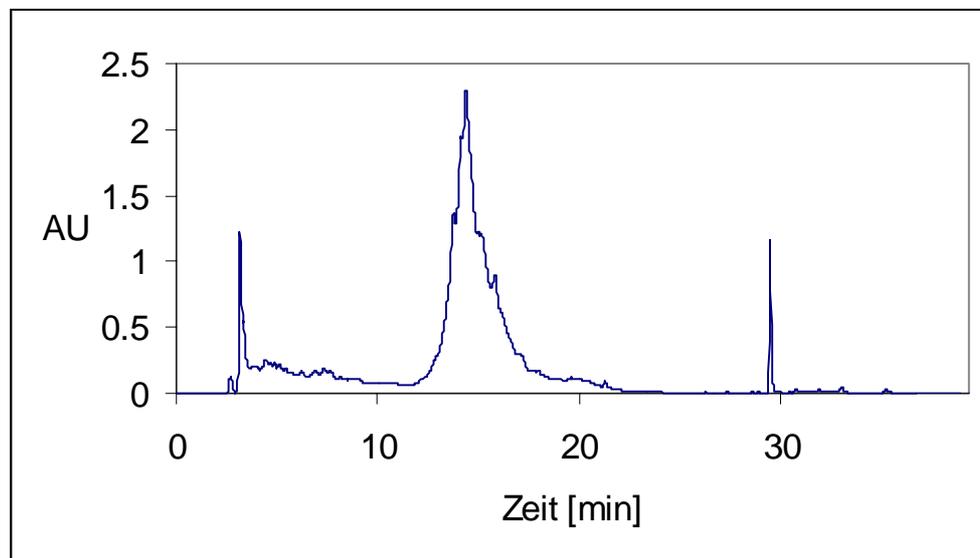


Abbildung 47: RP-HPLC-Chromatogramm des Rohproduktgemisches nach Abspaltung vom Harz und Disulfidbrückenbildung.

Die erfolgreiche Isolierung der glycosylierten V3-Loop **94** gemeinsam mit ihrem Hmb-geschützten Addukt **95** und ihrer methylierten Form **96** gelang schließlich nach Affinitätschromatographie an einer WGA-Säule (siehe Experimentellen Teil 9.5.8). Die anschließende Größenausschlußchromatographie und erneute RP-HPLC reinigten zwar vollständig von den Puffersalzen und dem Eluenten GlcNAc, vermochten es aber nicht, die drei glycosylierten Produkte voneinander zutrennen.

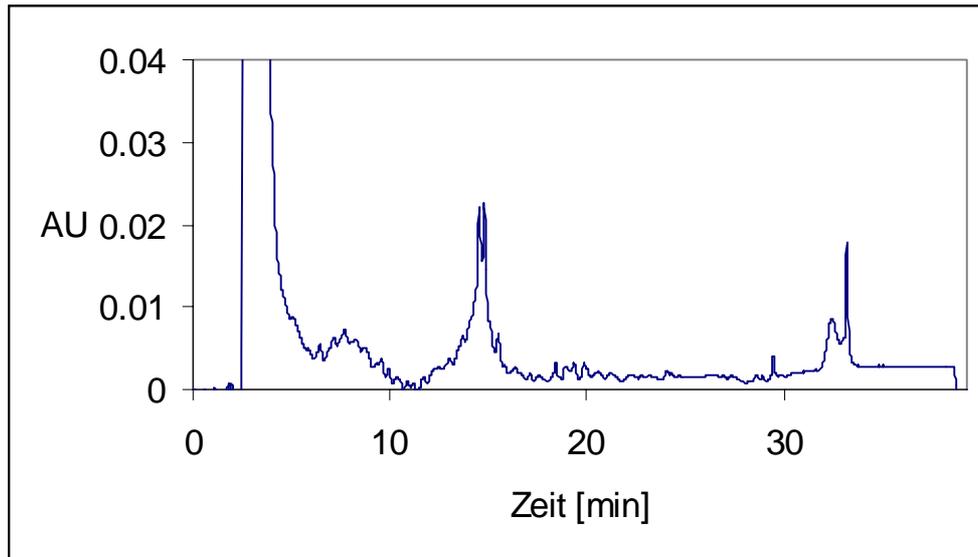


Abbildung 48: RP-HPLC-Chromatogramm der glycosylierten Produkte nach Aufreinigung an einer WGA-Affinitätssäule. Man beachte die veränderte Skalierung der Y-Achse (AU).

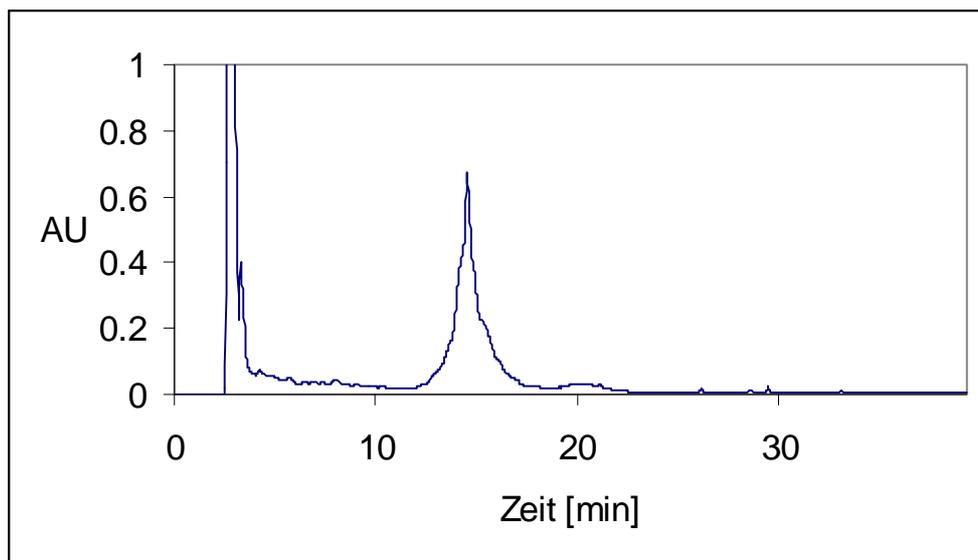


Abbildung 49: RP-HPLC-Chromatogramm aller nichtglycosylierter Produkte nach Aufreinigung an einer WGA-Affinitätssäule. Man beachte wiederum die veränderte Skalierung der Y-Achse (AU).

Da die vereinten Fraktionen keine wägbaren Produktmengen ergaben, wurde von weiteren Aufreinigungsversuchen abgesehen. Eine Aussage zur Ausbeute ist also nicht möglich.

6.7 Versuch der Seitenkettenglycosylierung neben Pseudoprolin

Pseudoproline sind Oxazolidine, die ihren Namen der strukturellen Verwandtschaft zu Prolin verdanken. Sie werden an Dipeptiden, deren C-terminale Aminosäure Ser, Thr oder Cys ist, dargestellt und lassen sich als Baustein, N-terminal Fmoc-geschützt in laufende Peptidsynthesen einführen.¹⁰⁴ Das Pseudoprolin hat über den gesamten Verlauf einer Peptidsynthese Bestand. Erst bei Behandeln des Harzes mit feuchter TFA, öffnet sich der Fünfring und die ursprüngliche Sequenz wird erhalten. Da Pseudoproline erfolgreich in der Synthese schwieriger Sequenzen eingesetzt werden,¹⁰⁵ weil sie bei entsprechendem Einsatz durch Verhindern der Wasserstoffbrückenausbildung, Aggregationen und β -Faltblattstrukturen unterdrücken können, war es naheliegend, auch ihren Einsatz in der Glycopeptidsynthese am Harz zu überprüfen und mit dem Einsatz von Hmb-Schutzgruppen zu vergleichen.¹⁰⁶

Es sollte zunächst das Dipeptid, bestehend aus der selektiv geschützten Glycosylierungsstelle und Serin, als Ausgangsverbindung für den Umsatz zum Pseudoprolin dargestellt werden, dieses dann zum Pseudoprolin überführt und als Dipeptid-Synthesebaustein in eine sehr einfache Peptidsynthese, mit der Zielsequenz FNST eingefügt werden. Um die Dipeptidbildung in Lösung durchführen zu können, ohne die β -Seitenkette an Serin noch temporär schützen zu müssen, wurde Fmoc-Asp(OAl)-OH in einem ersten Schritt zunächst in seinen Pfp-Aktivester **36** überführt. Dies geschah in einer Ausbeute von 98% fast quantitativ. Das Produkt wurde per Maldi-TOF-MS identifiziert.

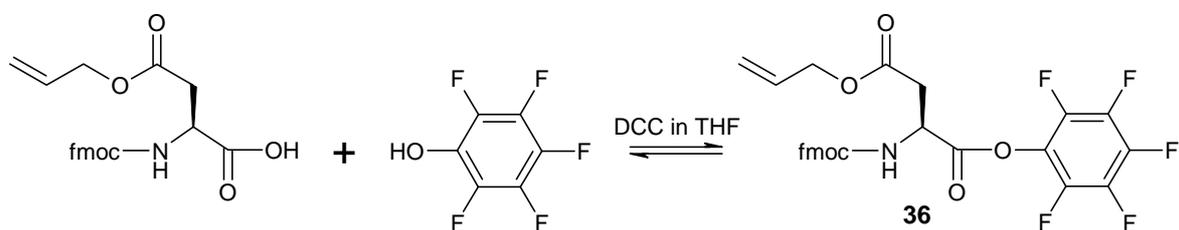


Abbildung 50: Überführung von Fmoc-Asp(OAl)-OH in seinen Pfp-Ester **36**.

Im nächsten Schritt wurde das Dipeptid **37** geknüpft und dieses, wie die aufgenommenen Maldi-Spektren zeigen, vollständig zum Pseudoprolin-Baustein **38** umgesetzt, welches dann nach den Vorschriften einer manuellen Peptidsynthese an bereits harzgebundenes Thr gekuppelt werden konnte. Nach Anknüpfen von

Phenylalanin wurde standardmäßig deallyliert und der Versuch unternommen, mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminylamin (**1**) zu glycosylieren.

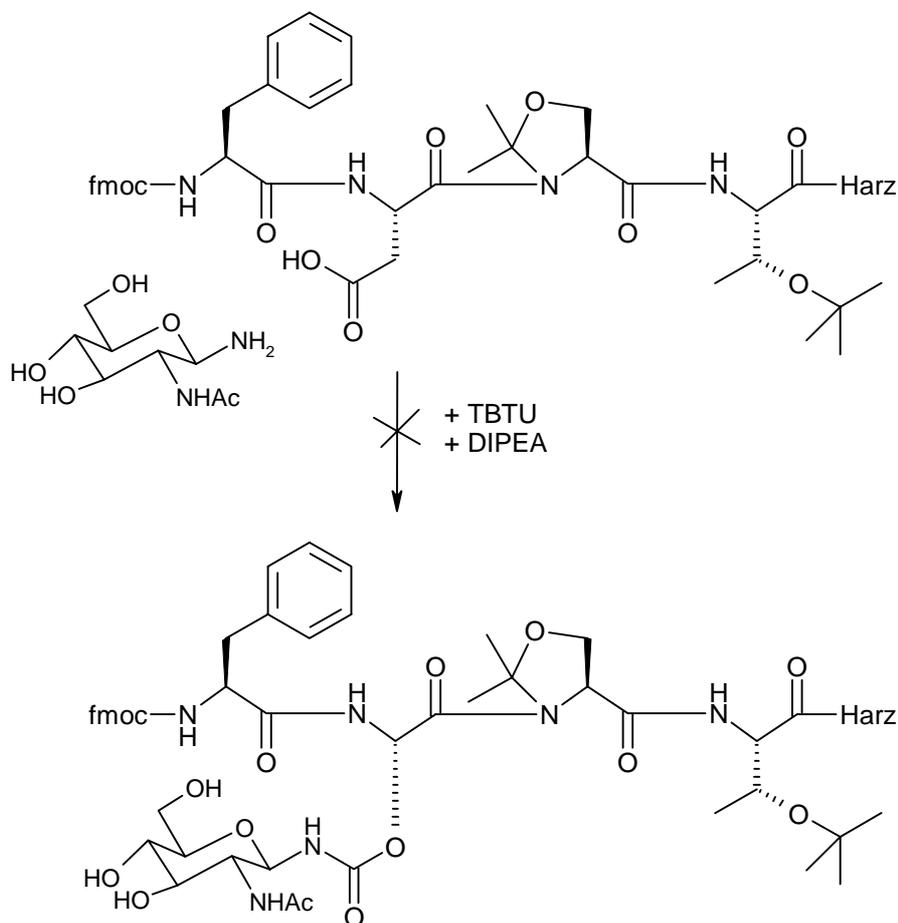


Abbildung 51: Synthesepfad zur Glycosylierung neben Pseudoprolin.

Nach Abspaltung, Aufarbeiten und Aufreinigung mit Hilfe der RP-HPLC, konnte jedoch nur das unglycosylierte Peptid isoliert und charakterisiert werden. Ob eine Glycosylierung neben Pseudoprolin aus sterischen Gründen erschwert ist, oder ob die Pseudoprolin-Ringstruktur über den Verlauf der Glycosylierung nicht stabil ist, ließ sich an diesem Experiment leider nicht aufzeigen. Hierzu hätte an einem selektiv abspaltbaren, z.B. säurelabilen Harz, bzw. Linker wie Tritylchlorid¹⁶⁷- oder HMPB¹⁰⁷-gearbeitet werden müssen, um dann an während der Glycosylierung abgenommenen Proben, zu untersuchen, ob die Pseudoprolinstruktur erhalten bleibt oder es zu unerwünschten Nebenreaktionen kommt. Möglicherweise stören aber auch die Methylgruppen an Position 2 des Fünfrings, so daß eine Glycosylierung neben S($\Psi^{H,H}$)pro erfolgreich verlaufen wäre.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Darstellung von N-Typ Glycopeptiden nach konvergenter Methode in Ausbeuten von 57% bis 95% möglich ist. Das Problem der Imidringbildung, welche nach Aktivierung des Aspartat-Säurerestes am Harz die Glycosylierungsausbeute massiv einschränkt, wurde durch Einsatz der 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl-(Hmb)-Schutzgruppe an der C-terminal benachbarten Aminosäure gelöst.

Die Herstellung von Aminosäurederivaten mit Hmb-Schutzfunktion an ihrer α -Aminofunktion, die in der Festphasenpeptidsynthese verwendbar sind, war bislang nur für einen Teil der natürlichen Aminosäuren möglich. Aufgrund umfangreicher Modifikationen an den bis dahin gängigen Synthesvorschriften ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, ein Verfahren zu entwickeln, das es ermöglicht auch die bisher nicht zugänglichen, seitenkettengeschützten Aminosäurederivate in Ausbeuten von 22% bis 47% darzustellen. Diese sind nur an ihrer α -Aminofunktion Fmoc-geschützt und werden in der Peptidsynthese mit freier phenolischer OH-Gruppe an der Hmb-Gruppe eingesetzt. Darüber hinaus ist es, wenn auch in geringer Ausbeute, gelungen, die analogen, an N^α und am phenolischen OH der Hmb-Schutzgruppe Fmoc-geschützten Derivate an fester Phase zu synthetisieren.

Es konnte gezeigt werden, daß der Einsatz alternativer Schutzgruppen, deren Fmoc-geschützte Derivate leichter zugänglich sind, nicht möglich ist. Ihr sterischer Anspruch führte in der laufenden Peptidsynthese zu Ausbeuteverlusten bei der nächstfolgenden Kupplung.

Nach umfangreichen Untersuchungen zur Optimierung der Kupplungsbedingungen ist es gelungen, den Hmb-Schutz in Form seines einfach Fmoc-geschützten Aminosäurederivates unter nur geringem Gesamtausbeuteverlust an den gewünschten Positionen im Peptid einzufügen. In diesem Zusammenhang wurde die von Albericio *et al.*⁷⁸ beschriebene Theorie der intermediären Ausbildung eines Oxazepin-Intermediats bestätigt, welches nur bei einfach Fmoc-geschützten Hmb-Aminosäurederivaten auftritt. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kinetik der 7-Ring-Bildung untersucht.

Die zur Glycosylierung erforderliche Aktivierung konnte durch direkten Vergleich verschiedener Aktivatoren und Reaktionsbedingungen genau wie die Abspaltbedingungen der Schutzgruppen an den Glycosylierungsstellen optimiert werden. Der Einsatz der nach Kochetkov⁵⁷ aminierten Zucker (GlcNAc und Chitobiose) wurde nach einer Vergleichsstudie auf einen 1.5 fachen Überschuß reduziert.

Die Abspalt- und Aufarbeitungsbedingungen wurden durch genaue Analytik der Produkte optimiert. Damit konnte sowohl der Verlust der Zucker ausgeschlossen, als auch die vollständige Abspaltung der Hmb-Schutzgruppen garantiert werden.

Als großen Vorteil der konvergenten N-Typ Glycopeptidsynthese gegenüber der alternativen Bausteinmethode erwies sich in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß nur ein oder wenige glycosylierte Produkte gebildet werden, die sich mit Hilfe der Affinitätschromatographie sehr komfortabel in wenigen Arbeitsschritten isolieren lassen.

Durch Einsatz eines orthogonal selektiven Schutzgruppenpaares (Dmab- und Allyl-) konnten zwei aufeinander folgende Glycosylierungen mit unterschiedlichen Zuckern, wie z.B. Chitobiose und GlcNAc durchgeführt werden. Die konvergente N-Typ Glycopeptidsynthese ist also nicht mehr auf nur eine Glycosylierungsstelle beschränkt. Neben den zweifach glycosylierten Produkten, traten allerdings auch die je einfach glycosylierten Addukte auf.

Am Beispiel der V3-Loop aus dem GP120 des HIV wurde darüber hinaus bewiesen, daß auch an längeren Peptidsequenzen, trotz Ausbildung von Sekundärstrukturen,⁹³ Seitenkettenglycosylierung am Harz möglich ist.

Die Glycosylierung mit einem Decasaccharid vom komplexen Typ wurde ebenfalls demonstriert, wobei ein Sarcosin-haltiges Peptid eingesetzt wurde. Die Ausbeute betrug 8%.

Neben dem glycosylierten Produkt wird durch Ammoniak aus Aspartat ein Asparagin gebildet. Dieses Nebenprodukt stellt damit das unglycosylierte Referenzpeptid dar.

Die konvergente N-Typ Glycopeptidsynthese ist also ein Verfahren, daß in wenigen Syntheseschritten in der Lage ist, komplexe Glycopeptide darzustellen.

8 Summary

This work describes the synthesis of N-type glycopeptides via on-resin glycosylation with overall yields of 57% - 95%. The problem of aspartimide-formation, which is observed after side-chain-activation and thereby drastically reduces the yield of glycopeptides was solved by protection of the neighbouring C-terminal amino acid with a 2-hydroxy-4-methoxybenzyl-(Hmb)-group.

The synthesis of Hmb-protected amino acids for use in the Fmoc/*t*Bu-SPPS was up to now restricted to only a few of the standard amino acids without functional groups in the side chain. After substantial modifications in the published synthesis-pathway, it is now possible to synthesize the side chain functionalized amino acids. Yields are between 22% - 47%. These compounds carry only a N^α-Fmoc-protecting group. The phenol OH-group of the Hmb remained unprotected during the coupling-step.

The corresponding bis-N,O-Fmoc-derivatives were also synthesized by solid-phase synthesis, but with lower yields.

Alternative protecting-groups, whose Fmoc-derivatives are easier to obtain, cannot be used in Fmoc/*t*Bu-SPPS. Here, sterical hindrance leads to lower coupling-rates in the next coupling-step.

In further investigations, the coupling conditions for Hmb-protected amino acids were optimized, such that the N^α-Fmoc-protected Hmb-derivative can successfully be introduced in the peptide chain. The temporary formation of a seven-membered ring postulated by Albericio *et al.*⁷⁸ was confirmed in this context and its kinetics were also studied.

The activation for the glycosylation step were optimized by comparing different reagents and reaction-conditions, just as the deprotection of the orthogonal side-chain protecting groups at the glycosylation site.

The excess of amino sugars required for glycosylation (GlcNAc and N,N'-diacetylchitobiose) was successfully reduced to 1.5 molar.

The cleavage- and isolation-conditions were optimized by analysis of the synthesis-products. Thereby, the postsynthetic loss of sugar or the uncompleted deprotection of the Hmb-group can be excluded.

A great advantage of the glycosylation approach described in this work is that only a few glycosylated products are obtained. Pure products can be obtained comfortably and in a few steps by specific purification methods like affinity chromatography.

The glycosylation with two different types of sugar (GlcNAc and N,N'-diacetylchitobiose) was successful by using orthogonal side-chain protecting groups (Dmab- and Allyl-) for the two glycosylation sites. The synthesis of N-type glycopeptides by direct side chain glycosylation is therefore no longer limited to only one glycosylation site. As byproducts, the mono-glycosylated derivatives were obtained.

In this work it was also shown that successful on-resin glycosylation can even be applied to longer sequences regardless of any potential secondary structure.⁹³ The V3-Loop of the gp120 was selected as a representative example.

The glycosylation with a complex type deca-saccharide was also demonstrated. A sarcosine-containing peptide was utilized. The overall yield was 8%.

In addition to the glycosylated product an asparagine-containing byproduct was formed by ammonia. This byproduct is identical to the reference peptide.

It was proven that synthesis of N-type glycopeptides can be accomplished by direct side chain glycosylation.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeines

9.1.1 HPLC

Alle im Folgenden beschriebenen Aufreinigungen, bzw. Auftrennungen von Rohproduktgemischen über HPLC wurden an RP-, bzw. RP-analogen Phasen an einer *Biocad Sprint*-HPLC-Anlage der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Als stationäre RP-Phasen wurden in analytischem Maßstab eine *VP 250/4.6mm NUCLEOSIL 100-5µm C18*-Säule (Flußrate 0.8 ml) und im präparativem Maßstab eine *VP 250/21mm NUCLEOSIL 100-7µm C18*-Säule (Flußrate 20 ml) der Firma *Macherey & Nagel* eingesetzt. Als RP-analoge Phase diente eine semipräparative *218TP510*-Säule (1.0 x 25 cm, 5 µm) der Firma *Vydac* (Flußrate 5 ml). Als mobile Phase wurden wie angegeben Gradienten zwischen Eluent A (95% Wasser / 5% MeCN / 0.1 % TFA) und Eluent B (95% MeCN / 5% Wasser / 0.1 % TFA), bzw. Eluent C (95% Wasser / 5% MeCN) und Eluent D (95% MeCN / 5% Wasser) eingestellt. Die Laufmittel sind filtriert, im Ultraschallbad vorentgast und von HPLC grade. Das verwendete Wasser wird über eine *USF Purelab Plus* gereinigt und in reinsten Qualität eingesetzt. Die Proben wurden stets in maximal 1 ml des verwendeten Eluentengemisches, in gleichem Verhältnis wie der eingestellte Gradient bei der Injektion, gelöst. Ungelöste Rückstände wurden abzentrifugiert, so daß stets klare Lösungen injiziert wurden. Die gewonnenen Fraktionen wurden im Anschluß gefriergetrocknet.

9.1.2 MALDI-TOF-MS

Die Aufnahme der MALDI-TOF-Spektren erfolgte an einem *Biflex III* Spektrometer der Firma *Bruker* im *reflector mode*. Die Proben wurden in einer 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) -, oder α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CCA) - Matrix mit einer Konzentration von 10 pmol/µl vermessen.

9.1.3 ESI-MS

Einige Massen von in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen wurden an einem ESI Massenspektrometer *5989B* der Firma *Hewlett-Packard* bestimmt, das mit einem ESI Interface *59987A* ausgestattet war.

9.1.4 NMR

Die eindimensionalen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem *Bruker AMX400*-Spektrometer bei 300K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der NMR-Spektren sind in Einheiten der δ -Skala angegeben, als interner Standard diente hierbei, wie bei Messungen in organischen Lösungsmitteln allgemein üblich, Tetramethylsilan ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm). Zur Kennzeichnung der Multiplizitäten der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten J sind, wenn nicht anders angegeben ^3J -Kopplungen und in Hertz angegeben. Die Indices kennzeichnen die jeweils miteinander koppelnden Wasserstoffatome. Alle höherdimensionalen Protonen-NMR-Spektren wurden an einem *DRX500* Spektrometer der Firma *Bruker* bei 300K in einem *TXI* ^1H - ^{13}C / ^{15}N -D-Probenkopf für 5 mm NMR-Röhrchen aufgenommen. Die Peptid- und Glycopeptid-Proben wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 bei einem pH-Wert von 3-4 (TFA) vermessen. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte auf das Lösungsmittelsignal. Die so aufgenommenen Daten wurden an einer *Silicon Graphics Workstation (O₂)* unter Zuhilfenahme der *Xwinnmr* Software Version 2.0 von *Bruker* prozessiert und bearbeitet. Die sequentielle Zuordnung der Spinsysteme gelang mit Hilfe der NOESY- oder ROESY-Experimente. Die chemischen Verschiebungen wurden den TOCSY-Experimenten entnommen.

9.1.5 Weitere chromatographische Methoden

Alle dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden an Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie (*Merck, GF₂₅₄*) durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Abhängigkeit der Reaktionspartner durch UV-Absorption, Eintauchen in eine ethanolisch/wässrige Lösung von Schwefelsäure (10%ig) oder eine ethanolische Lösung von Ninhydrin und anschließender Wärmebehandlung mit einem Heißluftfön.

Säulenchromatographische Aufreinigungen von Rohprodukten an Kieselgel wurden in präparativem Maßstab unter leicht erhöhtem Druck (150-600 kPa) an Kieselgel 60, Korngröße 40 μm – 63 μm der Firma *Merck* durchgeführt. Es wurden ausschließlich destillierte Laufmittel verwendet.

Die affinitätschromatographische Isolierung der mit Chitobiose monoglycosylierten V3-Loop wurde an einer *Wheat Germ Agglutinin (WGA)*-Säule durchgeführt. 70

mg/10 ml Lectin lagen agarosegebunden vor (MW=36000). Die Kapazität der Säule betrug 1.94 μmol Chitobiose. Das Rohproduktgemisch wurde in einer 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ und 0.15 M NaCl –Lösung (pH 7.5) gelöst und mit selber Lösung auf die Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit einer 500 mM GlcNAc-Pufferlösung. Es wurde an einer *Biosys 2000* Anlage von der Firma *Beckmann* gearbeitet. Die Flußrate betrug 0.2 ml/min.

Die an die affinitätschromatographische Isolierung der glycosylierten V3-Loop anschließende Entsalzung und Trennung vom Eluenten GlcNAc wurde an einer *G10-Sephadex* Entsalzungssäule durchgeführt. Die Säule (25 mm x 130 mm, 64 ml Volumen) war mit einer Packung der Firma *Supelco* gefüllt und hatte einen Trennbereich von > 700 D. Es handelt sich um hydrophiles Dextran, quervernetzt mit Epichlorhydrin. Die Partikelgröße beträgt 55 – 166 μm . Es wurde bei einer Flußrate von 2 und 0.5 ml/min gearbeitet, der Eluent ist reinst Wasser.

9.1.6 Verschiedenes

Teilweise wurden für die Synthesen absolutierte Lösungsmittel eingesetzt. Diese wurden unter Stickstoffatmosphäre und über frisch ausgeheizten Molsieb der Größe 4Å aufbewahrt und gehandhabt.

Die Schmelzpunkte wurden an einem *apotec[®] ST* – Schmelzpunktgerät gemessen. Die Drehwerte wurden an einem *Perkin Elmer Polarimeter 341* bestimmt (Natrium-D-Linie: $\gamma = 589 \text{ nm}$).

Die photometrischen Untersuchungen wurden an einem UV-160A – Photometer der Firma *Shimadzu* vorgenommen.

Alle angegebenen Lösungsmittelverhältnisse sind Volumenverhältnisse.

Unter *capping* wird im Folgenden die Acetylierung freier funktioneller Gruppen verstanden.

Die Abkürzung Fmoc-AS(X)-OH steht für eine α -N-Fmoc- und an ihrer Seitenkette X-geschützten, α -Carboxyl-freien Aminosäure.

Wasser ist von mindestens deionisierter Qualität.

Die Lösungsmittel sind, wenn nicht anders angegeben, von destillierter Qualität.

Die angegebenen Massen sind in Bezug auf die Isotopenverteilung Durchschnittswerte (*average mass*).

Als Harz wird in allen Festphasenpeptidsynthesen dieser Arbeit, sowohl nach manueller, als auch nach automatisierter Methode das *PAL-PEG-PS* der Firma *PerseptiveBiosystems* eingesetzt.

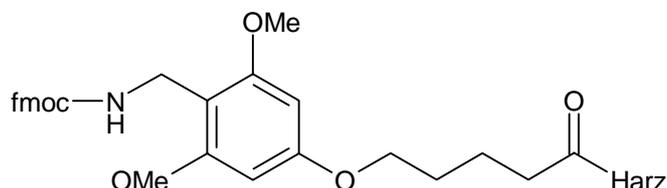


Abbildung 52: 5-(4-N-Fmoc-aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)valeryl- (PAL-) Linker am Harz (PEG-PS).

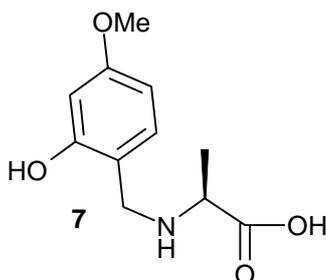
9.2 Darstellung der Aminosäurederivate

9.2.1 Darstellung von N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin (7)

L-Alanin (446 mg, 5 mmol) wird unter Rühren in 5 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung beträgt 6. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (846 mg, 5.5 mmol) wird in 5 ml Ethanol gelöst (Verfärbung nach gelb) und der wäßrigen Reaktionslösung zugesetzt. Die Lösung wird nun für ca. 30 min bei RT gerührt. Natriumcyanoborhydrid (3.2 g, 50.9 mmol) wird in 3 ml Wasser gelöst und über 15 min tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Währenddessen wird der pH-Wert der Lösung überwacht und durch Zugabe von 1 M Salzsäure auf pH 6 bis 6.5 schwach sauer gehalten. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 10 min in einem ca. 60°C warmen Wasserbad gerührt. Es wird eine mittelstarke Blasenbildung beobachtet, die Lösung entfärbt sich annähernd vollständig. Das im Anschluß langsam auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wird mit konz. Salzsäure auf pH 3 bis 4 angesäuert und über Nacht bei ca. 8°C in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird über eine Saugflasche abgenutscht (Porengröße 3) und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Das Filtrat wird gefriergetrocknet, um es dann unter Erwärmen in einem Wasserbad auf 60°C in wenig Wasser wiederaufzunehmen. Nach Ansäuern auf pH 2 bis 3 kommt es bei Abkühlen auf Raumtemperatur zum Auskristallisieren des gewünschten Produktes. Nach Stehenlassen der Mutterlauge über 3 d bei ca. 8°C im Kühlschrank wurde der weiß-kristalline Feststoff über eine Saugflasche abgenutscht, mit eiskaltem Wasser und

eiskaltem Wasser/Ethanol 1:1 – Gemisch gewaschen und über Nacht bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

Ausbeute: 512 mg (2.27 mmol) N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin (7), entsprechend 45% bezogen auf L-Alanin.



Schmelzpunkt.: > 300°C (Lit: > 300°C).⁵²

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/Triethylamin 1:1:0.1) = 0.49

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz):

δ = 7.12 (d, J_{Ar6,Ar5} 8.65 Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.45 (dd, J_{Ar5,Ar6} 8.14 Hz, J_{Ar5,Ar3} 2.55 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 6.42 (d, J_{Ar3,Ar5} 2.55 Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 3.65 (d, J_{CH₂,NH} 13.22 Hz, 2H, Hmb-CH₂), 3.68 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 3.53 (q, J_{Ch^α, Ch^β} 7.63 Hz, 1H, Ala-CH^α), 1.35 (d, J_{Ch^β,Ch^α} 7.63, 3H, Ala-CH^β).

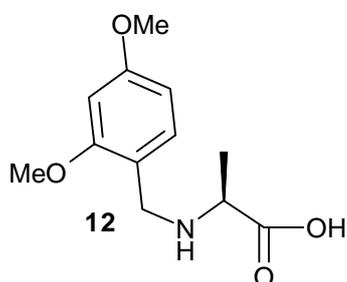
C₁₁H₁₅NO₄ (225.25 g/mol)

9.2.2 Darstellung von N^α-(2,4-Dimethoxybenzyl)-L-alanin (12)

L-Alanin (891 mg, 10 mmol) wird unter Rühren in 10 ml Wasser gelöst. 2,4-Dimethoxybenzaldehyd (1.7 g, 10 mmol) wird in 15 ml Ethanol gelöst und der wäßrigen Reaktionslösung zugesetzt. Die Lösung erfährt eine milchig weiße Trübung. Sie wird nun für ca. 30 min bei RT gerührt. Der pH-Wert der Lösung beträgt 6. Natriumcyanoborhydrid (1.27 g, 20.2 mmol) wird in 10 ml Wasser gelöst und über 15 min tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Währenddessen wird der pH-Wert der Lösung überwacht und durch Zugabe von 1 M Salzsäure auf pH 6 bis 6.5 schwach sauer gehalten. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 10 min in einem ca. 60°C warmen Wasserbad gerührt. Das im Anschluß langsam auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wird mit konz. Salzsäure auf pH 3 angesäuert und über Nacht bei ca. 8°C in den Kühlschrank gestellt. Da kein Feststoff ausgefallen

ist, wird das Gemisch an einer Oelpumpe gefriergetrocknet, um es dann unter Erwärmen in einem Wasserbad auf 60°C in wenig Wasser wiederaufzunehmen. Nach Ansäuern auf pH 3 kommt es bei Abkühlen auf Raumtemperatur zum Auskristallisieren des gewünschten Produktes. Nach Stehenlassen der Mutterlauge über 3 d bei ca. 8°C im Kühlschrank wird der weiß-kristalline Feststoff über eine Saugflasche abgenutscht, mit eiskaltem Wasser und eiskaltem Wasser/Ethanol 1:1 – Gemisch gewaschen und über Nacht bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

Ausbeute: 478.7 mg (2 mmol) N^α-(2,4-Dimethoxybenzyl)-L-alanin (**12**), entsprechend 20% bezogen auf L-Alanin.



Schmelzpunkt.: > 300°C.

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/Triethylamin 1:1:0.1) = 0.55

¹H-NMR (D₂O + NaOD, 400 MHz):

δ = 7.31 (d, J_{Ar6,Ar5} 7.88 Hz, 1H, Dmb-Ar-6H), 6.70 (m, 2 H, Dmb-Ar-3H, 5H), 3.71 (dd, J_{CH₂,NH} 12.92 Hz, 2H, Dmb-CH₂), 3.95 (s, 3H, Dmb-Ar-C2-OCH₃), 3.95 (s, 3H, Dmb-Ar-C4-OCH₃), 3.25 (q, J_{CH^α,CH^β} 6.94 Hz, 1H, Ala-CH^α), 1.35 (d, J_{CH^β,CH^α} 6.94, 3H, Ala-CH₃^β).

¹³C-NMR (MeOD, 100 MHz):

δ = 133 (Dmb-Ar-tertiär), 106 (Dmb-Ar-tertiär), 99 (Dmb-Ar-tertiär), 58 (Ala-CH^α), 56 (Dmb-OCH₃), 55 (Dmb-OCH₃), 46 (Dmb-CH₂), 16 (Ala-CH₃^β).

C₁₂H₁₇NO₄ (239.27 g/mol)

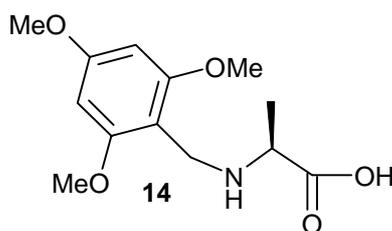
9.2.3 Darstellung von N^α-(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-L-alanin (**14**)

L-Alanin (456 mg, 5.16 mmol) wird unter Rühren in 7.5 ml Wasser gelöst. 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (993 mg, 5.05 mmol) wird unter Rühren und leichter

Erwärmung in 10 ml Ethanol gelöst und der wäßrigen Reaktionslösung zugesetzt. Sie wird nun für ca. 30 min in einem Wasserbad bei ca. 40°C gerührt.

Die weitere Durchführung entspricht der Vorschrift 9.2.2. Einwaage: Natriumcyanoborhydrid (640 mg, 10.1 mmol).

Ausbeute: 85.1 mg (0.32 mmol) N^α-(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-L-alanin (**14**), entsprechend 6% bezogen auf L-Alanin.



Schmelzpunkt.: > 300°C.

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/Triethylamin 1:1:0.1) = 0.61

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz):

δ = 6.15 (s, 2H, Tmb-Ar-H), 4.08 (d, J_{CH₂,NH} 2.52 Hz, 2H, Tmb-CH₂), 3.76 (s, 6H, Tmb-Ar-C2-OCH₃, Tmb-Ar-C6-OCH₃), 3.71 (s, 3H, Tmb-Ar-C4-OCH₃), 3.35 (q, J_{CH^α,CH^β} 6.94 Hz, 1H, Ala-CH^α), 1.35 (d, J_{CH^β,CH^α} 6.94, 3H, Ala-CH^β).

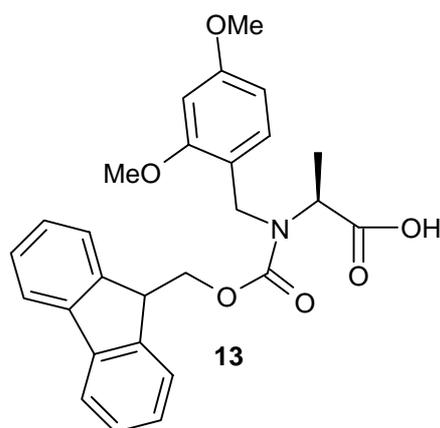
C₁₃H₁₉NO₅ (269.30 g/mol)

9.2.4 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2,4-dimethoxybenzyl)-L-alanin (**13**)

N^α-(2,4-Dimethoxybenzyl)-L-alanin (479 mg, 2 mmol) wird in einem Gemisch bestehend aus 12 ml 10%iger w/v Natriumcarbonat-Lösung und 6 ml Dioxan unter starkem Rühren gelöst und vorgelegt. Der pH-Wert der Lösung beträgt 8. Fmoc-Cl (1.04 g, 4 mmol) wird in ca. 3 ml Dioxan gelöst und der nun in einem Eisbad gekühlten Vorlage über ca. eine Stunde tropfenweise zugesetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht gerührt. Währenddessen fällt ein weißer Feststoff aus. Das Reaktionsgemisch wird gefriergetrocknet, um es dann in wenig Wasser wiederaufzunehmen. Diese Lösung wird dreifach gegen Diethylether ausgeschüttelt. Die etherischen Phasen werden vereint und mit einer 0.5 M Salzsäure gewaschen,

um sie dann über Natriumsulfat zu trocknen und am Rotationsverdampfer zur Trockene einzuengen. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch, unter Verwendung einer 50fachen Menge an Kieselgel aufgereinigt. Das benutzte Laufmittel ist Chloroform, dann Chloroform/MeOH 9:1 und schließlich MeOH.

Ausbeute: 377.1 mg (0.817 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2,4-dimethoxybenzyl)-L-alanin (**13**), entsprechend 41% bezogen auf N^α-(2,4-Dimethoxybenzyl)-L-alanin (**12**).



Schmelzpunkt.: 140°C

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH 9:1) = 0.45

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ = 7.98 (d, J_{Ar1,Ar2} = J_{Ar8,Ar7} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H/8H), 7.83-7.30 (m, 4H, Fmoc-Ar-2H/4H/5H/7H), 7.59 (dd, J_{Ar3,Ar4} = J_{Ar3,Ar2} = J_{Ar6,Ar5} = J_{Ar6,Ar7} = 7.12 Hz, 2H, Fmoc-Ar-3H/6H), 7.19 (m, 1H, Dmb-Ar-6H), 6.60 (m, 2H, Dmb-Ar-3H/5H), 4.50-4.81 (m, 5H, Fmoc-CH₂, Dmb-CH₂, Fmoc-CH), 4.39 (t, J_{CH^α,CH^β} 6.93 Hz, 1H, Ala-CH^α), 4.03 (s, 3H, Dmb-Ar-C2-OCH₃), 3.70 (s, 3H, Dmb-Ar-C4-OCH₃), 1.61 (d, J_{CH^β,CH^α} 6.93 Hz, 3H, Ala-CH^β).

¹³C-NMR (MeOD, 100 MHz):

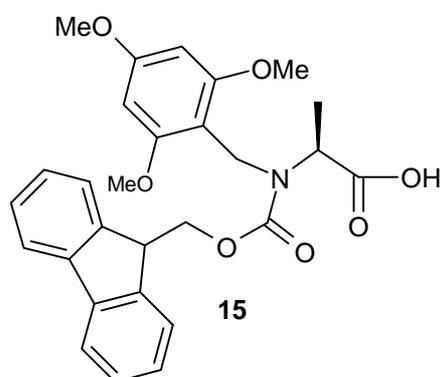
δ = 146 (2C, Fmoc-Ar-quartär), 143 (2C, Fmoc-Ar-quartär), 131 (Dmb-Ar-tertiär), 129 (Fmoc-Ar-tertiär), 128 (Fmoc-Ar-tertiär), 127 (Fmoc-Ar-tertiär), 122 (Fmoc-Ar-tertiär), 106 (Dmb-Ar-tertiär), 100 (Dmb-Ar-tertiär), 69 (Fmoc-CH₂), 56 (2C, Dmb-OCH₃), 49 (Ala-CH^α), 47 (Dmb-CH₂), 16 (Ala-CH₃^β).

C₂₇H₂₇NO₆ (461.52 g/mol)

9.2.5 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2,4,6-trimethoxybenzyl)-L-alanin (**15**)

Durchführung siehe Vorschrift 9.2.4. Einwaage: N^α-(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-L-alanin (676 mg, 2.5 mmol) in 8 ml 10%iger w/v Natriumcarbonat-Lösung und 3.5 ml Dioxan, Fmoc-Cl (1.63 g, 6.25 mmol) in ca. 2 ml Dioxan.

Ausbeute: 382.9 mg (0.78 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2,4,6-trimethoxybenzyl)-L-alanin (**15**), entsprechend 31% bezogen auf N^α-(2,4,6-Trimethoxybenzyl)-L-alanin (**14**).



Schmelzpunkt.: 142°C (Lit: 128°-137°C).⁵²

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/9:1) = 0.52

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz):

δ = 7.71 (d, J_{Ar1,Ar2} = J_{Ar8,Ar7} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H/8H), 7.60 (d, J_{Ar4,Ar3} = J_{Ar5,Ar6} = 7.12 Hz, 2H, Fmoc-Ar-4H/5H), 7.31 (dd, J_{Ar3,Ar4} = J_{Ar3,Ar2} = J_{Ar6,Ar5} = J_{Ar6,Ar7} = 7.12 Hz, 2H, Fmoc-Ar-3H/6H), 7.22 (dd, J_{Ar2,Ar3} = J_{Ar7,Ar6} = 7.12 Hz, J_{Ar2,Ar1} = J_{Ar7,Ar8} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-2H/7H), 6.06 (s, 2H, Tmb-Ar-H), 4.69-4.52 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.32-4.51 (m, 2H, Tmb-CH₂), 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH), 3.79-3.71 (m, 1H, Ala-CH_α), 3.76 (s, 3H, Tmb-Ar-C4-OCH₃), 3.70 (s, 6H, Tmb-Ar-C2-OCH₃, Tmb-Ar-C6-OCH₃), 1.39-1.21 (m, 3H, Ala-CH_β).

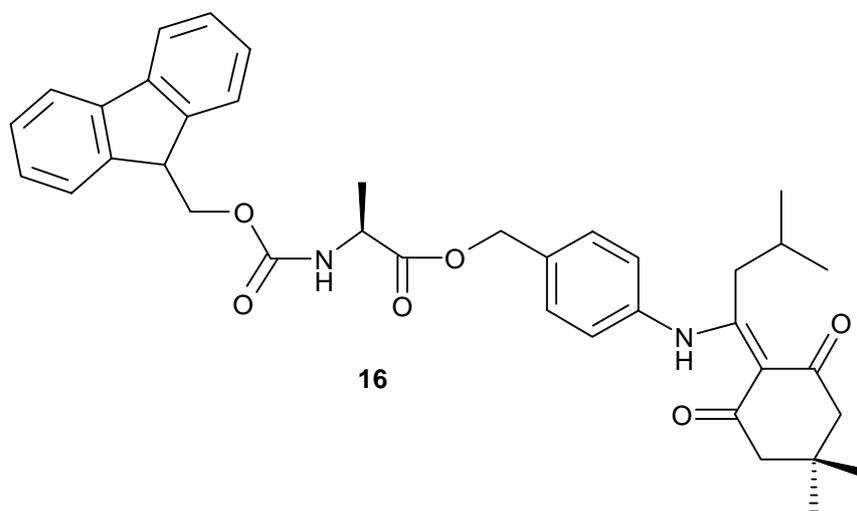
C₂₈H₂₉NO₇ (491.55 g/mol)

9.2.6 Versuch zur Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (**11**) über temporären Dmab-Schutz an der α-Carboxylfunktion

9.2.6.1 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-alanin-α-4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}-benzyl-ester (Fmoc-L-Ala-ODmab) (**16**)¹⁰⁸

Fmoc-L-Ala-OH (981 mg, 3.18 mmol), DCC (767 mg, 3.72 mmol), HOBT (509 mg, 3.32 mmol), DIPEA (1020 μl) und 4-[N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl)amino]benzylalkohol (Dmab-OH) (1g, 3 mmol) werden über 24 h bei RT gerührt. Der im Verlauf der Reaktion entstehende weiße, flockige Niederschlag wird über einen Papierfaltenfilter abfiltriert und gewaschen. Das Filtrat wird gemeinsam mit der Waschlösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und das so erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch, unter Verwendung einer 50fachen Menge an Kieselgel aufgereinigt. Das benutzte Laufmittel ist Chloroform.

Ausbeute: 1.73g (2.77 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-alanin-α-4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}-benzyl-ester (Fmoc-L-Ala-ODmab) (**16**), entsprechend 92% bezogen auf Dmab-OH.



DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH 9:1) = 0.86

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz):

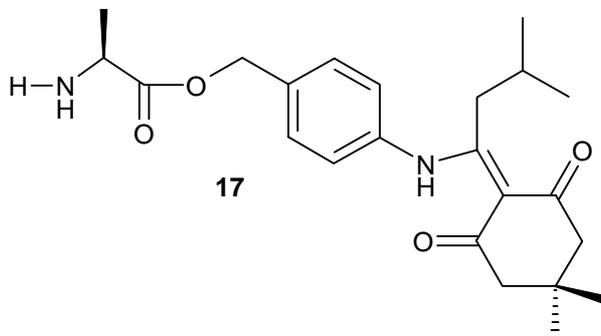
δ = 7.66 (d, J_{Ar1,Ar2} = J_{Ar8,Ar7} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H/8H), 7.49 (d, J_{Ar4,Ar3} = J_{Ar5,Ar6} = 7.12 Hz, 2H, Fmoc-Ar-4H/5H), 7.30 (dd, J_{Ar3,Ar4} = J_{Ar3,Ar2} = J_{Ar6,Ar5} = J_{Ar6,Ar7} = 7.12 Hz, 2H, Fmoc-Ar-3H/6H), 7.29 (d, 2H, Dmab-Ar-2H/6H), 7.20 (dd, J_{Ar2,Ar3} = J_{Ar7,Ar6} = 7.12 Hz, J_{Ar2,Ar1} = J_{Ar7,Ar8} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-2H/7H), 7.01 (d, J_{Ar3,Ar2} = J_{Ar5,Ar6} = 8.14 Hz, 2H, Dmab-Ar-3H/5H), 5.11 (s, 2H, Dmab-Ar-CH₂), 4.40-4.23 (m, 3H, Ala-CH_α, Fmoc-CH₂), 4.10 (t, J_{CH,CH2} 7.12 Hz, 1H, Fmoc-CH), 2.89 (m, 2H, Dmab-CH₂CH(CH₃)₂), 2.37 (s, 4H, -CH₂-C(CH₃)₂-CH₂-), 1.73 (m, J_{CH,CH2} = J_{CH,CH3} = 6.61 Hz, 1H, Dmab-CH₂CH(CH₃)₂), 1.34 (d, J_{CHβ,CHα} 7.12 Hz, 3H, Ala-CH_{3β}), 0.97 (s, 6H, -CH₂-C(CH₃)₂-CH₂-), 0.66 Hz (d, J_{CH3,CH} 6.61 Hz, 6H, -CH₂CH(CH₃)₂).

C₃₈H₄₂N₂O₆ (622.77 g/mol)

9.2.6.2 Darstellung von L-Alanin-α-4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)-3-methylbutyl]-amino}-benzyl-ester (17)

Fmoc-L-Alanin-ODmab (1.73 g, 2.77 mmol) wird unter Rühren in 40 ml Chloroform gelöst. Der dunkel gelben Lösung werden 10 ml Piperidin zugesetzt. Die Lösung verfärbt sich nach hell gelb. Der Reaktionsverlauf wird per DC überwacht und zeigt bereits nach 90 min einen vollständigen Umsatz des Eduktes. Das Reaktionsgemisch wird nun am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und dann mehrstündig im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in Chloroform wiederaufgenommen, der ungelöste Rückstand über einen Papierfaltenfilter abfiltriert und säulenchromatographisch, unter Verwendung einer 50fachen Menge an Kieselgel aufgereinigt. Das benutzte Laufmittel ist Chloroform, dann Chloroform/MeOH 30:1.

Ausbeute: 567.4 mg (1.42 mmol) L-Alanin- α -4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}-benzyl-ester (**17**), entsprechend 51% bezogen auf Fmoc-L-Alanin-ODmab (**16**).



DC: R_f -Wert (Chloroform/MeOH 9:1) = 0.38

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz):

δ = 7.34 (d, $J_{\text{Ar}2,\text{Ar}3} = J_{\text{Ar}6,\text{Ar}5} = 8.14$ Hz, 2H, Ar-2H/6H), 7.07 (d, $J_{\text{Ar}3,\text{Ar}2} = J_{\text{Ar}5,\text{Ar}6} = 8.65$ Hz, 2H, Ar-3H/5H), 5.11 (s, 2H, Ar- CH_2), 3.55 (q, $J_{\text{CH}\alpha,\text{CH}\beta} 6.61$ Hz, 1H, Ala- $\text{CH}\alpha$), 2.93 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}} 5.6$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.43 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-$), 2.32 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-$), 1.77 (m, $J_{\text{CH},\text{CH}_2} = J_{\text{CH},\text{CH}_3} = 6.61$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.31 (d, $J_{\text{CH}\beta,\text{CH}\alpha} 7.12$ Hz, 3H, Ala- $\text{CH}_3\beta$), 1.00 (s, 6H, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-$), 0.71 Hz (d, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}} 6.61$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ (400.52 g/mol)

9.2.6.3 Versuch zur Darstellung von N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin- α -4-{N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]-amino}-benzyl-ester

H-L-Ala-ODmab (576 mg, 1.42 mmol) wird in einer Lösung bestehend aus 3 ml Ethanol und 3 ml Wasser unter Rühren vollständig gelöst. Die Lösung ist von einer hell gelben Farbe. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (228 mg, 1.5 mmol) wird in fester Form zugegeben. Es wird über 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Natriumborhydrid (62 mg, 1.65 mmol) wird in 1.5 ml Wasser gelöst und dem Reaktionsgemisch über 10 min gleichmäßig zugetropft. Nach weiteren 15 min Rühren bei RT, wird das Gemisch über 10 min in einem 60°C warmen Wasserbad gerührt. Die Lösung ist nun farblos, es ist eine starke Blasenbildung zu beobachten.

Nach Abkühlen auf RT wird die Lösung mit konz. Salzsäure auf pH 3 eingestellt, das Lösungsmittelvolumen auf ca. die Hälfte eingengt und die Lösung dann über Nacht bei ca. 4°C in den Kühlschrank gestellt. Da kein Produkt ausgefallen oder über Nacht auskristallisiert ist, wird die Lösung gefriergetrocknet und der feste Rückstand, nach Lösen in Chloroform und Abfiltrieren aller ungelöster Bestandteile, säulenchromatographisch, unter Verwendung einer 50fachen Menge an Kieselgel aufgereinigt. Das benutzte Laufmittel ist Chloroform/MeOH 60:1, dann Chloroform/MeOH 30:1, 9:1.

Ausbeute: 122.1 mg (541.9 μmol) N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-alanin (**7**), entsprechend 38% bezogen auf L-Alanin- α -4-[N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)-3-methylbutyl]-amino]-benzyl-ester (**17**).

DC: R_f -Wert (Chloroform/MeOH/Triethylamin 1:1:0.1) = 0.49

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz):

δ = 7.12 (d, $J_{\text{Ar6,Ar5}}$ 8.65 Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.45 (dd, $J_{\text{Ar5,Ar6}}$ 8.14 Hz, $J_{\text{Ar5,Ar3}}$ 2.55 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 6.42 (d, $J_{\text{Ar3,Ar5}}$ 2.55 Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 3.655 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{NH}}$ 13.22 Hz, 2H, Hmb- CH_2), 3.68 (s, 3H, Hmb- OCH_3), 3.53 (q, $J_{\text{CH}^\alpha, \text{CH}^\beta}$ 7.63 Hz, 1H, Ala- CH^α), 1.35 (d, $J_{\text{CH}^\beta, \text{CH}^\alpha}$ 7.63, 3H, Ala- CH^β).

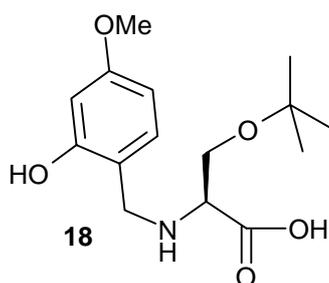
$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (225.25 g/mol)

9.2.7 Darstellung von N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin (**18**)

O^β -*tert*-Butyl-L-serin (1.64 g, 10.2 mmol) wird unter Rühren in 20 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung beträgt 5.6 und wird mit 2 M Natronlauge tropfenweise auf pH 9-9.5 eingestellt. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (1.55 g, 10.2 mmol) wird fest zugegeben und die Suspension über 2 h bei RT und konstantem pH-Wert gerührt. Das Reaktionsgemisch wird nun in einem mit Hilfe eines Kryostaten auf 5°C konstant gekühlten Ethanolbad gerührt. Natriumborhydrid (390 mg, 10.3 mmol) wird in 5 ml Wasser, das einige Tropfen einer 1 M Natronlauge enthält gelöst und über 15 min tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Es wird weitere 15 min bei RT gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für weitere 60 min bei 5°C gerührt. Es entfärbt sich langsam. Mit 2 M Salzsäure wird noch im Kühlbad auf pH 3

angesäuert. Es kommt zu einer starken Schaumbildung. Das Gemisch wird nun über Nacht bei ca. 8°C in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird über eine Saugflasche abgenutscht (Porengröße 3) und mit eiskaltem Wasser sehr ausgiebig gewaschen und im Anschluß über Nacht bei 65°C im Trockenschrank getrocknet.

Ausbeute: 1.68 g (5.65 mmol) N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**18**), entsprechend 55% bezogen auf O^β-*tert*-Butyl-L-serin.



Schmelzpunkt.: > 300°C (Lit.: >300°C)

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/Triethylamin 1:1:0.1) = 0.73

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz):

δ = 6.96 (d, J_{Ar6,Ar5} 8.14 Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.12 (d, J_{Ar3,Ar5} 2.55 Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 6.12 (dd, J_{Ar5,Ar6} 8.14 Hz, J_{Ar5,Ar3} 2.55 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 3.49 (d, J_{CH₂,NH} 13.22 Hz, 2H, Hmb-CH₂), 3.67 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 3.16 (t, J_{CH^α, JCH^β} 5.85 Hz, 1H, Ser-CH^α), 3.55 (m, 2H, Ser-CH^β), 1.1 (s, 9H, -CH₃ aus *t*Bu).

¹³C-NMR (D₂O, 400 MHz)

δ = 180.56 (Ser-α-Carbonyl), ca. 166 (Hmb-Ar-quartär), 159.81 (Hmb-Ar-quartär), 130.29 (Hmb-Ar-tertiär), 122.21 (Hmb-Ar-quartär), 104.49 (Hmb-Ar-tertiär), 100.06 (Hmb-Ar-tertiär), 75.02 (*t*Bu-quartär), 64.38 (Hmb-OCH₃), 63.79 (Ser-CH₂β), 55.57 (Ser-CH^α), 47.15 (Hmb-CH₂), 27 (Ser-*t*Bu).

C₁₅H₂₃NO₅ (297.35 g/mol)

9.2.8 Darstellung von N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-D,L-serin (**18**)

O^β-*tert*-Butyl-L-serin (1.64 g, 10.2 mmol) wird unter Rühren in 10 ml einer 1 M Kalilauge gelöst. Der pH-Wert der Lösung beträgt 13. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (1.55 g, 10.2 mmol) wird in 10.2 ml Ethanol gelöst (Verfärbung nach gelb) und der stark basischen Reaktionslösung zugesetzt. Die Lösung wird nun für ca. 30 min bei RT gerührt. Natriumborhydrid (390 mg, 10.3 mmol) wird in 5 ml Wasser, das einige Tropfen einer 1 M Natronlauge enthält gelöst und über 15 min tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Es wird weitere 15 min bei RT gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 10 min in einem ca. 60°C warmen Wasserbad gerührt. Es wird eine mittel starke Blasenbildung beobachtet, die Lösung entfärbt sich annähernd vollständig. Das im Anschluß langsam auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wird mit konz. Salzsäure, unter Kühlung in einem Eisbad auf pH 4 angesäuert und nach Reduzieren des Gesamtvolumens um ca. die Hälfte am Rotationsverdampfer über Nacht bei ca. 8°C in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird über eine Saugflasche abgenutscht (Porengröße 3) und mit wenig eiskaltem Wasser und eiskaltem Wasser/MeOH 1:1 – Gemisch gewaschen. Das feste Produkt wird über Nacht bei 65°C im Trockenschrank getrocknet und zur Aufreinigung mehrfach aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 2.2 g (7.41 mmol) N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-D,L-serin (**18**).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.7^{\circ}$ (c=1.0, 1 M Natronlauge) (Lit.: -7.1°)⁵²

9.2.9 Darstellung von N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**18**)

O^β-*tert*-Butyl-L-serin (1.64g, 10.2 mmol) wird unter Rühren in 10 ml Wasser gelöst. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (1.55g, 10.2 mmol) wird in 10 ml Ethanol gelöst (Verfärbung nach gelb) und der wäßrigen Reaktionslösung zugesetzt. Die Lösung wird nun für ca. 30 min bei RT gerührt. Natriumborhydrid (390 mg, 10.3 mmol) wird in 5 ml Wasser gelöst und über 15 min tropfenweise dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Währenddessen wird der pH-Wert der Lösung überwacht und durch

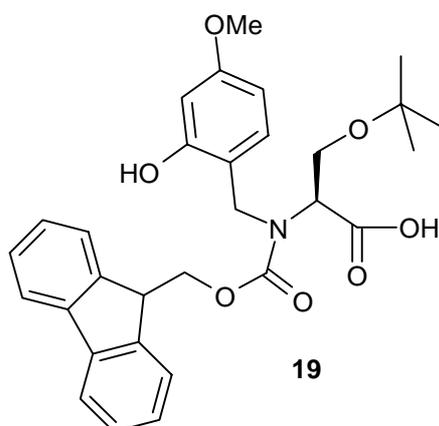
Zugabe von 1 M Salzsäure auf pH 6 bis 6.5 schwach sauer gehalten. Anschließend wird das Reaktionsgemisch über weitere 15 min bei RT und dann für 10 min in einem ca. 60°C warmen Wasserbad gerührt. Es wird eine mittel starke Schaumentwicklung beobachtet, die Lösung entfärbt sich vollständig. Das im Anschluß langsam auf Raumtemperatur abgekühlte Gemisch wird mit konz. Salzsäure auf pH 3 bis 4 angesäuert und über Nacht bei ca. 8°C in den Kühlschrank gestellt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird über eine Saugflasche abgenutscht (Porengröße 3) und mit wenig eiskaltem Wasser und eiskaltem Wasser/Ethanol 1:1 – Gemisch gewaschen und über Nacht bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

Ausbeute: 1.35 g (4.55 mmol) N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**18**), entsprechend 45% bezogen auf O^β-*tert*-Butyl-L-serin.

9.2.10 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**19**)

O^β-*tert*-Butyl-L-serin (806 mg, 5 mmol) wird unter Rühren in 50 ml MeOH gelöst. Es wird 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (761 mg, 5 mmol) in fester Form zugegeben und über 30 min bei RT gerührt. Ebenfalls in fester Form wird daraufhin Natriumcyanoborhydrid (314 mg, 5 mmol) zugesetzt und weitere 3.5 Stunden bei RT gerührt. Nun wird die Lösung am Rotationsverdampfer vollständig zur Trockene eingengt. Der gelbe, ölige Rückstand wird in 10 ml MeCN/Wasser 3:1 wiederaufgenommen. Es werden Triethylamin (2079 µl, 15 mmol) und Fmoc-ONSu (5 g, 14.82 mmol) zugegeben und das Gemisch über 120 min bei RT gerührt. Nach Einengen des Lösungsmittelvolumens auf ca. die Hälfte wird der wäßrige Rückstand gefriergetrocknet. Das feste Rohprodukt wird nun in wenig Chloroform wiederaufgenommen und nach Abfiltrieren ungelöster Rückstände säulenchromatographisch an einer 50fachen Menge Kieselgel aufgereinigt. Als Laufmittel wurde Chloroform, dann Chloroform/MeOH 30:1 verwendet

Ausbeute: 1.16 g (2.23 mmol), entsprechend 45% bezogen auf O^β-*tert*-Butyl-L-serin.



Schmelzpunkt.: 106-109°C.

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH 9:1) = 0.22

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ = 7.67 (d, J_{Ar1,Ar2} = J_{Ar8,Ar7} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H/8H), 7.47 (d, J_{Ar4,Ar3} = 7.12 Hz, 1H, Fmoc-Ar-4H), 7.44 (d, J_{Ar5,Ar6} = 6.61 Hz, 1H, Fmoc-Ar-5H), 7.34-7.21 (m, 4H, Fmoc-Ar-2H,3H,6H,7H), 6.86 (d, J_{Ar6,Ar5} = 8.14 Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.42 (d, J_{Ar3,Ar5} = 2.55 Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 6.28 (m, 1H, Hmb-Ar-5H), 4.64 (m, 1H, Fmoc-CH₂), 4.58 (m, 1H, Fmoc-CH₂), 4.44 (d, 1H, Hmb-CH₂), 4.23 (d, 1H, Hmb-CH₂), 4.14 (m, 1H, Fmoc-CH), 3.94 (m, 1H, Ser-CH_α), 3.68 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 3.40 (m, 1H, Ser-CH_{2β}), 3.06 (m, 1H, Ser-CH_{2β}), 0.96 (s, 9H, CH₃ aus *t*Bu).

¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 174.23 (Ser-α-Carbonyl), 161.21 (Fmoc-Carbonyl), 156.01 (Hmb-Ar-quartär), 143.37 (Fmoc-Ar-quartär), 141.18 (Fmoc-Ar-quartär), 132.72 (Hmb-Ar-tertiär), 127.50 (Fmoc-Ar-tertiär), 127.05 (Fmoc-Ar-tertiär), 124.41 (Fmoc-Ar-tertiär), 119.82 (Fmoc-Ar-tertiär), 105.82 (Hmb-Ar-tertiär), 102.49 (Hmb-Ar-tertiär), 77.07 (*t*Bu-quartär), 67.76 (Ser-CH_{2β}), 60.18 (Fmoc-CH₂), 59.99 (Hmb-OCH₃), 55.09 (Ser-CH_α), 49.28 (Hmb-CH₂), 46.88 (Fmoc-CH-tertiär), 27 (Ser-*t*Bu).

C₃₀H₃₃NO₇ (519.60 g/mol)

9.2.11 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**19**)

N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (1.87 g, 6.29 mmol) wird in 40 ml MeCN/Wasser 3:1 unter Rühren suspendiert. Es wird Triethylamin (2.6 ml, 18.86 mmol) zugesetzt, woraufhin die Suspension aufklart. Der gerührten Lösung wird Fmoc-ONSu (4.24 g, 12.57 mmol) in fester Form zugegeben und das Gemisch über 90 min bei RT gerührt. Es werden 200 ml einer 5%igen w/v Zitronensäure zugegeben und dreimal gegen 200 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen werden nach Trocknung über Natriumsulfat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt (5.81 g) wird in wenig Chloroform wiederaufgenommen und der ungelöste, weiße Rückstand über einen Papierfaltenfilter abfiltriert. Das so gelöste Rohprodukt wird säulenchromatographisch an einer 50fachen Menge Kieselgel aufgereinigt. Als Laufmittel wird Chloroform, dann 5% MeOH in Chloroform verwendet.

Ausbeute: 1.24 g (2.38 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**19**), entsprechend 38% bezogen auf N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**18**).

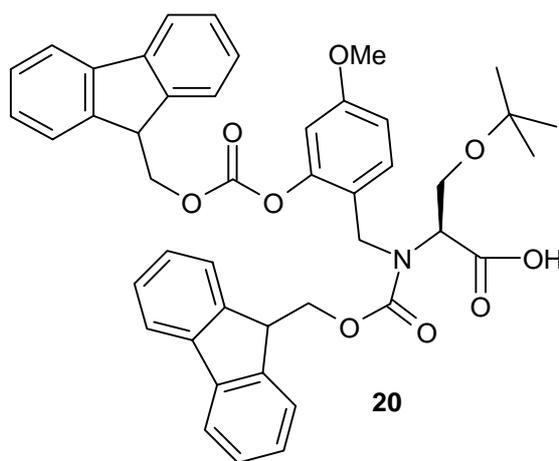
9.2.12 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**20**)

N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (2.2 g, 7.14 mmol) wird unter Zusatz von DIPEA (12.6 ml, 74.1 mmol) und Rühren in Chloroform gelöst. Es wird Fmoc-Cl (5.75 g, 22.23 mmol) in fester Form zugesetzt und die Reaktionslösung über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und das Rohprodukt (15.49 g) säulenchromatographisch, unter Verwendung einer 50fachen Menge an Kieselgel aufgereinigt. Das benutzte Laufmittel ist Chloroform, dann 4% MeOH in Chloroform.

Neben N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**20**) wurden eindeutig, per DC und ¹H-NMR

N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin (**19**) (51.4 mg, 98.9 μ mol) und N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin (**18**) (23.9 mg, 80.4 μ mol) als Nebenprodukte nachgewiesen.

Ausbeute: 43.5 mg (58.6 μ mol) N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]- O^β -*tert*-butyl-L-serin (**20**), entsprechend 1% bezogen auf N^α -(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin.



Schmelzpunkt.: 78°C (Lit.: 81-84°C)⁵²

DC: R_f -Wert (Chloroform/MeOH 9:1 = 0.87)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ = 7.81 (d, $J_{Ar1,Ar2} = J_{Ar8,Ar7} = 7.63$ Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H/8H), 7.73 (d, $J_{Ar1',Ar2'} = J_{Ar8',Ar7'} = 7.63$ Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H'/8H'), 7.63-7.54 (m, 4H, Fmoc-Ar-4H/4H'/5H/5H'), 7.47 (dd, $J_{Ar3,Ar2} = J_{Ar3,Ar4} = J_{Ar6,Ar5} = J_{Ar6,Ar7} = 7.12$ Hz, 4H, Fmoc-Ar-3H,3H',6H,6H'), 7.40-7.34 (m, 4H, Fmoc-Ar-2H/2H'/7H/7H'), 7.00 (d, $J_{Ar6,Ar5} = 8.65$ Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.55 (d, $J_{Ar3,Ar5} = 2.03$ Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 6.42 (m, 1H, Hmb-Ar-5H), 4.81-4.66 (m, 4H, Fmoc-CH₂/-CH₂'), 4.58 (d, 1H, Hmb-CH₂), 4.38 (d, 1H, Hmb-CH₂), 4.27 (m, 2H, Fmoc-CH/-CH'), 4.09 (m, 1H, Ser-CH α), 3.81 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 3.55 (m, 1H, Ser-CH₂ β), 3.21 (m, 1H, Ser-CH₂ β), 1.18 (s, 9H, CH₃ aus *t*Bu).

¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz)

δ = 169 (Ser- α -Carbonyl), 161.68 (Fmoc-Carbonyl), 157.74 (Hmb-Ar-quartär), 144.17 (Fmoc-Ar-quartär), 144.06 (Hmb-Ar-quartär), 141.76 (Fmoc-Ar-quartär), 128.23 (Fmoc-Ar-tertiär), 127.63 (Fmoc-Ar-tertiär), 125.22 (Fmoc-Ar-tertiär), 120.53 (Fmoc-Ar-tertiär), 115.42 (Hmb-Ar-quartär), 106.45 (Hmb-Ar-tertiär), 103.08 (Hmb-Ar-

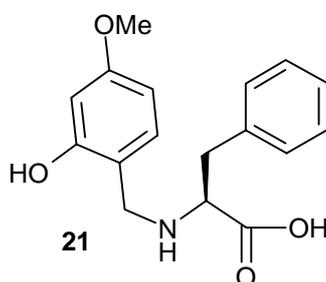
tertiär), 68.53 (Fmoc-CH₂), 67.52 (Ser-CH₂β), 61.04 (Hmb-OCH₃), 60.65 (Hmb-CH₂), 55.62 (Ser-CH_α), 27.67 (Ser-tBu).

C₄₅H₄₃NO₉ (741.85 g/mol)

9.2.13 Darstellung von N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (**21**)

Durchführung siehe Vorschrift 9.2.9. Einwaage: L-Phenylalanin (1.65 g, 10 mmol) in 10 ml Wasser, 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (1.52 g, 10 mmol) in 10 ml Ethanol und Natriumborhydrid (416.2 mg, 11 mmol) in 5 ml Wasser.

Ausbeute: 1.61 g (5.35 mmol) N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (**21**), entsprechend 54% bezogen auf L-Phenylalanin.



Schmelzpunkt.: > 300°C (Lit.: >300°C)⁵²

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/Triethylamin 1:1:0.1) = 0.76

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz):

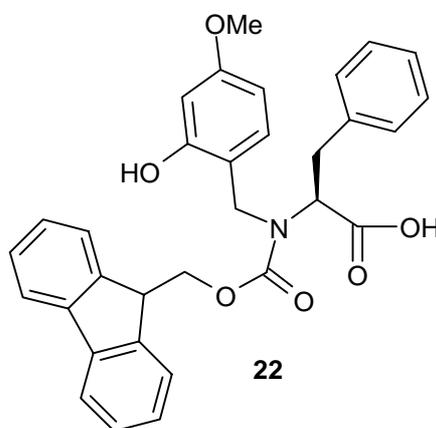
δ = 7.15 (m, 5H, Phe-Ar), 6.79 (d, J_{Ar6,Ar5} 8.14 Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.12 (d, J_{Ar3,Ar5} 2.54 Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 5.99 (dd, J_{Ar5,Ar6} 8.14 Hz, J_{Ar5,Ar3} 2.54 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 3.59 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 3.52 (m, 1H, Phe-CH_α), 3.44 (d, J_{CH2,NH} 13.23 Hz, 2H, Hmb-CH₂), 2.75 (m, 2H, Phe-CH_β).

C₁₇H₁₉NO₄ (301.35 g/mol)

9.2.14 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (**22**)

Durchführung siehe Vorschrift 9.2.11. Einwaage: N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (1.61 g, 5.35 mmol) in 40 ml MeCN/Wasser 3:1, Triethylamin (2.23 ml, 16.05 mmol) und Fmoc-ONSu (3.61 g, 10.7 mmol) in fester Form.

Ausbeute: 1.13 g (2.17 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (**22**), entsprechend 41% bezogen auf N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin



Schmelzpunkt.: 125-127°C.

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH 9:1) = 0.24

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

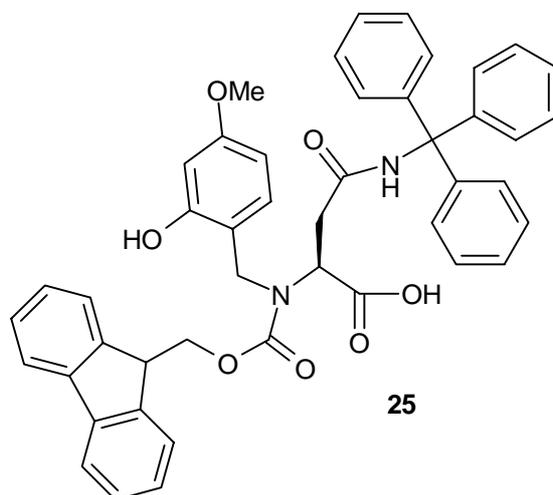
δ = 7.63 (d, J_{Ar1,Ar2} = J_{Ar8,Ar7} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H/8H), 7.52-6.99 (m, 11H, Fmoc-Ar-2H/3H/4H/5H/6H/7H, Phe-Ar), 6.58 (m, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.32 (s, 1H, Hmb-Ar-3H), 6.13 (d, J_{Ar5,Ar6} = 7.12 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 4.82 (d, J_{CH2,CH} = 7.63 Hz, 1H, Fmoc-CH₂), 4.41 (d, J_{CH2,CH} = 7.63 Hz, 1H, Fmoc-CH₂), 4.20 (d, 1H, Hmb-CH₂), 4.08 (s, 1H, Fmoc-CH), 3.88 (m, 1H, Phe-CH_α), 3.57 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 3.29 (d, 1H, Hmb-CH₂), 2.80 (d, 1H, Phe-CH_{2β}), 2.21 (d, 1H, Phe-CH_{2β}).

C₃₂H₂₉NO₆ (523.59 g/mol)

9.2.15 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-N^β-trityl-L-asparagin (**25**)

Durchführung siehe Vorschrift 9.2.10. Einwaagen: N^β-Trityl-L-asparagin (1.92 g, 5 mmol) in 50 ml MeOH, 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (761 mg, 5 mmol), Natriumcyanoborhydrid (314 mg, 5 mmol), Triethylamin (2079 μ l, 15 mmol) und Fmoc-ONSu (5 g, 14.82 mmol).

Ausbeute: 1.71 g (2.33 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-N^β-trityl-L-asparagin (**25**), entsprechend 47% bezogen auf N^β-Trityl-L-asparagin.



Schmelzpunkt.: 75-78°C.

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH 9:1) = 0.33

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

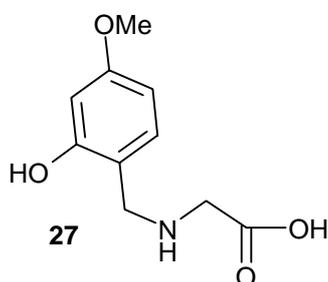
δ = 7.61 (d, J_{Ar1,Ar2} 7.12 Hz, 1H, Fmoc-Ar-1H), 7.54 (d, J_{Ar8,Ar7} 7.63 Hz, 1H, Fmoc-Ar-8H), 7.47-6.98 (m, 22H, Fmoc-Ar-2H/3H/4H/5H/6H, Ar-H aus trt), 6.92 (d, J_{Ar7,Ar8} 8.14 Hz, 1H, Fmoc-Ar-7H), 6.52 (m, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.29 (dd, J_{Ar5,Ar6} 8.14 Hz, J_{Ar5,Ar3} 2.03 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 6.02 (s, 1H, Hmb-Ar-3H), 5.13 (m, 1H, Fmoc-CH₂), 4.55 (m, 1H, Fmoc-CH₂), 4.32-4.12 (m, 3H, Hmb-CH₂, Asn-CH_α, Fmoc-CH), 3.74 (d, 1H, Hmb-CH₂), 3.74 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 2.17 (m, 1H, Asn-CH₂β), 1.49 (m, 1H, Asn-CH₂β).

C₄₆H₄₀N₂O₇ (732.84 g/mol)

9.2.16 Darstellung von N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-glycin (**27**)

Durchführung siehe Vorschrift 9.2.8. Einwaage: Glycin (774 mg, 10.31 mmol) in 10 ml einer 1 M Kalilauge, 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (1.57 g, 10.29 mmol) in 10.2 ml Ethanol und Natriumborhydrid (400 mg, 10.25 mmol) in 5 ml Wasser, das einige Tropfen einer 1 M Natronlauge enthält.

Ausbeute: 1.66 g (7.86 mmol) N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-glycin (**27**), entsprechend 76% bezogen auf Glycin.



Schmelzpunkt.: > 300°C.

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/Triethylamin 1:1:0.1) = 0.54

¹H-NMR (D₂O, 400 MHz):

δ = 7.12 (d, J_{Ar6,Ar5} 8.14 Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.30 (d, J_{Ar3,Ar5} 2.54 Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 6.25 (dd, J_{Ar5,Ar6} 8.14 Hz, J_{Ar5,Ar3} 2.54 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 3.82 (s, 3H, Hmb-OCH₃), 3.79 (d, J_{CH₂,NH} 2.54 Hz, 1H, Hmb-CH₂), 3.71 (s, 1H, Hmb-CH₂), 3.64 (s, 1H, Gly-CH₂), 3.25 (s, 1H, Gly-CH₂).

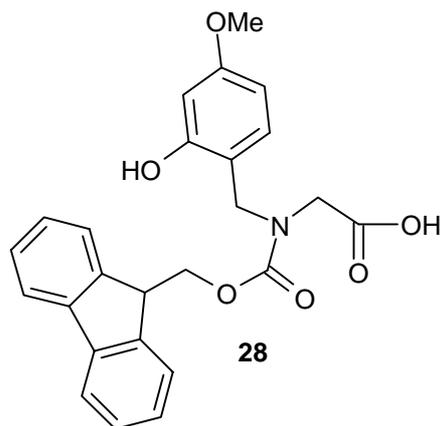
C₁₀H₁₃NO₄ (211.22 g/mol)

9.2.17 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-glycin (**28**)

Durchführung siehe Vorschrift 9.2.11. Einwaage: N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-Glycin (1.66 g, 7.86 mmol) in 40 ml MeCN/Wasser 3:1, Triethylamin (3.27 ml, 23.56 mmol) und Fmoc-ONSu (5 g, 14.82 mmol) in fester Form.

Bei Wiederaufnahme des Rohproduktes vor der säulenchromatographischen Aufreinigung kommt es aufgrund eines Kolbenbruches zu einem Rohproduktverlust von abgeschätzten 30%.

Ausbeute: 1.35 g (3.1 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-glycin (**28**), entsprechend 40% bezogen auf N^α-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-Glycin (**27**).



Schmelzpunkt.: 105-107°C.

DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH 9:1 = 0.26

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ = 7.62 (d, J_{Ar1,Ar2} = J_{Ar8,Ar7} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-1H/8H), 7.41 (d, J_{Ar4,Ar3} = J_{Ar5,Ar6} = 7.12 Hz, 2H, Fmoc-Ar-4H/5H), 7.25 (dd, J_{Ar3,Ar4} = J_{Ar6,Ar5} = J_{Ar3,Ar2} = J_{Ar6,Ar7} = 7.12 Hz, 2H, Fmoc-Ar-3H/6H), 7.16 (dd, J_{Ar2,Ar3} = J_{Ar7,Ar6} = 7.12 Hz, J_{Ar2,Ar1} = J_{Ar7,Ar8} = 7.63 Hz, 2H, Fmoc-Ar-2H/7H), 6.84 (d, J_{Ar6,Ar5} = 8.14 Hz, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.44 (s, 1H, Hmb-Ar-3H), 6.29 (dd, J_{Ar5,Ar6} = 6.62 Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 4.42 (d, J_{CH2,CH} = 6.1 Hz, 2H, Fmoc-CH₂), 4.28 (s, 2H, Hmb-CH₂), 4.10 (t, J_{CH,CH2} = 6.1 Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.81 (s, 2H, Gly-CH₂), 3.66 (s, 3H, Hmb-OCH₃).

C₂₅H₂₃NO₆ (433.47 g/mol)

9.2.18 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (11) an der Festphase

9.2.18.1 Verknüpfung des HMPB-Linkers an ein PEG/PS-Harz¹⁰⁹

Das Ausgangsharz PEG-PS X HCl (5.26 g, 1 mmol bei einer Belegung von 0.19 mmol/g) wird mit einer Lösung von 10% DIPEA in DMF bedeckt und 30 min zum Quellen in einer Glasfritte stengelassen. Nach mehrmaligem Waschen mit DMF wird das Harz mit einer Reaktionslösung bestehend aus 4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)-butansäure (481 mg, 2 mmol), HATU (761 mg, 2 mmol) und DIPEA (698 μ l, 4.1 mmol) in 18 ml DMF bedeckt und über Nacht schwach geschüttelt. Anschließend wird die Reaktionslösung abgenutscht und das Harz mit DMF, dann MeOH gewaschen bis der Überstand klar ist.

Zur Überprüfung der Reaktionsvollständigkeit wird das Harz per Kaiser-Test auf mögliche freie Amino-Gruppen überprüft. Der anschließende Kaiser-Test ist negativ, d.h. die Kupplung war vollständig.

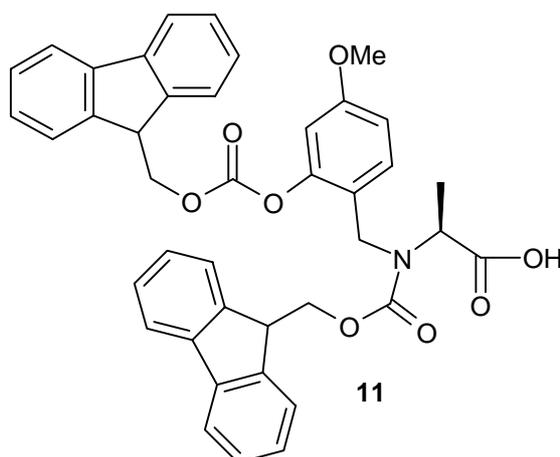
9.2.18.2 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (11) an HMPB-PEG-PS

Das Harz (HMPB-PEG-PS, 5.26 g, 1 mmol) wird mit DMF bedeckt und für 20 min zum Quellen stengelassen. Fmoc-L-Ala-OH (934 mg, 3 mmol), DMAP (61 mg, 0.5 mmol) und DICDI (779 μ l, 5 mmol) werden in wenig DMF gelöst und auf das Harz gegeben. Nach 80 min am Schüttler wird ein gleicher Ansatz über 90 min geschüttelt und das Harz dann im Anschluß mit DMF gewaschen. Mit einer 20%igen Piperidin/DMF-Lösung wird das Harz über 5 und dann 10 min bedeckt. Die Menge der auf diese Weise abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen und damit die tatsächliche Harzbelegung wird durch Messung der UV-Absorption des in der Abspaltung gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) am Photometer ermittelt. Anschließend wird das Harz ausgiebig mit DMF gewaschen. 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (304 mg, 2 mmol) wird in 20 ml DMF gelöst, auf das Harz gegeben und 30 min geschüttelt. Nach Waschen des Harzes mit DMF wird das Harz mit einer Lösung bestehend aus Natriumcyanoborhydrid (628 mg, 10 mmol) in 25% MeOH/DMF bedeckt und für weitere 60 min geschüttelt. Nach Waschen mit DMF, MeOH und DCM wird zweimal je 20 ml einer Dichlormethanolösung von Fmoc-Cl

(1.03 g, 4 mmol) auf das Harz gegeben und jeweils 60 min geschüttelt. Nach ausgiebigem Waschen mit DCM wird das Harz zweimal mit einer Abspaltlösung bestehend aus jeweils 1% TFA in DCM bedeckt und über 90 und dann 60 min an den Schüttler gehängt. Die Abspaltlösungen werden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch, unter Verwendung einer 50fachen Menge an Kieselgel aufgereinigt. Das benutzte Laufmittel ist 5% MeOH in Chloroform.

Harzbelegung (gemäß Fmoc-Grp.-Abspaltung): L-Alanin 377.4 μmol , entsprechend 38% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Ausbeute: 38.7 mg (57.8 μmol) N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -[2-(fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-4-methoxy-benzyl]-L-alanin (**11**), entsprechend 15% bezogen auf die Harzbelegung.



Schmelzpunkt.: 92°C (Lit.: 86-88°C)

DC: R_f -Wert (Chloroform/MeOH/9:1) = 0.58

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz):

δ = 7.63 (d, $J_{\text{Ar1,Ar2}} = J_{\text{Ar8,Ar7}} = 7.62$ Hz, 4H, Fmoc-Ar-1H/1H'/8H/8H'), 7.46 (m, 4H, Fmoc-Ar-4H/4H'/5H/5H'), 7.30-7.15 (m, 8H, Fmoc-Ar-2H/2H'/3H/3H'/6H/6H'/7H/7H'), 6.51 (s, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.41 (dd, $J_{\text{Ar5,Ar6}} = 8.65$ Hz, $J_{\text{Ar5,Ar3}} = 2.54$ Hz, 1H, Hmb-Ar-5H), 6.31 (d, $J_{\text{Ar3,Ar5}} = 2.03$ Hz, 1H, Hmb-Ar-3H), 4.33-4.22 (m, 5H, Fmoc- CH_2 , $-\text{CH}_2'$, Ala- $\text{CH}\alpha$), 4.09 (t, $J_{\text{CH,CH2}} = 6.61$ Hz, 2H, Fmoc-CH, $-\text{CH}'$), 3.74 (d, 2H, Hmb- CH_2), 3.72 (s, 3H, Hmb- OCH_3), 1.35 (d, $J_{\text{CH}\beta,\text{CH}\alpha} = 8.12$ Hz, 3H, Ala- $\text{CH}\beta$).

$\text{C}_{41}\text{H}_{35}\text{NO}_8$ (669.74 g/mol)

9.2.19 Untersuchung zur Bildung von 4,5-Dihydro-8-methoxy-1,4-benzoxazepin-2(3H)-on

Maldi-Experimente

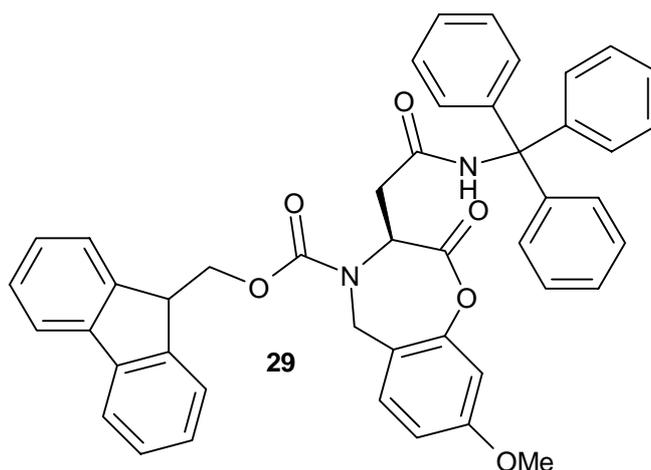
Unter Aktivierung mit HATU:

N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- N^β -trityl-L-asparagin (**25**) (4 mg, 5 μ mol), HATU (2 mg, 5 μ mol) und DIPEA (1 μ l, 5 μ mol) werden in 200 μ l DCM gelöst. Es werden nach 2, 5 und 10 min Reaktionszeit Proben entnommen und per Maldi-TOF-MS analysiert.

Unter Aktivierung mit TBTU:

N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- N^β -trityl-L-asparagin (**25**) (4 mg, 5 μ mol), TBTU (2 mg, 5 μ mol), HOBT (1 mg, 5 μ mol) und DIPEA (1 μ l, 5 μ mol) werden in 200 μ l DCM gelöst. Es werden nach 2, 5 und 10 min Reaktionszeit Proben entnommen und per Maldi-TOF-MS analysiert.

In keiner der Proben wird das Edukt N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- N^β -trityl-L-asparagin (**25**) identifiziert, sondern ausschließlich ein zum 7-Ring zyklisierte Intermediat **29**.



Maldi-TOF (m/z) = $[M+Na]^+$ 737.55, $[M+K]^+$ 753.51

$C_{46}H_{38}N_2O_6$ (714.83 g/mol)

N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)- N^β -trityl-L-asparagin (Edukt) (25)

(Maldi-TOF (m/z) = 754.16 $[M+Na]^+$, 770.11 $[M+K]^+$, aus der Referenzprobe)

$C_{46}H_{40}N_2O_7$ (732.84 g/mol)

NMR-Experimente

N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- N^β -trityl-L-asparagin (30 mg, 40 μ mol), TBTU (13 mg, 40 μ mol), HOBt (6 mg, 40 μ mol) und DIPEA (10 μ l, 60 μ mol) werden in 700 μ l deuteriertem DMF gelöst. Es werden im Minutenabstand 1H -1D-Experimente und im Anschluß ein ^{13}C -Spektrum, ein HMBC- und ein HMQC-2D-Spektrum aufgenommen.

Auswertung: Der Reaktionsverlauf wird an Hand der parallel aufgenommenen 1H -1D-Spektren beobachtet. Es wird ein kleines Fenster, der Bereich zwischen 7.2 und 6.3 ppm gewählt und ausgewertet. Während die Signale der drei aromatischen Protonen (H-3, H-5, H-6) aus der Hmb-Gruppe des Eduktes mit zunehmendem Reaktionsverlauf in Ihrer Intensität, d.h. in Ihrem Integral abnehmen, nehmen die Integrale über den Signalen von Hmb-Ar-H3 und Hmb-Ar-H6 des ringförmigen Produktes entsprechend zu. Diese Veränderung, betrachtet gegen die Zeit, spiegelt den kinetischen Verlauf der Ringbildung wieder.

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz), Ausschnitt:

Offenkettige Form:

δ = 7.11 (m, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.38 (m, 1H, Hmb-Ar-3H).

Ringform:

δ = 6.88 (m, 1H, Hmb-Ar-6H), 6.76 (m, 1H, Hmb-Ar-3H).

Versuch das zyklisierte 7-Ring-Intermediat **30** aus N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -tert-butyl-L-serin (**19**) zu isolieren

N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -tert-butyl-L-serin (**19**) (21 mg, 40 μ mol), TBTU (13 mg, 40 μ mol), HOBt (6 mg, 40 μ mol) und DIPEA (10 μ l, 40 μ mol) werden in 500 μ l DMF gelöst. Das Reaktionsgemisch wird an einer Oelpumpe im Hochvakuum zur Trockene eingengt, um es dann in wenig Wasser/MeCN wiederaufzunehmen und per HPLC an einer RP C-18 analogen Säule

aufzureinigen (Eluent A/Eluent B 25/75 → 25/75 (12.99 min) → 0/100 (15.15 min) → 0/100 (19.48 min), $R_t(\text{Ser}_{\text{NHmb}}) = 7.426$ min, $R_t(7\text{-Ring-Form}) = 16.892$ min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden per Maldi-TOF-MS analysiert.

Charakterisierung: Zum 7-Ring zyklisiertes Intermediat **30** aus N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin (**19**).

Maldi-TOF (m/z) = 524.66 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 540.23 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{NO}_9$ (501.58 g/mol)

N^α -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N^α -(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)- O^β -*tert*-butyl-L-serin (**19**)

Maldi-TOF (m/z) = 542.25 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 558.18 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{NO}_7$ (519.60 g/mol)

Es wird beobachtet, daß das zyklisierte 7-Ring-Intermediat **30** bereits nach mehreren Stunden wieder in die offene Form übergeht. Dies zeigen die begleitenden DC-Untersuchungen.

Offene Form: DC: R_f -Wert (Chloroform/MeOH/9:1) = 0.22

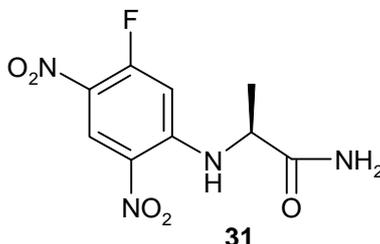
Ringform: DC: R_f -Wert (Chloroform/MeOH/9:1) = 0.86

9.2.20 Methode nach Marfey⁷¹

9.2.20.1 Darstellung von Marfey's Reagenz **31**

1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol (FFDNB, 175 mg, 0.86 mmol) wird in 3.94 ml Aceton gelöst und unter Rühren vorgelegt. L-Alanin-amid-hydrochlorid (125 mg, 1 mmol) wird in 1024 μl einer 1 M Natronlauge gelöst. Es wird 15.75 ml Aceton zugesetzt und über Natriumsulfat getrocknet. Die klare Lösung wird nun der Vorlage zugetropft. Es wird weitere 30 min bei RT gerührt. Nach Zugabe einer äquivalenten Menge Wassers fällt in goldgelben Nadeln ein Feststoff aus. Dieser wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und an der Luft und im Dunkeln über Nacht getrocknet.

Ausbeute: 124.7 mg (0.46 mmol) N^α-(5-Fluoro-2,4-dinitrobenzyl)-L-alanin-amid (F-DNB-L-Ala-NH₂, Marfey's Reagenz) (**31**), entsprechend 53% bezogen auf FFDNB (die Mutterlauge wurde nicht aufgearbeitet).



Schmelzpunkt.: 217°C (Lit.: 224-226°C).⁷¹

DC: R_f-Wert (Ethylacetat) = 0.4

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz):

δ = 9.32 (d, J_{NH,CH^α} 6.1 Hz, 1H, Ala-NH), 9.11 (d, ⁴J_{Ar3,F5} 8.14 Hz, 1H, Ar-3H), 7.95 (s, 1H, Ala-CONH₂), 7.72 (s, 1H, Ala-CONH₂), 7.16 (d, J_{Ar6,F5} 14.25 Hz, 1H, Ar-6H), 4.60 (m, 1H, J_{CH^α,CH^β} 6.61 Hz, Ala-CH^α), 1.65 (d, 3H, J_{CH^β,CH^α} 6.61 Hz, Ala-CH^β).

C₉H₉FN₄O₅ (272.19 g/mol)

9.2.20.2 Überprüfung der Enantiomerenreinheit an N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**19**)

Eine Spatelspitze N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxy-benzyl)-O^β-*tert*-butyl-L-serin (**19**) wird mit wenig TFA/Wasser 98:2 über ca. 90 min behandelt und anschließend an der Oelpumpe zur Trockene eingengt. Der feste Rückstand wird in wenig Piperidin/DMF 1:5 wiederaufgenommen, über 15 min geschüttelt und schließlich erneut an der Oelpumpe zur Trockene eingengt.

Das so erhaltene Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 70/30 → 70/30 (3.93 min) → 40/60 (11.78 min) → 0/100 (15.71 min) → 0/100 (19.63 min), R_t (L-Serin) = 6.54 min, Flußrate 5 ml/min). L-Serin wird in 500 µl Wasser gelöst. Es werden 200 µl einer 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 ml einer Lösung von Marfey's Reagenz (10 mg, 36.74 µmol) in Aceton zugesetzt und eine Stunde in einem auf 40°C erwärmten Wasserbad gerührt. Nach Abkühlen auf RT werden 100 µl einer 2 M Salzsäure zugegeben und weitere 5 min gerührt. Das Gemisch wird gefriergetrocknet und unter Wiederaufnahme in DMSO/Wasser 1:1 über HPLC an einer RP C-18 analogen

Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (6.55 min) → 40/60 (39.26 min) → 0/100 (45.81 min) → 0/100 (52.35 min), R_t (F-DNB-L-alanin-NH₂) = 25 min, R_t (L-Serin-DNB-L-alanin-NH₂) = 32.12 min, Flußrate 5 ml/min).

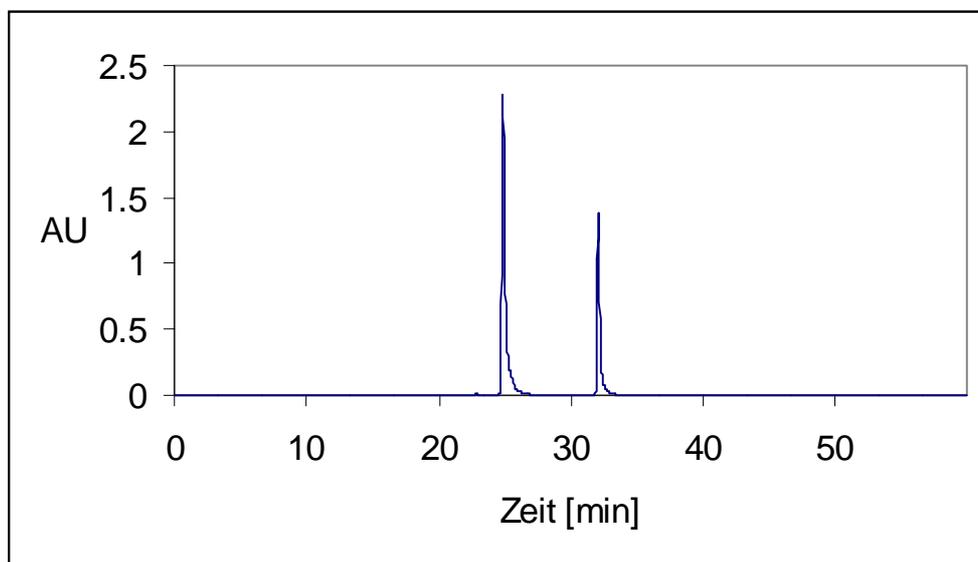


Abbildung 53: RP-HPLC-Chromatogramm zu 9.2.20.2. Links Marfeys Reagenz, rechts **33**.

Charakterisierung: L-Serin-DNB-L-alanin-NH₂ (**33**)

Maldi-TOF (m/z) = 493.53 [M+H]⁺, 515.62 [M+Na]⁺, 531.38 [M+K]⁺.

C₂₀H₂₃N₅O₁₀ (493.43 g/mol)

9.2.20.3 Überprüfung der Enantiomerenreinheit an N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-N^β-trityl-L-asparagin (**25**)

Eine Spatelspitze N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-N^β-trityl-L-asparagin (**25**) wird in wenig Piperidin/DMF 1:5 aufgenommen, über 15 min geschüttelt und an der Oelpumpe zur Trockene eingengt.

Das so erhaltene Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 70/30 → 70/30 (3.93 min) → 40/60 (11.78 min) → 0/100 (15.71 min) → 0/100 (19.63 min), R_t (N^β-Trityl-L-asparagin) = 7.61 min, Flußrate 5 ml/min). N^β-Trityl-L-asparagin wird in 500 µl Wasser suspendiert. Es werden 200 µl einer 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 ml einer Lösung von Marfey's Reagenz (10 mg, 36.74 µmol) in Aceton zugesetzt und eine Stunde in einem auf 40°C erwärmten Wasserbad gerührt. Das Gemisch wird gefriergetrocknet und unter Wiederaufnahme in DMSO/Wasser 1:1 über HPLC an einer RP C-18

analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (6.55 min) → 40/60 (39.26 min) → 0/100 (45.81 min) → 0/100 (52.35 min), R_t (F-DNB-L-alanin-NH₂) = 25 min, R_t (N^β-Trityl-L-asparagin-DNB-L-alanin-NH₂) = 41.08 min, Flußrate 5 ml/min).

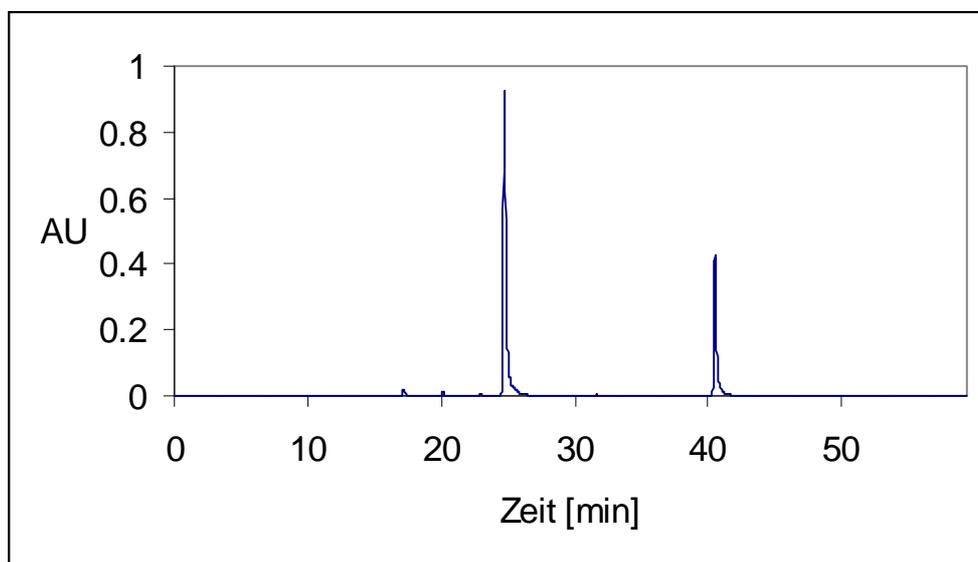


Abbildung 54: RP-HPLC-Chromatogramm zu 9.2.20.3. Links Marfey's Reagenz, rechts **34**.

Charakterisierung: N^β-Trityl-L-asparagin-DNB-L-alanin-NH₂ (**34**)

Maldi-TOF (m/z) = 763.31 [M+H]⁺, 785.27 [M+Na]⁺, 801.29 [M+K]⁺.

C₂₀H₃₈N₆O₁₀ (762.78 g/mol)

9.2.20.4 Überprüfung der Enantiomerenreinheit an N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin (**22**)

Eine Spatelspitze N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-N^α-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-L-phenylalanin wird in wenig Piperidin/DMF 1:5 aufgenommen, über 15 min geschüttelt und an der Oelpumpe zur Trockene eingengt.

Das so erhaltene Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 70/30 → 70/30 (3.93 min) → 40/60 (11.78 min) → 0/100 (15.71 min) → 0/100 (19.63 min), R_t (L-Phenylalanin) = 6.3 min, Flußrate 5 ml/min). L-Phenylalanin wird in 500 µl Wasser suspendiert. Es werden 200 µl einer 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 ml einer Lösung von Marfey's Reagenz (10 mg, 36.74 µmol) in Aceton zugesetzt und eine Stunde in einem auf 40°C erwärmten Wasserbad gerührt. Das Gemisch wird gefriergetrocknet und unter Wiederaufnahme in DMSO/Wasser 1:1 über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule

aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (6.55 min) → 40/60 (39.26 min) → 0/100 (45.81 min) → 0/100 (52.35 min), R_t (F-DNB-L-alanin-NH₂) = 24.4 min, R_t (L-Phenylalanin-DNB-L-alanin-NH₂) = 31.25 min, Flußrate 5 ml/min).

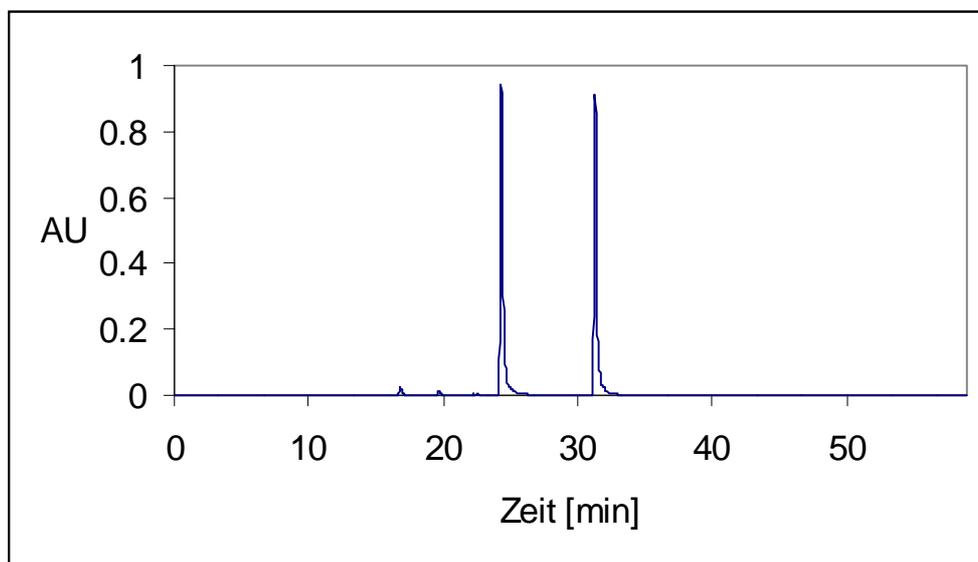


Abbildung 55: RP-HPLC-Chromatogramm zu 9.2.20.4. Links Marfeys Reagenz, rechts **35**.

Charakterisierung: L-Phenylalanin-DNB-L-alanin-NH₂ (**35**)

Maldi-TOF (m/z) = 417 [M+H]⁺, 439 [M+Na]⁺, 455 [M+K]⁺.

C₁₈H₁₉N₃O₇ (417.38 g/mol)

9.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften und Standardverfahren

9.3.1 Peptidsynthese

9.3.1.1 Manuelle Peptidsynthese

Das Harz wird in äquivalenter Menge in einer Glasfritte (Porengröße 3) eingewogen und zum Quellen über 20 min mit DMF bedeckt stengelassen. Nach Absaugen der (Quell-)Lösung im Wasserstrahlvakuum beginnt ein im Folgenden ausführlich beschriebener Zyklus.

Zyklus: Das Harz wird zunächst für 5 min dann 10 min mit zuvor frisch zubereiteter DMF/Piperidin 4:1 -Lösung bedeckt und mit DMF gewaschen.¹¹⁰ Die Menge der auf diese Weise abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen wird durch Messung der UV-Absorption des in der Abspalllösung gelösten Metylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon =$

7950) ermittelt. Im Anschluß wird solange mit DMF gespült bis die Waschlösung neutral ist.

Die Aminosäure wird gegebenenfalls seitenkettengeschützt als N-terminal Fmoc-geschütztes Derivat, soweit nicht anders angegeben in 1.5 fachem Überschuß eingewogen und gemeinsam mit 1 eq TBTU, 1 eq HOBT und 2 eq DIPEA in wenig DMF gelöst und nach einer Voraktivierungszeit von 5 min auf das Harz gegeben, welches auf diese Weise gerade bedeckt wird. Nach Schütteln des Reaktionsansatzes über den angegebenen Zeitraum wird die Kupplung gegebenenfalls wiederholt (Mehrfachkupplung) bis ein Farbttest (Kaiser, TNBS oder Chloranil) den annähernd vollständigen Umsatz der freien Aminogruppen am Harz anzeigt. Nach Absaugen der Reaktionslösung und ausgiebigem Waschen mit DIPEA und DMF wird zur Acetylierung nicht umgesetzter freier funktioneller Gruppen über 25 min mit einer Lösung bestehend aus jeweils 2% Acetanhydrid und 2% DIPEA in DMF gecappt¹¹. Nach Absaugen dieser Acetylierungslösung und ausgiebigem Waschen des Harzes mit DMF wird der oben beschriebene Zyklus bis zur Fertigstellung der gewünschten Peptidsequenz wiederholt. Um das Peptid vor Weiterbehandlung am Harz lagerungsbeständig zu machen, wird die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe erst vor der letzten Acetylierung abgespalten. Das Produkt ist auf diese Weise endgecappt und kann nach Waschen mit MeOH oder Isopropanol und DCM, sowie mehrstündiger Trocknung im Hochvakuum langfristig gelagert werden.

9.3.1.2 Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierte Peptidsynthese wird an einem Peptidsynthesizer (*Pioneer Peptide Synthesis System*) der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt.

Das Harz wird in äquivalenter Menge in einer Stempelsäule mit Frittenboden eingewogen. Die Aminosäuren werden als N-terminal Fmoc- und gegebenenfalls seitenkettengeschützte Derivate, in vierfachem Überschuß und in Abhängigkeit der Kupplungsanzahl entsprechend mehrfach eingewogen und in Reihenfolge der vorgegebenen Peptidsequenz an das Harz angeknüpft. Als Aktivator wird, wenn nicht anders angegeben, HATU in fünffachem Überschuß in Gegenwart von DIPEA (ebenfalls 5 eq) verwendet. Nach jeder angeknüpften Aminosäure wird zur Blockierung noch freier funktioneller Gruppen mit Acetanhydrid in DMF (1:10) über jeweils 5 min in kontinuierlichem Fluß acetyliert. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen erfolgt standardmäßig mit Piperidin in DMF (1:4) über je 10 min. Zur Bestimmung der Rohausbeute wird die N-terminale Fmoc-Gruppe zunächst am Harz belassen, um sie dann vor Weiterbehandlung des Peptids unter Messung der

UV-Absorption (siehe manuelle Peptidsynthese) abzuspalten. Zur Erhöhung der Lagerbeständigkeit wird das Peptid im Anschluß acetyliert, so daß alle bis dahin freien funktionellen Gruppen geschützt sind. Zur Lagerung selbst wird das Peptid ausgiebig mit MeOH oder Isopropanol und DCM gewaschen und mehrstündig im Hochvakuum getrocknet.

9.3.2 Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen mit 1.8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen mit DBU erfolgt gleichermaßen wie mit Piperidin, aber mit einer Lösung bestehend aus DBU/Piperidin/DMF 1:1:48, anstelle der 20%igen Piperidin-Lösung in DMF.⁹²

9.3.3 Entschützen der Glycosylierungsstellen

9.3.3.1 Untersuchung zur selektiven Deallylierung des am Harz gebundenen und noch vollständig geschützten Peptids

Es wurde das Peptid LFD_{OAI}ST (**41**) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.2 synthetisiert.

Aminosäure	Harz	Thr	Ser	Asp _{OAL}	Phe	Leu
Einwaage	556 mg	158 mg	154 mg	158 mg	154 mg	158 mg

Tabelle 6: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese von LFD_{OAI}ST (**41**).

Das Harz wird mehrstündig im Hochvakuum getrocknet, in acht gleiche Teile geteilt und in den im Folgenden beschriebenen acht verschiedenen Ansätzen weiterverarbeitet.

Variante 1 modifiziert nach D.Vetter¹¹²

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (38.5 mg, 33.3 µmol), PPh₃ (41.8 mg, 159.4 µmol), Eisessig (69 µl, 1.2 mmol) und NMM (33 µl, 0.3 mmol) in DCM abs. versetzt und über 2 Stunden

unter Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig mit DCM, Isopropanol und DMF gewaschen. Das Peptid wird standardmäßig abgespalten, durch RP-HPLC an einer C18 analogen Phase aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (3.93 min) → 60/40 (15.71 min) → 0/100 (23.56 min) → 0/100 (27.49 min), R_t (LFDST) = 12.13 min, Flußrate 5 ml/min) und per Maldi-TOF-MS analysiert. Die Allyl-Schutzgruppe ist vollständig abgespalten.

Dieses Verfahren wurde als Standardverfahren übernommen.

Charakterisierung: LFDST (42)

Maldi-TOF (m/z) = 623.44 [M+H]⁺, 645.52 [M+Na]⁺, 661.46 [M+K]⁺.

$C_{28}H_{42}N_6O_{10}$ (622.68 g/mol)

Variante 2 nach P.Loyd-Williams¹¹³

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (2 mg, 1.8 µmol), 375 µl DMSO, 375 µl THF, 188 µl einer 0.5 M Salzsäure und 19 µl Morpholin versetzt und über 18 Stunden unter Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig mit DMF/0.5 M Salzsäure 1:1 und DMF gewaschen. Das Peptid, bzw. Produktgemisch wird standardmäßig abgespalten, durch RP-HPLC an einer C18 analogen Phase aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (3.93 min) → 60/40 (15.71 min) → 0/100 (23.56 min) → 0/100 (27.49 min), R_t (LFDST) = 12.13 min, R_t (LFD_{OAI}ST) = 12.43 min, Flußrate 5 ml/min) und per Maldi-TOF-MS analysiert. Die Allyl-Schutzgruppe ist nicht vollständig abgespalten.

Charakterisierung: LFD_{OAI}ST (41)

Maldi-TOF (m/z) = 685.44 [M+Na]⁺, 700.41 [M+K]⁺.

$C_{38}H_{54}N_{10}O_{17}$ (662.75 g/mol)

Variante 3 nach S.A.Kates¹¹⁴

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (14.5 mg, 12.5 µmol), 1 ml DMSO, 1 ml THF, 0.5 ml einer 0.5M Salzsäure und 50 µl Morpholin versetzt und über 3 Stunden unter

Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig mit THF gewaschen. Das Produktgemisch wird wie in der Variante 2 (modifiziert nach P.Loyd-Williams) beschrieben abgespalten, aufgereinigt und identifiziert. Die Allyl-Schutzgruppe ist nicht vollständig abgespalten.

Variante 4 nach S.A.Kates in DCM¹¹⁵

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (43.3 mg, 37.5 µmol), 50 µl Eisessig, 20 µl NMM und 925 µl DCM versetzt und über 2 Stunden unter Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig mit 0.5% DIPEA in DMF und 0.5% w/v Natriumdiethyldithiocarbaminat in DMF gewaschen. Das Peptid wird wie in der Variante 1 (modifiziert nach D. Vetter) beschrieben abgespalten, aufgereinigt und identifiziert. Die Allyl-Schutzgruppe ist vollständig abgespalten.

Variante 5 nach H. Kunz¹¹⁶

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (1.5 mg, 1.3 µmol), Morpholin (11 µl, 125 µmol) in 0.95 ml THF versetzt und über 30 min unter Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig THF gewaschen. Das Produktgemisch wird wie in der Variante 2 (modifiziert nach P.Loyd-Williams) beschrieben abgespalten, aufgereinigt und identifiziert. Die Allyl-Schutzgruppe ist nur zu geringem Anteil abgespalten.

Variante 6 nach R. Deziel¹¹⁷

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (0.4 mg, 0.3 µmol), PPh₃ (0.2 mg, 0.6 µmol), Pyrrolidin (1µl, 13.1 µmol) in 1.25 ml MeCN versetzt und über 2 Stunden unter Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig mit MeCN gewaschen. Das Produktgemisch wird wie in der Variante 2 (modifiziert nach P.Loyd-Williams) beschrieben abgespalten, aufgereinigt und identifiziert. Die Allyl-Schutzgruppe ist nur zu sehr geringem Anteil abgespalten.

Variante 7 nach P.D. Jeffrey¹¹⁸

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (0.3 mg, 0.3 µmol), PPh₃ (0.3 mg, 1.3 µmol), 2-Ethylhexansäure (5 µl, 31.3 µmol) in 1.25 ml DCM versetzt und über 2 Stunden unter Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig mit DCM gewaschen. Das Produktgemisch wird wie in der Variante 2 (modifiziert nach P.Loyd-Williams) beschrieben abgespalten, aufgereinigt und identifiziert. Die Allyl-Schutzgruppe ist nur zu geringem Anteil abgespalten.

Variante 8 nach B. K. Handa¹¹⁹

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus Pd(PPh₃)₄ (76 mg, 65.8 µmol) in 658 µl DMSO/DMF 1:1 versetzt. HOBT (20.2 mg, 131.6 µmol) wird in 132 µl DMF gelöst und zugegeben. Das Gemisch wird daraufhin über 18 Stunden unter Lichtausschluß geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz ausgiebig mit DMF, DCM, Isopropanol und abschließend DCM gewaschen bis die Waschlösung nicht mehr gelb ist. Das Produktgemisch wird wie in der Variante 2 (modifiziert nach P.Loyd-Williams) beschrieben abgespalten, aufgereinigt und identifiziert. Die Allyl-Schutzgruppe ist nicht vollständig abgespalten.

9.3.3.2 Untersuchung zur Abspaltung von 4-[N-(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl)amino]benzyl (Dmab) in Lösung

Eine Spatelspitze Fmoc-L-Asp(ODmab)-OH wird in 1 ml einer 10%igen Hydrazin-Lösung in DMF gerührt. Der Reaktionsverlauf wird per DC beobachtet. Nach 9 min ist kein Edukt mehr zu identifizieren.

DC:

Fmoc-L-Asp(ODmab)-OH: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/1:1) = 0.89

Fmoc-L-Asp-OH: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/1:1) = 0.12

9.3.3.3 Untersuchung zur selektiven Abspaltung der Dmab-Schutzgruppe vom harzgebundenen und noch vollständig geschützten Peptid

Als Target wurde das Peptid LFD_{ODmab}SarT (**43**) benutzt und nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Harz	556 mg			
Thr	60 mg	1.5	2	30, 60 min
Sar	47 mg	1.5	2	30, 60 min
Asp(ODmab)	100 mg	1.5	2	30, 60 min
Phe	58 mg	1.5	2	30, 60 min
Leu	53 mg	1.5	2	30, 60 min

Tabelle 7: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{ODmab}SarT (**43**).

Das Harz wird mehrstündig im Hochvakuum getrocknet, in sechs gleiche Teile geteilt und in den im Folgenden beschriebenen sechs verschiedenen Ansätzen weiterverarbeitet.

Die Ausbeute wird durch Messung der UV-Absorption des in der letzten Fmoc-Abspalllösung (von Leu) gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt und auf die eingewogene Harzmenge bezogen. Sie beträgt 91.1 μmol (= 91%).

Variante 1

Das Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit DMF bedeckt und 20 min zum Quellen stehengelassen. Nach Absaugen wird das frisch gequollenen Harz mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus 2% Hydrazin in DMF versetzt und über 10 min geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz mit einer 5% DIPEA enthaltenen DMF-Lösung, DMF, Isopropanol und schließlich DCM gewaschen. Das Peptid, bzw. Produktgemisch wird abgespalten, durch RP-HPLC an einer C18 analogen Phase aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (8.66 min) \rightarrow 52/48 (25.98 min) \rightarrow 0/100 (28.31 min) \rightarrow 0/100 (30.31 min), R_t (LFD_{SarT}) = 19.40 min, R_t (LFD_{ODmab}SarT) = 30.42 min, Flußrate 20 ml/min) und per Maldi-TOF-MS analysiert. Die Dmab-Schutzgruppe ist nicht vollständig abgespalten.

Charakterisierung: LFDSarT (44)

Maldi-TOF (m/z) = 607.75 [M+H]⁺, 629.84 [M+Na]⁺, 645.89 [M+K]⁺.

C₂₈H₄₂N₆O₉ (606.68 g/mol)

LFD_{ODmab}SarT (43)

Maldi-TOF (m/z) = 940.25 [M+Na]⁺, 956.26 [M+K]⁺.

C₄₈H₆₇N₇O₁₁ (918.11 g/mol)

Varianten 2 bis 6

Variante	Modifikation zu Variante 1	Ergebnis
2	mit 5% Hydrazin in DMF	LFD _{ODmab} SarT ist nur noch in Spuren zu identifizieren.
3	über 5 min Reaktionszeit	Die Dmab-Schutzgruppe ist nicht vollständig abgespalten.
4	über 60 min Reaktionszeit	LFD _{ODmab} SarT ist nur noch in Spuren zu identifizieren.
5	über 3.5 Stunden Reaktionszeit	Die Dmab-Schutzgruppe ist vollständig abgespalten.
6	nach Absaugen der Quelllösung wird das frisch gequollene Harz über 10 min mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus 2% Hydrazin in DMF gespült.	LFD _{ODmab} SarT ist nur noch in Spuren zu identifizieren.

¹ Es ist auf einen kontinuierlichen Durchfluß zu achten.

Selektive Abspaltung der Dmab-Schutzgruppe vom harzgebundenen und noch vollständig geschützten Peptid

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit DMF bedeckt und 20 min zum Quellen stehengelassen. Nach Absaugen wird das frisch gequollene Harz über 10 min mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus 5% Hydrazin in DMF gespült. Es ist auf einen kontinuierlichen Durchfluß zu achten. In Anwesenheit einer O-Allyl-

Schutzgruppe wird der Abspaltung Allylalkohol in 200fachem Überschuß (bez. auf die Allylschutzgruppe) zugesetzt. Im Anschluß wird das Harz mit einer 5% DIPEA enthaltenen DMF-Lösung und schließlich DMF gewaschen. Dieses Verfahren wurde als Standardverfahren übernommen.

9.3.3.4 Überprüfung der orthogonalen Selektivität von Allyl-Schutzgruppen neben Dmab-Schutz

Es wurde das Peptid $\text{FD}_{\text{ODmab}}\text{STGSD}_{\text{OAI}}\text{N}$ (**45**) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.2 synthetisiert.

Aminosäure	Harz	Asn	Asp _{OAI}	Ser	Gly	Thr	Ser	Asp _{ODmab}	Phe
Einwaage [mg]	278	119	79	77	59	79	77	133	77

Tabelle 8: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese von $\text{FD}_{\text{ODmab}}\text{STGSD}_{\text{OAI}}\text{N}$ (**45**).

Die Dmab-Schutzgruppe wird nach Standardverfahren abgespalten. Es wird eine Harzprobe entnommen, von der das Produktgemisch standardmäßig abgespalten, aufgearbeitet und durch RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt wird (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (8.66 min) → 48/52 (25.98 min) → 0/100 (28.14 min) → 0/100 (32.47 min), R_t ($\text{FDSTGSD}_{\text{OAI}}\text{N}$) = 4.99 min, Flußrate 20 ml/min). Das Produkt wird durch Maldi-TOF-MS identifiziert.

Charakterisierung: $\text{FDSTGSD}_{\text{OAI}}\text{N}$ (**46**)

Maldi-TOF (m/z) = 923 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 945 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 961 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_{10}\text{O}_{17}$ (922.91 g/mol)

Der Harzrest wird nach Standardverfahren deallyliert. Anschließend wird das Produktgemisch standardmäßig abgespalten, aufgearbeitet und per Maldi-TOF-MS analysiert. Neben zahlreichen nicht identifizierten Nebenprodukten findet sich ausschließlich deallyliertes Produkt.

Charakterisierung: FDSTGSDN (**47**)

Maldi-TOF (m/z) = 905 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 921 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{N}_{10}\text{O}_{17}$ (882.85 g/mol)

9.3.4 Glycosylierung

1.1.1.1 Untersuchung zur Glycosylierung der freien β -Säurefunktion von Asparaginsäure am Harz mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminylamin (**1**)

Es wurde das Peptid TEGSD_{OAI}SarTEG (**48**) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.2 synthetisiert.

Das Peptid **48** wurde für die folgenden vier Varianten jeweils in einem 50 μ molaren Ansatz dargestellt.

Aminosäure	Harz	Gly	Glu	Thr	Sar	Asp _{OAI}	Ser	Gly	Glu	Thr
Einwaage [mg]	278	119	170	159	125	158	153	119	170	159

Tabelle 9: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese von TEGSD_{OAI}SarTEG (**48**).

Die Allylschutzgruppe wird jeweils standardmäßig und selektiv am Harz abgespalten.

Variante 1 unter Aktivierung mit TBTU

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit DMF bedeckt und 20 min zum Quellen stehengelassen. Nach Absaugen wird das frisch gequollene Harz mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus 2-N-Acetyl-D-glucosaminylamin (16.5 mg, 75 μ mol), TBTU (19.3 mg, 60 μ mol) und DIPEA (10 μ l, 60 μ mol) in wenig DMF bedeckt und über Nacht geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz mit DMF, Isopropanol und schließlich DCM gewaschen.

Das Produktgemisch wird standardmäßig vom Harz abgespalten, aufgearbeitet und durch RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (8.66 min) \rightarrow 40/60 (38.96 min) \rightarrow 0/100 (43.29 min) \rightarrow 0/100 (51.95 min), R_t (TEGSN(β -D-GlcNAc)SarTEG) = 24.96 min, R_t (TEGSNSarTEG) = 25.16 min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden durch MALDI-TOF-MS und NMR identifiziert.

Ausbeute:

Ausbeute nach automatisierter Peptidsynthese von TEGSD_{OAI}SarTEG **48**: 34.9 μ mol, entsprechend 70% bezogen auf die eingewogene Harzmenge (zur Bestimmung der Ausbeute siehe 9.3.1.2).

30.4 mg (22.8 μ mol) TEGSN(β -D-GlcNAc)SarTEG (**50**), entsprechend 65% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung. 2 mg (1.77 μ mol) TEGSNSarTEG (**49**), entsprechend 5% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung.

Charakterisierung: TEGSNsarTEG (49)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Thr-9	Glu-8	Gly-7	Ser-6	Asn-5	Sar-4	Thr-3	Glu-2	Gly-1
NH	8.116	8.385	8.354	8.057	8.412		8.099	8.310	8.342
CH α_1	4.344	4.332	3.903	4.393	5.151	3.730	4.344	4.314	3.903
CH α_2/β_1	4.228	2.104		3.781	2.781	4.385	4.223	2.090	
CH β_2		1.975			2.600			1.957	
CH γ	1.184	2.388					1.184	2.379	

Tabelle 10: NMR Daten zu 49.

Maldi-TOF (m/z) = 906.06 [M+H]⁺, 928.25 [M+Na]⁺, 944.18 [M+K]⁺.

C₃₄H₅₄N₁₀O₁₉ (905.88 g/mol)

TEGSN(β -D-GlcNAc)sarTEG (50)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Thr-9	Glu-8	Gly-7	Ser-6	Asn-5	Sar-4	Thr-3	Glu-2	Gly-1
NH	7.984	8.245	8.217	8.058	8.337		7.970	8.166	8.205
CH α_1	4.165	4.169	3.722	4.390	4.977	4.155	4.165	4.164	3.722
CH α_2/β_1	4.038	1.938		3.782	2.665	4.448	4.038	1.938	
CH β_2		1.803			2.426			1.789	
CH γ	1.001	2.259					1.001	2.250	

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc	8.409	7.943	4.842	2.903	2.620	2.491	2.553		3.008

Tabelle 11: NMR-Daten zu 50.

Maldi-TOF (m/z) = 1109.38 [M+H]⁺, 1131.42 [M+Na]⁺, 1147.43 [M+K]⁺.

C₄₂H₆₈N₁₂O₂₃ (1109.07 g/mol)

Variante 2 unter Aktivierung mit DCC

Wie unter Variante 1 beschrieben, aber Reaktionslösung bestehend aus 2-N-Acetyl-D-glucosaminylamin (16.5 mg, 75 μ mol), DCC (51.6 mg, 250 μ mol) und HOBT (38.3 mg, 250 μ mol) in wenig DMF. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgt wie unter Variante 1 beschrieben.

Ausbeute:

Ausbeute nach automatisierter Peptidsynthese von TEGSDSarTEG (**48**): 31.6 μmol , entsprechend 63% bezogen auf die eingewogene Harzmenge. 4.8 mg (3.8 μmol) TEGSN(β -D-GlcNAc)SarTEG (**50**), entsprechend 12% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung. 13.1 mg (12.0 μmol) TEGSNSarTEG (**49**), entsprechend 38% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung.

Variante 3 unter Aktivierung mit HATU

Wie unter Variante 1 beschrieben, aber Reaktionslösung bestehend aus 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin (16.5 mg, 75 μmol), HATU (114.1 mg, 300 μmol) und DIPEA (51 μl , 300 μmol) in wenig DMF. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgt wie unter Variante 1 beschrieben.

Ausbeute:

Ausbeute nach automatisierter Peptidsynthese von TEGSDSarTEG (**48**): 35.6 μmol , entsprechend 71% bezogen auf die eingewogene Harzmenge. 28.9 mg (26.0 μmol) TEGSN(β -D-GlcNAc)SarTEG (**50**), entsprechend 73% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung. 1.2 mg (1.3 μmol) TEGSNSarTEG (**49**), entsprechend 4% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung.

Variante 4 unter Aktivierung mit HBTU

Wie unter Variante 1 beschrieben, aber Reaktionslösung bestehend aus 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin (16.5 mg, 75 μmol), HBTU (113.8 mg, 300 μmol), HOBT (46.0 mg, 300 μmol) und DIPEA (102 μl , 600 μmol) in wenig DMF. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgt wie unter Variante 1 beschrieben.

Ausbeute:

Ausbeute nach automatisierter Peptidsynthese von TEGSDSarTEG (**48**): 31.2 μmol , entsprechend 62% bezogen auf die eingewogene Harzmenge. 20.3 mg (22.5 μmol) TEGSN(β -D-GlcNAc)SarTEG (**50**), entsprechend 72% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung. 2.4 mg (2.14 μmol) TEGSNSarTEG (**49**), entsprechend 7% bezogen auf **48** unmittelbar vor Deallylierung.

Es wurde das Peptid TQLFD_{OAI}SarTWF (**51**) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.2 synthetisiert.

Aminosäure	Harz	Phe	Trp	Thr	Sar	Asp _{OAI}	Phe	Leu	Gln	Thr
Einwaage [mg]	278	155	211	159	125	158	155	141	244	159

12: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese von TQLFD_{OAI}SarTWF (**51**).

Die Allylschutzgruppe wird standardmäßig und selektiv vom Harz abgespalten.

Variante 5 unter Aktivierung mit TFFH

Wie unter Variante 1 beschrieben, aber Reaktionslösung bestehend aus 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin (16.5 mg, 75 µmol), TFFH (66.0 mg, 250 µmol), HOBt (38.3 mg, 250 µmol) und DIPEA (85 µl, 500 µmol) in wenig DMF. Das Produktgemisch wird standardmäßig vom Harz abgespalten, aufgearbeitet* und durch RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 70/30 → 70/30 (12.99 min) → 40/60 (30.31 min) → 0/100 (38.96 min) → 0/100 (51.95 min), R_t (TQLFN(β-D-GlcNAc)SarTWF) = 24.55 min, R_t (TQLFNSarTWF) = 27.60 min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden durch Maldi-TOF-MS und NMR identifiziert.

*Das Rohgemisch, bzw. der aufgearbeitete Rückstand ist deutlich schlechter wasserlöslich und geht auch nach Zugabe von 30% MeCN nicht vollständig in Lösung.

Ausbeute:

Ausbeute nach automatisierter Peptidsynthese von TQLFD_{OAI}SarTWF (**51**): 29.7 µmol, entsprechend 60% bezogen auf die eingewogene Harzmenge. 17.3 mg (11.2 µmol) TQLFN(β-D-GlcNAc)SarTWF (**53**), entsprechend 38% bezogen auf **51** unmittelbar vor Deallylierung. 4.3 mg (3.7 µmol) TQLFNSarTWF (**52**), entsprechend 12% bezogen auf **51** unmittelbar vor Deallylierung.

Charakterisierung: TQLFNSarTWF (**52**)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Thr-9	Gln-8	Leu-7	Phe-6	Asn-5	Sar-4	Thr-3	Trp-2	Phe-1
NH	8.357	8.701	8.420	8.001	8.504		8.320	8.161	8.001
CH α_1	4.325	4.366	4.314	4.485	4.474	4.168	4.325	4.639	4.485
CH α_2/β_1	4.202	2.324	1.588	3.054	3.065	4.535	4.202	3.219	3.054
CH β_2		1.990		2.877	2.737				2.877
CH γ	1.143	3.014	1.475				1.143		
CH δ			0.900						
2-H								7.184	

Tabelle 13: NMR-Daten zu **52**.

Maldi-TOF (m/z) = 1168.42 [M+H]⁺, 1190.38 [M+Na]⁺, 1206.52 [M+K]⁺.

C₅₇H₇₇N₁₃O₁₄ (1168.33 g/mol)

TQLFN(β -D-GlcNAc)SarTWF (**53**)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Thr-9	Gln-8	Leu-7	Phe-6	Asn-5	Sar-4	Thr-3	Trp-2	Phe-1
NH	7.979	8.322	8.046	7.623	8.402		7.940	7.794	7.623
CH α_1	4.032	4.058	3.994	4.178	5.145	3.466	4.032	4.339	4.178
CH α_2/β_1	3.912	2.020	1.292	2.757	2.769	3.284	3.912	2.914	2.757
CH β_2		1.691		2.582	2.595				2.582
CH γ	0.855	2.722	1.172				0.855		
CH δ			0.621						
H-2								6.806	

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc	8.384	8.309	4.311	2.382	2.070	1.925	2.001	2.556	2.468

Tabelle 14: NMR-Daten zu **53**.

Maldi-TOF (m/z) = 1372.15 [M+H]⁺, 1394.08 [M+Na]⁺, 1410.21 [M+K]⁺.

C₆₅H₉₁N₁₅O₁₈ (1371.52 g/mol)

9.3.4.2 Untersuchung zum erforderlichen Überschuß von 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin bei Glycosylierung der freien β -Säurefunktion von Asparaginsäure am Harz

Es wurde das Peptid LFD_{OAI}SarT (54) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Harz	556 mg			
Thr	60 mg	1.5	2	30, 60 min
Sar	47 mg	1.5	2	30, 60 min
Asp _{OAI}	60 mg	1.5	2	30, 60 min
Phe	58 mg	1.5	2	30, 60 min
Leu	53 mg	1.5	2	30, 60 min

Tabelle 15: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{OAI}SarT (54).

Die Ausbeute wird durch Messung der UV-Absorption des in der letzten Fmoc-Abspaltung (von Leu) gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt und auf die eingewogene Harzmenge bezogen. Sie beträgt 95.3 μmol (= 95%).

Die Allylschutzgruppe wird standardmäßig und selektiv abgespalten.

Das Harz wird mehrstündig im Hochvakuum getrocknet, in sechs gleiche Teile geteilt und in diesen sechs verschiedenen Ansätzen weiterverarbeitet.

Jeder Ansatz wird mit einer frisch zubereiteten Lösung bestehend aus 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin, TBTU und DIPEA in wenig DMF bedeckt und über Nacht geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz mit DMF, Isopropanol und schließlich DCM gewaschen. Das Produktgemisch wird standardmäßig vom Harz abgespalten, aufgearbeitet und durch RP-HPLC an einer C18 Phase aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/90 \rightarrow 90/10 (3.93 min) \rightarrow 60/40 (15.71 min) \rightarrow 0/100 (23.56 min) \rightarrow 0/100 (27.49 min), R_t (LFN(β -D-GlcNAc)SarT) = 19.90 min, R_t (LFNSarT) = 21.05 min, Flußrate 0.8 ml/min). Die Produkte werden durch Maldi-TOF-MS identifiziert. Das Verhältnis zwischen glycosyliertem Produkt und den nicht-glycosylierten Nebenprodukten wird durch Integration über den Peakflächen nach HPLC bestimmt. Es wird angenommen, daß alle Produkte ein gleiches Absorptionsverhalten besitzen.

Ausbeute:

Ansatz	GlcNAc Einwaage* [mg]	TBTU / DIPEA Einwaage [mg]	Verhältnis [%] von	
			Glycopeptid 55	Peptid 44 und 56 **
1) 0.5 eq	2.2	7.7 / 4 µl	19	81
2) 1.0 eq	4.4	7.7 / 4 µl	40	60
3) 1.1 eq	4.8	7.7 / 4 µl	44	56
4) 1.5 eq	6.6	7.7 / 4 µl	71	29
5) 2.0 eq	8.8	7.7 / 4 µl	59	41
6) 3.0 eq	13.2	7.7 / 4 µl	61	39

Tabelle 16: Ausbeuten zu den Ansätzen aus 9.3.4.2.

* Die Ansätze werden nicht einzeln eingewogen, sondern es wird aus einer angesetzten Maßlösung zu pipettiert, ** Das an seiner Aspartat-β-Säurefunktion noch freie Peptid wird mit dem an der Glycosylierungsfunktion aminierten Produkt zusammen gerechnet.

Charakterisierung: LFN(β-D-GlcNAc)SarT (55)

Maldi-TOF (m/z) = 809.09 [M+H]⁺, 831.11 [M+Na]⁺, 847.09 [M+K]⁺.

C₃₆H₅₇N₉O₁₂ (808.89 g/mol)

LFNSarT (56)

Maldi-TOF (m/z) = 606.14 [M+H]⁺, 628.17 [M+Na]⁺, 644.13 [M+K]⁺.

C₂₈H₄₃N₇O₈ (605.70 g/mol)

LFDSarT (44)

Maldi-TOF (m/z) = 607.29 [M+H]⁺, 629.29 [M+Na]⁺, 645.26 [M+K]⁺.

C₂₈H₄₂N₆O₉ (606.68 g/mol)

9.3.4.3 Standardverfahren zur Seitenkettenglycosylierung

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz (50 µmolarer Ansatz) wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit DMF bedeckt und 20 min zum Quellen stehengelassen. Nach Absaugen wird das frisch gequollenen Harz mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin (33.0 mg, 150 µmol) oder 1-β-Amino-chitobiose (31.8 mg, 75

μmol), TBTU (19.3 mg, 60 μmol) und DIPEA (10.3 μl , 60 μmol) in wenig DMF bedeckt und über Nacht geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz mit DMF, Isopropanol und schließlich DCM gewaschen.

9.3.5 Abspaltung vom Harz

Abspaltung der Peptide bzw. Glycopeptide vom Harz

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird zweimal in direkter Folge mit einer Lösung bestehend aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (95:5:2) bedeckt und über 60, dann 90 min geschüttelt. Die Lösung wird im Unterdruck abgesaugt, das Harz mit TFA gewaschen und die vereinten Lösungen an der Oelpumpe zur Trockene eingengt.

Beim Ansetzen der Abspalllösung wird stets darauf geachtet, daß minimal 2 eq Triisopropylsilan (pro mol Schutzgruppe am Harz) eingesetzt werden³³ und das Gesamtvolumen 25 ml pro Gramm Harz beträgt.⁹⁸ Dieses Verfahren wurde als Standardverfahren übernommen.

Abspaltung der Peptide bzw. Glycopeptide von säurelabilen Harzen

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird zweimal in direkter Folge mit einer Lösung bestehend aus 5% TFA in DCM bedeckt und über 60, dann 90 min geschüttelt. Die Lösung wird im Unterdruck abgesaugt, das Harz mit der 5% TFA-haltigen DCM-Lösung gewaschen und die vereinten Lösungen an der Oelpumpe zur Trockene eingengt.

Abspaltung der cysteinhaltigen Glycopeptide vom Harz und Bildung einer Disulfidbrücke

Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz wird unter Stickstoffatmosphäre zweimal in direkter Folge mit einer frisch entgasten Lösung bestehend aus TFA/Triisopropylsilan/Wasser (95:5:2) bedeckt und über 60, dann 90 min geschüttelt. Die Lösung wird (weiterhin unter Stickstoffatmosphäre) abgesaugt, das Harz mit TFA gewaschen und die vereinten Lösungen an der Oelpumpe zur Trockene eingengt.

Beim Ansetzen der Abspalllösung wird stets darauf geachtet, daß minimal 2eq Triisopropylsilan (pro mol Schutzgruppe am Harz) eingesetzt werden³³ und das Gesamtvolumen 25 ml pro Gramm Harz beträgt.⁹⁸

Dem so erhaltenen Rohprodukt wird noch unter Stickstoff eine halbstündig im Ultraschallbad entgast, 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung (50 ml auf 1 µmmol eingewogenes Harzäquivalent) zugegeben. Diese Lösung wird nun über 24 h bei offenem Reaktionsgefäß stark gerührt, so daß sie mit Luftsauerstoff durchsetzt wird. Mit Hilfe einer Ultrafiltration (*cut off* 1000 D) wird die Lösung auf ca. 75 ml eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Der feste Rückstand wird nun mehrmals aus wäßriger Lösung lyophilisiert, bis sich sein Gewicht nicht mehr verändert und dann per HPLC weiter aufgereinigt.

9.3.6 Aufarbeitung nach Peptidabspaltung vom Harz

Untersuchung zur Aufarbeitung nach Peptidabspaltung vom Harz am Beispiel von TITLPS (57).

Vorschrift siehe 9.3.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften.

Aminosäure	Harz	Ser	Pro	Leu	Thr	Ile	Thr
Einwaage	278 mg	77 mg	67 mg	71 mg	79 mg	71 mg	79 mg

Tabelle 17: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese von TITLPS (57).

Das Testpeptid wird standardmäßig vom Harz abgespalten, die Abspalllösung dreigeteilt und in drei verschiedenen Ansätzen aufgearbeitet.

- A) Das Abspaltgemisch 1 wird an der Ölpumpe zur Trockene eingengt und anschließend im Hochvakuum mehrstündig getrocknet.
- B) Das Abspaltgemisch 2 wird auf 4°C abgekühlt und unter Rühren mit eisgekühltem Diethylether versetzt. Nach 10 minütigem Rühren wird das ausgefallene Produkt abzentrifugiert, in Ethanol wiederaufgenommen und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der feste Rückstand wird abschließend lyophilisiert.
- C) Das Abspaltgemisch 3 wird mit 8 ml einer 20%igen Essigsäure verdünnt und mit Diethylether extrahiert. Die wäßrigen Phasen werden vereint und lyophilisiert.

Die Rohprodukte aus A), B) und C) werden jeweils in Wasser/MeCN/TFA 95:5:0.1 wieder aufgenommen, im Ultraschallbad behandelt und nach Abzentrifugieren

ungelöster Rückstände durch RP-HPLC an einer C18-Phase aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (7.85 min) → 60/40 (35.35 min) → 0/100 (39.27 min) → 0/100 (47.13 min), R_t (TITLPS) = 21.16 min, Flußrate 5 ml/min). Die Ausbeute beträgt 26.39 mg (39.28 μ mol), entsprechend 79% bezogen auf die eingewogene Harzmenge, gleichmäßig auf die Ansätze A) bis C) verteilt.

Charakterisierung: TITLPS (57)

Maldi-TOF (m/z) = 672.23 [M+H]⁺, 694.19 [M+Na]⁺, 710.31 [M+K]⁺.

C₃₀H₅₃N₇O₁₀ (671.80 g/mol)

Standardverfahren zur Aufarbeitung des Abspaltgemisches

Das hochvakuumgetrocknete Abspaltgemisch wird unter Behandlung im Ultraschallbad in eiskaltem *t*-Butylmethylether suspendiert. Nach Zentrifugieren der so bereiteten Suspension wird der klare Überstand dekantiert und verworfen und der ungelöste Rückstand abermals unter Behandlung im Ultraschallbad in Wasser wiederaufgenommen und lyophilisiert. Das so gewonnene Rohprodukt wird per HPLC aufgereinigt. Dieses Verfahren wurde als Standardverfahren übernommen.

9.3.7 Farbtests zur Überprüfung auf freie, nicht umgesetzte Amino-Funktionen am Harz

Kaiser-Test

Herstellen der erforderlichen Reagenzien:

Lösung 1: 500 mg Ninhydrin wird in 10 ml Etanol gelöst.

Lösung 2: 8 g Phenol (in flüssiger Form) wird in 2 ml Ethanol gelöst.

Lösung 3: 200 μ l einer 0.001 M Kaliumcyanid-Lösung werden zu 9.8 ml Pyridin gegeben und gut verrührt.

Durchführung des Tests:

Einige wenige Harz-Beads werden mit Ethanol gewaschen. Es werden jeweils 2 Tropfen aus den Lösungen 1 bis 3 zugesetzt und das gesamte Gemisch für 5 min auf 120°C erhitzt. Ein Test ist positiv verlaufen, wenn sich die Harz-Beads blau verfärbt haben.

TNBS-Test

Herstellen der erforderlichen Reagenzien:

Lösung 1: 10% DIPEA in DMF

Lösung 2: 1% w/v 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure in DMF

Durchführung des Tests:

Einige wenige Harz-Kügelchen werden mit DMF gewaschen und anschließend mit etwas DMF bedeckt. Es wird jeweils 1 Tropfen aus den Lösungen 1 und 2 zugesetzt und das gesamte Gemisch für 5 min bei RT stengelassen. Abschließend wird das Harz mit DMF gewaschen bis die Waschlösung farblos ist. Ein Test ist positiv verlaufen, wenn sich die Harz-Kügelchen rot verfärbt haben.

Chloranil-Test (auf freie sekundäre Amine)

Herstellen der erforderlichen Reagenzien:

Lösung 1: 2% Acetaldehyd in DMF

Lösung 2: 2% w/v p-Chloranil in DMF

Durchführung des Tests:

Einige wenige Harz-Kügelchen werden mit DMF gewaschen. Es wird jeweils 1 Tropfen aus den Lösungen 1 und 2 zugesetzt und das gesamte Gemisch für 5 min bei RT stengelassen. Ein Test ist positiv verlaufen, wenn sich die Harz-Kügelchen blau verfärbt haben.

Pikrinsäureexperiment

Herstellen der erforderlichen Pikrinsäurelösung in DCM:

Es werden 3 g Pikrinsäure (phlegmatisiert, also zuzüglich 30% Gewichtsanteil Wasser) in 100 ml DCM gelöst und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet.

Durchführung des Pikrinsäureexperiments¹²⁰:

Das Harz wird nach Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen, d.h. mit seinen freien Aminogruppen ausgiebig mit DMF, Isopropanol und DCM gewaschen. Es wird über ca. 5 min in DCM zum Quellen stengelassen. Nach Absaugen der Quelllösung wird das Harz zweimal über je 3 min mit 5% DIPEA in DCM, dann mit DCM und schließlich zweimal über je 3 min mit der Pikrinsäurelösung in DCM gewaschen. Nach Waschen mit DCM wird das Harz zweimal mit je 1 ml 5% DIPEA in DCM und abschließend mit achtmal 1 ml DCM gewaschen. Die so entstehenden 10 ml

Waschlösung werden mit Ethanol 1:100 verdünnt. Der Anteil an Pikrinsäure in der Waschlösung wird bei 358 nm am Photometer bestimmt ($\epsilon = 14.500$).

Vergleich mit der Ausbeuteberechnung aus Fmoc-Abspaltung

Vorschrift siehe 9.3.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur manuellen Peptidsynthese.

Aminosäure	Einwaage [mg]	eq ¹	Kupplg ²	Kupplungsdauer	Ausbeute	
					(Fmoc) ³	(Pikrinsäure) ⁴
Harz	140				86%	100%
Ala	12	1.5	2	30, 60 min	98%	99%
Phe	10	1	1	60 min	65%	68%

Tabelle 18: Ausbeuten zum Vergleich mit der Ausbeuteberechnung aus Fmoc-Abspaltung 9.3.7.

¹ bezogen auf die eingewogene Harzmenge, ² Anzahl der Kupplungen, ³ Die Ausbeute wird auf die jeweils vorangehende Kupplung, bzw. Harzbelegung bezogen und durch Messung der UV-Absorption des in der Fmoc-Abspaltung gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt, ⁴ siehe Durchführung des Pikrinsäureexperiments.

9.4 Untersuchung zum Kupplungsverhalten von α -N-geschützten Aminosäurederivaten in einer Peptidsynthese am Harz

9.4.1 Kupplung von Dmb- und Tmb-geschützten Aminosäurederivaten

Es wurde das Peptid LFD_{OAI}ATW (58) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer	Ausbeute*
Harz	278 mg				92%
Trp	39 mg	1.5	2	30, 60 min	94%
Thr	30 mg	1.5	2	30, 60 min	95%
Ala	23 mg	1.5	2	30, 60 min	86%
Asp(OAI)	30 mg	1.5	2	30, 60 min	98%
Phe	29 mg	1.5	2	30, 60 min	97%
Leu	27 mg	1.5	2	30, 60 min	nicht bestimmt

Tabelle 19: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{OAI}ATW (58).

Manuelle Peptidsynthese von LFD_{OAI}A_{NDmb}TW (59)

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer	Ausbeute*
Harz	278 mg				90%
Trp	39 mg	1.5	2	30, 60 min	98%
Thr	30 mg	1.5	2	30, 60 min	91%
Dmb-Ala	69 mg	3.0	2	30, 60 min	96%
Asp(OAI)	30 mg	1.5	2	30, 60 min	12%
Phe	29 mg	1.5	2	30, 60 min	99%
Leu	27 mg	1.5	2	30, 60 min	nicht bestimmt

Tabelle 20: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{OAI}A_{NDmb}TW (59).

Manuelle Peptidsynthese von LFD_{OAl}A_{NTmb} TW (60)

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer	Ausbeute*
Harz	278 mg				94%
Trp	39 mg	1.5	2	30, 60 min	99%
Thr	30 mg	1.5	2	30, 60 min	82%
Tmb-Ala	74 mg	3.0	2	30, 60 min	92%
Asp(OAl)	30 mg	1.5	2	30, 60 min	25%
Phe	29 mg	1.5	2	30, 60 min	100%
Leu	27 mg	1.5	2	30, 60 min	nicht bestimmt

Tabelle 21: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{OAl}A_{NTmb} TW (60).

*Die Ausbeute wird auf die jeweils vorangehende Kupplung, bzw. Harzbelegung bezogen und durch Messung der UV-Absorption des in der Fmoc-Abspaltung gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt.

9.4.2 Untersuchung zur Kupplung von Hmb-geschützten Aminosäurederivaten

9.4.2.1 Kupplung von Ser_{NHmb} an Thr oder Asp (Ansatz 1)

Vorschrift siehe 9.3.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur manuellen Peptidsynthese. Nach Kupplung des Hmb-geschützten Aminosäurederivats erfolgt keine Acetylierung.

Aminosäure	aus Ansatz	Einwaage [mg]	H ¹ /T ¹	eq ² / Kupplg ³	Kupplungsdauer	Kaiser-Farbttest nach Kupplg	Ausbeute	
							(Fmoc) ⁴	(Pikrinsäure) ⁵
Harz	1 - 12	111				nicht durchgeführt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Asp _{OAl}	1	12	H	3 / 3	30, 60, 90 min			
Thr	2 - 12	24	H	3 / 3	30, 60, 90 min			
Ser _{NHmb}	1	16	T	1.5 / 2	30, 60 min			
Ser _{NHmb}	2	21	H	2 / 2	30, 60 min			
Ser _{NHmb}	3	21	T	2 / 2	30, 60 min			
Ser _{NHmb}	4	31	H	3 / 2	30, 60 min			
Ser _{NHmb}	5	31	T	3 / 2	30, 60 min			
Ser _{NHmb}	6	62	T	6 / 2	30, 60 min			
Ser _{NHmb}	7	31	T	3 / 2	3h, 3h			
Ser _{NHmb}	8	31	T	3 / 2	22h, 17h	neg.	81 %	74 %
Ser _{NHmb}	9	31	T	3 / 2	25h, 23h	neg.	92 %	81 %
Ser _{NHmb}	10	31	T	3 / 2	24h, 72h	neg.	96 %	85 %
Ser _{NHmb}	11	31	T	3 / 3	16h, 23h, 62h	neg.	112 %	82 %
Ser _{NHmb}	12	31	T	3 / 3	25h, 47h, 68h	neg.	138 %	86 %

Tabelle 22: Angaben zur Kupplung von S_{NHmb} an (harzgebundenem) Thr oder Asp (Ansatz 1).

* Thr ungecapt, ¹ Aktivierung mit H = 1eq HATU, 1eq DIPEA oder T = 1eq TBTU, 1eq HOBT, 1.5eq DIPEA (eq bezogen auf die eingesetzte Aminosäure), ² bezogen auf die eingewogene Harzmenge, ³ Anzahl der Kupplungen, ⁴ Die Ausbeute wird auf die jeweils vorangehende Kupplung, bzw. Harzbelegung bezogen und durch Messung der UV-Absorption des in der Fmoc-Abspaltung gelösten Metylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt, ⁵ siehe Durchführung des Pikrinsäureexperiments.

9.4.2.2 Kupplung von Asn_{NHmb} an Thr

Vorschrift siehe 9.3.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur manuellen Peptidsynthese. Nach Kupplung des Hmb-geschützten Aminosäurederivats erfolgt keine Acetylierung.

Aminosäure	aus Ansatz	Einwaage [mg]	H ¹ /T ¹	eq ² / Kupplg ³	Kupplungsdauer	Kaiser-Farbttest nach Kupplg	Ausbeute (Fmoc) ⁴	
Harz	13 – 14	111				nicht durchgeführt	nicht bestimmt	
Thr	13 – 14	24	H	3 / 3	30, 60, 90 min			
Asn _{NHmb}	13	59	H	4 / 1	über Nacht		78 %	
Asn _{NHmb}	14	59	T	4 / 1	über Nacht		72 %	
Harz	15 – 18	28					nicht bestimmt	
Thr	15 – 18	6	H	3 / 3	30, 60, 90 min			
Asn _{NHmb}	15	15	T	4 / 3	30, 60, 90 min			pos.
Asn _{NHmb}	16	30	T	8 / 3	30, 60, 90 min			pos.
Asn _{NHmb}	17	9	T	2.5 / 2	24h, 16h			neg.
Asn _{NHmb}	18	15	T	4 / 2	24h, 16h			neg.

Tabelle 23: Angaben zur Kupplung von N_{NHmb} an (harzgebundenem) Thr.

^xIndices siehe 9.4.2.1.

9.4.3 Untersuchung zur Kupplung von Asp_{OAI} an ein Festphasen-gebundenes und Hmb-geschütztes Aminosäurederivat

9.4.3.1 Kupplung von Asp_{OAI} an Ser_{NHmb} Thr (aus 9.4.2.1)

Vorschrift siehe 9.3.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur manuellen Peptidsynthese.

Aminosäure	aus Ansatz	Einwaage [mg]	H ¹ /T ¹	eq ² / Kupplg ³	Kupplungsdauer	Chloraniltest nach Kupplg	Ausbeute	
							(Fmoc) ⁴	(Pikrinsäure) ⁵
Asp _{OAI}	6	12	T	1.5 / 2	30, 60 min	nicht durchgeführt	35-100%	nicht bestimmt
Asp _{OAI}	2	16	H	2 / 2	30, 60 min		38-100%	
Asp _{OAI}	3	16	T	2 / 2	30, 60 min		51-100%	
Asp _{OAI}	4	24	H	3 / 2	30, 60 min		54-100%	
Asp _{OAI}	7	40	T	5 / 2	3h, 3h	pos.	39-100%	42 %
Asp _{OAI}	8	40	T	5 / 2	23h, 16h	pos.	53-100%	68 %
Asp _{OAI}	9	40	T	5 / 2	24h, 24h	neg.	63-100%	81 %
Asp _{OAI}	10	40	T	5 / 2	22h, 72h	neg.	66-100%	80 %
Asp _{OAI}	11	40	T	5 / 3	24h, 23h, 67h	neg.	74-100%	94 %
Asp _{OAI}	12	40	F**	5 / 3	23h, 49h, 66h	neg.	94-100%	100 %

Tabelle 24: Angaben zur Kupplung von N_{NHmb} an (harzgebundenem) Thr.

^xIndices siehe 9.4.2.1, ergänzend zu ⁴: aufgrund des "doppelten" Fmoc-Wertes (siehe Abbildung 31) ist eine Ausbeutedifferenz angegeben, ** F : TFFH, Aktivierung mit 1eq TFFH, 2eq DIPEA (eq bezogen auf die eingesetzte Aminosäure)

9.4.3.2 Kupplung von Asp_{OAI} an (harzgebundenem) Asn_{NHmb} Thr (aus 9.4.2.2)

Vorschrift siehe 9.3.1.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur manuellen Peptidsynthese.

Aminosäure	aus Ansatz	Einwaage [mg]	H ¹ /T ¹	eq ² / Kupplg ³	Kupplungsdauer	Chloraniltest nach Kupplg	Ausbeute (Fmoc) ⁴
Asp _{OAI}	13	32	H	4 / 2	3h, 3h	nicht durchgeführt	42-100%
Asp _{OAI}	14	32	T	4 / 2	3h, 3h		46-100%
Asp _{OAI}	15	8	T	4 / 3	30, 60, 90 min	pos.	nicht bestimmt
Asp _{OAI}	16	6	T	3 / 2	24h, 16h	neg.	
Asp _{OAI}	17	6	T	3 / 3	24h, 24h, 16h	neg.	

Tabelle 25: Angaben zur Kupplung von Asp_{OAI} an (harzgebundenem) Asn_{NHmb} Thr (aus 9.4.2.2).

^xIndices siehe 9.4.2.1, ergänzend zu ⁴: aufgrund des "doppelten" Fmoc-Wertes (siehe Abbildung 31) ist eine Ausbeutedifferenz angegeben.

9.4.3.3 Kupplung des symmetrisches Anhydrids von Asp_{OAI} **61** an Ser_{NHmb} Thr (aus 9.4.2.1)

N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-asparaginsäure-β-allylester (10 eq bezogen auf die eingewogene Harzmenge) und DCC (5 eq) werden unter Stickstoffatmosphäre und unter Rühren in wenig abs. DCM gelöst und über 20 min gerührt. Der ausfallende weiße Niederschlag wird über eine Glasfritte, ebenfalls unter Schutzgas abgenutscht und mit wenig abs. DCM gewaschen.¹²¹ Das vereinte Filtrat wird zur Kupplung auf das Harz gegeben. Es wird 2 h geschüttelt⁹⁷. Der anschließende Chloranil-Farbttest ist positiv, d.h. die Kupplung war nur unvollständig.

9.4.4 Untersuchung zur Kupplung weiterer Aminosäure-Derivate

9.4.4.1 Kupplung von Phe an (harzgebundenem) Asp_{OAl}Ser_{NHmb}Thr (aus 9.4.3.1)

Vorschrift siehe 9.3.1.1 zur manuellen Peptidsynthese.

Aminosäure	aus Ansatz	Einwaage [mg]	H ¹ /T ¹	eq ² / Kupplg ³	Kupplungsdauer	TNBS-Farbttest nach Kupplg	Ausbeute	
							(Fmoc) ⁴	(Pikrinsäure) ⁵
Phe	2	12	H	1.5 / 2	30, 60 min	nicht durchgeführt	53-100%	nicht bestimmt
Phe	4	12	H	1.5 / 2	30, 60 min		37-100%	
Phe	6	12	H	1.5 / 2	30, 60 min		63-100%	
Phe	3	12	T	1.5 / 2	30, 60 min		66-100%	
Phe	7	12	T	1.5 / 2	30, 60 min	pos.	49-100%	66 %
Phe	8	31	T	4 / 3	30, 60, 90 min	neg.	78-100%	88 %
Phe	9	31	T	4 / 3	1h, 2h, 3h	neg.	101%	94 %

Tabelle 26: Angaben zur Kupplung von Phe an (harzgebundenem) Asp_{OAl}Ser_{NHmb}Thr (aus 9.4.3.1).

*Indices siehe 9.4.2.1, ergänzend zu ⁴: aufgrund des "doppelten" Fmoc-Wertes (siehe Abbildung 31) ist eine Ausbeutedifferenz angegeben.

9.4.4.2 Kupplung von Ser an (harzgebundenem) Asp_{OAl}Asn_{NHmb}Thr (aus 9.4.3.2)

Vorschrift siehe 9.3.1.1 zur manuellen Peptidsynthese.

Aminosäure	aus Ansatz	Einwaage [mg]	H ¹ /T ¹	eq ² / Kupplg ³	Kupplungsdauer	TNBS-Farbttest nach Kupplg	Ausbeute	
							(Fmoc) ⁴	(Pikrinsäure) ⁵
Ser	13	12	H	1.5 / 2	30, 60 min	nicht durchgeführt	65-100%	nicht bestimmt
Ser	14	12	T	1.5 / 2	30, 60 min		55-100%	
Ser	15	8	T	4 / 3	30, 60, 90 min	neg.	nicht bestimmt	

Tabelle 27: Angaben zur Kupplung von Ser an (harzgebundenem) Asp_{OAl}Asn_{NHmb}Thr (aus 9.4.3.2).

*Indices siehe 9.4.2.1, ergänzend zu ⁴: aufgrund des "doppelten" Fmoc-Wertes (siehe Abbildung 31) ist eine Ausbeutedifferenz angegeben.

9.5 Glycopeptidsynthesen

9.5.1 Vergleich der Ausbeuten nach Glycosylierung von Asp direkt N-terminal neben N_{NHmb} und Sar

Manuelle Peptidsynthese von GSD_{OAI}N_{NHmb}T (**62**)

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer	Ausbeute*
Harz	278 mg				76 %
Thr	30 mg	1.5	2	30, 60 min	94 %
Asn _{NHmb} **	147 mg	4.0	1	über Nacht	72 %
Asp _{OAI}	79 mg	4.0	2	3h, 3h	84 %
Ser	29 mg	1.5	2	30, 60 min	65-100 %
Gly	22 mg	1.5	2	30, 60 min	74-100 %

Tabelle 28: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von GSD_{OAI}N_{NHmb}T (**62**).

*Die Ausbeute wird auf die jeweils vorangehende Kupplung, bzw. Harzbelegung bezogen und durch Messung der UV-Absorption des in der Fmoc-Abspaltung gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt. Aufgrund des "doppelten" Fmoc-Wertes (siehe Abbildung 31) ist teilweise eine Ausbeutedifferenz angegeben, ** Nach Kupplung des Hmb-geschützten Asn erfolgt keine Acetylierung.

Die nun folgende Deallylierung, Glycosylierung mit GlcNAc, Abspaltung und Aufarbeitung erfolgt nach Standardverfahren (siehe 9.3.3.1, 9.3.4.3, 9.3.5 und 9.3.6). Das Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (8.66 min) → 40/60 (30.31 min) → 0/100 (34.64 min) → 0/100 (38.96 min), R_t (GSN(β -D-GlcNAc)_{N_{NHmbAc}}T) = 6.3 min, R_t (GSNN_{N_{NHmbAc}}T) = 7.5 min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden durch Maldi-TOF-MS und NMR identifiziert.

Ausbeute:

9.4 mg (10.2 μmol) GSN(β -D-GlcNAc) N_{NHmbAc} T (**63**), entsprechend 21% und 0.6 mg (0.9 μmol) GSNN N_{NHmbAc} T (**64**), entsprechend 2% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung: GSN(β -D-GlcNAc) N_{NHmbAc} T (**63**)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Gly-5	Ser-4	Asn-3	Asn N_{NHMBAC} -2	Thr-1
NH	8.186	8.153	8.427		8.208
CH α_1	3.733	4.167	4.556	5.044	3.890
CH α_2 / β_1		3.568	2.559	2.692	3.704
CH β_2			2.427	2.416	
CH γ					0.891

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc	8.599	8.083	4.811	3.612	3.371	3.281	3.331	3.857	3.727

Tabelle 29: NMR-Daten zu **63**.

Wie das 1D $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, ist der Zucker eindeutig β -verknüpft. Das Signal des C-1-Protons spaltet zum Triplett mit einer Kopplungskonstanten von 9.76 Hz.

Maldi-TOF (m/z) = 936.12 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 952.20 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_{17}$ (913.89 g/mol)

GSNN N_{NHmbAc} T (**64**)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Gly-5	Ser-4	Asn-3	Asn N_{NHMBAC} -2	Thr-1
NH	8.185	8.153	8.433		8.206
CH α_1	3.749	4.182	5.072	5.261	3.907
CH α_2 / β_1		3.590	2.682	2.810	3.712
CH β_2			2.438	2.560	
CH γ					0.908

Tabelle 30: NMR-Daten zu (**64**).

Maldi-TOF (m/z) = 733.11 [M+Na]⁺, 749.06 [M+K]⁺.

C₂₉H₄₂N₈O₁₃ (710.70 g/mol)

9.5.2 Synthese von SVN(β-D-GlcNAc)FTDNAKT (68)

Es wurde das Peptid SVD_{OAI}F_{NHmbAc}TDNAKT (67) bis Thr-6 nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.2 synthetisiert.

Aminosäure	Harz	Thr	Lys	Ala	Asn	Asp	Thr
Einwaage	278 mg	79 mg	94 mg	62 mg	119 mg	82 mg	79 mg

Tabelle 31: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese bis Thr-6.

Die Peptidsynthese wird nun manuell fortgesetzt (siehe Allgemeine Arbeitsvorschrift 9.3.1.1).

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Phe _{NHmb} *	104 mg	4	2	17h, 25h
Asp _{OAI} **	79 mg	4	2	3h, 3h
Val	25 mg	1.5	2	30, 60 min
Ser	28 mg	1.5	2	30, 60 min

Tabelle 32: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese (Teil 2).

* Nach Kupplung des Hmb-geschützten Phe erfolgt keine Acetylierung, ** Unter Aktivierung mit 1eq TFFH, 1eq HOBt, 2eq DIPEA (eq bezogen auf die eingesetzte Aminosäure).

Die nun folgende Deallylierung, Glycosylierung mit GlcNAc, Abspaltung und Aufarbeitung erfolgt nach Standardverfahren (siehe 9.3.3.1, 9.3.4.3, 9.3.5 und 9.3.6). Vor Abspaltung wird 15 minütig in einer 20%igen Piperidin/DMF-Lösung geschüttelt. Das Rohprodukt (41.3 mg) wird über HPLC an einer RP C-18 Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (8.66 min) → 40/60 (30.31 min) → 0/100 (34.64 min) → 0/100 (38.96 min), R_t (SVN(β-D-GlcNAc)FTDNAKT) = 12.83 min, R_t (SVNFTDNAKT) = 15.63 min, R_t (SVN(β-D-GlcNAc)F_{NHmbAc}TDNAKT) = 18.85 min, R_t (SVNF_{NHmbAc}TDNAKT) = 20.37 min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden durch Maldi-TOF-MS und NMR identifiziert.

Ausbeute:

13.28 mg (9.9 μmol) SVN(β -D-GlcNAc)FTDNAKT (**68**), entsprechend 20%, 5.3 mg (4.7 μmol) SVNFTDNAKT (**69**), entsprechend 9%, 8.3 mg (5.4 μmol) SVN(β -D-GlcNAc) F_{NHmbAc} TDNAKT (**70**), entsprechend 11%, 4.1 mg (3.1 μmol) SVNF $_{\text{NHmbAc}}$ TDNAKT (**71**), entsprechend 6%. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung: SVN(β -D-GlcNAc)FTDNAKT (**68**)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Ser-10	Val-9	Asn-8	Phe-7	Thr-6	Asp-5	Asn-4	Ala-3	Lys-2	Thr-1
NH	8.200	8.053	8.211	8.317	7.902	8.244	8.207	8.044	8.172	7.973
NH									7.352	
$\text{CH}\alpha_1$	4.184	4.418	4.409	4.471	4.059	4.422	4.404	4.047	4.123	4.018
$\text{CH}\alpha_2/\beta_1$	3.586	2.878	2.639	2.590		2.584	2.644	1.161	1.565	3.915
$\text{CH}\beta_2$			2.553	2.448		2.522	2.558		1.444	
$\text{CH}\gamma$		0.605			0.966				1.214	0.926
$\text{CH}\delta$									1.443	
$\text{CH}\epsilon$									2.754	

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc	8.505	8.068	4.788	3.576	3.349	3.245	3.903	3.713	

Tabelle 33: NMR-Daten zu **68**.

Wie das 1D $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, ist der Zucker eindeutig β -verknüpft. Das Signal des C-1-Protons spaltet zum Triplet mit einer Kopplungskonstanten von 9.35 Hz.

Maldi-TOF (m/z) = 1362.56 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1378.59 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{56}\text{H}_{90}\text{N}_{16}\text{O}_{22}$ (1340.41 g/mol)

SVN(β -D-GlcNAc) F_{NHmbAc} TDNAKT (**70**)

Maldi-TOF (m/z) = 1541.05 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1557.13 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{66}\text{H}_{100}\text{N}_{16}\text{O}_{25}$ (1518.60 g/mol)

SVNFTDNAKT (69)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Ser-10	Val-9	Asn-8	Phe-7	Thr-6	Asp-5	Asn-4	Ala-3	Lys-2	Thr-1
NH	8.205	8.364	8.188	8.201	7.864	8.319	8.206	7.988	8.154	7.936
NH									7.299	
CH α_1	4.388	3.843	4.393	4.388	4.018	4.418	4.383	3.993	4.075	3.988
CH α_2/β_1	3.542	1.696	2.872	2.637	3.973	2.482	2.542	1.116	1.592	3.873
CH β_2			2.762	2.532		2.407	2.467		1.511	
CH γ		0.596			0.921				1.174	0.871
CH γ		0.541							1.168	
CH δ									1.400	
CH ϵ									2.712	

Tabelle 34: NMR-Daten zu **69**.

Maldi-TOF (m/z) = 1159.35 [M+Na]⁺, 1175.38 [M+K]⁺.

C₄₈H₇₆N₁₄O₁₈ (1137.22 g/mol)

SVNF_{NHmbAc}TDNAKT (71)

Maldi-TOF (m/z) = 1337.57 [M+Na]⁺, 1353.37 [M+K]⁺.

C₅₈H₈₆N₁₄O₂₁ (1315.41 g/mol)

9.5.3 Synthese von WGSN(β -D-GlcNAc)NTE (73)

Es wurde das Peptid WGD_{OAl}N_{NHmb}TE (72) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift

9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage [mg]	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Harz	278			
Glu	85	4	2	30 min, 16h
Thr	80	4	2	30, 60 min
Asn _{NHmb} *	110	3	2	44h, 98h
Asp _{OAl}	99	5	3	23h, 24h, 23h
Ser	77	4	2	30, 60 min
Gly	59	4	2	30 min, 64h
Trp	105	4	2	30, 120 min

Tabelle 35: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von WGD_{OAl}N_{NHmb}TE (72).

* Nach Kupplung des Hmb-geschützten Asn erfolgt keine Acetylierung.

Die nun folgende Deallylierung, Glycosylierung mit GlcNAc, Abspaltung und Aufarbeitung erfolgt nach Standardverfahren (siehe 9.3.3.1, 9.3.4.3, 9.3.5 und 9.3.6). Vor Abspaltung wird 30 minütig in einer 20%igen Piperidin/DMF-Lösung geschüttelt. Das Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (8.66 min) \rightarrow 40/60 (34.64 min) \rightarrow 0/100 (38.96 min) \rightarrow 0/100 (47.62 min), R_t (WGSN(β -D-GlcNAc)NTE) = 20.04 min, R_t (WGSNNTE) = 21.15 min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden durch Maldit-TOF-MS und NMR identifiziert.

Ausbeute:

7.4 mg (6.0 μ mol) WGSN(β -D-GlcNAc)NTE (73), entsprechend 12% und 4.6 mg (4.5 μ mol) WGSNNTE (74), entsprechend 9% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung: WGSN(β -D-GlcNAc)NTE (73)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Trp-7	Gly-6	Ser-5	Asn-4	Asn-3	Thr-2	Glu-1
NH	8.070	8.230	7.895	8.358	8.340	7.350	8.148
$\text{CH}\alpha_1$	4.275	3.544	4.462	4.874	4.874	3.836	4.294
$\text{CH}\alpha_2/\beta_1$	2.945		3.485	2.579	2.579	3.746	2.071
$\text{CH}\beta_2$				2.300	2.300		
$\text{CH}\gamma$						0.798	2.983
$\text{CH}\gamma$							2.907
H-2	7.007						

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc	8.525	8.035	4.717	3.485	3.258	3.132	3.197		3.594

Tabelle 36: NMR-Daten zu 73.

Wie das 1D $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, ist der Zucker eindeutig β -verknüpft. Das Signal des C-1-Protons spaltet zum Triplet mit einer Kopplungskonstanten von 9.71 Hz.

Maldi-TOF (m/z) = 1251.42 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1267.39 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1289.34 $[\text{M}+\text{K}+\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{53}\text{H}_{73}\text{N}_{13}\text{O}_{21}$ (1229.23 g/mol)

WGSNNTE (74)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Trp-7	Gly-6	Ser-5	Asn-4	Asn-3	Thr-2	Glu-1
NH	8.097	8.045	7.914	8.259	8.338	7.361	8.135
$\text{CH}\alpha_1$	4.515	3.767	4.284	5.487	5.094	4.019	4.200
$\text{CH}\alpha_2/\beta_1$	3.176		3.701	2.822	2.789	3.965	2.021
$\text{CH}\beta_2$	3.107			2.652	2.526		1.855
$\text{CH}\gamma$						1.005	2.334
H-2	7.198						

Tabelle 37: NMR-Daten zu 74.

Maldi-TOF (m/z) = 1048.46 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1064.41 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 1070.34 $[\text{M}+2\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{45}\text{H}_{59}\text{N}_{11}\text{O}_{17}$ (1026.04 g/mol)

9.5.4 Synthese von LFN(komplex-Typ-Decasaccharid)SarT (75)

Es wurde das Peptid LFD_{OAI}SarT (54) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage [mg]	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Harz	278			
Thr	30	1.5	2	60 min, 16h
Sar	47	3	2	30h, 64.5h
Asp _{OAI}	99	5	3	24.5h, 23h, 23h
Phe	29	1.5	2	30, 60 min
Leu	27	1.5	2	30, 60 min

Tabelle 38: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{OAI}SarT (54).

Es wird eine Harzprobe (ca. 1/100) abgenommen und nach Standardverfahren deallyliert. Das mehrstündig im Hochvakuum getrocknete Harz (500 nmolarer Ansatz) wird unter Stickstoff-Atmosphäre mit DMF bedeckt und 20 min zum Quellen stehengelassen. Nach Absaugen wird das frisch gequollene Harz mit einer ebenfalls unter Schutzgas frisch zubereiteten Lösung bestehend aus 1-β-Amino-Decasaccharid (0.9 mg, 503.6 nmol), TBTU (1.2 mg, 3.6 μmol) und DIPEA (1 μl, 3.6 μmol) in wenig DMF bedeckt und über Nacht geschüttelt. Im Anschluß wird das Harz mit DMF, Isopropanol und schließlich DCM gewaschen. Es wird nach Standardverfahren abgespalten. Das Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 Säule aufgereinigt (Eluent C/Eluent D 90/10 → 90/10 (3.93 min) → 60/40 (19.64 min) → 0/100 (27.49 min) → 0/100 (31.42 min), R_t (LFN(komplex-Typ Decasaccharid)SarT) = 3.76 min, R_t (LFNSarT) = 13.86 min, Flußrate 5 ml/min). Die Produkte werden durch Maldi-TOF-MS identifiziert.

Ausbeute:

0.1 mg (42 nmol) LFN(komplex-Typ Decasaccharid)SarT (75), entsprechend 8 % bezogen auf den eingesetzten Zucker.

Maldi-TOF (m/z) = 2397.79 [M+Na]⁺, 2416.47 [M+K]⁺.

C₉₆H₁₅₆N₁₂O₅₇ (2375.35 g/mol)

LFNSarT (56)

Maldi-TOF (m/z) = 628.24 [M+Na]⁺, 644.21 [M+K]⁺.

C₂₈H₄₃N₇O₈ (605.70 g/mol)

9.5.5 Versuch zur Synthese von LFN(komplex-Typ Decasaccharid)GT (77)

Es wurde das Peptid LFD_{OAl}G_{NHmb}T (76) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift

9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage [mg]	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Harz	278			
Thr	30	1.5	2	60 min, 16h
Gly _{NHmb} *	65	3	2	30h, 64.5h
Asp _{OAl} **	99	5	3	24.5h, 23h, 23h
Phe	29	1.5	2	30, 60 min
Leu	27	1.5	2	30, 60 min

Tabelle 39: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{OAl}G_{NHmb}T (76).

* Nach Kupplung des Hmb-geschützten Gly erfolgt keine Acetylierung, ** Unter Aktivierung mit 1eq TFFH, 1eq HOBt und 2eq DIPEA (eq bezogen auf die eingesetzte Aminosäure).

Es wird eine Harzprobe (ca. 1/100) abgenommen und nach Standardverfahren deallyliert, mit 1-β-Amino-decasaccharid des komplexen Typs nach der Vorschrift in 9.5.4 glycosyliert und schließlich abgespalten. Das Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (3.93 min) → 60/40 (19.64 min) → 0/100 (27.49 min) → 0/100 (31.42 min), R_t (LFNG_{HmbAc}T) = 22.12 min, Flußrate 5 ml/min). Das Produkt wird durch Maldi-TOF-MS identifiziert.

Ausbeute:

0.3 mg (390 nmol) LFNG_{HmbAc}T (78), entsprechend 78 % bezogen auf die eingesetzte Harzprobe.

Maldi-TOF (m/z) = 770.21 [M+H]⁺, 793.31 [M+Na]⁺, 809.25 [M+K]⁺.

C₃₇H₅₁N₇O₁₁ (769.86 g/mol)

9.5.6 Synthese von LFN(β -D-GlcNAc)STWGSN(β -D-GlcNAc)NTE (**80**)

Es wurde das Peptid LFD_{ODmab}S_{NHmb}TWGSD_{OAl}N_{NHmb}TE (**79**) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage [mg]	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Harz	278			
Glu	85.10	4	2	30 min, 16h
Thr	79.50	4	2	30, 60 min
Asn _{NHmb} *	109.93	3	2	44h, 98h
Asp _{OAl}	98.85	5	3	24h, 24h, 23h
Ser	76.69	4	2	30, 60 min
Gly	59.46	4	2	30, 64h
Trp	105.32	4	2	30, 60 min
Thr	79.50	4	2	30, 60 min
Ser _{NHmb} *	77.94	3	2	65h, 4d
Asp _{ODmab} **	166.68	5	3	24h, 70h
Phe	77.49	4	2	30, 60 min
Leu	70.68	4	2	30, 60 min

Tabelle 40: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von LFD_{ODmab}S_{NHmb}TWGSD_{OAl}N_{NHmb}TE (**79**).

* Nach Kupplung der Hmb-geschützten Aminosäurederivate erfolgt keine Acetylierung, ** Nach Kupplung von Asp_{ODmab}-10 werden alle folgenden Fmoc-Abspaltungen mit DBU durchgeführt (siehe 9.3.2).

Die Durchführung der folgenden Arbeitsschritte erfolgt jeweils nach den Standardverfahren (siehe 9.3.3.1, 9.3.3.3, 9.3.4.3, 9.3.5 und 9.3.6). Nach selektivem Abspalten der Dmab-Schutzgruppe und Glycosylierung mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminylamin wird deallyliert und erneut mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminylamin selektiv an zweiter Stelle glycosyliert. Das Rohprodukt wird vom Harz abgespalten und über HPLC an einer RP C-18 Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (8.66 min) → 60/40 (30.31 min) → 0/100 (34.64 min) → 0/100 (43.29 min), R_t (Diglycosyliertes Peptid) = 19.96 min, R_t (Monoglycosylierte Peptide) = 21.32-21.55 min, R_t (Peptid) = 22.01 min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden durch ¹H-NMR und Maldi-TOF-MS identifiziert.

Ausbeute:

1.6 mg (0.8 μmol) $\text{LFN}(\beta\text{-D-GlcNAc})\text{S}_{\text{NHmbAc}}\text{TWGSN}(\beta\text{-D-GlcNAc})\text{N}_{\text{NHmbAc}}\text{TE}$ (**80**),
entsprechend 2%, 11.9 mg (6.0 μmol) $\text{LFNS}_{\text{NHmbAc}}\text{TWGSN}(\beta\text{-D-GlcNAc})\text{N}_{\text{NHmbAc}}\text{TE}$ (**81**),
bzw. $\text{LFN}(\beta\text{-D-GlcNAc})\text{S}_{\text{NHmbAc}}\text{TWGSNN}_{\text{NHmbAc}}\text{TE}$ (**82**), entsprechend (zusammen) 12%,
2.7 mg (1.5 μmol) $\text{LFNS}_{\text{NHmbAc}}\text{TWGSNN}_{\text{NHmbAc}}\text{TE}$ (**83**), entsprechend 3%. Alle
Prozentangaben beziehen sich auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung: $\text{LFN}(\beta\text{-D-GlcNAc})\text{S}_{\text{NHmbAc}}\text{TWGSN}(\beta\text{-D-GlcNAc})\text{N}_{\text{NHmbAc}}\text{TE}$ (**80**)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Leu 12	Phe 11	Asn 10	Ser 9	Thr 8	Trp 7	Gly 6	Ser 5	Asn 4	Asn 3	Thr 2	Glu 1
NH	8.420	8.477	8.763		8.317	8.531	8.394	8.372	8.869		8.497	8.686
$\text{CH}\alpha_1$	4.300	4.654	5.155		4.380	4.721	3.873	4.447	5.234		4.393	4.373
CH^*	1.504	3.116	2.841		4.215	3.366		3.879	2.914		4.306	2.157
$\text{CH}\beta_2$		2.988	2.573			3.311			2.682			2.011
$\text{CH}\gamma$					1.187						1.259	2.432
$\text{CH}\gamma$												
$\text{CH}\delta$	0.900											
H-2						7.562						

* $\text{CH}\alpha_1/\beta_2$

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc 1	8.952	8.453	5.082	3.842	3.635	3.507	3.562	4.038	3.952
GlcNAc 2	8.935	8.453	5.082	3.842	3.635	3.507	3.560	4.035	3.952

Tabelle 41: NMR-Daten zu **80**.

Wie das 1D $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, sind die Zucker eindeutig β -verknüpft. Die Signale der C-1-Protonen spalten jeweils zum Triplet.

Maldi-TOF (m/z) = 2173.73 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 2195.79 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 2111.75 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 2217.72 $[\text{M}+2\text{Na}]^+$.

$\text{C}_{97}\text{H}_{135}\text{N}_{21}\text{O}_{36}$ (2173.25 g/mol)

LFNS_{NHmbAc}TWGSN(β -D-GlcNAc)N_{NHmbAc}TE (**81**), bzw.

LFN(β -D-GlcNAc)S_{NHmbAc}TWGSNN_{NHmbAc}TE (**82**)

Maldi-TOF (m/z) = 1970.04 [M+H]⁺, 1992.35 [M+Na]⁺, 2008.54 [M+K]⁺, 2014.60 [M+2Na]⁺.

C₈₉H₁₂₁N₁₉O₃₂ (1970.05 g/mol)

LFNS_{NHmbAc}TWGSNN_{NHmbAc}TE (**83**)

Maldi-TOF (m/z) = 1767.81 [M+H]⁺, 1789.38 [M+Na]⁺, 1795.29 [M+K]⁺, 1811.90 [M+2Na]⁺.

C₈₁H₁₀₇N₁₇O₂₈ (1766.86 g/mol)

LFNSTWGSNNTE (**84**)

(Nach Behandlung mit 20% Piperidin/DMF und TFA/TIPS/H₂O 95:5:2)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Leu 12	Phe 11	Asn 10	Ser 9	Thr 8	Trp 7	Gly 6	Ser 5	Asn 4	Asn 3	Thr 2	Glu 1
NH	8.055	8.021	8.408	8.117	8.081	8.020	8.192	8.016	8.440	8.317	8.128	8.211
CH α_1	4.154	4.596	4.651	4.350	4.235	4.585	3.777	4.332	4.660	4.669	4.241	4.230
CH*	1.371	3.221	2.714	3.791	3.777	3.762		3.760	2.745	2.745	3.788	2.031
CH β_2						3.210			2.696	2.696		1.889
CH γ	1.032				1.114						1.120	2.333
CH δ	0.776											
CH δ												
H-2						7.183						

Tabelle 42: NMR-Daten zu **84**.

* CH α_1 / β_2

Maldi-TOF (m/z) = 1589.38 [M+H]⁺, 1611.25 [M+Na]⁺, 1627.54 [M+K]⁺.

C₇₁H₉₇N₁₇O₂₅ (1588.67 g/mol)

9.5.7 Synthese von LFN(1- β -Amino-chitobiose)SarTWGSN(β -D-GlcNAc)SarTE (**86**)

Es wurde das Peptid LFD_{ODmab}SarTWGSD_{OAl}SarTE (**85**) nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.2 synthetisiert.

Aminosäure	Glu	Thr	Sar	Asp _{OAl}	Ser	Gly
Einwaage [mg]	85	79	62	79	77	59
Aminosäure	Trp	Thr	Sar	Asp _{ODmab}	Phe	Leu
Einwaage [mg]	105	79	62	133	77	71

Tabelle 43: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese von LFD_{ODmab}SarTWGSD_{OAl}SarTE (**85**).

Es werden 278 mg Harz eingewogen. Die Durchführung der folgenden Arbeitsschritte erfolgt jeweils nach den Standardverfahren (siehe 9.3.3.1, 9.3.3.3, 9.3.4.3, 9.3.5 und 9.3.6). Nach selektivem Abspalten der Dmab-Schutzgruppe und Glycosylierung mit 1- β -Amino-chitobiose wird deallyliert und anschließend mit 2-N-Acetyl-D-glucosaminyllamin selektiv an zweiter Stelle glycosyliert. Das Rohprodukt wird vom Harz abgespalten. Es wird versucht das Rohprodukt über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule aufzureinigen (Eluent A/Eluent B 90/10 \rightarrow 90/10 (7.85 min) \rightarrow 70/30 (23.56 min) \rightarrow 60/40 (35.34 min) \rightarrow 0/100 (39.27 min) \rightarrow 0/100 (47.12 min), R_t (Diglycosyliertes Peptid) = 23.10 min, R_t (mit 1- β -Amino-chitobiose monoglycosyliertes Peptid) = 22.81 min, R_t (mit β -D-GlcNAc monoglycosyliertes Peptid) = 22.02 min, R_t (Peptid) = 21.37 min, Flußrate 5 ml/min). Die Produkte werden durch Maldi-TOF-MS und NMR identifiziert.

Ausbeute:

1.8 mg (0.9 μ mol) LFN(1- β -Amino-chitobiose)SarTWGSN(β -D-GlcNAc)SarTE (**86**), entsprechend 2%, 9.9 mg (5.6 μ mol) LFNSarTWGSN(β -D-GlcNAc)SarTE (**87**), entsprechend 11%, 2.9 mg (1.9 μ mol) LFN(1- β -Amino-chitobiose)SarTWGSNSarTE (**88**), entsprechend 4%, 10.0 mg (7.4 μ mol) LFNSarTWGSNSarTE (**89**), entsprechend 15%. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die eingewogene Harzmenge.

Charakterisierung: LFN(1- β -Amino-chitobiose)SarTWGSN(β -D-GlcNAc)SarTE (86)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Leu 12	Phe 11	Asn 10	Sar 9	Thr 8	Trp 7	Gly 6	Ser 5	Asn 4	Sar 3	Thr 2	Glu 1
NH	8.028	8.111	8.306		7.886	8.134	8.109	7.997	8.472		8.331	8.112
CH α_1	4.143	4.242	4.990	3.766	4.221	4.557	3.775	4.306	5.098	3.397	4.275	4.242
CH*		3.769	2.768	3.667	4.077	3.204		3.729	2.780	3.409	4.137	2.918
CH β_2			2.546			2.994			2.546			2.802
CH γ	1.363				1.039						1.147	3.151
CH δ	0.757											
H-2						7.186						

* CH α_1/β_2

Chitobiose	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc Chi1	8.529	8.044	4.935	3.717	3.506	3.383	3.452	3.763	3.916
GlcNAc Chi2		8.274	4.454	3.656	3.454	3.222	3.369	3.756	3.868
GlcNAc	8.561	8.072	4.949	3.717	3.506	3.393	3.428		

Tabelle 44: NMR-Daten zu (86).

Maldi-TOF (m/z) = 1981.14 [M+Na]⁺, 1997.14 [M+K]⁺, 2003.14 [M+2Na]⁺.

C₈₄H₁₂₇N₂₁O₃₃ (1961.01 g/mol)

LFN(1- β -Amino-chitobiose)SarTWGSNSarTE (88)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Leu 12	Phe 11	Asn 10	Sar 9	Thr 8	Trp 7	Gly 6	Ser 5	Asn 4	Sar 3	Thr 2	Glu 1
NH	8.028	8.152	8.305		7.883	8.131	8.125	8.004	8.463		8.111	8.112
CH α_1	4.147	4.597	5.003	4.455	4.219	4.556	3.790	4.330	5.094	4.455	4.250	4.560
CH*		3.208	2.766	3.488	4.076	3.228		3.748	2.784	3.670	3.798	2.984
CH β_2			2.554			3.181			2.554			2.857
CH γ	1.368				1.043						1.123	3.202
CH γ												
CH δ	0.757											
H-2						7.186						

* CH α_1/β_2

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc 1	8.537	8.082	4.939	3.751	3.634	3.420	3.567	3.795	3.629
GlcNAc 2		8.274	4.265	3.665	3.481	3.390	3.442	3.898	3.687

Tabelle 45: NMR-Daten zu **88**.

Wie das 1D ¹H-NMR-Spektrum zeigt, ist der Zucker eindeutig β-verknüpft. Das Signal des C-1-Protons spaltet zum Triplet mit einer Kopplungskonstanten von 9.35 Hz.

Maldi-TOF (m/z) = 1778.69 [M+Na]⁺, 1795.58 [M+K]⁺.

C₇₆H₁₁₃N₁₉O₂₉ (1757.81 g/mol)

LFNSarTWGSN(β-D-GlcNAc)SarTE (**87**)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Leu 12	Phe 11	Asn 10	Sar 9	Thr 8	Trp 7	Gly 6	Ser 5	Asn 4	Sar 3	Thr 2	Glu 1
NH	8.307	7.991	8.514		8.188	8.136	8.029	8.112	8.625		8.195	8.478
CH _α ₁	4.176	4.331	5.006	3.678	4.243	4.572	4.155	4.579	5.110	3.770	4.243	4.280
CH*	1.416	3.786	2.796	3.465	4.097	3.248		3.800	2.784		4.097	2.051
CH _β ₂	1.355	3.731	2.564			3.197			2.564			1.899
CH _γ					1.056						1.056	2.381
CH _γ												
CH _δ	0.781											
H-2						7.183						

* CH_α₁/β₂

	NH-1	NH-2	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'
GlcNAc	8.689	8.336	4.976	3.736	3.523	3.401	3.457		3.854

Tabelle 46: NMR-Daten zu **87**.

Wie das 1D ¹H-NMR-Spektrum zeigt, ist der Zucker eindeutig β-verknüpft. Das Signal des C-1-Protons spaltet zum Triplet mit einer Kopplungskonstanten von 9.35 Hz.

Maldi-TOF (m/z) = 1555.12 [M+H]⁺, 1577.15 [M+Na]⁺, 1593.10 [M+K]⁺, 1599.09 [M+2Na]⁺.

C₆₈H₁₀₀N₁₈O₂₄ (1554.64 g/mol)

LFNSarTWGSNSarTE (**89**)

¹H-NMR (H₂O/D₂O 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Leu 12	Phe 11	Asn 10	Sar 9	Thr 8	Trp 7	Gly 6	Ser 5	Asn 4	Sar 3	Thr 2	Glu 1
NH	8.420	8.518	8.801		8.296	8.545	8.415	8.402	8.642		8.310	8.660
CH α_1	4.307	4.696	5.250		4.376	4.732	3.904	4.501	5.144		4.376	4.407
CH*	1.517	3.155	2.884		4.233	3.385		3.898	2.878		4.233	2.185
CH β_2		3.021	2.703			3.333			2.659			2.035
CH γ					1.192						1.192	2.503
CH γ												
CH δ	0.900											
H-2						7.587						

Tabelle 47: NMR-Daten zu **89**.

* CH α_1/β_2

Maldi-TOF (m/z) = 1374.18 [M+Na]⁺, 1391.01 [M+K]⁺, 1396.98 [M+2Na]⁺.

C₆₀H₈₆N₁₆O₂₀ (1351.45 g/mol)

LFNSarTWGSNSarTE (**90**)*

*methylierte Form

Maldi-TOF (m/z) = 1389 [M+Na]⁺, 1405 [M+K]⁺.

C₆₁H₈₇N₁₅O₂₁ (1366.46 g/mol)

9.5.8 Darstellung der V3-Loop aus dem GP120

Es wurde die V3-Sequenz bis Thr-28 nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.2 synthetisiert.

Aminosäure	Harz	Cys	His	Ala	Gln	Arg
Einwaage [mg]	556	234	248	124	244	260
Aminosäure	Ile	Asp	Gly	Ile	Ile	Glu
Einwaage [mg]	142	164	118	142	142	170
Aminosäure	Gly	Thr	Ala	Tyr	Phe	Ala
Einwaage [mg]	118	158	124	184	154	124

Aminosäure	Arg	Gly	Pro	Gly	Ile	His
Einwaage [mg]	260	118	134	118	142	248
Aminosäure	Ile	Ser	Lys	Arg	Thr	
Einwaage [mg]	142	154	188	260	158	

Tabelle 48: Einwaagen zur automatisierten Peptidsynthese, 1. Teil V3-Loop.

Die Peptidsynthese wird nun manuell fortgesetzt (siehe Allgemeine Arbeitsvorschrift 9.3.1.1).

Aminosäure	Einwaage [mg]	eq bez. auf den ersten Teil	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer
Asn _{NHmb} *	64	3	2	70h, 65h
Asp _{OAl} **	59	5	3	24h, 23h, 23h
Ser	46	4	3	30, 60, 90 min
Pro	40	4	3	30, 60 min, 87h
Arg	78	4	3	30, 60, 90 min
Thr	48	4	3	30, 60 min, 16h
Cys	70	4	3	30, 60, 120 min

Tabelle 49: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese, 2. Teil V3-Loop.

* Nach Kupplung des Hmb-geschützten Asn erfolgt keine Acetylierung, ** Unter Aktivierung mit 1eq TFFH, 1eq HOBt und 2eq DIPEA (eq bezogen auf die eingesetzte Aminosäure).

Ausbeute: Die Ausbeute beträgt nach 28 Aminosäuren 28.5 µmol, entsprechend 28% bezogen auf die eingewogene Harzmenge und nach 35 Aminosäuren mindestens noch 14.1 µmol, entsprechend 14%. Sie wird durch Messung der UV-Absorption des in der jeweils terminalen Fmoc-Abspaltung gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt.

Charakterisierung: Es wird eine Harzprobe entnommen und das gebildete Produktgemisch standardmäßig abgespalten, um es per Maldi-TOF-MS zu analysieren. Das gewünschte Produkt (die V3-Sequenz) wird, an seiner Glycosylierungsstelle mit Allyl-geschützt **91**, eindeutig identifiziert ($C_{178}H_{278}N_{56}O_{52}S_2$ (4098.64 g/mol), $[M+H]^+ = 4099$, $[M+Na]^+ = 4121$).

Die Durchführung der folgenden Arbeitsschritte erfolgt jeweils nach den Standardverfahren (siehe 9.3.3.1, 9.3.4.3, 9.3.5 und 9.3.6). Nach selektivem Abspalten

der Allyl-Schutzgruppe und Glycosylierung mit 1-β-Amino-chitobiose wird das Harz zur Deacetyl- bzw. Deacylierung der phenolischen OH-Gruppen an Hmb über 30 min in einer 20% Piperidin/DMF-Lösung geschüttelt und im Anschluß mehrfach mit DMF gewaschen. Das Rohprodukt wird vom Harz abgespalten und unter Bildung einer Disulfidbrücke weiterverarbeitet (Durchführung siehe 9.3.5). Der wasserlösliche Anteil wird über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule (Eluent A/Eluent B 80/20 → 80/20 (7.85 min) → 60/40 (23.56 min) → 0/100 (27.49 min) → 0/100 (35.34 min), $R_t = 13.2\text{-}15.0$ min, Flußrate 5 ml/min) aufgereinigt. Die vereinten HPLC-Fractionen werden per Maldi-TOF-MS analysiert. Die berechneten Molmassen von der nichtglycosylierten V3-Loop mit Disulfidbrücke **92** ($C_{165}H_{264}N_{56}O_{49}S_2$ (3880.4 g/mol), Maldi-TOF (m/z) = 3878 $[M+H]^+$, 3900 $[M+Na]^+$, 3916 $[M+K]^+$), der nichtglycosylierten, Hmb-geschützten V3-Loop **93** ($C_{173}H_{272}N_{56}O_{51}S_2$ (4016.55 g/mol), Maldi-TOF (m/z) = 4015 $[M+H]^+$, 4037 $[M+Na]^+$, 4053 $[M+K]^+$), der einfach mit 1-β-Amino-chitobiose glycosylierten V3-Loop **94** ($C_{181}H_{292}N_{58}O_{59}S_2$ (4288.8 g/mol), Maldi-TOF (m/z) = 4308 $[M+Na]^+$, 4322 $[M+K]^+$), ihrer methylierten Form **95** ($C_{182}H_{294}N_{58}O_{59}S_2$ (4302.83 g/mol), Maldi-TOF (m/z) = 4300 $[M+H]^+$, 4321 $[M+Na]^+$, 4337 $[M+K]^+$) und der einfach mit 1-β-Amino-chitobiose glycosylierten und Hmb-geschützten V3-Loop **96** ($C_{189}H_{300}N_{58}O_{61}S_2$ (4424.95 g/mol), Maldi-TOF (m/z) = 4422 $[M+H]^+$, 4444 $[M+Na]^+$, 4461 $[M+K]^+$, 4484 $[M+K+2Na]^{3+}$) können mittels Maldi-TOF-MS bestätigt werden.

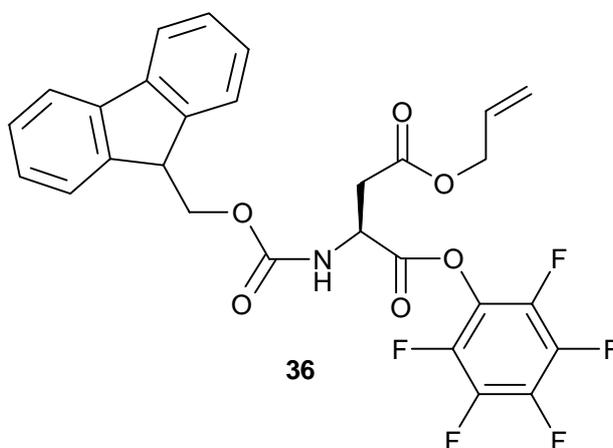
Die durch HPLC gewonnenen Fraktionen werden anschließend affinitätschromatographisch an einer WGA-Säule in glycosylierte und nicht glycosylierte Produkte aufgetrennt. Die Entsalzung und Trennung vom Eluenten GlcNAc wird an einer G10-Sephadex Entsalzungssäule per Größenausschlußchromatographie durchgeführt. Abschließend werden die so voneinander getrennten Rohproduktgemische abermals über HPLC an einer RP C-18 analogen Säule (Eluent A/Eluent B 80/20 → 80/20 (7.85 min) → 60/40 (23.56 min) → 0/100 (27.49 min) → 0/100 (35.34 min), R_t (GlcNAc) = 3.76 min, R_t (Produkte) = 13.2-15.0 min, Flußrate 5 ml/min) aufgereinigt. Die HPLC-Fractionen werden per Maldi-TOF-MS analysiert. Sie enthalten die drei glycosylierten Produkte **94**, **95** und **96**, allerdings in nicht wägbaren Mengen, so daß eine weitere Autrennung der glycosylierten Produkte nicht erfolgt. Eine Ausbeute wird nicht bestimmt.

9.6 Untersuchung zum Einsatz von Pseudoprolin

9.6.1 Darstellung von N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-allylester-1-pentafluorphenylester (**36**)

Fmoc-Asp(OAl)-OH (3.95 g, 10 mmol) wird in 30 ml trockenem THF gelöst und in einem Eisbad gerührt. Es wird Pentafluorphenol (2.02 g, 11 mmol) in 10 ml trockenem THF gelöst und zugegeben, gefolgt von DCC (2.17 g, 10.5 mmol) in ebenfalls 10 ml trockenem THF. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht gerührt. Es wird filtriert und der Rückstand zweimal mit 10 ml trockenem THF gewaschen. Das vereinte Filtrat wird zur Trockene eingeeengt. Der weiße Rückstand wird über Kieselgel (Laufmittel Chloroform) gereinigt.

Ausbeute: 5.61 g (9.81 mmol) N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-allylester-1-pentafluorphenylester (**36**), entsprechend 98% bezogen auf N^α-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-asparaginsäure-4-allylester.



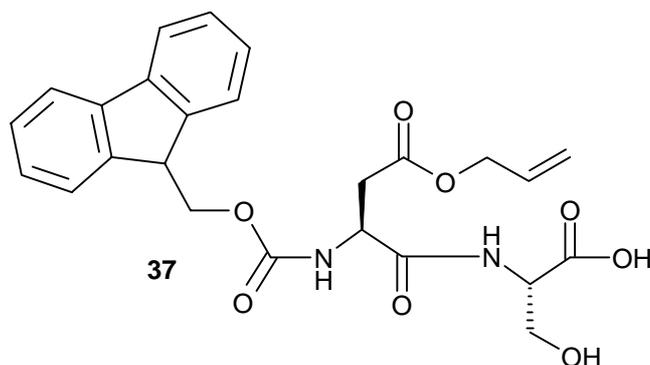
DC: R_f-Wert (Chloroform/MeOH/9:1) = 0.50

C₂₈H₂₀F₅NO₆ (561.47 g/mol)

9.6.2 Darstellung des Dipeptids **37**

L-Serin (3.15 g, 30 mmol) wird in wenig 10%iger (w/v) Natriumcarbonat-Lösung gelöst und einer gerührten Suspension von Fmoc-Asp(OAl)-Pfp (5.61 g, 9.81 mmol) in 80 ml Aceton zugesetzt. Nach ca. 2 h wird das Reaktionsgemisch mit einer 2 M Salzsäure in einem Eisbad auf pH 1 angesäuert. Das Reaktionsgemisch wird

anschließend am Rotationsverdampfer auf ca. die Hälfte des Volumens eingengt und zweimal gegen 150 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Es wird zweimal mit je 100 ml Wasser gegen geschüttelt und die organ. Phasen im Anschluß über MgSO_4 getrocknet, sowie zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wird *in situ* umgesetzt, also nicht weiter aufgereinigt und charakterisiert.

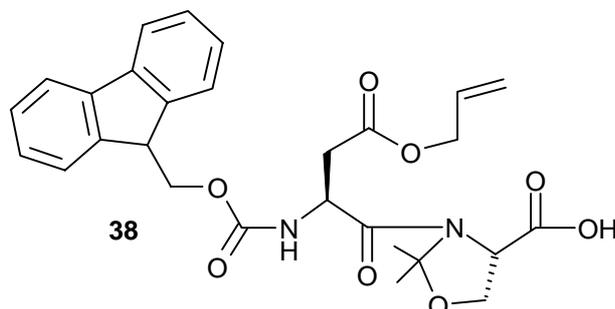


9.6.3 Darstellung des Pseudoprolins **38**

Das Dipeptid **37** wird als Rohprodukt in 100 ml trockenem THF unter Zugabe von etwas ausgeheiztem Molsieb und Rühren gelöst. Es werden Pyridinium-4-toluolsulfonat (250 mg, 1 mmol) und 2,2-Dimethoxypropan (3 ml, 25 mmol) zugegeben. Die Suspension wird über mehrere Stunden unter N_2 -Atmosphäre und Rückfluß gekocht und dann zum Abkühlen auf Raumtemperatur stengelassen. Der gelben Lösung wird Triethylamin zugegeben (210 μl , 1.5 mmol) und dann zur Trockene eingengt.

Der Rückstand wird in Ethylacetat (150 ml) wiederaufgenommen, dreimal mit je 70 ml Wasser gewaschen, anschließend über MgSO_4 getrocknet und schließlich zur Trockene eingengt. Das Produkt wird per Maldi-TOF-MS identifiziert. Das Edukt kann nicht identifiziert werden.

Charakterisierung: Pseudoprolin-Synthesebaustein, Fmoc-D_{OAl}S($\Psi^{Me,Me}$)pro-OH (**38**)



Maldi-TOF (m/z) = 545.42 [M+Na]⁺, 561.39 [M+K]⁺.

C₂₈H₃₀N₂O₈ (522.56 g/mol)

9.6.4 Darstellung von FD_{OAl}S($\Psi^{Me,Me}$)proT (**39**)

Es wurde das Peptid **39** nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 9.3.1.1 synthetisiert.

Aminosäure	Einwaage	eq bez. auf Harzbelegung	Kupplungsanzahl	Kupplungsdauer	Ausbeute*
Harz	278 mg				86%
Thr	30 mg	1.5	2	30, 60 min	97%
D _{OAl} S($\Psi^{Me,Me}$)pro	78 mg	3	2	60, 90 min	70%
Phe	29 mg	1.5	2	30, 60 min	97%

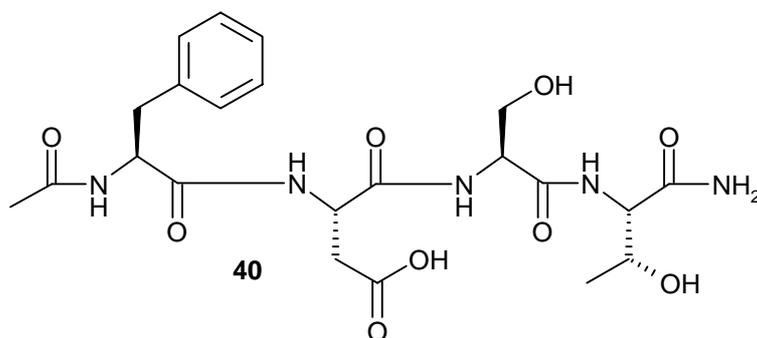
Tabelle 50: Einwaagen zur manuellen Peptidsynthese von FD_{OAl}S($\Psi^{Me,Me}$)proT (**39**).

*Die Ausbeute wird auf die jeweils vorangehende Kupplung, bzw. Harzbelegung bezogen und durch Messung der UV-Absorption des in der Fmoc-Abspaltung gelösten Methylenfluorens bei 301 nm ($\epsilon = 7950$) bestimmt.

Die nun folgende Deallylierung, Glycosylierung mit GlcNAc, Abspaltung und Aufarbeitung erfolgt nach Standardverfahren (siehe 9.3.3.1, 9.3.4.3, 9.3.5 und 9.3.6). Das Rohprodukt wird über HPLC an einer RP C-18 Säule aufgereinigt (Eluent A/Eluent B 90/10 → 90/10 (6.49 min) → 40/60 (23.81 min) → 0/100 (28.14 min) → 0/100 (36.80 min), R_t (FDST) = 9.86 min, Flußrate 20 ml/min). Die Produkte werden durch Maldi-TOF-MS und NMR identifiziert.

Ausbeute:

12.6 mg (24.82 μmol) FDST (**40**), entsprechend 50% bezogen auf die eingewogene Harzmenge.



$^1\text{H-NMR}$ ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 5 (TFA), 500 MHz):

ppm	Phe-4	Asp-3	Ser-2	Thr-1
NH	8.197	8.436	8.166	7.983
$\text{CH}\alpha_1$	4.522	4.658	4.390	4.214
$\text{CH}\alpha_2/\beta_1$	3.051	2.763	3.830	
$\text{CH}\beta_2$	2.939	2.637		
$\text{CH}\gamma$				1.141

Tabelle 51: NMR-Daten zu **40**.

Maldi-TOF (m/z) = 532.21 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 548.35 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_9$ (509.52 g/mol)

10 Sicherheitshinweise

Substanzname	Gefahren-symbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetaldehyd	F+, Xn	12-36/37-40	16-33-36/37
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Allylalkohol	T, N	10-23/24/25-36/37/38-50	36/37/39-38-45-61
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	22	
O-(Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat	Xi	36/37/38	26-36
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat	Xi	36/37/38	26-36
O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat	Xi	36/37/38	26-36
tButylmethylether	F	11-66	16-23.2-29-33
CDCl ₃	Xn	20/22-38-40-48	36/37
p-Chloranil	Xi, N	36/38-50/53	37-60-61
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
α-Cyano-4-hydroxymethylsäure	Xn	20/21/22-36/37/38	26-36
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	C	22-34-52/53	26-36/37/39-45-61
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	T	22-24-41-43	24-26-37/39-45
Diethylether	F+, Xn	12-19-22-66-67	(2-)9-16-29-33
1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol	T	23/24/25-33	36/37-45
2,5-Dihydroxybenzoesäure			24/25
N,N'-Diisopropylcarbodiimid	T+	10-26-41	24-26-28.1-39-45
N,N'-Diisopropylethylamin	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-61
2,2-Dimethoxypropan	F, Xi	11-36-66	9-16-26
4-Dimethylaminopyridin	T	25-36/38	37-45
N,N'-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	Xi	36/38	26
Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40	16-36/37
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16

Substanzname	Gefahren-symbole	R-Sätze	S-Sätze
2-Ethylhexansäure	Xn	63	36/37
9-Fluorenylmethylchlorformiat	C	20/21/22-34	26-36/37/39-45
9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat			22-24/25
Hydrazin	T, N	45-E23/24/25-34-43-50/53	53-26-36/37/39-45-60-61
2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd	Xi	36/38	
Hydroxybenzotriazol	F	11	
Kalilauge	C	22-35	26-36/37/39-45
Kaliumcyanid	T+, N	26/27/28-32-50/53	7-28.1-29-45-60-61
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
4-Methylmorpholin	F, C	11-21/22-34	16-23.2-26-36/37/39-45
Morpholin	C	10-20/21/22-34	23.2-36-45
Natrium	F, C	14/15-34	5.3-8-43.7-45
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumborhydrid	F, T	15-25-34	14.2-26-36/37/39-43.6-45
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natriumcyanoborhydrid	F, C	15-32-34	26-36/37/39-43.6-45
Natriumdiethyldithiocarbaminat	Xn	22	
Natriummethanolat	C, F	11-14-34-36/37/38	26-36
Natronlauge	C	35	26-37/39-45
Ninhydrin	Xn	22-36/37/38	
Pentafluorphenol	Xn	21/22	36/37
Phenol	T	24/25-34	28.6-45
Pikrinsäure	E, T	2-4-23/24/25	35-36/37-45
Piperidin	F, T	11-23/24-34	16-26-27-45
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Pyrrolidin	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure	C	35	26-30-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0)			22-24/25
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61
Triisopropylsilan	Xi	10-36/37/38	26-36

Substanzname	Gefahren -symbole	R-Sätze	S-Sätze
2,4,6-Trinitrobenzol- sulfonsäure	Xn	20/21-36	26-28-36
Triphenylphosphin	Xn, N	43-48/20/22-50/53	22-24-37
Zitronensäure	Xi	36	24/25

Tabelle 52: Sicherheitshinweise

11 Literaturverzeichnis

- ¹ H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* (1993) 218, 1-27.
- ² D. Voet, J.G. Voet, Biochemie, VCH Weinheim (1992) 575.
- ³ L. Stryer, Biochemie, Spektrum Akad. Verlag (1990) 4.Auflage.
- ⁴ A. Gottschalk (Hrsg.), Glycoproteins, Vol. 1 & 2, Elsevier, Amsterdam (1972).
- ⁵ N. Sharon, H. Lis, *Spektrum d. Wiss.* (1993) 3, 66-74.
- ⁶ S.J. Singer, *Annu. Rev. Biochem.* (1974) 43, 805.
- ⁷ T.W. Rademacher, R.B. Parekh, R.A. Dwek, *Ann. Rev. Biochem.* (1988) 57, 785-838.
- ⁸ I. Christiansen-Brams, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin I* (1993) 1461-1471.
- ⁹ S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* (1992) 61, 307-330.
- ¹⁰ R.C. Gallo, S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, P.D. Markham, *Science* (1984) 224, 500-503.
- ¹¹ E. Helseth, U. Olshevsky, C. Furmann, J. Sodroski, *J. Virol.* (1991) 65, 2119-2123.
- ¹² P.D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R.W. Sweet, J. Sodroski, W.A. Hendrickson *Nature* (1998) 393, 648-659.
- ¹³ J.E. Hansen, O. Lund, J.O. Nielsen, S. Brunak, J.E.S. Hansen, *Proteins* (1996) 25, 1-11.
- ¹⁴ C. Seeberger, Unveröffentlichte Ergebnisse.
- ¹⁵ L. Kasturi, J.R. Eshleman, W.H. Wunner, S.H. Shakin-Eshleman, *J. Biol. Chem.* (1995) 270, 14756-14761.
- ¹⁶ E. Fenouillet, J.C. Gluckma, I.M. Jones, *Trends Biochem. Sci.* (1994) 19, 65-70.
- ¹⁷ R.A. Gryters, J.J. Neefjes, M. Tersmette, R.E.V. De Goede, G. Huismann, F. Miedema, H.L. Ploegh, *Nature* (1987) 330, 74-77.
- ¹⁸ Y. Li, L. Luo, N. Rasool, C.Y. Kang, *J. Virol.* (1993) 67, 584-588.
- ¹⁹ E. Fenouillet *et al.*, *J. Exp. Med.* (1989) 169, 807-822.
- ²⁰ L. Dirx, D. Lindemann, C. Manzoni, D. Moritz, J. Mous, *Virus Res.* (1990) 18, 9-20.
- ²¹ A. Blomstedt, B. Losman, M. Biller, B. Svennerholm, S. Olofson, Abstracts of the XIV International Symposium on Glycoconjugates (1997) 140.
- ²² K. Schönning, B. Jansson, S. Olofson, J.E. Stig Hansen, *Virology* (1996) 218, 134-140.
- ²³ P.N. Nehete, R.B. Arlinghaus, K.J. Sastry, *J. Virol.* (1993) 67, 6841-6846.
- ²⁴ P.E. Stephens, G. Clements, G.T. Yarranton, *Nature* (1990) 343, 219.
- ²⁵ M. Schreiber, H. Petersen, C. Wachsmuth, H. Müller, F.T. Hufert, H. Schmitz, *J. Virol.* (1994) 68, 3908-3916.

- ²⁶ N. Yahia, J. Fantini, K. Mabrouk, C. Tamalet, H. Rochat, P. de Micco, J. van Rietschoten, J.M. Sabatier, *J. Virol.* (1994) 68, 5714-5720.
- ²⁷ P.N. Nehete, R.B. Arlinghaus, K.J. Sastry, *J. Virol.* (1993) 67, 6841-6846.
- ²⁸ M. Meldal, K. Bock, *Glycoconj. J.* (1994) 11, 59-63.
- ²⁹ C. Unverzagt, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* (1994) 2, 1189-1201.
- ³⁰ L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.* (1972) 37, 3404-3409.
- ³¹ L.A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* (1993) 115, 4397.
- ³² G.E. Reid, R.J. Simpson, *Anal. Biochem.* (1992) 200, 301-309.
- ³³ D.A. Pearson, M. Blanchette, M.L. Baker, C.A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* (1989) 2739-2742.
- ³⁴ F. Albericio, M. Cases, J. Alsina, S.A. Triolo, L.A. Carpino, S.A. Kates, *Tetrahedron Lett.* (1997) 38, 4853.
- ³⁵ J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* (1990) 31, 205.
- ³⁶ R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillissen, *Tetrahedron Lett.* (1989) 30, 15, 1927-1930.
- ³⁷ L.A. Carpino, M. Beyermann, H. Wendschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* (1996) 29, 268-274.
- ³⁸ L.A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.* (1995) 117, 5401-5402.
- ³⁹ L.A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* (1994) 35, 2279-2282.
- ⁴⁰ I. Annis, B. Hargittai, G. Barany, *Meth. Enzym.* (1997) 289, 198-220.
- ⁴¹ J.P. Tam, C.-R. Wu, W. Liu, J.-W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* (1991) 113, 6657-6662.
- ⁴² J. Kihlberg, M. Elofsson, L.A. Salvador, *Meth. Enzym.* (1997) 289, 221-245.
- ⁴³ M. Quibell, L.C. Packman, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* (1996) 1227-1234.
- ⁴⁴ F. Albericio, N. Kneib-Cordonier, S. Biancalana, L. Gera, R.I. Masada, D. Hudson, G. Barany, *J. Org. Chem.* (1990) 55, 3730-3743.
- ⁴⁵ P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* (1987) 28, 1637-1640.
- ⁴⁶ S.T. Anisfeld, P.T. Lansbury, *J. Org. Chem.* (1990) 55, 5560-5562.
- ⁴⁷ M. Bodanczky, J.Z. Kwei, *Int. J. Peptide Protein Res.* (1978) 12, 69-74.
- ⁴⁸ C. Hyde, T. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R.C. Sheppard, *Int. J. Peptide Protein Res.* (1994) 43, 431-440.
- ⁴⁹ M. Quibell, T. Johnson, W.G. Turnell, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* (1994) 1, 3-12.
- ⁵⁰ M. Quibell, W.G. Turnell, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions I* (1995) 128, 2019-2024.
- ⁵¹ M. Quibell, L.C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* (1995) 117, 11656-11668.
- ⁵² T. Johnson, M. Quibell, R.C. Sheppard, *J. Pept. Sci.* (1995) 1, 11-25.

- ⁵³ T. Johnson, L.C. Packman, C.B. Hyde, D. Owen, M. Quibell, *J. Chem. Soc., Perkin.Trans. I* (1996) 719-728.
- ⁵⁴ J.G. Wilson, *Aust. J. Chem.* (1990) 43, 1283-1289.
- ⁵⁵ T. Johnson, M. Quibell, *Tetrahedron Lett.* (1994) 35, 463-466.
- ⁵⁶ M. Quibell, W.G. Turnell, T. Johnson, *J. Org. Chem.* (1994) 59, 1745-1750.
- ⁵⁷ L.M. Likkosherstov, O.S. Novikova, V.A. Derevitskaja, N.K. Kochetkov, *Carbohydr.Res.* (1986) 146, C1-C5.
- ⁵⁸ C.H. Bolton und R.W. Jeanloz, *J. Org. Chem.* (1963) 28, 3228.
- ⁵⁹ R.B. Caballero, *Carbohydr. Res.* (1986) 154, 280.
- ⁶⁰ C.D. Warren, S. Nakabayashi, R.W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* (1987) 169, 221-223.
- ⁶¹ S.T. Cohen-Anisfeld, P.T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* (1993) 115, 10531-10537.
- ⁶² A. Adachi, H.E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, M.A. Martin, *Journal of Virology* (1986), 59, 284-291.
- ⁶³ M. Tessier, F. Albericio, E. Pedroso, A. Grandas, R. Eritja, E. Giralt, C. Granier, J. van Rietschoten, *Int. J. Peptide Protein Res.* (1983) 22, 125-128.
- ⁶⁴ S.F. Bochnitschek, H. Waldmann, H. Kunz, *J. Org. Chem.* (1989) 54, 751-756.
- ⁶⁵ N.J. Ede, K.H. Ang, I.W. James, A.M. Bray, *Tetrahedron Lett.* (1996) 37, 9097-9100.
- ⁶⁶ M. Mergler, R. Nyfeler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* (1988) 29, 4009.
- ⁶⁷ R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 2559-2560.
- ⁶⁸ B. Keil, *Laboratoriumstechnik der Organ. Chemie*, Akademie-Verlag, Berlin (1961) 424, 254-258.
- ⁶⁹ D.R. Bolin, I.-I. Sytwu, F. Humiec, J. Meienhofer, *Int. J. Peptide Protein Res.* (1989) 33, 353-359.
- ⁷⁰ F. Ende, *Diplomarbeit* (1997) 59.
- ⁷¹ P. Marfey, *Carlsberg Res. Commun.* (1986) 49, 591-596.
- ⁷² S. Kochhar, P. Christen, *Anal. Biochem.* (1989) 178, 17-21.
- ⁷³ J.G. Adamson, T. Hoang, A. Crivici, G.A. Lajoie, *Anal. Biochem.* (1992) 202, 210-214.
- ⁷⁴ D.J. Aberhart, J.A. Cotting, *Meth. Enzym.* (1988) 166, 14-17.
- ⁷⁵ G. Szokan, G. Mezo, F. Hudecz, *J. Chromatogr.* (1988) 444, 115-122.
- ⁷⁶ E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.* (1970) 34, 595-598.
- ⁷⁷ B.F. Gisin, *Anal. Chim. Acta* (1972) 58, 248-249.
- ⁷⁸ E. Nicolas, M. Pujades, J. Bacardit, E. Giralt, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* (1997) 2317-2320.
- ⁷⁹ J.H. Short, C.W. Ours, *J. Heterocycl. Chem.* (1975) 12, 869-876.

- ⁸⁰ A.B. Clippingdale, M. Macris, J.D. Wade, C.J. Barrow, *J. Peptide Res.* (1999) 53, 665-672.
- ⁸¹ J. Offer, *Tetrahedron Lett.* (1997) 38, 52, 9047-9050.
- ⁸² H. Günther, NMR-Spektroskopie, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1992) 372-376.
- ⁸³ T. Johnson, M. Quibell, D. Owen, R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1993) 369-372.
- ⁸⁴ T. Vojkowsky, *Pept. Res.* (1995) 8, 236-237.
- ⁸⁵ H. Wendschuh, M. Beyermann, R. Winter, M. Bienert, D. Ionescu, L.A. Carpino, *Tetrahedron Lett.* (1996) 37, 5483.
- ⁸⁶ J.D. Fontenot, J.M. Ball, M.A. Miller, C.M. David, R.C. Montelaro, *Pept. Res.* (1991) 4, 19-25.
- ⁸⁷ W.S. Hancock, J.E. Battersby, *Anal. Biochem.* (1976), 71, 260-264.
- ⁸⁸ S. Meyer, J. Tost, Unveröffentlichte Ergebnisse.
- ⁸⁹ B.M. Tost, *Acc. Chem. Res.* (1980) 11, 385-393.
- ⁹⁰ H. Schwarz, K. Arakawa, *J. Am. Chem. Soc.* (1959), 81, 5691-5695.
- ⁹¹ B. Rohwedder, Y. Mutti, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* (1998) 1175-1178.
- ⁹² J.D. Wade, J. Bedford, R.C. Sheppard, G.W. Tregear, *Peptide Research* (1991) 4, 194-199.
- ⁹³ S. Meyer, Dissertation (1999).
- ⁹⁴ J. Tost, Diplomarbeit (1999).
- ⁹⁵ J. Offer, M. Quibell, T. Johnson, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions I* (1996) 175-182.
- ⁹⁶ M. Quibell, W.G. Turnell, T. Johnson, *Tetrahedron Lett.* (1994) 35, 2237-2238.
- ⁹⁷ R.G. Simmonds, *Int. J. Peptide Res.* (1996) 47, 36-41.
- ⁹⁸ N.A. Sole, G. Barany, *J. Org. Chem.* (1992) 57, 5399-5403.
- ⁹⁹ J. Wuelfken, Unveröffentlichte Ergebnisse.
- ¹⁰⁰ L.C. Packman, M. Quibell, T. Johnson, *Peptide Research* (1994) 3, 125-131.
- ¹⁰¹ G. Talbo, J.D. Wade, N. Dawson, M. Manoussios, G.W. Tregear, *Lett. Pept. Sci.* (1997) 4, 121-127.
- ¹⁰² L. Urge, L. Otvos, *Lett. Pept. Sci.* (1994) 1, 207-212.
- ¹⁰³ A.G. Tomasselli, C.A. Bannow, M.R. Deibel, J.O. Hui, H.A. Zurcher-Neely, I.M. Reardon, C.W. Smith, R.L. Heinrikson, *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 10232-10237.
- ¹⁰⁴ M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr, *Peptide Research* (1995) 8, 145-153.
- ¹⁰⁵ T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* (1996) 118, 9218-9227.

- ¹⁰⁶ W.R. Sampson, H.Patsiouras, N.J. Ede, *J. Pept. Sci.* (1999) 5, 403-409.
- ¹⁰⁷ I. Dalcol, F. Rabanal, M.-D. Ludevid, F. Albericio, E. Giralt, *J. Org. Chem.* (1995) 60, 7575-7581.
- ¹⁰⁸ W.C. Chan, B.W. Bycroft, D.J. Evans, P.D. White, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1995), 2209-2210.
- ¹⁰⁹ B. Riniker, A. Flörsheimer, H. Fretz, P. Sieber, B. Kamber, *Tetrahedron* (1993), 49, 9307-9320.
- ¹¹⁰ C. Gioeli, J.B. Chattopadhyaya, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1982) 672-674.
- ¹¹¹ W. Zeng, P.-O. Regamey, K. Rose, Y. Wang, E. Bayer, *J. Peptide Res.* (1997) 49, 273-279.
- ¹¹² D. Vetter, D. Tumelty, S.K. Singh, M.A. Gallop, *Angew.Chem.* (1995) 107, 94-97.
- ¹¹³ P. Loyd-Williams, G. Jou, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* (1991) 32, 4207-4210.
- ¹¹⁴ S.A. Kates, N.A. Sole, C.R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* (1993), 34, 1549-1552.
- ¹¹⁵ S.A. Kates, B.G. de la Torre, R. Eritja, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* (1994) 35, 1033-1034.
- ¹¹⁶ H. Kunz, H. Waldmann, C. Unverzagt, *Int. J. Peptide Protein Res.* (1985) 26, 493-497.
- ¹¹⁷ R. Deziel, *Tetrahedron Lett.* (1987) 28, 4371.
- ¹¹⁸ P.D. Jeffrey, S.W. McCombie, *J. Org. Chem.* (1982) 47, 587.
- ¹¹⁹ B.K. Handa, E. Keech, *Int. J. Peptide Protein Res.* (1992), 40, 66-71.
- ¹²⁰ A. Oded, R.A. Houghten, *Pept. Res.* (1990) 3, 42-50.
- ¹²¹ E. Atherton, R.C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach*, Oxford University Press (1989).

Ich danke meinen Eltern.

Und:

Angela Kahrs, Axel Neffe, Boris Kröplin, Christian Seeberger, Erika Paul,
Esther Ende, Heiko Möller, Helge Kränz, Ilona Müller, Jan Jänichen, Jan
Wülken, Jan-C. Westermann, Jens Klein, Jörg Dojahn, Jutta Tost, Martina
Krasova, Michael Tiemann, Moriz Mayer, Nicolai Nagorny, Oliver Schuster,
Robert Meinecke, Sonja Meyer, So-Young Shin, Tatjana Ponomarenko,
Thomas Kühnemund, Volker Sinnwell ...

Lebenslauf

31.03.1971 Florian Ende, geboren in Hamburg
verheiratet

03.98 Geburt des Sohnes Frederik Leon

02.00 Geburt des Sohnes Niklas Finn

Schulbildung:

08.77 – 06.81 Grundschule Horn (Hamburg)

08.81 – 06.90 Gymnasium Hamm (Hamburg)

Wehrdienst:

07.90 – 06.91 Panzergrenadierbataillon 72 (Hamburg-Fischbek)

Akademische Ausbildung:

10.91 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität
Hamburg

12.93 Diplomvorprüfung (Note: sehr gut)

11.96 Diplomhauptprüfung (Note: sehr gut)

01.97 – 10.97 Diplomarbeit bei Prof. Dr. B. Meyer am Institut für
Organische Chemie der Universität Hamburg mit dem
Thema: *Untersuchungen zur Darstellung von N-Typ-
Glycopeptiden am Beispiel von Ala-Lys-Trp-Asn(b-D-
GlcNAc)-Asp-Thr*

01.98 – 12.00 Dissertation bei Prof. Dr. B. Meyer am Institut für
Organische Chemie der Universität Hamburg mit dem
Thema: *Untersuchung zur konvergenten Synthese von
festphasengebundenen N-Typ-Glycopeptiden durch
Seitenkettenglycosylierung*

Anstellungsverhältnisse:

04.97 – 10.97 Studentische Hilfskraft für die PC-Betreuung

11.97 – 12.97 Wissenschaftlicher Angestellter an der Medizinischen
Universität zu Lübeck

04.98 – 07.98 Lehrbeauftragter für das Grundpraktikum in Organischer
und Anorganischer Chemie für Medizinstudenten

07.98 – 12.00 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische
Chemie der Universität Hamburg

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.