

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.