# Chemische und enzymochemische Synthese von krebs-assoziierten Glycopeptidstrukturen des Mucins MUC1

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie der
Universität Hamburg

vorgelegt von
**Nida Serttas**
aus Hamburg

Hamburg 2003

Universität Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

Tag der letzten Prüfung: 21.01.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1999 bis Oktober 2002 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. C. Meier, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Paulsen danke ich für die interessante, flexible Themenstellung und für die stets freundliche und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

# I. Inhaltsverzeichnis


## II. Abkürzungsverzeichnis 1

**1. Einleitung** 3

1.1. Struktur und Biosynthese der Glycoproteine 4

1.2. Humane Mucine 6

1.3. Die chemische Synthese von Glycopeptiden 9

1.4. Analytische Methoden zur Charakterisierung von Glycopeptiden

**2. Problemstellung** 14

**3. Ergebnisse und Diskussion** 18

3.1. Synthese von O-glycosylierten MUC1-Glycopeptiden 18

3.2. Darstellung der O-Glycosylaminosäurebausteine 18

*3.2.1. Darstellung des D-GalNAc-α(1-O)-Thr-Bausteins* 18

*3.2.2. Darstellung des D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr-Bausteins* 19

*3.2.3. Darstellung des D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Ser-Bausteins* 20

3.3. Vorbereitende Untersuchungen 22

3.4. Die Festphasensynthese von Glycopeptiden 24

*3.4.1. Die Glycopeptidfestphasensynthese in einem manuellen 20-Loch "multiple-column" Peptidsyntheziser* 24

*3.4.2. Die Multiple Festphasensynthese von Glycopeptiden in Glassäulen* 26

3.5. Synthese von modifizierten MUC1-Glycopeptiden 27

*3.5.1. Befunde von Hanisch et. al. hinsichtlich der Sequenz des MUC1* 27

*3.5.2. Synthese von modifizierten MUC1-Glycopeptiden mit den Monosaccharidbausteinen **8** und **25*** 28

*3.5.3. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide **26** bis **30*** 29

*3.5.4. Synthese von modifizierten Glycopeptiden mit variablen Schnitt der Repeating Unit mit den Monosaccharidbausteinen **8** und **25*** 32

*3.5.5. Synthese von modifizierten Glycopeptiden mit den Disaccharidbausteinen **14** und **24*** 33

*3.5.6. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide **36** bis **45*** 34

3.6. Untersuchungen zur T-Zellstimulation 36
*3.6.1. Assay zur T-Zellstimulation* 36
*3.6.2. Vorläufige Ergebnisse der T-Zellstimulation* 37
3.7. Synthese der Glycopeptide **46-54**, basierend auf der Struktur des Glycopeptids **38=A4** 39

**4. Synthese von Glycopeptiden mit N- und O-Glycosylierungsstellen** 41
4.1. Darstellung des D-GlcNAc-β(1-4)-D-GlcNAc-β(1-N)-Asn-Bausteins 41
4.2. Synthese N- und O-glycosylierter Glycopeptide 43
4.3. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide **63** bis **67** 45

**5. Chemoenzymatische Synthese sialylierter MUC1-Glycopeptide** 46
5.1. Bisherige Versuche 46
5.2. Aufarbeitung der 2,3-Sialyltransferase 47
5.3. Synthese der Glycopeptidsubstrate für die 2,3-Sialyltransferase 48
5.4. Umsatz der Glycopeptide **68** bis **75** mit der 2,3-Sialyltransferase 50
5.5. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide **76** bis **83** 53

**6. Zusammenfassung** 55

**7. Summary**

**8. Experimenteller Teil** 67
*8.1.1. Syntheseapparatur für die Festphasensynthese im Syntheseblock* 68
*8.1.2. Syntheseapparatur für die Festphasensynthese in Glassäulen* 68
8.2. Multiple Festphasensynthese der Glycopeptide **26** bis **30** 68
8.3. Multiple Festphasensynthese der Glycopeptide **36** bis **45** 76
8.4. Multiple Festphasensynthese der Glycopeptide **46** bis **54** 80
8.5. Multiple Festphasensynthese der Glycopeptide **63** bis **67** 91
8.6. Multiple Festphasensynthese der Glycopeptidsubstrate **68** bis **75** 98
8.7. Enzymatische Sialylierung der Glycopeptide **76** bis **83** 100

**9. Literaturverzeichnis** 112

**10. Sicherheitshinweise** 116

# II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| abs. | absolut |
| Ac | Acetyl |
| $Ac_2O$ | Acetanhydrid |
| Boc | 1,1-Dimethylethyloxycarbonyl |
| CMP | Cytidinmonophosphat |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| Dhbt-OH | 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin |
| DIPEA | Ethyldi-(2-propyl)-amin |
| DMF | Dimethylformamid |
| ES | Electronspray |
| Et | Ethyl |
| FID | Free Induction Decay |
| Fmoc | 9-Flourenylmethyloxycarbonyl |
| HATU | *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethyluroniumhexafluorophosphat |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HMQC | Heteronuclear Multiple Quantum Coherence |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| ges. | gesättigt |
| MALDI | Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation |
| MeOH | Methanol |
| MeCN | Acetonitril |
| MHC | Major Histocompability Complex |
| MS | Massenspektrometrie |
| MSNT | 1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1*H*-1,2,3-benzotriazol |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| NOESY | Nuclear Overhauser Enhancement And Exchange Spectroscopy |
| Pbf | 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl |
| PEGA | Polyethylenglycoldimethylacrylamid-Copolymer |
| Pfp | Pentafluorphenyl |
| Pmc | 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl |
| Rink | p-(α-Amino-2,4-dimethoxybenzyl)-phenoxyessigsäure |
| RP | Reversed Phase |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SPPS | Solid Phase Peptide Synthesis |
| TBTU | 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat |
| tBu | 1,1-Dimethylethyl |

| | |
|---|---|
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TMSOTf | Trimethylsilyltrifluormethansulfonat |
| TOCSY | Total Correlation Spectroscopy |
| TOF | Time Of Flight |
| U | Units |

**Kohlenhydrate***

| | |
|---|---|
| Ara | Arabinose |
| Fuc | Fucose |
| GalNAc | 2-Acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranose |
| Glc | Glucose |
| GlcNAc | 2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranose |
| Glu | Glucositol |
| Man | Mannose |
| Neu5Ac | 5-N-Acetylneuraminsäure |
| Rha | Rhamnose |
| Xyl | Xylose |

* Kohlenhydrate ohne Präfix besitzen D-Konfiguration

**Aminosäuren***

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala | A | Alanin | His | H | Histidin | Phe | F | Phenylalanin |
| Arg | R | Arginin | Hyl | | 5-Hydroxylysin | Pro | P | Prolin |
| Asn | N | Asparagin | Hyp | | 4-Hydroxyprolin | Ser | S | Serin |
| Asp | D | Asparaginsäure | Ile | I | Isoleucin | Thr | T | Threonin |
| Gln | Q | Glutamin | Leu | L | Leucin | Tyr | W | Tyrosin |
| Glu | E | Glutaminsäure | Lys | K | Lysin | Val | V | Valin |
| Gly | G | Glycin | Met | M | Methionin | | | |

* Aminosäuren ohne Präfix besitzen L-Konfiguration

# 1. Einleitung

Durch die Verknüpfung von Kohlenhydraten und Proteinen entstehen die in vielen Lebensvorgängen essentiellen Glycoproteine. Sie spielen in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Die in löslicher Form oder in Zellmembranen verankert vorkommenden Glycoproteine können antigen oder rezeptiv wirken (Voet 1994). Veränderungen in der Kohlenhydratzusammensetzung führen zu einer Reihe von komplexen Reaktionen. So exprimieren carcinome Zellen tumorspezifische Glycoproteine mit teilweise verkürzten Saccharidstrukturen, die vom Körper als endogene Antigene erkannt werden (Kim, Varki 1997). Makrophagen, B-Lymphozyten oder dendritische Zellen besitzen auf der Zelloberfläche Immunglobulinstrukturen, die die antigenen Proteine spezifisch binden und nach deren Abbau auf ihrer Oberfläche in Zusammenwirken mit den MHC I bzw. MHC II-Molekül präsentieren.

Während die Prozessierung von Proteinen gut studiert ist, war unklar, ob die Saccharidstrukturen von Glycoproteinen während der Prozessierung und Präsentation im MHC-Komplex erhalten bleiben. *Finn et al.* konnten zeigen, dass bei der Prozessierung von Glycoproteinen durch dendritische Zellen und deren Präsentation im MHC II-Komplex die Saccharidstrukturen mitpräsentiert werden (Vlad, Finn 2002). Bindungsstudien von synthetischen MUC1-Glycopeptiden des Tn-Monosaccharids mit dem MHC I-Molekül zeigten, dass der Saccharidrest die Bindung zum MHC-Komplex deutlich verstärkt (Apostolopoulos, unveröffentlichte Ergebnisse). Glycopeptidstrukturen könnten somit ebenfalls zur Stimulierung von T-Zellen über den MHC-Komplex beitragen.

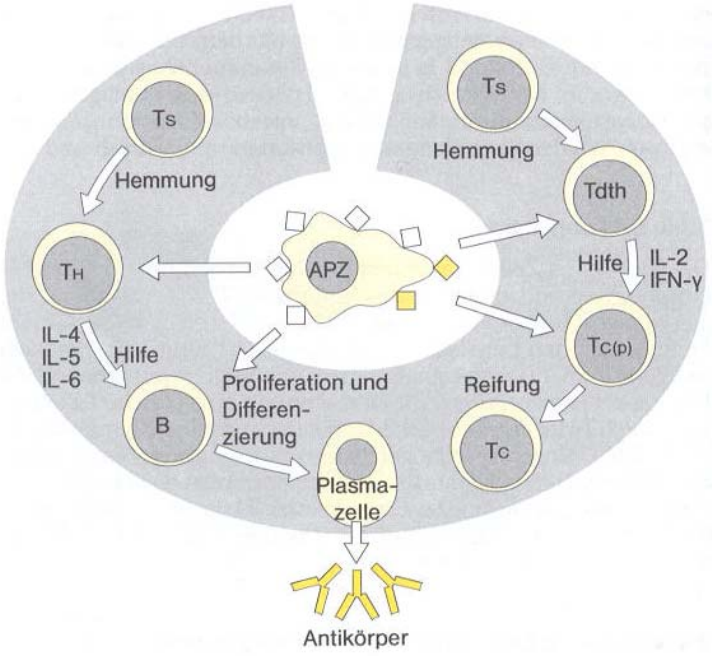



**Abb. 1.1.:** Zellinteraktionen im Rahmen einer Immunantwort. Die von der Antigen präsentierenden Zelle (APZ) präsentierten Antigene werden von verschiedenen Zellen erkannt und es kommt zu einer komplexen Abfolge von Reaktionen. Es bedeuten Tc(p): Cytotoxische T-Zellen, $T_{DTH}$: T-Helferzellen, $T_S$: T-Suppressorzellen, B: B-Zellen, IL: Interleukin, IFN: Interferon .

An die auf diese Weise präsentierten Antigene binden CD4 oder CD8 T-Zellen. Die akzessorischen Moleküle CD4 und CD8 sind auf der Oberfläche von T-Zellen bzw. T-Helferzellen lokalisierte Proteine, die die T-Zellrezeptor-MHC-Wechselwirkung stabilisieren. Eine Kaskade von Reaktionen wird eingeleitet, in deren Verlauf es auch zur Bildung von tumorspezifischen Antikörpern kommt, die carcinome Zellen anhand der tumorspezifischen Glycoproteinstrukturen für den Abbau durch Phagozytose erkennen.

Offenbar können auch kürzere Ketten eines tumorspezifischen Proteins oder Glycoproteins als Antigen wirksam sein. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass ein dem antigenen Bereich entsprechendes synthetisches Peptid T-Zellen stimulieren kann. Synthetische Glycoproteine von tumorspezifischen Glycoproteinen sind daher entsprechend von Interesse, denn sie könnten als zusätzliche Stimulierung bei der Entwicklung von Tumorvaccinen wirken.

## 1.1. Struktur und Biosynthese der Glycoproteine

Bis etwa 1960 betrachteten die Proteinchemiker die die Proteine begleitenden Kohlenhydrate als Verunreinigung, die die Proteinreinigung erschwerten. Inzwischen weiß man, dass eine Vielzahl der Proteine Glycoproteine sind. Die in vielen Lebensvorgängen essentiellen Glycoproteine enthalten ein oder mehrere kovalent gebundene Kohlenhydratketten mit einem Gehalt von < 1 bis 90 Gew.%. Sie finden sich in allen biologischen Bereichen, in Proteinklassen unterschiedlicher Funktion, bei Enzymen, Hormonen, Strukturproteinen und bei Transport- und Rezeptorproteinen.
Die Peptidketten der Glycoproteine werden, wie bei den Proteinen, genetisch kontrolliert synthetisiert. Die Kohlenhydratketten werden dagegen im Golgi-Apparat mit Hilfe von Glycosidasen und Glycosyltransferasen prozessiert und aufgebaut.

Nach Art der glycosidischen Bindung zwischen dem reduzierenden Ende der Kohlenhydratseitenkette und der funktionellen Gruppe der Aminosäure im Protein wird unterschieden zwischen O-, N- und S-Glycoproteinen.

Bei den N-Glycoproteinen ist der Oligosaccharidanteil über 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose (GlcNAc) durch eine β-N-glycosidische Bindung an die Amidgruppe der Aminosäure Asparagin (Asn) gebunden.

Bei den O-Glycopeptiden liegt dagegen in der Mehrzahl der Glycopeptide eine α-O-glycosidische Bindung zwischen dem Kohlenhydratanteil und einer Hydroxylaminosäure, zumeist Serin (Ser) oder Threonin (Thr), vor. Aber auch die Bindung zu 5-Hydroxylysin, wie im Kollagen, ist möglich (Spiro 1967).

Die bevorzugten Glycosylierungsmuster sind die Core A- und Core B-Struktur. In der Core A-Struktur ist 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose (GalNAc) α-O-glycosidisch an eine Hydroxyaminosäure wie Threonin oder Serin gebunden während bei der in Proteoglycanen

bevorzugten Core B-Struktur D-Xylose β-O-glycosidisch mit einer Hydroxyaminosäure verknüpft ist (Fransson 1985, Motreuil 1980).

**Core A** D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser

**Core B** D-Gal-β(1-3)-D-Gal- β(1-4)-D-Xyl- β(1-O)-Ser

**Core C**

D-Man
|α(1-3)
D-Man-α(1-4)-D-GlcNAc- β(1-4)-D-GlcNAc- β(1-N)-Asn
|α(1-3)
D-Man

**Abb 1.2.:** Die Core-Strukturen der Glycoproteine. Core A und Core B bilden die Grundstruktur der O-Glycoproteine. Core C tritt in N-Glycoproteinen auf.

Die bei den N-Glycoproteinen auftretende Core C-Struktur besteht aus einer GlcNAc-Einheit, an die eine weitere GlcNAc-Einheit und drei Mannose-Einheiten gebunden sind (Berger 1985). Diese Pentasaccharidgrundstruktur tritt in allen N-Glycoproteinen auf. An diese Grundstruktur schließen sich weitere Oligosaccharideinheiten an. Je nach Aufbau dieser peripheren Strukturen wird unterschieden zwischen dem 'complex', 'high mannose' und 'hybrid'-Typ (Montreuil 1984).

Die Komplexität der Struktur der Oligosaccharidseitenketten in Glycoproteinen erfordert eine gut abgestimmte Regulierung der Enzyme der Biosynthese von Glycoproteinen. Die Polypeptid-Komponenten werden am Ribosomen synthetisiert, die dem rauhen endoplasmatischen Reticulum anhaften. Die synthetisierten Proteine werden in Membranvesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. Der Golgi-Apparat besteht aus 5 bis 20 flachen, membranumhüllten Säckchen, die unterteilt werden in die cis-, medial- und trans-Zisternen. Diese enthalten jeweils einen anderen Satz von Glycosyltransferasen, mit deren Hilfe beim Durchlaufen des Golgi-Apparates die Oligosaccharidreste kontinuierlich angeknüpft und modifiziert werden.

Die Biosynthese der O-Glycoproteine beginnt nach der Synthese der Peptidkette mit dem Transfer einer GalNAc-Einheit im *cis*-Golgiapparat auf die Hydroxygruppe von Thr oder Ser. Ausgehend von dieser GalNAc-Einheit findet eine stufenweise Anknüpfung von weiteren Saccharidresten statt. Im *medial*-Golgiapparat werden durch Glycosyltransferasen mit aktivierten Saccharidresten von Gal und GlcNAc die Core 1 bis Core 4-Strukturen gebildet (vgl. Abschnitt 1.2.). Durch den Transfer zusätzlicher Saccharideinheiten im *trans*-Golgiapparat werden weitere Core-Strukturen erhalten. Hier erfolgt auch die Ausbildung sulfatierter und sialylierter Strukturen. Jeder Reaktionsschritt wird durch weitgehend spezifische Glycosyltransferasen katalysiert. So wird die O-Glycosylierung von Peptiden in Mucinen von einer Enzymfamilie von schätzungsweise 10 bis 12 Polypeptid-GalNAc-

Transferasen kontrolliert. In der Regel katalysieren Glycosyltransferasen die Bildung einer spezifischen Bindung zwischen Kohlenhydrat und Peptidrest. Die Übertragung des Saccharidrestes auf die Peptidkette erfolgt durch UDP-Glycosyldonoren. Die hohe Spezifität der Glycosyltransferasen erfordert spezifische UDP-Glycosyl-Donoren. Der Saccharidrest wird unter Bildung einer Glycosidbindung auf das Polypeptid übertragen, dabei wird UDP reduziert zu UMP. Die folgende allgemeine Reaktionsgleichung soll die Reaktionsweise der Glycosyltransferasen verdeutlichen:

UDP-GalNAc:Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltranferase + UDP-GalNAc + Polypeptid → GalNAc-Polypeptid + UMP + Phosphorsäure

Die Biosynthese der N-Glycoproteine wird mit dem cotranslationalen Transfer einer $Glc_3Man_9GalNAc$-Einheit als Dolicholpyrophosphat auf die Amidgruppe am Asparagin-Rest der naszierenden Polypeptidkette im rauhen endoplasmatischen Retikulum eingeleitet. Asn ist hierbei Teil einer Erkennungssequenz Asn-Xaa-Thr bzw. Asn-Xaa-Ser, wobei Xaa für jeden Aminosäure-Rest außer Prolin (Pro) und Asparaginsäure (Asp) steht (Struck 1980). Im Lumen und Golgi-Apparat werden dann unter Katalyse durch spezifische Glycosidasen drei Glucose und vier Mannose-Einheiten abgespalten. Nach dieser Modifikation erhält man eine Core-Struktur, von der mit einer Serie von Glycosyltransferasen die Synthese und Prozessierung zu den verschiedenen Typen von N-Glycanen erfolgt.

## 1.2. Humane Mucine

Mucine stellen eine Klasse weit verbreiteter hochglycosylierter O-Glycoproteine dar. Sie kommen in dem Schleimhautsekreten, im Verdauungs- und Bronchialtrakt sowie der Genitalregion vor.

Die O-verknüpften Polysaccharide konzentrieren sich bei diesen Makromolekülen ($\approx 10^7$ D) auf einen hochglycosylierten Bereich, in dem Serin bzw. Threonin als potentielle O-Glycosylierungstellen 25 bis 40 % der Aminosäuren ausmachen. Der Gewichtsanteil der Kohlenhydrate kann 50 bis 80 % der Molekülmasse betragen (Rose 1992). Bei vielen Mucinen sind an die Kohlenhydratketten terminal 5-N-Acetyl-neuraminsäure- und Sulfatgruppen gebunden. Die Abstoßungskräfte und der hohe Hydratisierungsgrad verleihen den Lösungen des Mucinmoleküls sein charakteristisches thixotropes Verhalten.

Neben ihrem hohen Kohlenhydratanteil weisen die Mucinproteine im zentralen Bereich einen repetetiven Proteinteil auf. Da die erste Aminosäure der repetetiven Einheit zugleich die letzte Aminosäure bildet, spricht man von einer Tandem Repeating Unit. Anhand dieser repetetiven Einheit werden Mucine von mucinähnlichen Glycoproteinen, wie das GlyCAM1 oder MadCAM1, unterschieden (Shimidzu, Shaw 1993). Die Repeating Unit enthält im Vergleich zum Rest des Proteins besonders bevorzugt Serin und Threonin als potentielle O-Glycosylierungsstellen. Ferner findet man einen hohen Anteil Alanin, Glycin und Prolin in der Repeating Unit. In den kleineren terminalen Regionen findet man auch N-glycosidisch

gebundene Kohlehydratanteile sowie Cysteineinheiten, welche die Proteine mittels Disulfidbrücken zu großen Molekülen vernetzen.

Der hohe Glycosidierungsgrad der Mucine erschwert die Isolierung und Charakterisierung des entglycosylierten Apomucins. Eine Möglichkeit zur Sequenzierung des Apomucins ist, die Apomucin-cDNA zu klonen und aus deren Nucleotidsequenz die Peptidsequenz zu ermitteln (Verma 1994). Auf diese Weise konnten die Sequenzen der in Tabelle 1.2. dargestellten Repeating Units entschlüsselt werden. Es sind bis heute zwölf Mucine anhand ihrer cDNA charakterisiert worden (Hanisch 2000).

| **Mucin** | **Repetitive Einheit** | **Referenz** |
|---|---|---|
| MUC1 | PDTRPAPGSTAPPAHGVTSA | Milchdrüse |
| MUC2 | PTTTPITTTTTVTPTPTPTGTQT | Darmtrakt |
| MUC3 | HSTPSFTSSITTTETTS | Darmtrakt |
| MUC4 | TSSASTGHATPLPVTD | Bronchialtrakt |
| MUC5AC | TTSTTSAP | Bronchialtrakt |
| MUC5B | irreguläre repeats bestehend aus 29 Aminosäuren | Bronchialtrakt |
| MUC6 | SPFSSTGPMTATSFQTTTTYPTPSHPQTTLPTH<br>VPPFSTSLVTPSTGTVWPTHAQMATSASIHSTP<br>TGTIPPPTTLKATGSTHTAPPMTPTTSGTSQAHS<br>SFSTAKTSTSLHSHTSSTHHPEVTPTSTTTITPNP<br>TSTGTSTPVAHTTSATSSRLPTPFTTHSPPTGS | Magen |
| MUC7 | WAAPPTPSATTPAPPSSSAPPG | Speicheldrüse |
| MUC8 | YSGPRPLQEGTPGSRAAHALSRRGHRVHELPTS<br>SPGGDTGF | Bronchialtrakt |
| MUC9 | GEKLTPVGHQSVTP | |
| MUC11 | SGLSEESTTSHSSPGSTHTTLSPASTTT | |
| MUC12 | SGLSQESTTFHSSPGSTETTLSPASTTT | |

**Tabelle 1.1.:** Bezeichnung, Repeating Unit und Herkunft verschiedener Mucin-cDNA aus humanem Gewebe (Hanisch 2000)

Nach ihrer Struktur und Funktion unterscheidet man zwischen exprimierten und membrangebundenen Mucinen. Im Gegensatz zu den exprimierten Mucinen sind membrangebundene Mucine über ein lipophiles transmembranes Proteinfragment in der Plasmamembran fest verankert (Strous 1992). Zu den membrangebundenen Mucinen gehören MUC1, MUC3, MUC4 und das MUC 12. Mit Ausnahme von MUC7 besitzen die sekretierten Mucine MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 cysteinreiche Peptidabschnitte, die der Oligomerisierung von Mucinmonomeren über Disulfidbrückenbindungen dienen (Perez-Vilar, Hill 1999).

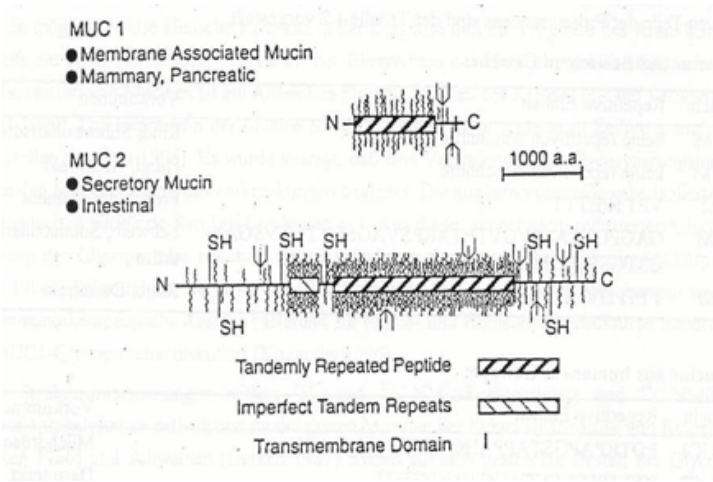



**Abb. 1.3.:** Schematische Darstellung des membrangebundenen Mucins MUC1 und des exprimierten Mucins MUC2 (Kim 1996)

Exprimierte als auch membrangebundene Mucine stellen hoch glycosylierte Verbindungen dar. Für die peptidgebundenen Seitenketten des Mucinmoleküls sind sieben Core-Strukturen bekannt, von denen die Core 1- und Core 2-Struktur in den meisten Glycoproteinen dominieren (Hounsell 1996).

Bei allen Mucin-Glycoproteinen sind die Kohlenhydratseitenketten durch eine GalNAc-Einheit α-glycosidisch am reduzierenden Ende mit der Hydroxylgruppe von Threonin bzw. Serin gebunden. Das Strukturelement D-GalNAc-α(1-O)-Ser/Thr wird auch als Tn-Antigen bezeichnet. Das Tn-Antigen als auch die sialylierte Form sTn [NeuNAc-α(2-6)-GalNAc-α(1-O)-Ser/Thr] werden als tumorassoziierte Antigene beschrieben (Schachter 1992). Ein weiteres wichtiges tumorassoziiertes Antigen stellt die auch als TF-Antigen [D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Ser/Thr] bezeichnete Core 1-Struktur und deren sialylierte Form dar. In der TF-Antigenstruktur kann eine Sialylierung in 6-Position der GalNAc-Einheit stattfinden. Zusätzlich kann hier noch die 3-Position der Gal-Einheit sialyliert werden. Außer der Core 1 können auch die Core 3,4,5 und 7 an den jeweiligen GalNAc-Einheiten in 6-Position sialyliert sein (Brockhausen 1997).

**Core 1** D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser

**Core 2** D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser
β(1-6)
D-GlcNAc

**Core 3** D-GlcNAc-β(1-3)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser

**Core 4** D-GlcNAc-β(1-3)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser
β(1-6)
D-GlcNAc

**Core 5** D-GalNAc-α(1-3)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser

**Core 6** D-GlcNAc-β(1-6)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser

**Core 7** D-GalNAc-α(1-6)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser

**Core 8** D-Gal-α(1-3)-D-GalNAc- α(1-O)-Thr/Ser

**Abb. 1.4.:** Die Core-Strukturen der O-Glycane von Mucinmolekülen (Hanisch 2000)

In den Seren von Tumorpatienten treten Mucin-Strukturen auf, die eine Immunantwort auslösen. So sind im Brustkrebsfall aufgrund einer tumorbegleitenden reduzierten Biosynthese der einzelnen Glycosyltransferasen die Saccharidketten das Mucin MUC1 auf die Core-Strukturen reduziert. Es treten das Monosaccharid Tn-Antigen und das Disaccharid TF-Antigen als auch deren sialylierte Formen vermehrt auf. Durch die verkürzten Saccharidseitenketten wird das Peptidrückgrat teilweise freigelegt und ist somit für Antikörper frei zugänglich (Kim 1996). Es ließen sich eine Anzahl von monoklonalen Antikörpern herstellen, die gegen diese Mucinstrukturen mit verkürzten Saccharidseitenketten gerichtet sind. Ausgehend von vielversprechenden Ergebnissen aus Antikörper-untersuchungen werden immunotherapeutische Ansätze auf der Grundlage von Peptid- und Kohlenhydratstrukturen diskutiert.

## 1.3. Die chemische Synthese von Glycopeptiden

B. Merrifield entwickelte 1962 die Peptidfestphasensynthese (Merrifield 1963) und wies damit einen besonders effektiven Weg, um in relativ kurzer Zeit in guten Ausbeuten zu Peptiden zu gelangen, vor.

Bei der Festphasensynthese nach Merrifield wird die wachsende Peptidkette kovalent, gewöhnlich am C-Terminus, an ein unlösliches, quellfähiges Kunstharz gebunden und schrittweise verlängert. Die erste N-geschützte Aminosäure wird über ihre Carboxygruppe an

das funktionalisierte Harz gebunden. Nach Entschützen des N-Terminus wird dann die neue N-geschützte Aminosäure mit Hilfe eines Aktivesters an die vorherige bereits gebundene Aminosäure gekuppelt. Das so schrittweise aufgebaute Peptid wird vom Träger je nach Art der Bindung durch Behandlung mit HBr/HAc oder TFA/MeOH abgespalten. Die Schutzgruppen können wahlweise mitabgespalten werden. Zwischen den einzelnen Reaktionsschritten wird das Reaktionsmedium gewaschen. Um eine quantitative Umsetzung zu erzielen, werden die blockierten Aminosäuren in zwei- bis vierfachem Überschuß eingesetzt.

Die kontinuierliche Aufeinanderfolge gleichartiger Reaktionen macht die Merrifield-Peptidfestphasensynthese für eine Automation geeignet. Mit Peptidsynthesizern lassen sich in relativ kurzer Zeit und mit weniger Arbeitsaufwand einfachere Peptidsequenzen synthetisieren. Die Continous Flow Methode, bei der die Reaktionsmedien ständig kontinuierlich durchmischt werden, ist besonders geeignet. Bei dieser Methode wird der polymere Träger in eine Säule gefüllt und mit den Reagenz- und Waschlösungen durchspült. Als polymere Träger eignen sich druckstabile Polymere, wie Pepsyn K® oder Macrosorb SPR®, welche aus Polyamiden in porösen Kieselgurmatrices bestehen (Atherton 1981). Bei Substitution des Kieselgur durch Polystyrolvinylbenzol-Copolymer erhält man Polyhipe™ (Small 1989). Das Polyhipe™ und das Polyethylpolystyrol-Pfropfcopolymer Tentagel® (Bayer 1991) stellen gute kommerzielle Harze dar.

Das Polyethylenglycoldimethylacrylamid-Copolymer PEGA (Meldal 1995) ist aufgrund seiner höheren Belegungsdichte vorzuziehen. Ein weiterer Vorteil ist, dass es sich nicht statisch auflädt, womit die Handhabung erheblich erleichtert wird.

Die amidfrei vernetzten Copolymere Polyoxethylen-polyoxypropylen POEPOP und Polyoxyethylen-polystyrol POEPS (Meldal 1996) sind speziell für Glycosylierungsreaktionen am Harz optimierte Polymere. Neben dem PEGA-Harz sind diese Polymere besonders geeignet für die Glycosyl-Building Block-Methode.

Für die manuelle Festphasensynthese ist die Wahl des Harzes nicht eingeschränkt. Hier lassen sich sehr gute Ergebnisse bereits mit dem 4-Alkoxybenzylalkohol substituierten Polystyrolpolymeren erzielen (Wang 1973).

Bei der klassischen Merrifield-Synthese wurde die erste Aminosäure direkt an die funktionelle Gruppe des Harzes gekuppelt. Bei den neueren Harzen werden die funktionellen Gruppen der Trägermaterialien mit Ankergruppen, sogenannten Linkern, derivatisiert. Der gewählte Linker bestimmt die Struktur des C-terminalen Endes des synthetisierten Peptids als Säure, Amid, Hydrazid oder Ester. Das synthetisierte Peptid sollte unter milden, definierten Bedingungen abzuspalten sein. Die 4-Alkoxybenzylalkohol-Gruppe (Wang 1973) ist mit wässriger Trifluoressigsäure (95 % TFA) zu spalten. Das abgespaltene Peptid liegt dann als Säure vor. Mit der 4-Alkoxy-2-methoxybenzylalkohol-Gruppe (Mergler 1988), bei deren Abspaltung mit 50 % TFA in Dichlormethan die Gewinnung geschützter Peptide möglich ist, gelangt man ebenfalls zur Säure. Für säurelabile Peptide ist die Abspaltung des Linkers mit 4-

Bromcrotonsäure (Kunz 1988) oder unter neutralen Bedingungen über Pd(0)-Katalyse geeignet, bei deren Abspaltung man ebenfalls zur Säure gelangt. Eine basische Abspaltung mit Natronlauge, wobei man die Säure erhält, ist bei der 4-Hydroxymethylbenzoesäure-Gruppe (Atherton 1989) durchführbar. Spaltet man dieselbe Gruppe unter ammoniakalischen Bedingungen ab, erhält man das Peptidamid.

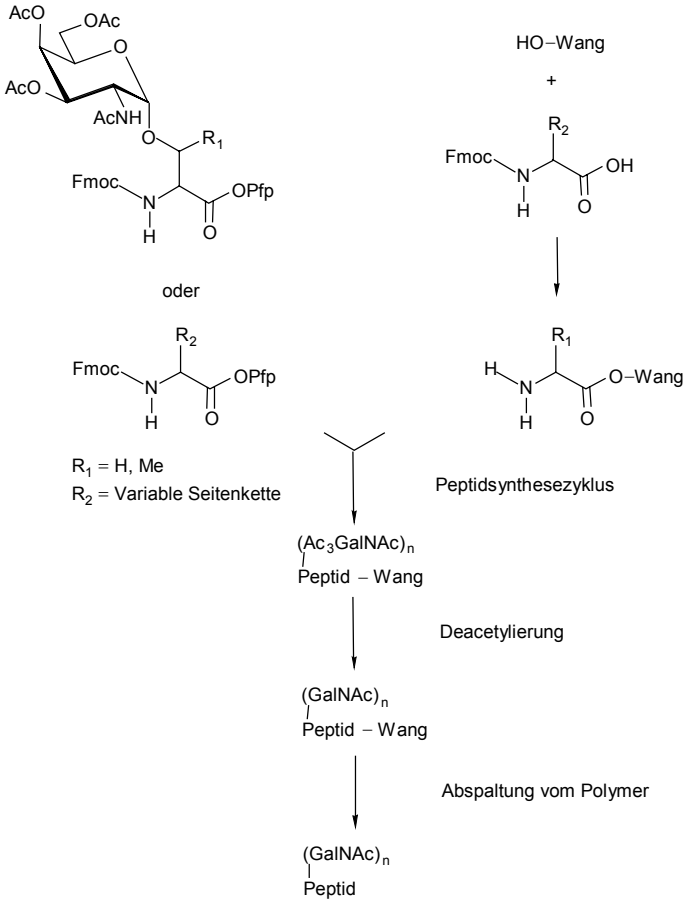



**Abb. 1.5.:** Schema einer Festphasenglycopeptidsynthese mit N-Acetylgalactosaminbaustein

Bei der Glycopeptidfestphasensynthese stellt sich das Problem der Einführung des Kohlenhydratrestes in die Peptidkette. Der Einsatz spezieller glycosylierter Aminosäurederivate, einem Saccharid-Aminosäure-Building Block, hat sich gegenüber einer nachträglichen Glycosylierung des Peptids bewährt (Paulsen 1985). In diesem Building Block ist eine zumeist geschützte Saccharideinheit glycosidisch an eine orthogonal geschützte Aminosäure gebunden. Durch selektives Freisetzen des C- bzw. N-Terminus der Aminosäure wird die Glycosylaminosäure in die wachsende Peptidkette eingeführt. Die schwierige Zugänglichkeit und Empfindlichkeit der Reaktion mit der Building Block-Einheit führen zu einer eingeschränkten Nutzung in der automatischen Peptidsynthese.

Die Schutzgruppenwahl in der Synthese von Glycopeptiden ist zusätzlich erschwert durch die instabile O-glycosidische Bindung. Im Kohlenhydratteil der Glycosylaminosäurebausteine werden zumeist Acetat-, Benzoat- und Benzylschutzgruppen eingesetzt (Anisfield 1990).

Die Aminofunktion des Aminosäureteils wird blockiert mit der Benzyloxycarbonyl (Z)-, 2-(4-Pyridyl)-ethyloxycarbonyl (4-Pyroc)-, Allyloxycarbonyl (Aloc)- oder 9-Fluorenylmethyl-oxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe. Letztere ist schon unter milden, basischen Bedingungen mit Piperidin quantitativ abspaltbar (Carpino 1972, Bardaji 1991).

Für den Schutz der Seitenkettenfunktionalitäten der unglycosylierten Aminosäurederivate sind basenstabile Schutzgruppen erforderlich, die unter sauren Bedingungen leicht zu entfernen sind. Für Hydroxy- und Carbonylreste ist die *t*Bu-Gruppe geeignet, Bei Aminofunktionen hat sich die Boc-Gruppe bewährt (Chang 1980). Die Guanidinogruppe wird bevorzugt mit dem unter sauren Bedingungen leicht abspaltbaren 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-Rest (Pbf) blockiert (Carpino 1993).

Die Aktivierung des Kupplungsschritts in der Glycopeptidsynthese kann durch *in situ*-Aktivierung oder durch die Bildung bzw. dem Einsatz von Aktivestern erfolgen, wobei sich die letztere Methode durchgesetzt hat. So werden Dhbt- und Pfp-Aktivester wegen ihrer leichten Handhabbarkeit häufig eingesetzt (Atherton 1988). Peptidkupplungen mit carboxylfreien Aminosäurederivaten lassen sich unter Zuhilfenahme einer milden Base wie 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluriniumtetrafluoroborat (TBTU) bzw. O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU, Carpino 1993) durchführen.

## 1.4. Analytische Methoden zur Charakterisierung von Glycopeptiden

Die Komplexität der Struktur erschwert die Charakterisierung von Glycopeptiden erheblich. Neben der Molekularmassenbestimmung ist eine zerstörungsfreie Strukturanalyse mit zumeist kleinen Mengen der Verbindung notwendig.

Zur Bestimmung der Molekularmasse werden massenspektroskopische Methoden herangezogen, wie die Elektronspray (ESI)- und Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)-Massenspektrometrie. Besonders die Time of Flight Technik hat bei letzterer Methode (MALDI-TOF) an Bedeutung gewonnen. Neben der Bestimmung der Molekularmasse lassen sich aus dem Fragmentierungsverhalten von Peptiden und Glycopeptiden Rückschlüsse auf die Primärstruktur durchführen. Für diese Methode wird nur eine geringe Menge Substanz benötigt.

NMR-Analysen bilden eine Grundlage in der Strukturaufklärung. Ein entscheidender Vorteil dieser Analysemethode ist die zerstörungsfreie Strukturanalyse. Im Gegensatz zur Sequenzierung mit Hilfe des MALDI-TOF wird jedoch mehr Substanz benötigt. Bei höhermolekularen Verbindungen, wie es sie Peptide darstellen, ist es oftmals unmöglich, auf der Basis von eindimensionalen NMR-Spektren Aussagen über die Struktur zu treffen. Es muß dann auf zwei- und höherdimensionale Techniken zurückgegriffen werden. Neben den Protonen-NMR-Analysen kann auch auf Heteroatome gestützte Untersuchungsergebnisse, dank immer empfindlicher werdenden Geräten, zurückgegriffen werden. O-Glycanstrukturen

können anhand der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten einschließlich der anomeren Bindungen analysiert werden.

Die Bestimmung der $^{1}$H-Verschiebungen lassen sich mit Hilfe von TOCSY- (Braunschweiler 1983, Davies 1985, Edwards 1985, Piveteau 1987) und teilweise auch COSY-Spektren (Aue 1976, Bax 1983) gut durchführen. Während im COSY-Experiment nur skalare Kopplungen beobachtet werden, führt die skalare Kopplung im TOCSY-Experiment zu einem Magnetisierungstransfer über die Nachbarkerne hinaus zu entfernteren Kernen.

Von nichtprotonierten Atomen unterbrochenen Spinsysteme, wie sie beispielsweise die Carbonylgruppen in Peptiden darstellen, lassen sich mit Hilfe eines HMBC-Spektrums (Summers 1986) zuordnen. Die im HMBC-Experiment erhaltenen crosspeaks $H_{Ni+1}C'$ und $H_{\alpha i'}$ C' ermöglichen eine sequentielle Zuordnung der Signale. Im Gegensatz zu den auf dipolare Wechselwirkungen durch Raum beruhenden NOESY-Spektren, werden im HMBC-Experiment keine nichtsequentiellen crosspeaks beobachtet.

Mit Hilfe des HMBC-Experiments können auch die $^{13}$C-Verschiebungen bestimmt werden. Eine Ergänzung zur Ermittlung der $^{13}$C-Verschiebungen stellt das HMQC-Experiment dar, in welchem crosspeaks durch direkte Kopplung von $^{1}$H- und $^{13}$C-Kernen beobachtet werden.

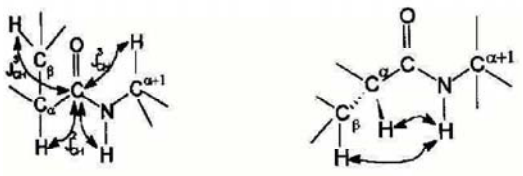



**Abb. 1.6.:** Mögliche Kopplungen in einem HMBC-Spektrum (links) und NOESY-Spektrum (rechts). Im HMBC-Spektrum sind Kopplungen der Amidprotonen zum vorangehenden Kohlenstoff zu beobachten. Gerade diese Kopplungen machen das HMBC-Spektrum zu einer wertvollen Hilfe bei der Bestimmung der Konnektivitäten im Peptidrückgrat.

# 2. Problemstellung

Mucine sind im Organismus weit verbreitet und kommen besonders im Respirations- und Intestinaltrakt vor. Sie stellen hochglycosylierte Verbindungen dar, in denen der Kohlenhydratanteil bis zu 85 % der Masse ausmachen kann. Ihre Struktur besteht aus einer langen Peptidkette als Rückgrat, an die eine Vielzahl von Saccharidseitenketten unterschiedlicher Länge geknüpft sind.

Im Rahmen dieser Arbeit ist das auf Epithelzellen weitverbreitete membrangebundene Mucin MUC1 von besonderem Interesse. Das MUC1 wurde erstmals aus humaner Milch isoliert (Shimiza 1982). Die Repeating Unit des MUC1 ist aus 20 Aminosäuren aufgebaut. In Bezug auf die Repeat-Anzahl ist das MUC1 polymorph. Die Zahl der Tandem Repeats umfasst 20 bis 120 Repeats, die den zentralen Bereich des Mucinmoleküls bilden. Innerhalb der Repeating Unit hat das MUC1 mit zwei Serin und drei Threonin fünf potentielle Glycosylierungsstellen. Die Repeatimg Unit von MUC1 besitzt die folgende Struktur, in der die fünf Glycosylierungsstellen durch Pfeile angedeutet sind:

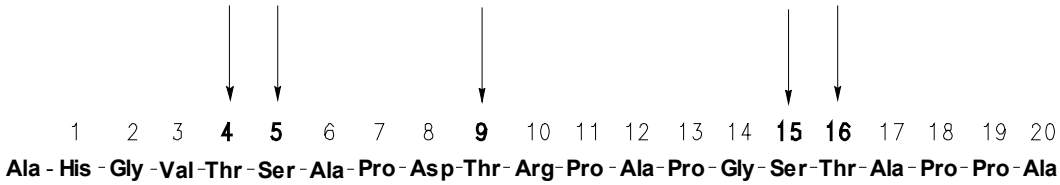



**Abb. 2.1.:** Repeating unit und potentielle Glycosylierungstellen innerhalb des MUC1

Im Fall von Brustkrebs wird das MUC1 mit auf die Core-Strukturen reduzierten Glycanstrukturen exprimiert (Hanisch 1996, Lloyd 1996). Man findet dann als Seitenkette bevorzugt das Tn-Monosaccharid, das TF-Disaccharid und deren sialylierte Formen sTn und sTF. Eine reduzierte Expression der β-Glucosaminyltransferase, die wichtig für die Ausbildung der Core 2-Struktur ist, führt dazu, daß die Oligosaccharid-Biosynthese beim Core 1-Disaccharid nicht weitergeführt wird. Diese verkürzten Saccharidketten dienen wiederum als Substrat für Gal-spezifische 2,3-Sialyltransferasen bzw. GalNAc-spezifische 2,6-Sialyltransferasen.

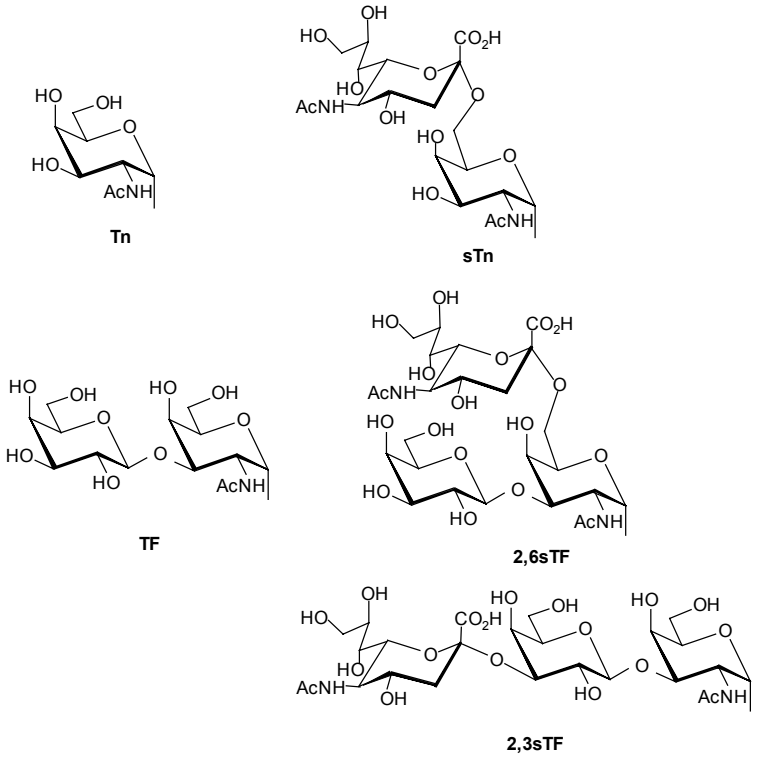



**Abb. 2.2.:** Tumorassozierte Antigenstrukturen im MUC1

Durch die verkürzten Saccharidstrukturen wird das Peptidrückgrat teilweise freigelegt. Es ließen sich eine große Anzahl gegen das carcinome MUC1 gerichtete monoklonale Antikörper herstellen. Durch Vergleich der Bindungsfähigkeit der Antikörper wurde die Aminosäuresequenz DTR als immunogenes Motif identifiziert. Man postuliert eine knob-artige bevorzugte Konformation der Repeating Unit, was auch durch NMR-spektroskopische Konformationsanalysen bestätigt wurde (Dojahn, Diplomarbeit).

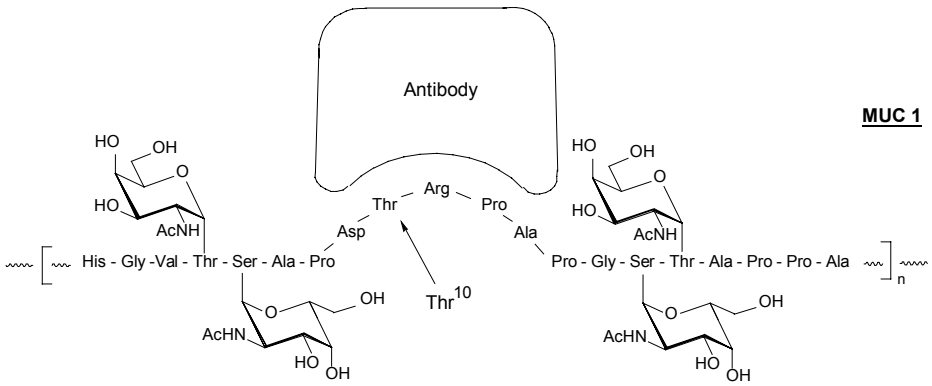



**Abb. 2.3.:** Knob-artige Konformation des DTR-Motifs

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen sind im Rahmen dieser Arbeit folgende Untersuchungen vorgesehen:

1) Das Mucin MUC1 zeigt im Krebsfall eine besondere krebsspezifische Struktur. Es treten vermehrt die tumorassoziierten Antigene Tn und TF auf. Diese Strukturen werden vom Organismus als antigen erkannt und bekämpft. NMR-spektroskopische Untersuchungen eines Peptids mit drei Tandemrepeats zeigten, dass das DTR-Motif in einer knob-artigen

Konformation vorliegt, während die Kette eine Prolin-β-Helix einnimmt (Fontenot 1993). Diese knob-artige Konformation machen das Peptidrückgrat gut zugänglich für die Reaktion mit krebsassozierten Antikörpern.

Es wurde bereits erfoglreich eine Serie von Glycopeptiden mit unterschiedlichen Glycosylierungsstellen und Glycosylierungsgrad synthetisiert und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hanisch, Köln, und Dr. Karsten, Berlin, mit krebsassoziierten Antikörpern getestet. Das an $Thr^{9}$ des DTR-Motif glycosylierte Glycopeptid zeigte überraschenderweise eine stärkere Wechselwirkung mit den Antikörpern als entsprechende an dieser Stelle nicht glycosylierte Peptide (Karsten 1998).

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass prinzipiell mit kürzeren MUC1 Glycopeptidsequenzen in bestimmten Fällen die Bildung von T-Zellen bzw. cytotoxischen T-Zellen stimuliert werden können. Es sollen daher ausgewählte Sequenzen von MUC1 mit unterschiedlichen Glycosylierungsstellen und Glycosylierungsgrad für eine Überprüfung synthetisiert werden.

2) In einer weiterführenden Untersuchung fanden Hanisch et. al. einen Polymorphismus bezüglich der Peptidsequenz von MUC1 (Hanisch 2000). Im Brustkrebsfall kommt es zu einem Austausch einzelner Aminosäuren. Innerhalb des DTR-Motifs sind zu 50 % die Aminosäuren $Asp^{8}$-$Thr^{9}$ gegen Glu-Ser und $Pro^{19}$ zu 30% gegen Ala ausgetauscht.

Der beschriebene Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der Repeating Unit des MUC1 ist bei Syntheseüberlegungen zu berücksichtigen. Es sollen eine Reihe Glycopeptide unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse mit unterschiedlichen Glycosylierungsstellen und Glycosylierungsgrad synthetisiert werden.

3) Im Rahmen dieser Arbeit sollen erstmalig N- und O-glycosylierte Glycopeptide synthetisiert werden. In MUC1 findet man zwischen der Repeating Unit und der transmembranen Domäne potentielle N-Glycosylierungsstellen (Lightenberg 1990). Recherchen in einer Proteindatenbank (Swiss Prot) zeigten den Austausch von Asparaginsäure gegen Asparagin am Ende der Repeating Unit. Dadurch ist eine Einführung der N-Glycosylierungsstelle gegeben. Es ist von Interesse, Modellsubstanzen mit N-verknüpften Saccharideinheiten neben der O-Glycosylierungsstellen zu synthetisieren.

4) Neben den im Krebsfall vermehrt auftretenden tumorassoziierten Antigene Tn und TF treten auch sialylierte Saccharide im Krebsfall auf. Das Auftreten von sTn und sTF im Brustkrebsfall machen diese für weitere Untersuchungen besonders interessant. Die rein chemische Synthese einer sialylierten Building Block-Einheit erfolgt über eine Vielzahl von Reaktionsstufen. Es bietet sich hier die kombinierte chemoenzymatische Synthese an. Auf diesem Wege sollen mehrfach glycosylierte MUC1 Glycopeptide enzymatisch weiter sialyliert werden.

Alle synthetisierten Glycopeptide sollen auf eine mögliche T-Zellstimulierung getestet werden. Der Assay zur T-Zellstimulierung ist nicht Gegenstand dieser Arbeit. Der Assay soll in einer teilweise parallelen oder späteren Untersuchung in den Laboratorien von Prof. Dr.

Joyce Taylor-Papadimitriou, Imperial Cancer Research Fund, Immonutherapy Laboratory, Guy's Hospital, GB-London SE1 9RT und Prof. Dr. Marianna Nuti, Dept. Experimental Medicine & Pathology, Viale Regina Elena 324, Rome durchgeführt werden.

# 3. Ergebnisse und Diskussion

## 3.1. Synthese von O-glycosylierten MUC1-Glycopeptiden

Bei der Synthese von Glycopeptiden ist die definierte Einführung der Glycosylierungsstellen wichtig. Durch den Einsatz von Glycosylaminosäurebausteinen ist die Einführung einer oder mehrerer definierter Glycosylierungsstellen in eine wachsende Peptidkette möglich. Die Schutzgruppen des eingesetzten Bausteins sind so zu wählen, dass der N- bzw. C-Terminus der eingesetzten Aminosäure selektiv deblockierbar ist. Der Kohlenhydratteil wird vorwiegend mit Acetyl-Gruppen geschützt. Als orthogonale Schutzgruppenkombination hat sich die Kombination Fmoc/tBu am günstigsten erwiesen.

## 3.2. Darstellung der O-Glycosylaminosäurebausteine

### 3.2.1. Darstellung des D-GalNAc-α(1-O)-Thr-Bausteins

Die Synthese des Monosaccharid-Building Blocks erfolgt nach dem in Abb. 3.1. dargestellten Schema. Hiernach wird zunächst das Aminosäurederivat **5** nach der von Adermann entwickelten Methode dargestellt (Paulsen 1989) und anschließend in einer α-Glycosidsynthese mit **4** zum Building Block **6** umgesetzt.

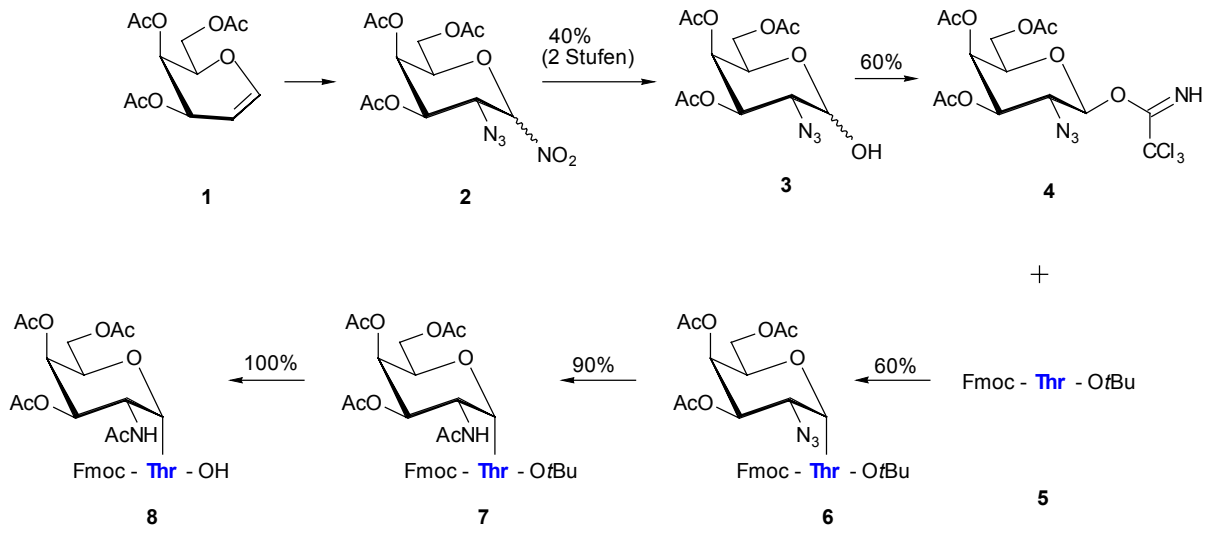



**Abb. 3.1.:** Reaktionsschema zur Synthese der Glycosylaminosäure D-GalNAc-α(1-O)-Thr **8**

Zur Gewinnung der Akzeptorverbindung **5** wird Threonin mit 9-Fluorenylsuccinimidylcarbonat zum $N^{\alpha}$-Fmoc geschützten Threonin umgesetzt. Die freie Hydroxygruppe wird dann mit Diketen als Acetoacetyl (AcA)-Verbindung geschützt ( Geysen 1984). Durch Veresterung der freien Säure mit Isobuten zum *t*Bu-Ester und anschließender Deblockierung der Hydroxygruppe mit Hydrazin gelangt man zur OH-freien Akzeptorverbindung **5** (Lapatsanis 1983).

Durch Umsatz des OH-freien Glycosylakzeptors **5** mit dem β-Imidat **4** unter Katalyse von TMSOTf wird in guter Stereoselektivität und Ausbeute die 2-Azido-2-desoxy-α-D-galactopyranosylaminosäure **6** erhalten. Nach Reduktion und N-Acetylierung der Azidogruppe mit aktiviertem Zink gelangt man zum Monosaccharidbaustein **7**. Hierfür wird Zinkpulver, das mit einer wäßrigen $CuSO_4$-Lösung aktiviert ist, benutzt und mit THF/$Ac_2O$/AcOH bei Raumtemperatur sofort zur Reduktion eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von etwa 20 Minuten erhält man den reduzierten und gleichzeitig N-acetylierten Monosaccharidbaustein **7**. Baustein **8** wird stets kurz vor der Peptidsynthese durch Hydrolyse mit 95 % TFA frisch dargestellt.

## 3.2.2. Darstellung des D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr-Bausteins

Der Monosaccharidbaustein **6** wird für die weitere Synthese zum Disaccharidbaustein als Ausgangsverbindung eingesetzt.

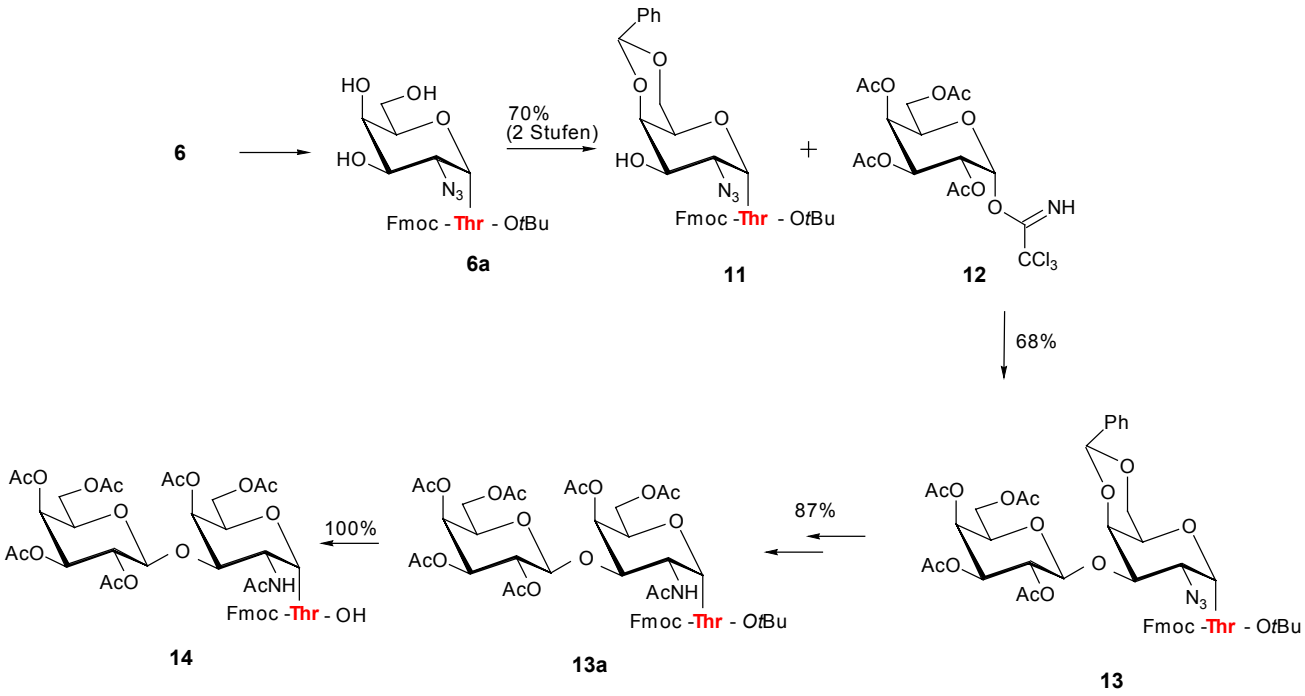



**Abb. 3.2.:** Reaktionsschema zur Synthese des Disaccharidbaustein D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Thr **14**

Durch Einwirken von katalytischen Mengen Natriummethoxid in Methanol werden die Acetylgruppen in Verbindung **6** abgespalten zu **6a**. Die ebenfalls basenlabile Fmoc-Gruppe bleibt unter diesen Bedingungen erhalten (Chang 1980). Zur Anknüpfung der Galactose-Einheit sind die reaktiveren 4- und 6-OH-Gruppen durch Einführung einer 4,6-Benzylidenschutzgruppe zu blockieren. Die Reaktion der OH-freien Verbindung **6a** mit Benzaldehyddimethylacetal unter Katalyse von p-Toluolsulfonsäure liefert die gewünschte 3-OH freie Akzeptorverbindung **11**. Die Glycosylierungsreaktion des Akzeptors **11** mit Trichlorimidat **12** unter TMSOTf-Katalyse liefert das gewünschte Disaccharid **13** in guter Ausbeute. Durch selektive Entblockierung mit Essigsäure bei 80° C kann die

Benzylidenschutzgruppe abgespalten werden. Die Reduktion der Azidogruppe erfolgt mit aktiviertem Zink. Hierfür wird Zinkpulver mit einer wäßrigen $CuSO_4$-Lösung aktiviert und in THF/$Ac_2O$/AcOH bei Raumtemperatur sofort zur Reduktion eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von etwa 20 Minuten erhält man den reduzierten und gleichzeitig N-acetylierten Disaccharidbaustein. Die 4- und 6-OH Gruppe werden ohne weitere Reinigung nachacetyliert und Verbindung **13a** wird in guter Ausbeute erhalten. Die *t*Bu-Schutzgruppe wird vor dem Einsatz des Bausteins in der Glycopeptidsynthese durch Umsetzung mit 95 %iger TFA quantitativ entfernt.

## 3.2.3. Darstellung des D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Ser-Bausteins

Für den Serin-Baustein, dessen Synthese nach der Methode des Threonin-Bausteins erheblich schwieriger ist, wurde durch Optimierung eine neuartige Synthese entwickelt. Die Synthese des Serin-Building Blocks **20** erfolgt nach dem in Abb. 3.3. dargestellten Schema.

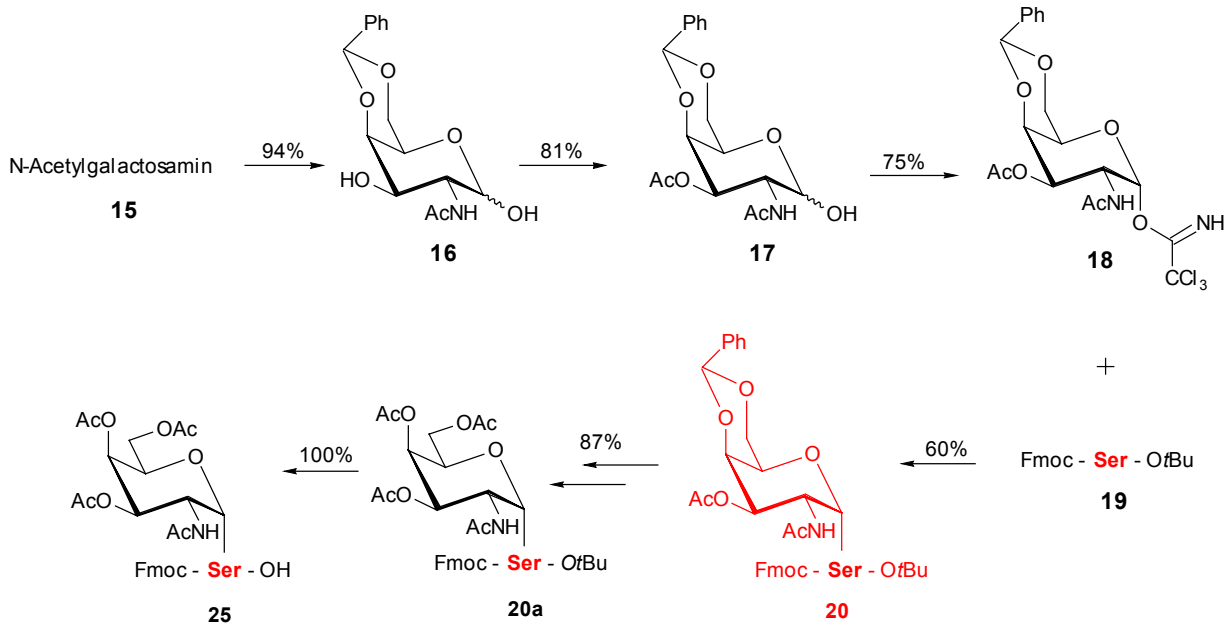



**Abb. 3.3.:** Reaktionsschema zur Synthese des Building Blocks D-GalNAc-α(1-O)-Ser **25**

N-Acetylgalactosamin **15** kann direkt mit Benzaldehyddimethylacetal unter Katalyse von p-Toluolsulfonsäure zur Blockierung der reaktiveren 4- und 6-OH Gruppen zu **16** umgesetzt werden. Nach selektiver Acetylierung der freien 3-OH Gruppe in 16 bei tiefen Temperaturen (-20 C) wird die erhaltene Verbindung **17** mit Trichloracetonitril zum Imidat **18** umgesetzt. Durch Umsetzung des OH-freien Glycosylakzeptors **19** mit dem α-Imidat **18** unter Katalyse von TMSOTf wird in überraschend guter Stereoselektivität das α-glycosidisch verknüpfte Produkt **20** erhalten. Die überraschend hohe Selektivität dürfte durch die Fixierung des Pyranoseringes durch die Benzylidengruppe verursacht worden sein.

Ausgehend von Verbindung **20** kann der Monosaccharidbaustein D-GalNAc-α(1-O)-Ser **25** durch Entfernen der Benzylidengruppe mit Essigsäure und anschließender Acetylierung der

freien OH-Gruppen dargestellt werden. Die *t*Bu-Gruppe wird kurz vor der Peptidsynthese mit TFA entfernt.

Der Vorteil dieser Syntheseroute besteht ferner darin, dass der Baustein **20** zugleich für die weitere Synthese zum Dissaccharidbaustein mit Serin als Aminosäure als Ausgangsverbindung eingesetzt werden kann. Die Synthese eines Threonin-Disaccharidbausteins bzw. Monosaccharidbausteins nach der hier beschriebenen Synthese hat sich als ungünstig erwiesen, da dann die α-Glycosidselektivität beim Schritt **19→20** nicht mehr gewährt ist.

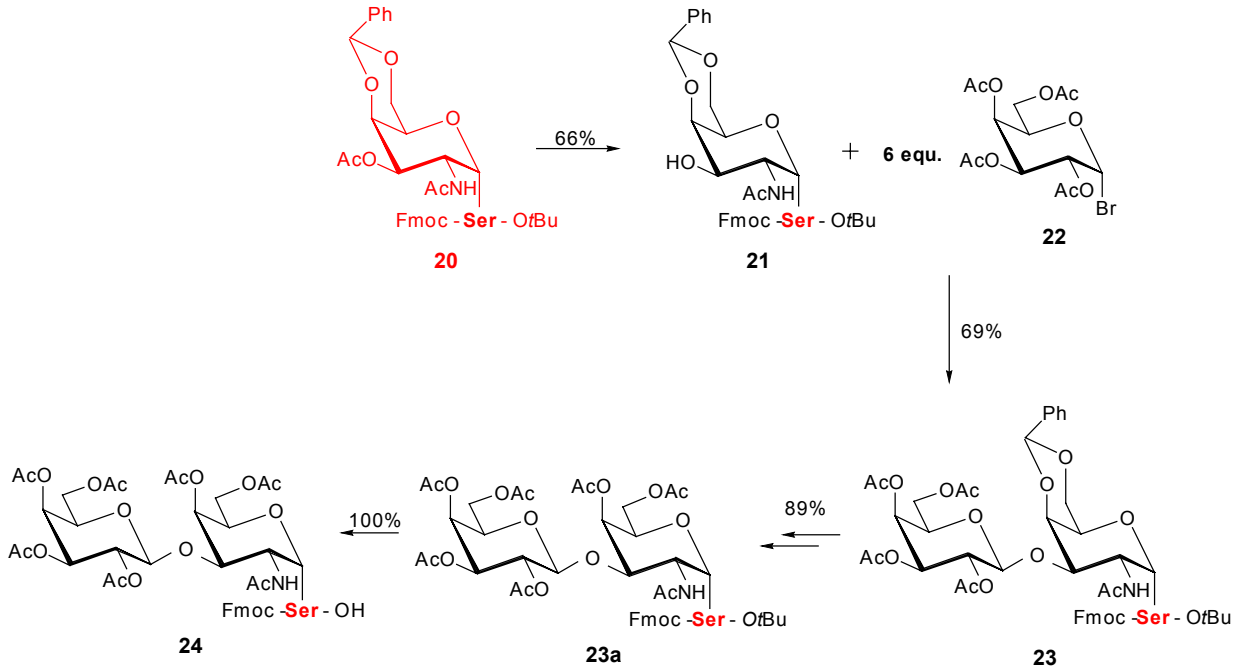



**Abb. 3.4.:** Reaktionsschema zur Synthese des Building Blocks D-Gal-β(1-3)-D-GalNAc-α(1-O)-Ser **24**

Durch Einwirken von katalytischen Mengen Natriummethoxid in Methanol wird die 3-OH Gruppe von Verbindung **20** entschützt. Das gewünschte Disaccharid wird durch die Glycosylierungsreaktion des Akzeptors **21** mit einem großen Überschuß von Acetobromgalactose unter Silbercyanid-Katalyse in guter Ausbeute gewonnen. Es sei erwähnt, dass diese Glycosylierungsreaktion nur mit Acetobromgalactose gelingt. Alle anderen Glycosylierungsmethoden, wie z.B. das Imidatverfahren, führen hier zu keinen Produkten.

Die Entfernung der Benzylidenschutzgruppe mit Essigsäure bei 80 °C liefert die entschützte Verbindung **23a**. Die *t*Bu-Schutzgruppe kann durch Umsetzung mit 95 %iger TFA vor dem Einsatz des Bausteins in der Glycopeptidsynthese quantitativ entfernt werden.

## 3.3. Vorbereitende Untersuchungen

NMR-spektroskopische Untersuchungen eines MUC1 Peptides mit drei Tandemrepeats wiesen auf eine knob-artige Konformation für das DTR-Motiv hin, während die Kette eine Prolin-β-Helix einnimmt (Fontenot 1993). Diese ausgestülpte knob-artige Konformation sollte besonders gut mit krebsassoziierten Antikörpern reagieren. Es wurde bereits erfolgreich eine Serie von Glycopeptiden mit unterschiedlichen Glycosylierungsstellen und Glycosylierungsgrad synthetisiert (Diotel, unveröffentlicht) und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hanisch, Köln, und Dr. Karsten, Berlin, mit krebsassoziierten Antikörpern getestet (Karsten 1998).

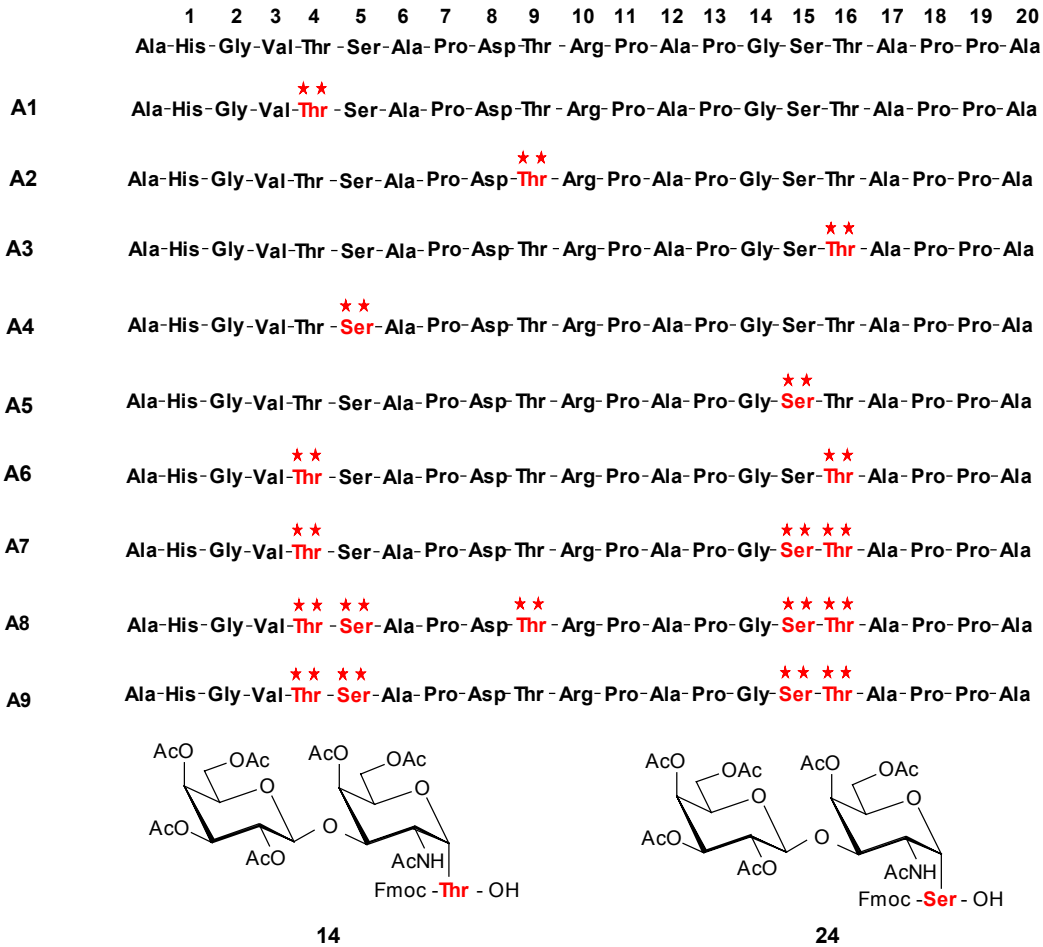



**Abb. 3.5.:** Die bereits dargestellten Glycopeptide mit unterschiedlichen Glycosylierungstellen und unterschiedlichem Glycosylierungsgrad (Diotel, unveröffentlicht).

Überraschenderweise zeigte das an $Thr^9$ des DTR-Motivs glycosylierte Glycopeptid **A2** eine stärkere Wechselwirkung mit den Antikörpern als entsprechende an dieser Stelle nicht glycosylierte Peptide (Karsten 1998). Eine Analyse von aus Milch isoliertem MUC1 ergab, dass in dieser Verbindung das $Thr^9$ auch glycosyliert ist (Müller 1997).

Die synthetischen MUC1-Glycopeptide **A1** bis **A10** wurden in einem T-Zellstimulationsassay mit dem Blut von Krebspatientinnen in London getestet.

In allen vier Assays zeigt das im DTR-Motif mit dem Tn- als auch TF-Saccharid glycosylierte MUC1-Glycopeptid eine T-Zell-Proliferation. Bei der Testung zweier gesunder Patienten lieferte neben dem im DTR-Motif glycosylierten Peptid das am Ser des GST glycosylierte MUC1-Glycopeptid **A6** und das vollglycosylierte Peptid **A8** höhere Werte. Diese Ergebnisse erwiesen sich jedoch alle als schwierig reproduzierbar. Die Werte sind stark von der Art des Krebses und der Personen abhängig. Sie konnten daher als nicht reproduzierbar und damit als vorerst nicht relevant angesehen werden. Genauere Untersuchungen waren in jedem Fall notwendig.

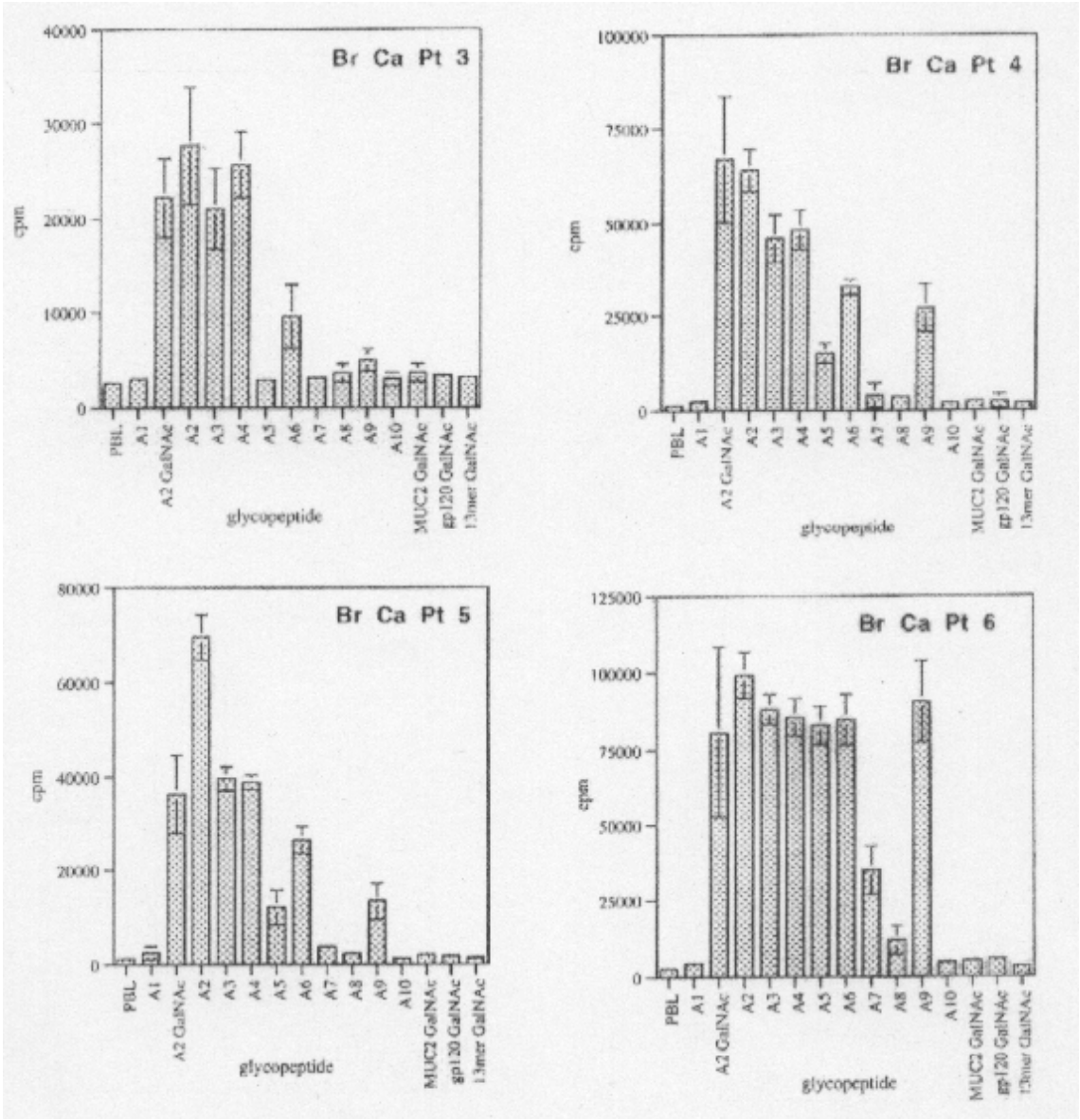



**Abb. 3.6:** T-Zellstimulation der synthetischen MUC1 Glycopeptide **A1** bis **A10**. Für den Assay wurde vier Brustkrebspatientinnen Blut entnommen.

# 3.4. Die Festphasensynthese von Glycopeptiden

## 3.4.1. Die Glycopeptidfestphasensynthese in einem manuellen 20-Loch "multiple-column"-Peptidsyntheziser

Die Syntheseapparatur besteht aus einem Teflonblock mit 20 Reaktionszellen. In die Reaktionszellen können jeweils bis zu 100 mg Harz eingefüllt werden. Jede Reaktionszelle hat am Boden einen Teflonfilter. Unterhalb des Teflonfilters befindet sich ein kleiner Auslass, der alle Reaktionszellen mit einer Vakuum- bzw. Stickstoffüberdruckkammer verbindet. Mit Hilfe eines Vakuums werden die Waschlösungen während der Synthese aus den einzelnen Zellen abgesaugt. Ein leichter Stickstoffüberdruck verhindert während der Kupplungsreaktion ein Einsickern der Reaktionslösung in die Druckkammer. Die Wasch- und Reaktionslösungen werden für jede Reaktionszelle manuell eingefüllt.

Es wird für die Synthese der Glycopeptide das Wang-Harz als polymerer Träger verwendet, die synthetisierten Peptide werden dann als freie Säuren erhalten. N,N-Dimethylformamid (DMF) wird für alle Kupplungsreaktionen und Waschschritte als Lösungmittel verwendet. Die eingesetzten Aminosäuren sind am N-Terminus Fmoc-geschützt.

Die Fmoc-Schutzgruppe ist bereits unter schwach basischen Bedingungen, wie mit 20 % Piperidin in DMF, leicht und quantitativ entfernbar. Mit einer β-Eliminierung der Saccharidreste ist unter diesen Bedingungen erfahrungsgemäß nicht zu rechnen.

Die Aminosäuren werden hier als Pfp-Ester eingesetzt und unter Zusatz von DhbtOH gekuppelt. Die Saccharidbausteine werden mit TBTU und Diisopropylamin (DIPEA) aktiviert. Die Schutzgruppen der eingesetzten Aminosäuren werden so gewählt, dass die Entschützung bei der Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgt. Als Schutzgruppen sind hier die *t*Bu-Gruppe für die Hydroxyfunktion von Ser bzw. Thr geeignet. Die Fmoc-Glu- und Fmoc-Asp-Aktivester werden ebenfalls *t*Bu-geschützt eingesetzt. Für den Schutz der Guanidino-Gruppe von Arg empfielt sich die Pbf-Schutzgruppe. Die Aminofunktion von His wird durch die Boc-Schutzgruppe blockiert. Die Abspaltung des Peptides vom Wang-Harz erfolgt mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung.

Die simultane Synthese einer Glycopeptid-Reihe ist schematisch in Abb. 3.7. wiedergegeben. Im ersten Schritt wird außerhalb der Reaktionszellen die erste Aminosäure Fmoc-Xaa-OH unter der Katalyse von 1-(Mesitylsulfonyl)-3-nitro-1,2,4,-triazol (MSNT) und Methylimidazol mit der Hydroxygruppe des Ankers verestert. Das auf diese Weise derivatisierte Harz wird in die Reaktionszellen des Syntheseblocks eingefüllt.

Der Synthesezyklus beginnt mit der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Darauf folgt die Anknüpfung eines weiteren Fmoc-Aminosäure-Pfp-Aktivesters bzw. einer Fmoc-Glycosylaminosäure. Die Kupplungsreaktionenen werden über Nacht fortgesetzt.

Nach Anknüpfung der letzten Aminosäure und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe werden alle Harze mit DMF und Dichlormethan gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Danach wird das Harz vorsichtig von den Wandungen der Reaktionszellen sowie den Teflonfilter in

Glassäulen überführt. Die Glycopeptide werden einzeln weiter aufgearbeitet. Die Entschützung der Glycosylaminosäurebausteine erfolgt in Glasfritten für jedes Peptid getrennt. Hierfür wird das am Harz gebundene Glycopeptid mit methanolischer Hydrazinhydratlösung behandelt und nach Reaktionsende mit Methanol ausgewaschen.

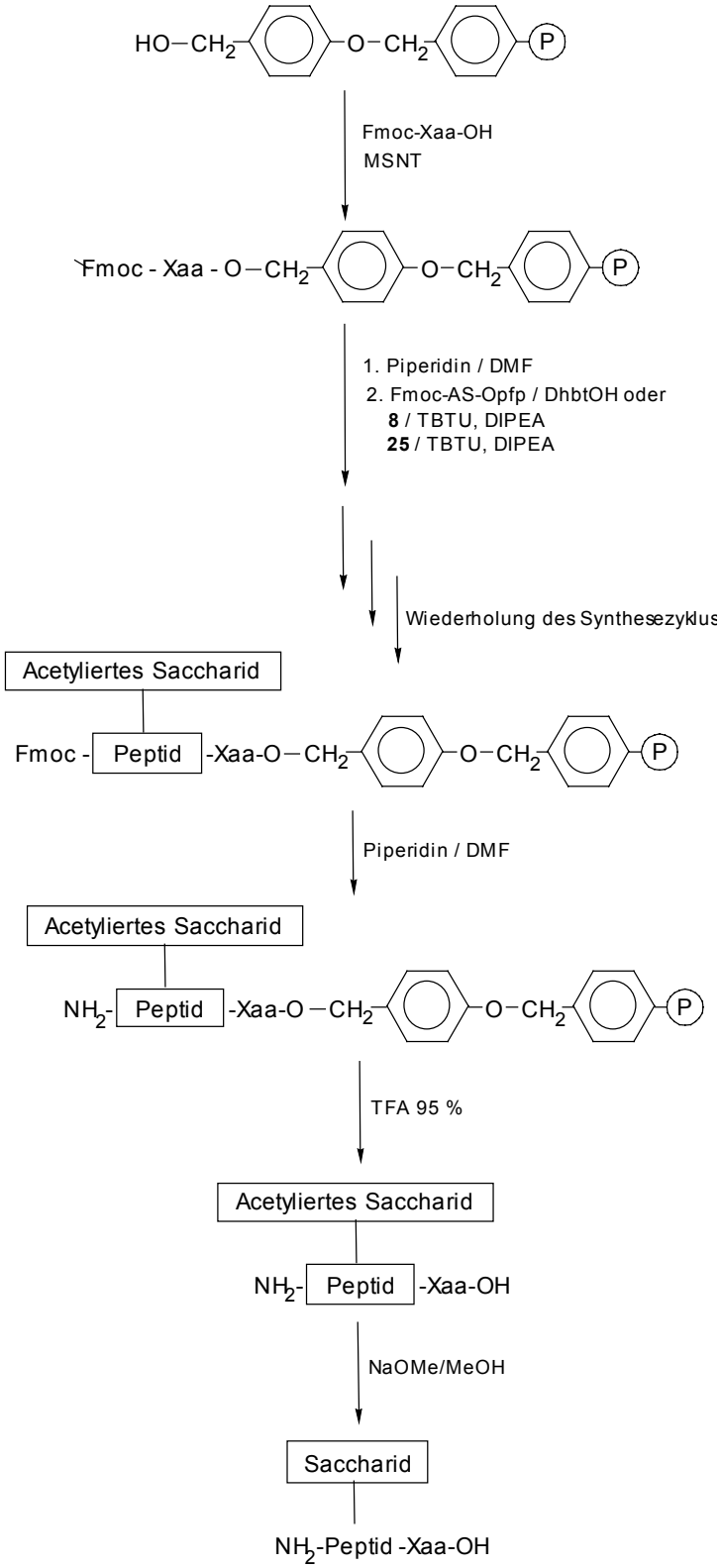



**Abb. 3.7.:** Schematische Darstellung der parallelen Festphasensynthese

Die Acetylschutzgruppen an den Kohlenhydratresten werden unter diesen Bedingungen quantitativ entfernt. Ein Nachteil dieser Methode ist die erschwerte Überwachung der Deacetylierungsreaktion. Zur Überprüfung der Reaktion muss Glycopeptid vom Harz abgespalten und aufgearbeitet werden. Eine HPLC-Verfolgung der Deacetylierungsreaktion ist daher unpraktikabel. Die Massenspektrometrie ist in diesem Fall eine sehr geeignete Methode zur Detektion. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Deacetylierung wird alle zwei Stunden eine minimale Menge Harz entnommen und mit zwei bis drei Tropfen 95 %iger TFA-Lösung behandelt. Die auf diese Weise vom polymeren Träger abgespaltene kleine Menge des Peptides wird mittels MALDI-TOF vermessen. Die O-Deacetylierung von Glycopeptiden am polymeren Träger läßt sich durch Behandlung mit methanolischer Hydrazinhydratlösung innerhalb sechs Stunden erfolgreich durchführen.

Die Abspaltung der Glycopeptide erfolgt durch die Behandlung mit 95 %iger wässriger TFA bei Raumtemperatur. Alle Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren werden quantitativ mit entfernt.

Die vom Harz abgespaltenen Peptide werden durch präparative reversed phase HPLC mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten unter Zusatz von 0.1 % TFA gereinigt.

### 3.4.2. Die Multiple Festphasensynthese von Glycopeptiden in Glassäulen

Die Syntheseapparatur besteht Glassäulen, deren Ausgänge durch einen Vakuumverteiler verbunden sind. Mit Hilfe des Vakuumverteilers ist es möglich Reaktions- und Waschlösungen aus allen Glassäulen gleichzeitig abzuziehen. Der Synthesezyklus entspricht dem Synthesezyklus mit dem 20-Loch 'multiple Peptidesynthesizer'.

Im Gegensatz zum 20-Loch 'multiple Peptidesynthesizer' erlaubt der Einsatz von Glassäulen die Synthese von größeren Menge Peptid. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die Überwachung der Kupplungsreaktion durch visuelle Verfolgung des Reaktionsverlaufs. Durch den Zusatz von Dhbt-OH bildet sich mit dem freien Amin des N-terminalen Ende des Peptides ein DhbtOH-Ammoniumsalz, dessen gelbe Farbe während der Peptidkupplung verschwindet. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das für die Synthese verwendete Trägermaterial keine Eigenfärbung besitzen sollte. Hierfür ist das Wang-Harz aufgrund seiner geringen Eigenfarbe gut geeignet. Das erhaltene synthetisierte Glycopeptid liegt dann nach Abspaltung als Säure vor.

Weiterhin ist eine Verfolgung des Syntheseverlaufs durch die photometrische Bestimmung des bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gebildeten Benzofulvalenaddukts nützlich. Anhand der photometrischen Bestimmung können Aussagen über die Vollständigkeit der Kupplungsreaktion gemacht werden, so dass misslungene Synthesen frühzeitig erkannt und abgebrochen werden können.

Für alle Kupplungsreaktionen und Waschschritte wird DMF als Lösungsmittel verwendet. Die eingesetzten Aminosäuren sind am N-Terminus Fmoc-geschützt. Die Fmoc-Schutzgruppe kann unter schwach basischen Bedingungen mit Piperidin in DMF leicht entfernt werden.

Die Aminosäuren werden als Pfp-Ester eingesetzt und unter Zusatz von DhbtOH gekuppelt. Die Saccharidbausteine werden mit TBTU und Diisopropylamin (DIPEA) aktiviert. Die erste Aminosäure Fmoc-Xaa-OH wird unter der Katalyse von MSNT und Methylimidazol mit der Hydroxygruppe des Wang-Ankers verestert. Das auf diese Weise derivatisierte Harz wird in die Glassäulen eingefüllt, die weitere Synthese der Glycopeptide erfolgt wie in Abschnitt 3.4.1. beschrieben. Nach Anknüpfung der letzten Aminosäure und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe werden alle Harze mit DMF und Dichlormethan gewaschen und im Luftstrom getrocknet.

Die O-Deacetylierung der Glycosyleinheiten erfolgt mit dem Glycopeptid am Harz mit methanolischer Hydrazinhydratlösung binnen sechs Stunden und wird mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie wie unter 3.4.1. beschrieben überwacht. Zur Abspaltung der Glycopeptide vom polymeren Träger wird mit 95 %iger wässriger TFA bei Raumtemperatur behandelt. Alle Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren werden dabei quantitativ mitentfernt. Die vom Harz abgespaltenen Peptide werden durch präparative reversed phase HPLC mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten unter Zusatz von 0.1 % TFA gereinigt.

# 3.5. Synthese von modifizierten MUC1-Glycopeptiden

## 3.5.1. Befunde von Hanisch *et. al.* hinsichtlich der Sequenz des MUC1

In weiterführenden Untersuchungen fanden Hanisch *et. al.* eine Heterogenität in der Aminosäurezusammensetzung des MUC1 (Hanisch 2000). Danach sind innerhalb des DTR-Motifs die Aminosäuren Asp[8]-Thr[9] gegen Glu-Ser ausgetauscht. Dieser Austausch kann in 50 % aller Fälle auftreten. Außerdem sind bis zu 30 % Pro[19] gegen Ala und Thr[16] gegen Ser ausgewechselt.

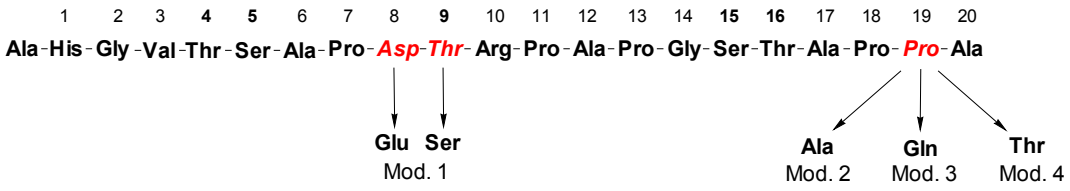



**Abb. 3.8.:** Sequenzpolymorhismus innerhalb der MUC1 Repeating Unit nach den Befunden von Hanisch *et. al.*

Der beschriebene Austausch einzelner Aminosäuren wurde in MUC1 aus Brustkrebszellen als auch in MUC1 von Darmkrebszellen gefunden, während in MUC1 aus gesunden Zellen diese Heterogenität nicht auftritt.

Von diesen Ergebnissen ausgehend sollten ausgewählte Sequenzen von MUC1-Glycopeptiden in einer Festphasensynthese dargestellt werden. Die Aminosäuren Asp$^{8}$-Thr$^{9}$ im DTR-Motif sollen gegen Glu-Ser und Pro$^{19}$ gegen Ala ausgetauscht werden. Es wird selektiv am Threonin bzw. Serin glycosyliert. Die Glycosylierungstellen wurden mit Hilfe der Monosaccharidbausteine **8** und **25** sowie der Disaccharidbausteine **14** und **24** eingeführt. Weiterhin sind die in den T-Zellstimulierungstest erzielten Ergebnisse mit den Glycopeptiden **A1** bis **A10** zu überprüfen. Hierfür wurden ausgewählte Sequenzen mit unterschiedlichen Glycosylierungsstellen und Glycosylierungsgrad synthetisiert und erneut einem T-Zellstimulierungstest unterworfen.

### 3.5.2. Festphasensynthese von modifizierten MUC1-Glycopeptiden mit den Monosaccharidbausteinen 8 und 25

Auf der Grundlage des von Hanisch et. al gefundenen Sequenzpolymorphismus wurden die in Abb. 3.9. abgebildeten Glycopeptide **26** bis **30** synthetisiert. Die Synthese der Glycopeptide **26** bis **30** wurde in einem manuellen 20-Loch 'multiple Peptidesynthesizer', wie unter 3.4.1. beschrieben, durchgeführt. Die Glycosylierungstellen wurden selektiv mit Hilfe der Monosaccharidbausteine **8** und **25** eingeführt. Die Aminosäuren Asp$^{8}$-Thr$^{9}$ im DTR-Motif wurden gegen Glu-Ser und die Aminosäure Pro$^{19}$ durch Ala substituiert.

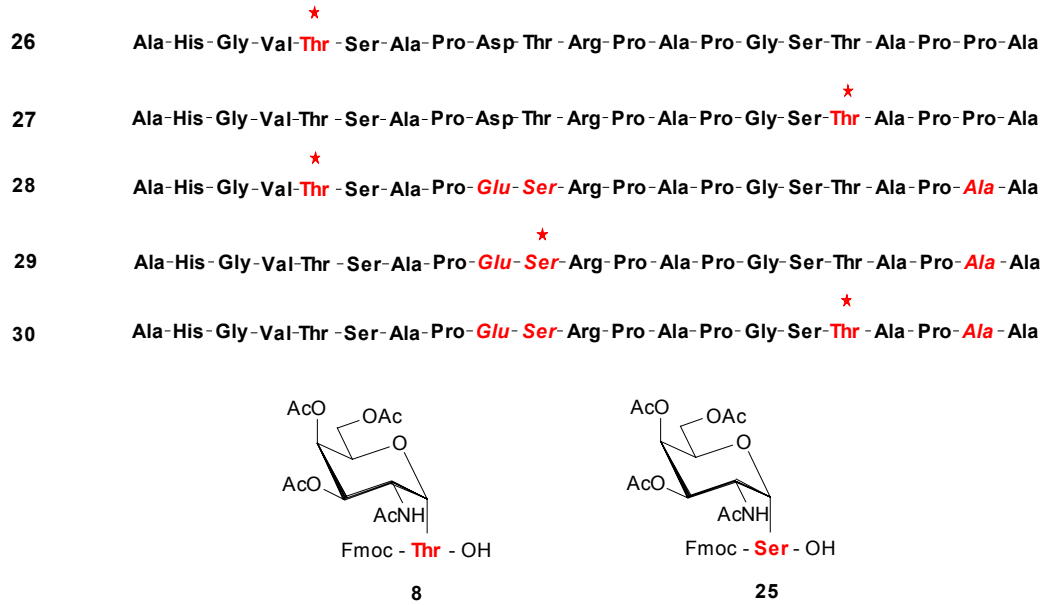



**Abb. 3.9.:** Glycopeptidstrukturen **26-30**. Es sind Asp$^{8}$-Thr$^{9}$ gegen Glu-Ser und Pro gegen Ala substituiert. Die Glycosylierungsstellen werden mit Hilfe der Bausteine **8** und **25** eingeführt.

Die O-Deacetylierung der Glycopeptide **26-30** wurde durch Behandlung mit methanolischer Hydrazinhydratlösung innerhalb sechs Stunden erfolgreich durchgeführt. Die Abspaltung der Glycopeptide erfolgte durch die Behandlung mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung bei Raumtemperatur. Alle Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren wurden hierbei quantitativ mitentfernt.

Die vom Harz abgespaltenen Peptide wurden durch präparative reversed phase HPLC mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten unter Zusatz von 0.1 % TFA gereinigt. Die HPLC-Reinigung wies für die Glycopeptide **28**, **29** und **30** neben der Hauptsubstanz zwei weitere Nebenprodukte auf, die nicht weiter untersucht wurden. Die HPLC-Reinigung der Glycopeptide **26** und **27** zeigte kaum Nebenprodukte. Die Ausbeuten der varianten Glycopetide **28**, **29** und **30** sind, wie auch aus der HPLC-Reinigung zu schließen ist, deutlich niedriger als die Ausbeuten der Glycopeptide **26** und **27**.

Die Molekularmassen der Glycopeptide **26-30** wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt.

Die Gesamtausbeute der Synthese der Glycopeptide **26-30** sind der Tabelle 3.1. zu entnehmen.

| Glycopeptid | Ausbeute |
|---|---|
| **26** | 7 % |
| **27** | 8 % |
| **28** | 5 % |
| **29** | 5 % |
| **30** | 5 % |

**Tab. 3.1.:** Gesamtausbeute der Synthese der Glycopeptide **26-30**

## 3.5.3. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide 26 bis 30

Die NMR-Charakterisierung der mit dem Tn-Antigen glcosylierten Peptide **26-30** wurde durchgeführt, um die $^1$H-Verschiebungen möglichst aller Protonen im jeweiligen Molekül zu bestimmen. Die hier beschriebene Methodik wird auch bei der NMR-Charakterisierung der in den folgenden Kapiteln beschriebenen Glycopeptide verwendet.

Von den Glycopeptide **26-30** wurde zunächst ein $^1$H-1D-NMR-Spektrum in wässriger Lösung aufgenommen. Das $^1$H-1D-NMR-Spektrum dient der vorläufigen Überprüfung des zu untersuchenden Glycopeptids vor der Durchführung der komplexeren 2D-NMR-Experimente. Anhand der Integration differenzierter spektraler Bereiche im $^1$H-1D-NMR-Spektrum kann eine grobe Aussage über die Anzahl der Protonen gemacht werden.

Die Chemischen Verschiebungen einzelner Peptidfragmenten bzw. Kohlenhydratseitenketten können auf der Grundlage von $^1$H-$^1$H-COSY- und $^1$H-$^1$H-TOCSY-Experimenten ermittelt werden. Die hierbei beobachteten Kopplungen entstammen einem isolierten Kopplungssystem und machen keine Aussagen über Konnektivitäten der Aminosäure- und Kohlenhydrateinheiten.

Die Überlagerung der chemischen Verschiebungen einzelner Aminosäuren, wie bei Gly$^3$ und Gly$^{15}$, erschwert die eindeutige Zuordnung der Signale bis hin zur Unmöglichkeit. So wird die eindeutige Bestimmung der Protonenverschiebungen der Proline durch deren starke Überlagerung ebenfalls erschwert. Mit Hilfe eines $^1$H-$^1$H-NOESY-Experiments, in welchem

dipolare Wechselwirkungen durch den Raum beobachtet werden, ist jedoch eine teilweise Zuordnung der Protonenverschiebungen der Proline möglich.

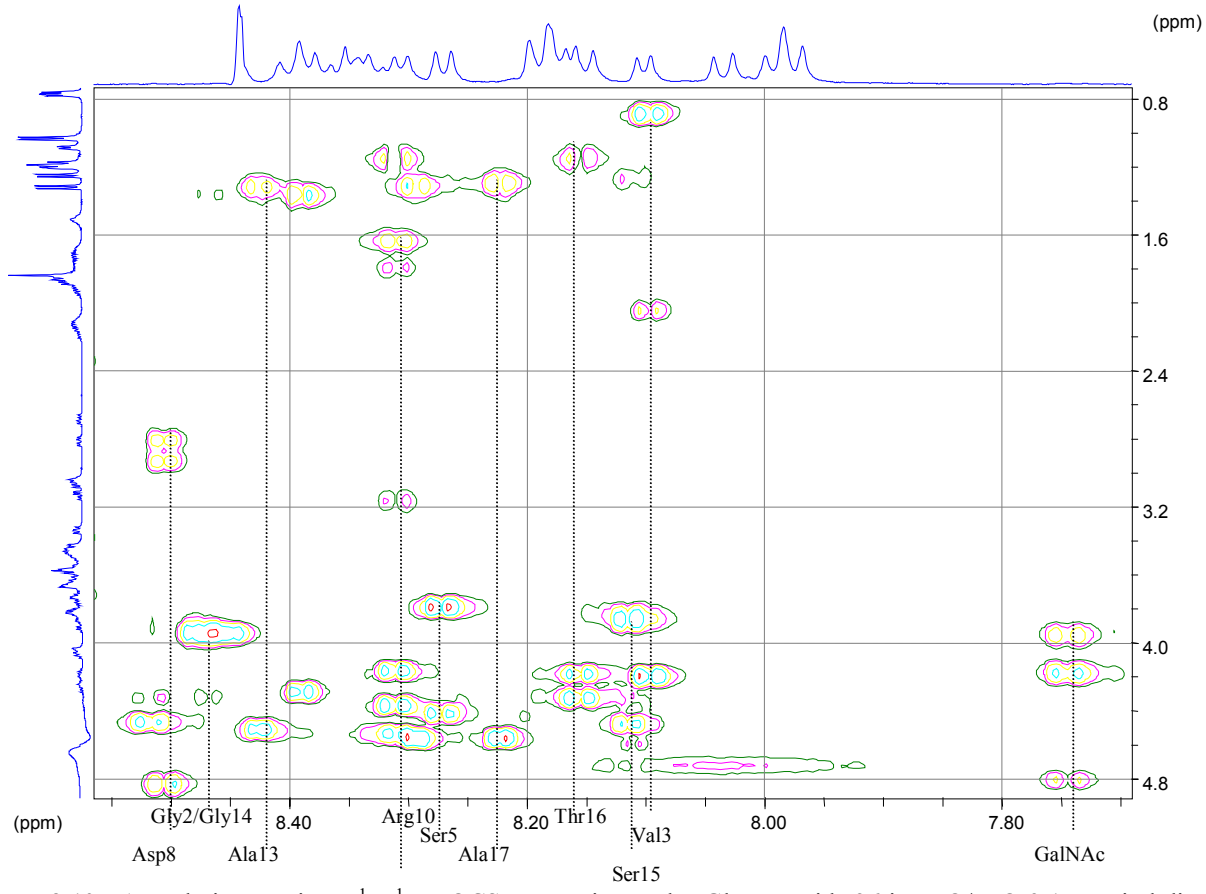



**Abb. 3.10.:** Ausschnitt aus einem $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY Experiment des Glycopeptids **26** in $H_2O/D_2O$ 9:1. Es sind die Korrelationssignale der Amidprotonen des Peptidrückrats (links) mit den Seitenkettenprotonen und die Korrelationssignale der Amidprotonen des GalNAc-Rests (rechts) mit den Kohlenhydratprotonen.

Das NOESY-Experiment wird weiter zur Bestimmung der Konnektivitäten sowie zur Bestimmung der glycosidischen Bindung herangezogen. Die Zuordnung der Korrelationsignale läßt auf die räumliche Anordnung der Protonen und damit der Konnektivitäten schließen.

Eine zusätzliche Bestimmung der Konnektivitäten im Peptidrückrat erfolgt mit Hilfe des $^{1}$H-$^{13}$C-HMBC-Experiments. In diesem Experiment werden die $^{1}$J(C,H)-Kopplungen unterdrückt, während die $^{2}$J(C,H)- und $^{3}$J(C,H)-Kopplungen entfernter Kerne aufgedeckt werden. Zugleich liefert das $^{1}$H-$^{13}$C-HMBC-Experiments auch Daten über die $^{13}$C-Resonanzen. Eine weitere Unterstützung bei der Ermittlung der $^{13}$C-Resonanzen bildet das HMQC-Experiment. Es zeigt die direkte Kopplung $^{1}$J(C,H) über die Bindung zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff. Beide Methoden bedürfen jedoch mehr Substanz zur Messung als die entsprechenden $^{1}$H-2D-NMR-Experimente. Geringe Mengen an Substanz erfordern eine lange Meßzeit und führen zu einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis.

Die im HMBC-Experiment beobachteten $^{2}$J(C,H)-Kopplungen gestatten eine Bestimmung der Sequenz im Peptidrückrat. Ausgehend von den chemischen Verschiebungen der CHα-

Protonen werden die fragmentinternen Carbonylkohlenstoffisotope ermittelt. Deren Kreuzrelation zu den Amidprotonen der benachbarten Peptidfragmente ermöglicht die Bestimmung der Konnektivitäten im Peptidrückrat.

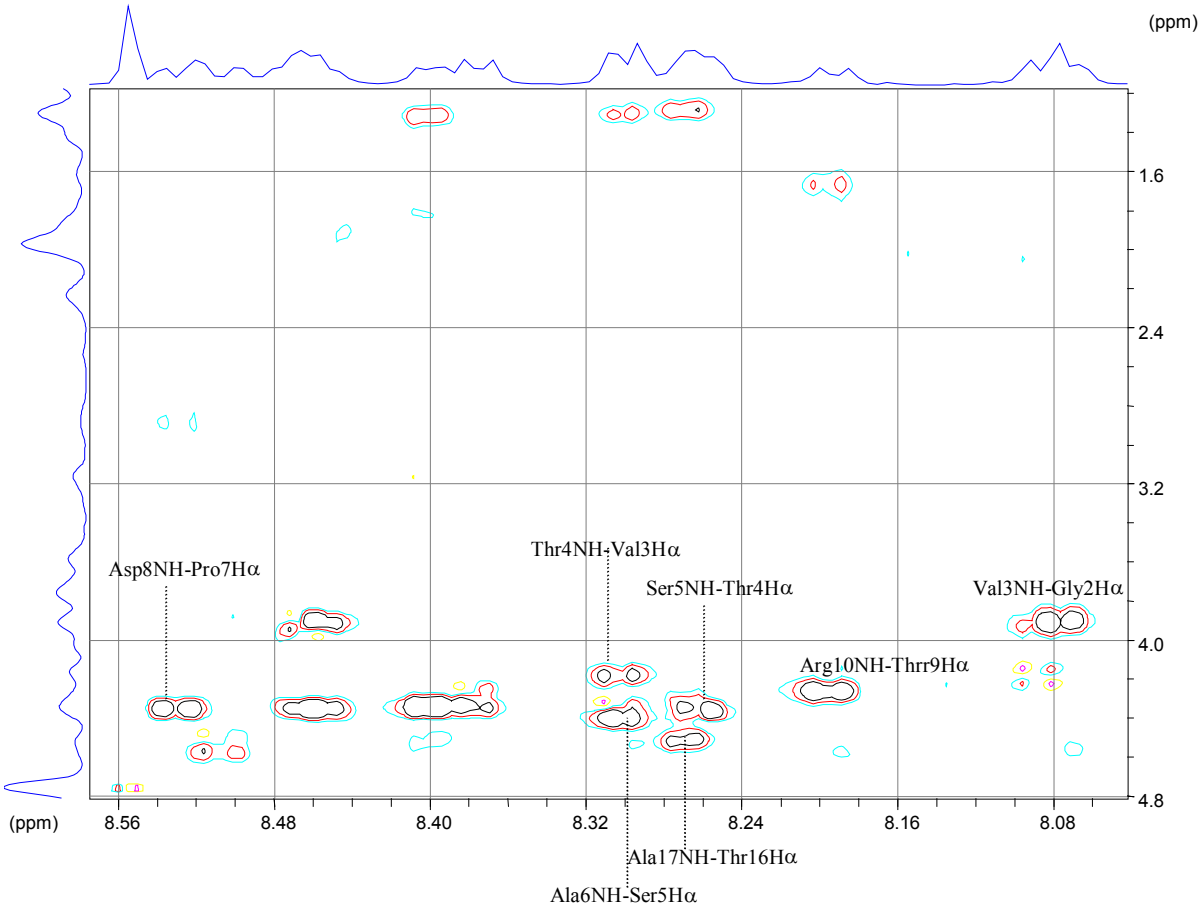



**Abb. 3.11.:** Ausschnitt aus dem $^{1}$H-$^{1}$H-NOESY-Sektrum des Glycopeptids **27** in Wasser. Gezeigt sind die zur Bestimmung der Struktur des Peptidrückrats interessanten NOE-Kontakte der Seitenkettenprotonen zu den peptidischen Amidprotonen benachbarter Aminosäurepositionen.

Die Werte der auf diese Weise untersuchten Peptide **26-30** sind in den Tabellen im Experimentellen Teil zusammengefaßt.

### 3.5.4. Synthese von modifizierten Glycopeptiden mit variablen Schnitt der Repeating Unit mit den Monosaccharidbausteinen 8 und 25

Zur Untersuchung der T-Zellstimulierung bei einer Verschiebung des DTR-Motifs durch einen variablen Schnitt der Repeating Unit soll neben der bisher in guten Ausbeuten synthetisierbaren MUC1 Repeating Unit mit dem DTR-Motif in der Mitte der Sequenz eine Reihe von MUC1-Glycopeptiden mit einem variablen Schnitt der MUC1 Repeating Unit synthetisiert werden. Das DTR- bzw. ESR-Motif befindet sich in dieser gewählten Sequenz am Ende der Repeating Unit, so dass der Pro-Ala-Austausch vor dem ESR-Motif zu liegen kommt.

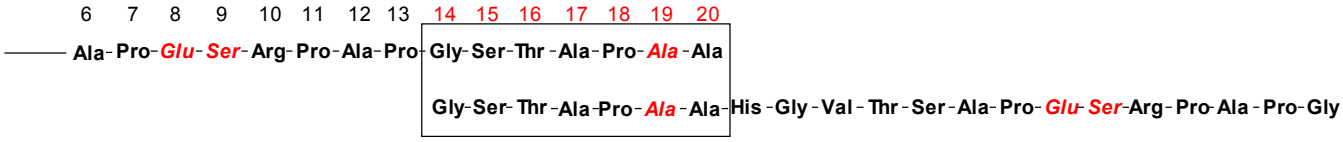



**Abb. 3.12.:** Peptidsequenz der MUC1 Repeating Unit mit variablem Schnitt im Vergleich zur 'normalen' MUC1-Repeating Unit

Es wurden zur Synthese die in Abb. 3.13. dargestellten Glycopeptide **31-35** mit den Monosaccharidbausteinen **8** und **25** ausgesucht. Verglichen mit der Peptidsequenz der Peptide **26-30** beginnt die Sequenz der Glycopeptide **31-35** mit $Gly^{14}$ (siehe Abb. 3.12.).

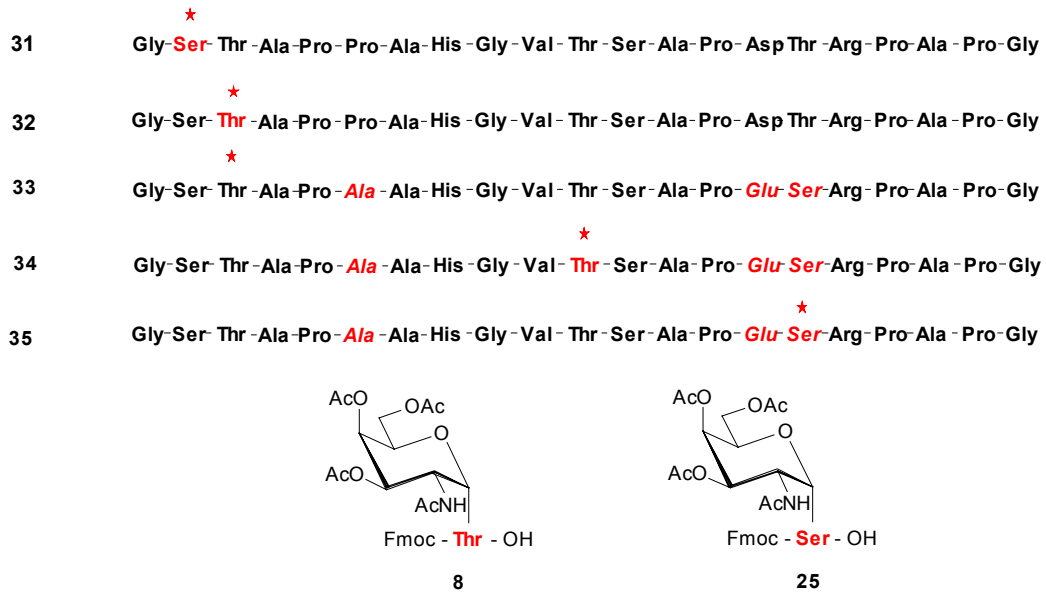



**Abb 3.13.:** Glycopeptidstrukturen **31-35** mit variablem Schnitt der MUC1 Repeating Unit

Die Synthese der Glycopeptide **31** bis **35** war jedoch unter den bei den anderen Verbindungen erfolgreichen Bedingungen nicht durchführbar. Eine vergleichende Synthese der entsprechenden unglycosylierten Sequenz führte ebenfalls zu keinem Produkt. Man muss annehmen, dass sich bei dieser Sequenzfolge während der Festphasensynthese der Glycopeptide **30-35** Sekundärstrukturen und Aggregationen bilden, die die weitere Synthese strikt verhindern.

### 3.5.5. Synthese von modifizierten Glycopeptiden mit den Disaccharidbausteinen 14 und 24

Die ebenfalls auf dem von Hanisch *et al.* gefundenen Sequenzpolymorphismus beruhenden Glycopeptide **36-45** wurden im Gegensatz zu den unter Abschnitt 5.3.1. beschriebenen Glycopeptiden **26-30** mit Hilfe der Disaccharidbausteine **14** und **24** dargestellt.

Die Synthese der in Abb. 3.14. wiedergegebenen Glycopeptide **36-45** wurde in Glassäulen, wie in Abschnitt 3.4.2. beschrieben, durchgeführt.

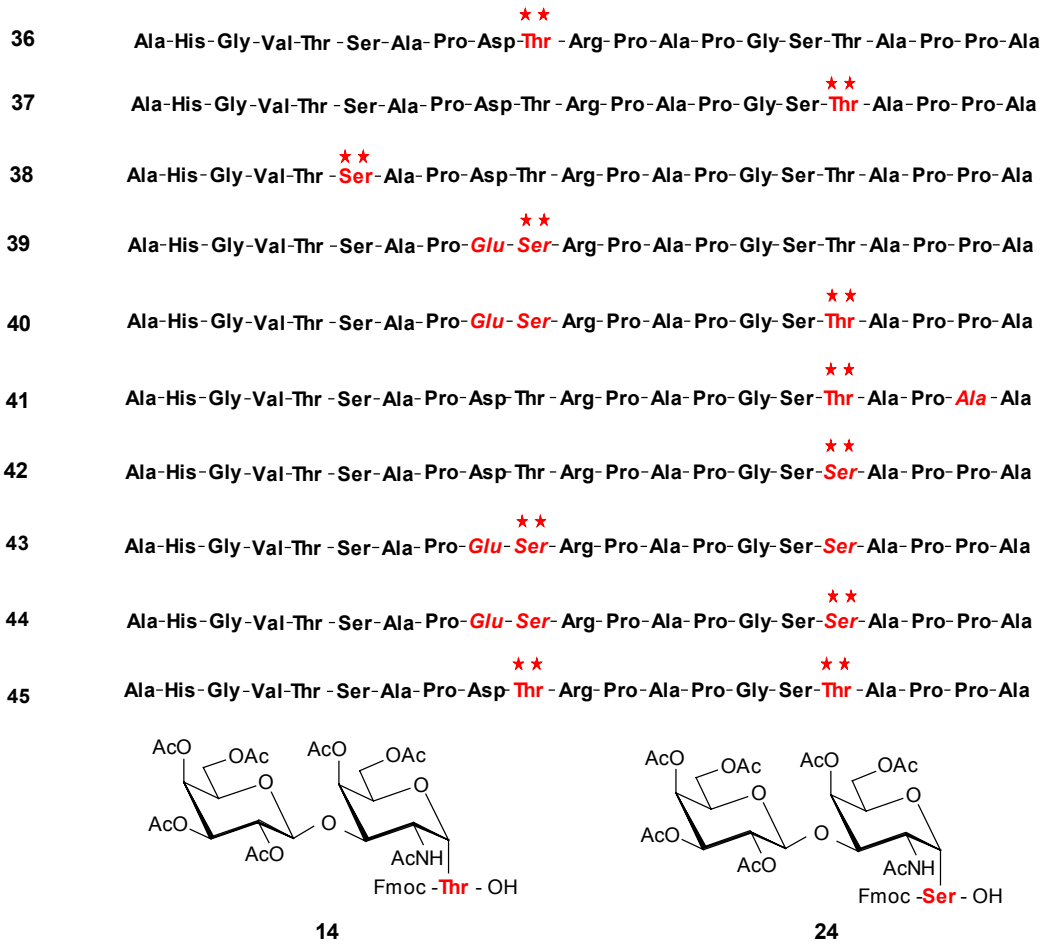



**Abb. 3.14.:** Glycopeptidstrukturen **36-45**. Es sind Asp[8]-Thr[9] gegen Glu-Ser, Thr[16] gegen Ser und Pro[19] gegen Ala substituiert. Die Glycosylierungsstelle wird mit Hilfe der Bausteine **14** und **24** eingeführt.

Die O-Deacetylierung der Glycosyleinheiten erfolgte mit dem Glycopeptid am Harz mit methanolischer Hydrazinhydratlösung binnen sechs Stunden. Die Deacetylierung wurde mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie überwacht. Zur Abspaltung der Glycopeptide vom polymeren Träger wurde mit 95 %iger wässriger TFA bei Raumtemperatur behandelt. Alle Schutzgruppen der Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäuren werden unter diesen Reaktionsbedingungen quantitativ mitabgespalten.

Die vom Harz abgespaltenen Peptide wurden durch präparative reversed phase HPLC mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten unter Zusatz von 0.1 % TFA gereinigt. Die HPLC-

Reinigung der Glycopeptide **39-45**, in welchen selektiv einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden, zeigte neben der Hauptsubstanz jeweils mindestens zwei weitere Nebenprodukte.

Die HPLC-Reinigung der Glycopeptide **36-38** wies neben der Hauptsubstanz nur sehr geringe Mengen Nebenprodukt auf. Die Ausbeuten der variierten Glycopetide **39-45** sind teilweise schlechter als die Ausbeuten der Glycopeptide **36-38**. Die durch HPLC abgetrennten Nebenprodukte sind nicht weiter untersucht worden.

Die Molekularmassen aller Glycopeptide wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt.

Die Gesamtausbeute der Synthese der Glycopeptide **36-45** sind der Tabelle 3.1. zu entnehmen.

| Glycopeptid | Ausbeute |
|---|---|
| **36** | 22 % |
| **37** | 16 % |
| **38** | 12 % |
| **39** | 10 % |
| **40** | 21 % |
| **41** | 7 % |
| **42** | 22 % |
| **43** | 21 % |
| **44** | 9 % |
| **45** | 7 % |

**Tab. 3.2.:** Gesamtausbeute der Synthese der Glycopeptide **36-45**

## 3.5.6. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide 36 bis 45

Von den mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifizierten Verbindungen wird zunächst zur groben Überprüfung der Verbindungen durch die Integration differenzierter spektraler Bereiche ein $^{1}$H-1D-NMR Spektrum aufgenommen. Es werden die erwartete Anzahl von Protonen gefunden.

Durch die Analyse der daraufhin in wässriger Lösung aufgenommenen $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY- und $^{1}$H-$^{1}$H-NOESY-Spektren konnten die Protonenverschiebungen der Peptid- und Kohlenhydratresonanzen des jeweiligen Glycopeptids ermittelt werden. Auch bei dieser Reihe von Glycopeptiden ist aufgrund starker Überlagerung eine genaue Bestimmung der chemischen Verschiebungen der Proline erschwert. Mit Hilfe des NOESY-Experiments war eine teilweise Bestimmung der Protonenresonanzen für die jeweilgen Proline möglich.

Die Ermittlung der Sequenz erfolgte hauptsächlich aus den jeweiligen NOESY-Spektren der Glycopeptide. Die geringen Mengen einiger Glycopeptide erschwerten die Durchführung der $^{1}$H-$^{13}$C-Experimente. Aufgrund der schlechten Signal-Rausch-Verhältnisse und der

notwendigen langen Meßzeiten wurde auf die Aufnahme von $^{1}H$-$^{13}C$-HMBC- und $^{1}H$-$^{13}C$-HMQC-Spektren verzichtet.

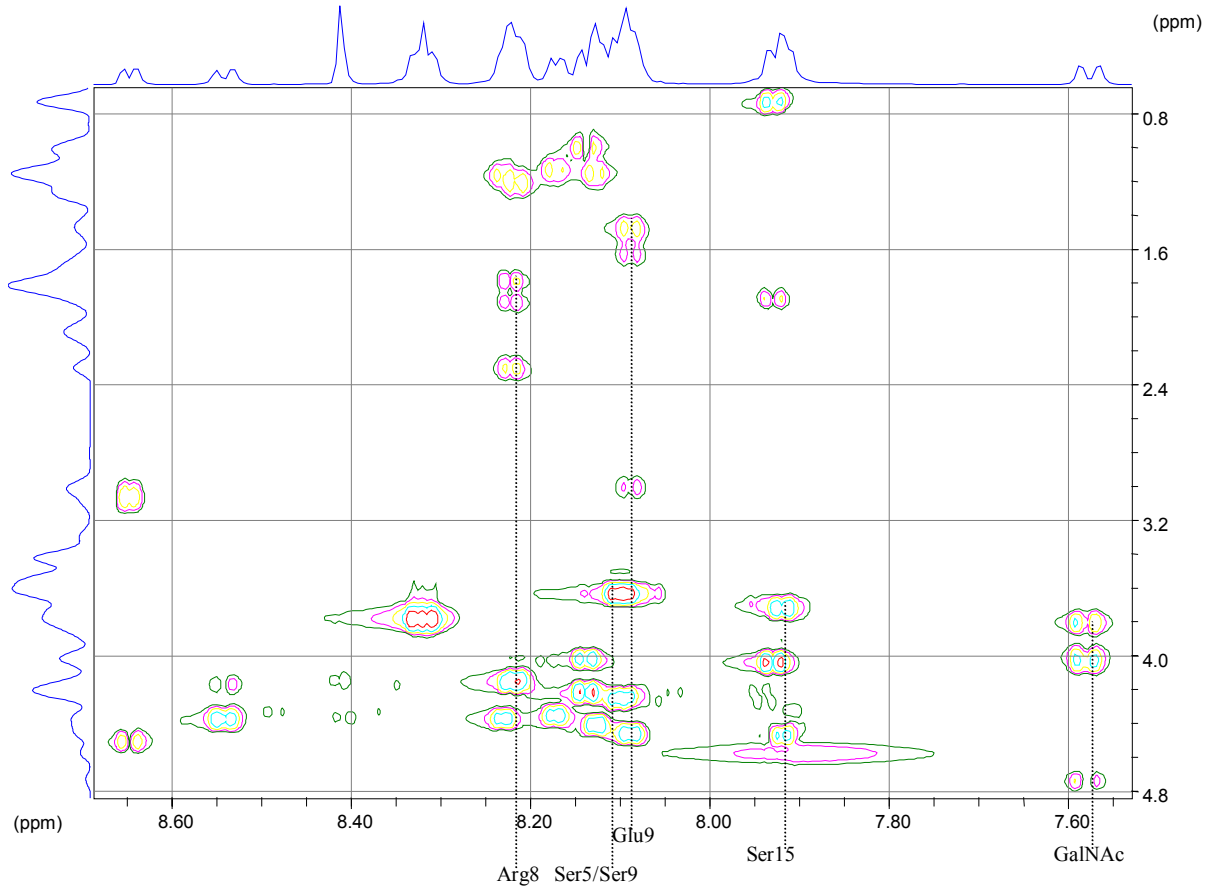



**Abb. 3.15.:** NH-Bereich aus dem $^{1}H$-$^{1}H$-TOCSY-Spektrum des Glycopeptids **40**

Die Protonenresonanzen der ausgetauschten Aminosäuren sowie die Verschiebungen der Kohlenhydratprotonen waren in den jeweiligen Glycopeptiden gut bestimmbar. Die NMR-Analyse bestätigt die angenommene Struktur für die einzelnen Glycopeptide.

## 3.6. Untersuchungen zur T-Zellstimulation

Makrophagen, B-Lymphozyten oder dendritische Zellen besitzen auf der Zelloberfläche Immunglobulinstrukturen, die antigene Strukturen, wie sie auch die tumorassoziierten antigenen Saccharistrukturen Tn und TF darstellen, spezifisch binden können und nach deren Abbau auf ihrer Oberfläche im Komplex mit den MHC I bzw. MHC II-Molekül präsentieren. An die auf diese Weise präsentierten Antigene binden die auf der Oberfläche von T-Zellen bzw. T-Helferzellen lokalisierte Proteine CD4 oder CD8. T-Zellen, die an einen von Makrophagen präsentierten Antigen-MHC-Komplex binden, werden zur Vermehrung angeregt. Durch klonale Selektion werden nur diejenigen Zellen in großer Menge produziert, die das Antigen spezifisch erkennen und binden. Durch Ausschüttung von Interleukinen werden T-Zellen spezifisch zur Teilung und Differenzierung angeregt. Die Ausschüttung von Interferonen, wie das Interferon γ (IFN γ) führt zusätzlich zur Makrophagenaktivierung und gesteigerten Expression von MHC-Molekülen.

Kürzere Ketten eines tumorspezifischen Proteins oder Glycoproteins können ebenfalls als Antigen wirksam sein. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass ein dem antigenen Bereich entsprechendes synthetisches Peptid T-Zellen stimulieren kann.

Die hier synthetisierten MUC1 Glycopeptide sind durch den Austausch von Aminosäuren im als antigen identifizierten DTR-Motif gegen die Aminosäuren ESR für immunologische Untersuchungen besonders interessant.

In den Laboratorien von Prof. Dr. J. Taylor-Papadimitriou, Imperial Cancer Research Fund, Immunotherapy Laboratory, Guy`s Hospital und Prof. Dr. M. Nuti, Dept. Experimental Medicine & Pathology, Rome wurden Assays zur T-Zell-Stimmulierung mit den Glycopeptiden **36-45** durchgeführt. Die bisherigen Ergebnisse dieser Assays werden in den folgenden Kapiteln erläutert.

### 3.6.1. Assay zur T-Zellstimulation

Ein Schema eines allgemein angewandten Assays zur T-Zellstimulation ist in Abb. 3.14. wiedergegeben.

Für den Assay werden die Leukozyten aus 20-25 mL Blut mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation separiert. Die Zellen werden gezählt und mit dem zu testenden Glycopeptid bei 37 °C inkubiert. PHA wird als Positivkontrolle mitgetestet. Nach vier Tagen Inkubationszeit wird eine genau definierte Menge $^{3}$H-Thymidin zugefügt und über Nacht inkubiert.

Durch Bestimmung des Einbau des radioaktiven $^{3}$H-Thymidin werden Hinweise auf die T-Zellstimulierung des getesteten Peptids erhalten. Die Stärke der T-Zellstimulation wird durch den Stimulationsindex wiedergegeben. Der Stimulationsindex wird berechnet durch

Dividieren der radioaktiven Counts durch den $^{3}$H-Thymidineinbau im Sample durch die Counts vor der Zugabe von $^{3}$H-Thymidin ermittelt.

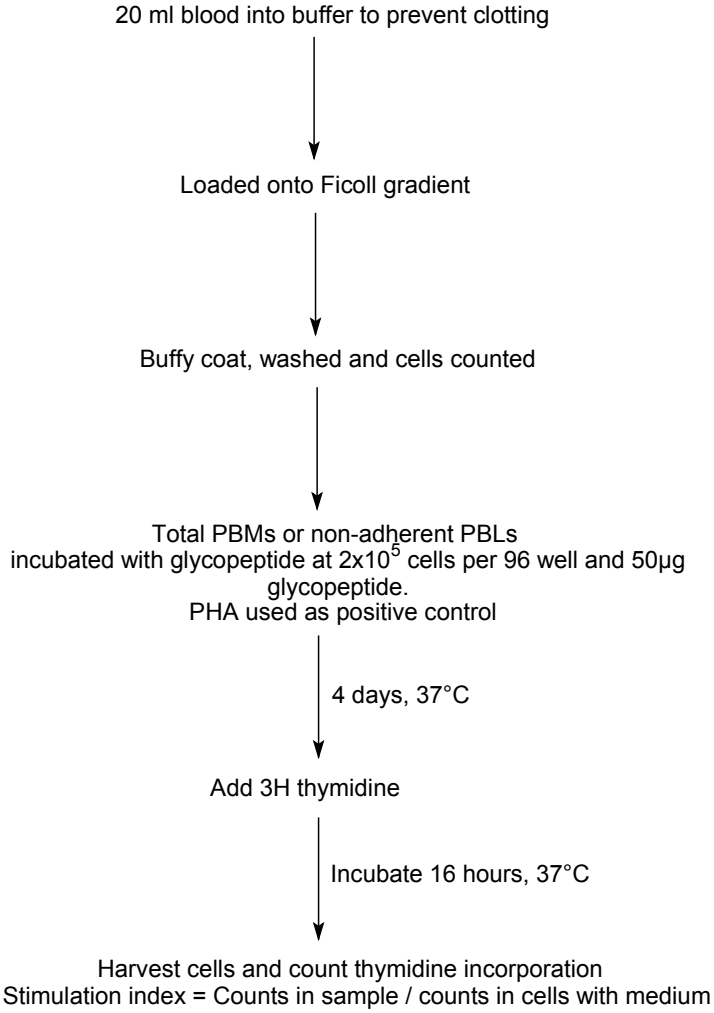



**Abb. 3.16.:** Schematischer Ablauf eines T-Zellstimulationsassays

Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode liegt in ihrer Ungenauigkeit und ihrer Anfälligkeit für Fehler. Das Blut aus verschiedenen Quellen liefert oft auch eine unterschiedliche Reaktion im Assay. Die Reproduzierbarkeit der Methode ist daher begrenzt.

## 3.6.2. Vorläufige Ergebnisse der T-Zellstimulation

Eine Reihe von schon synthetisierten MUC1-Glycopeptiden **A1-A8** mit unterschiedlichen Glycosylierungsstellen und Glycosylierungsgrad (vergleiche Abschnitt 3.3.) wurden bereits in einem T-Zellstimulationsassay mit dem Blut von Krebspatientinnen getestet. Die Ergebnisse sind als Beispiel in Abb. 3.6. mitaufgenommen.

In allen Assays ergibt das im DTR-Motif mit dem Tn- als auch TF-Saccharid glycosylierte MUC1-Glycopeptid **A2** eine gewisse T-Zell-Proliferation. Eine Stimulierung zeigt auch das vollglycosylierte Peptid **A8**. Bei der Testung zweier gesunder Patienten liefert neben dem im DTR-Motif glycosylierten Peptid, das am Ser$^{5}$ glycosylierte MUC1-Glycopeptid **A4** und das

vollglycosylierte Peptid **A8** die besten Werte. Es sei aber darauf hingewiesen, dass stark schwankende Werte bei unterschiedlichen Patienten zu beobachten waren, wodurch die Reproduzierbarkeit eingeschränkt ist.

Mit den neuen MUC1 Glycopeptiden **36-45** wurde ebenfalls ein Assay zur T-Zellstimulierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.17. zusammengefasst.

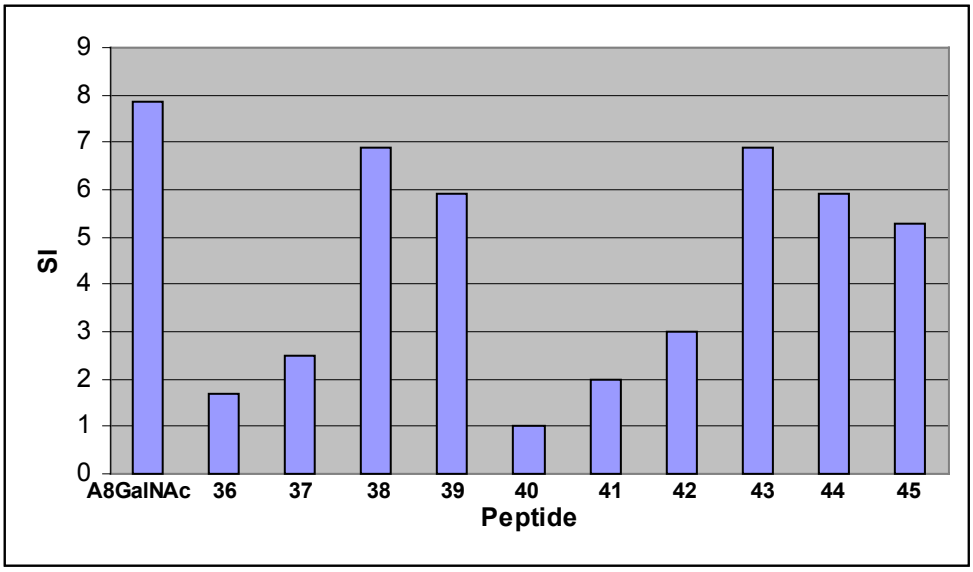



**Abb. 3.17.:** Stimulationsindices der Peptide **36-45**. **A8GalNA**c steht für das vollglycosylierte MUC1 Peptid. Es dient hier als Positivkontrolle.

Die Glycopeptide **38** (=**A4**) und **45**, welche keinen Austausch an Aminosäuren aufweisen, zeigen eine Stimulation, die fast mit der Stimulation durch das als Positivkontrolle verwendete vollgylcosylierte MUC1 Peptid **A8GalNAc** vergleichbar ist. Die Gycopeptide **42**, **43** und **44** zeigen ebenfalls eine Stimulation. Bei allen drei Glycopeptiden ist $Thr^{16}$ gegen $Ser^{16}$ ausgetauscht. Die Glycopeptide **39**, **40** und **41**, in denen teilweise $Asp^{8}Thr^{9}$ gegen $Glu^{8}Ser^{9}$ substituiert ist, haben niedrige Stimulationsindices. Insgesamt sind die Stimulationswerte jedoch erheblich niedriger im Vergleich mit vorher gefundenen Werten der Abb. 3.6., was auch auf die Unsicherheit dieser Methode hinweist.

Um Diskrepanzen zu den früheren Werten von **A1-A8** zu klären, wurden die Glycopeptide **A1-A8** vollständig neu synthetisiert. Ein Stimulationstest mit den neu synthetisierten Substanzen ergab jetzt ebenfalls niedrigere Stimulationswerte, die denen von **36-45** entsprachen. Die niedrigere Stimulation zu den vorherigen Glycopeptidchargen könnten verschiedene Ursachen haben. Da Blut aus verschiedenen Quellen verwandt wird, können auch unterschiedliche Reaktionen im Assay beobachtet werden. Weitere Fehlerquellen können, trotz genauester Analyse, mögliche Verunreinigungen in den Glycopeptidchargen sein. Diese könnten selbst eine gute Stimulation hervorrufen bzw. unterdrücken. Mögliche Verunreinigungen in den bei der Testung verwandten Reagenzien bilden ebenfalls eine Fehlerquelle. Bei dem Verfahren bleibt weiterhin ungeklärt, ob während der gesamten Inkubationszeit Veränderungen am Glycopeptidmolekül auftreten. Dieses ist ein sehr

wichtiger Punkt, der in weiteren Untersuchungen genauer geklärt werden muss. Es könnten nur Teile des Glycopeptides für eine Anregung des MHC-Apparates verantwortlich sein. Insofern sind die hier eingefügten Befunde nur als vorläufige Untersuchungen anzusehen, die sicher einer weiteren detaillierten Überprüfung bedürfen. Von Finn wird auch diskutiert, dass eine Präsentation mit dentritischen Zellen günstigere Ergebnisse geben soll.

## 3.7. Synthese der Glycopeptide 46-54, basierend auf der Struktur des Glycopeptids 38=A4

Das neu synthetisierte Glycopeptid **36=A4**, das am Thr$^{9}$ glycosyliert ist, und das neue Peptid **37=A3** mit einer Glycosylierungsstelle am Thr$^{16}$ zeigten im neuen Test (siehe Abb. 3.17.) auch nur eine mäßige Stimulierung im Gegensatz zu der ersten synthetisierten Charge (siehe Abb. 3.6.). Das neu synthetisierte Glycopeptid **38=A4** zeigt im neuen Test noch die beste Stimulation. Ausgehend von diesen Befunden wurde in Zusammenarbeit mit Meike Jungclaus eine Serie von modifizierten Glycopeptiden basierend auf der Struktur des Peptids **38=A4** synthetisiert (Abb. 3.18.).

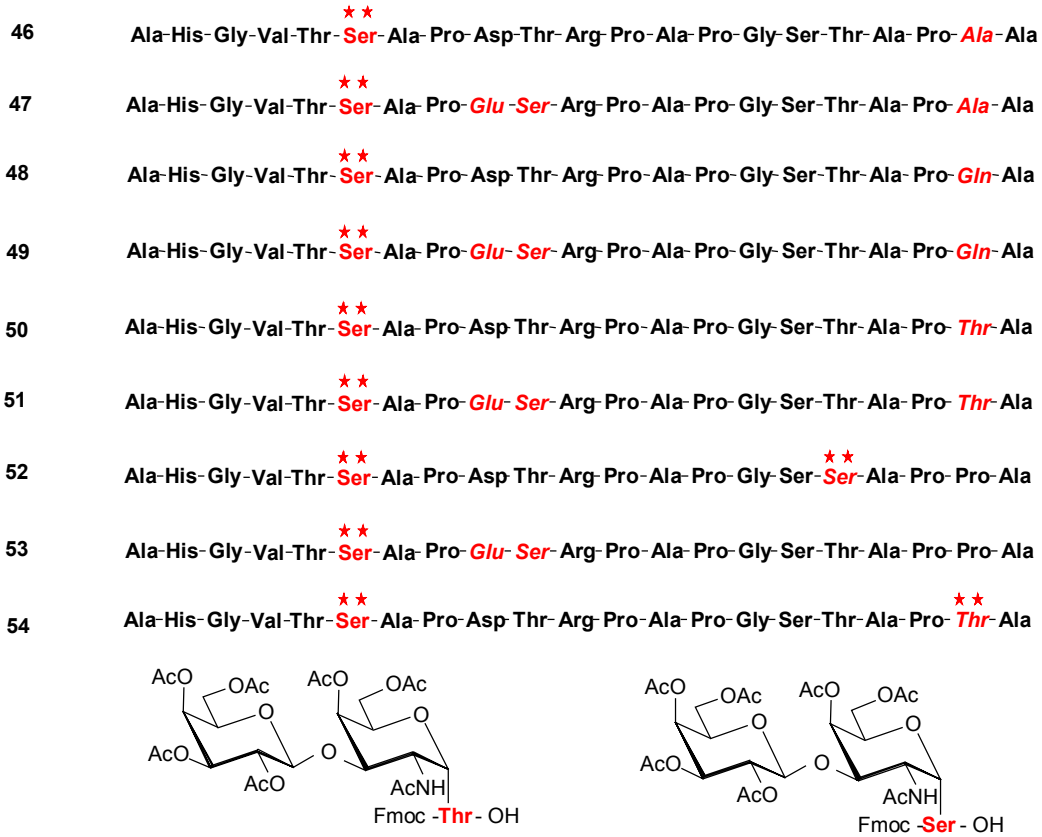



**Abb. 3.18.:** Glycopeptidstrukturen **46-54**. Die Strukturen sind alle am Ser$^{5}$ mit dem Disaccharid GalGalNAc glycosyliert. Die Aminosäuren Asp$^{8}$Thr$^{9}$, Thr$^{16}$ sowie Pro$^{20}$ sind gegen Glu$^{8}$Ser$^{9}$, Ser$^{16}$ und Ala$^{20}$, Gln$^{20}$ bzw. Thr$^{20}$ ausgetauscht. In **52** ist Ser$^{16}$ und in **54** Thr$^{19}$ glycosyliert.

$Ser^{6}$ ist in allen Strukturen mit dem Disaccharid GalGalNAc glycosyliert. Die Aminosäuren $Asp^{8}Thr^{9}$, $Thr^{16}$ sowie $Pro^{20}$ sind gegen $Glu^{8}Ser^{9}$, $Ser^{16}$ und $Ala^{20}$, $Gln^{20}$ bzw. $Thr^{20}$ ausgetauscht.

Die Glycopeptide **46-53** wurden parallel in Glassäulen synthetisiert (Abschnitt 3.4.2.). Die Deblockierung der Saccharideinheiten erfolgte in diesem Fall nach der Abspaltung der Peptide vom Harz durch Behandlung mit 95 %ige wässrige TFA bei Raumtemperatur. Es wird hierfür das Produkt mit katalytischen Mengen Natriummethanolat unter genauer Einhaltung des pH-Wertes (8.1-8.3) 2-3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortschritt der Deacetylierungreaktion wird durch Dünnschichtchromatograpie überprüft.

Die Reaktion wird durch Neutralisation mit Essigsäure abgebrochen. Zur Entfernung organischer Reste, wie sie die mitabgespaltenen Schutzgruppen darstellen, wird mit kaltem *t*-Butylmethylether behandelt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und nach Filtration über einen Cellulosefilter, Porengröße 0.8 μm (Sartorius GmbH, Göttingen) durch reversed phase HPLC mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten unter Zusatz von 0.1 % TFA gereinigt.

Die Molekularmassen der Glycopeptide **46-53** wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt.

Die Gesamtausbeute der Glycopeptide **46-53** sind der Tabelle 3.4. zu entnehmen.

| Glycopeptid | Ausbeute |
|---|---|
| **46** | 24 % |
| **46** | 21 % |
| **47** | 31 % |
| **48** | 26 % |
| **49** | 41 % |
| **50** | 33 % |
| **51** | 20 % |
| **52** | 34 % |

**Tab. 3.4:** Geamtausbeute der Synthese der Glycopetide **64-53**

Die Glycopeptide **46-53** sollen auf eine mögliche T-Zellstimulation getestet werden.

# 4. Synthese von Glycopeptiden mit N- und O-Glycosylierungsstellen

Recherchen in einer Proteindatenbank (Swiss Prot) von bisher untersuchten MUC1-Molekülen zeigten am Ende der Tandem Repeating Domäne zwischen den Aminosäuren 935 bis 955 eine nicht perfekte Repeating Unit mit einem Austausch des Threonin im DTR-Motif gegen Asn. In dieser nicht perfekten Repeating Unit sind außerdem $Pro^{13}$ gegen Leu und $Ala^{21}$ gegen Val ausgetauscht. In natürlich vorkommenden MUC1 Glycoproteinen findet man zwischen der Repeating Unit und der transmembranen Domäne N-Glycosylierungsstellen. Damit bietet sich die Synthese gemischter Glycopeptide vom MUC1-Typ an, in denen eine N-Glycosylierungsstelle neben einer O-Glycosylierungsstelle vorliegt.

Normale MUC1 Repeating Unit:

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala | His | Gly | Val | Thr | Ser | Ala | Pro | Asp | Thr | Arg | Pro | Ala | Pro | Gly | Ser | Thr | Ala | Pro | Pro | Ala |

Repeating Unit zwischen den Aminosäuren 935 bis 955:

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala | His | Gly | Val | Thr | Ser | Ala | Pro | Asp | *Asn* | Arg | Pro | Ala | *Leu* | Gly | Ser | Thr | Ala | Pro | Pro | *Val* |

**Abb. 4.1.:** Normale MUC1 Repeating unit und Repeating unit zwischen den Aminosäuren 935 und 955

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher erstmalig N- und O-gylcosylierten Glycopeptide synthetisiert werden. Die Synthese und Reinigung der normalen MUC1-Repeat-Sequenz war in guter Ausbeute möglich. Der Austausch von Thr gegen Asn ermöglicht die Einführung einer N-Glycosylierungsstelle neben O-Glycosylierungsstellen. Die O-glycosylierten Seitenketten können während der Peptidfestphasensynthese mit Hilfe der unter 3.2. bereits beschriebenen Glycosylaminosäuren **8**, **25**, **14** und **24** eingeführt werden. Zur Einführung der N-glycosidischen Seitenkette ist ein neuer Baustein erforderlich, der Asparagin mit dem entsprechenden Saccharidrest enthält. Ein geeigneter Baustein besteht aus Asparagin mit Chitobiose als Saccaridrest (S. Meyer, Dissertation). Die Chitobiose kann hierbei aus dem Chitin gewonnen werden.

## 4.1. Darstellung des D-GlcNAc-β(1-4)-D-GlcNAc-β(1-N)-Asn Bausteins

N-Glycoproteine enthalten nahezu ausschließlich Kohlenhydratstrukturen, in denen wie in der Core C-Struktur N-Acetylchitobiosereste β-glycosidisch an die Amidgruppe der Seitenkette der Aminosäure Asparagin gebunden sind. Das Reaktionsschema für den hier verwendeten Syntheseweg zur Gewinnung des $N_\gamma$-Chitobiosylasparaginbausteins ausgehend von Chitin wird auf Abb. 4.2. wiedergegeben. Im Arbeitskreis von Prof. Meyer liegen für eine derartige Synthese bereits gute Erfahrungen vor.

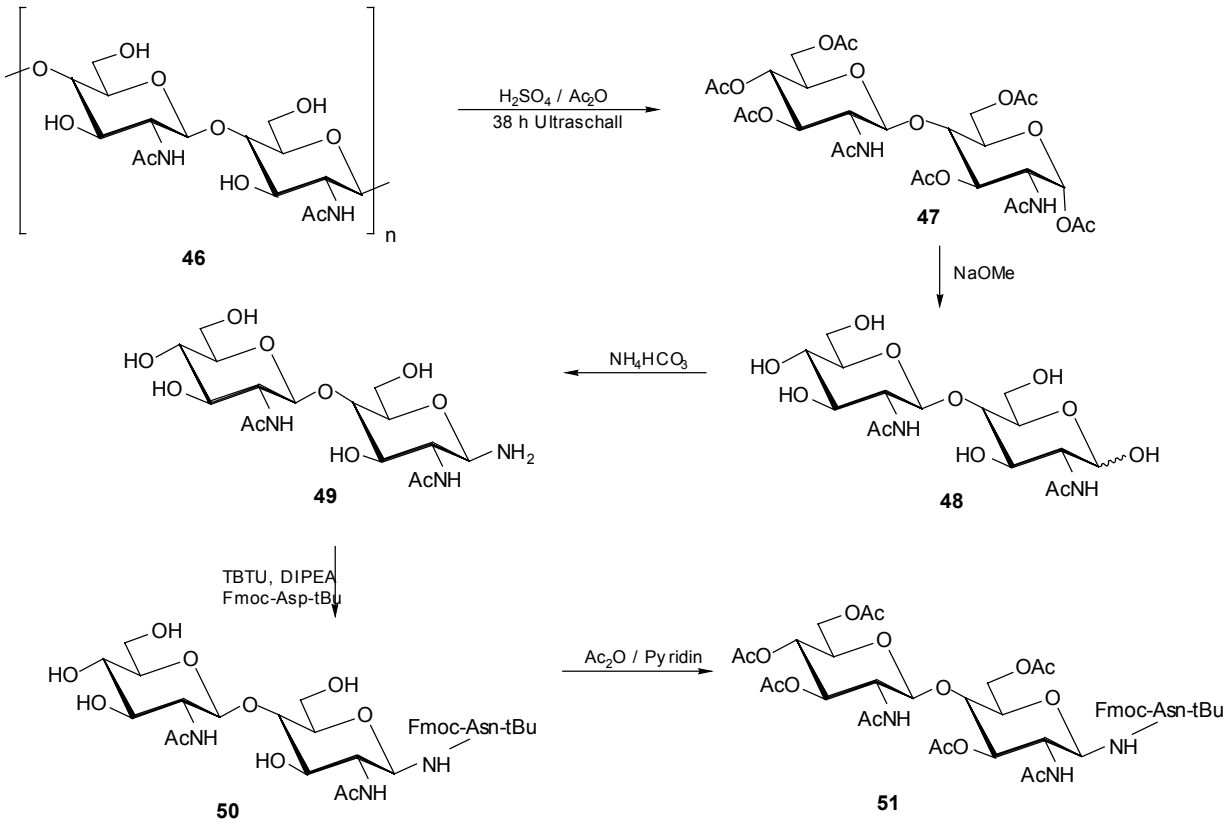



**Abb. 4.2.:** Reaktionsschema zur Darstellung des Chitobiosylbausteins

Bei der sauren Acetolyse des gut gepulverten Chitins in einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure bei 36 °C unter 38 Stunden Ultraschalleinwirkung erhält ein Oligomerengemisch, aus dem das Chitobioseoctaacetat als Hauptprodukt isolierbar ist (Scheel 1996). Bei der Chitinspaltung ist die Einhaltung der Reaktionstemperatur besonders wichtig, da bei niedriger Reaktionstemperatur die Bildung längerkettiger Oligomere überwiegt, während bei einer hohen Reaktionstemperatur der Anteil an Monosaccharid anwächst.

Das Reaktionsgemisch des unter Ultraschalleinwirkung gespaltenen Chitins wird nach Abkühlen auf Raumtemperatur auf Eiswasser gegeben und mit Natriumacetat vesetzt.

Vor einer Säulentrennung ist es empfehlenswert, das mit Dichlormethan extrahierte Rohprodukt in Essigester aufzunehmen. Langkettige Oligomere gehen bei Behandlung mit Essigester in Lösung, während das Bioseacetat und Trioseacetat im Niederschlag verbleibt (D. Mampers, mündliche Mitteilung). Nach einer Mitteldrucksäulentrennung und Umkristallisation aus Ethanol wird das reine α-Chitobioseoctaacetat **57** erhalten.

Durch Einwirken von katalytischen Mengen Natriummethoxid in Methanol werden die Acetylgruppen abgespalten. Die so erhaltene entblockierte Verbindung **58** wird nach der Methode von Kochetkow in gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung in das 1-β-Glycosylamin **59** überführt. Nach Entfernen der Salze im Hochvakuum wird das Glycosylamin **59** mit Fmoc-Asp-*t*Bu unter TBTU-Katalyse zum Disaccharidbaustein **60** umgesetzt. Anschließende Acetylierung führt zu **61**. Die *t*Bu-Schutzgruppe wird vor dem

Einsatz des Bausteins in die Glycopeptidsynthese durch Umsetzung mit 95 %iger wässriger TFA quantitativ entfernt.

## 4.2. Synthese N- und O-glycosylierter Glycopeptide

Die Synthese der Glycopeptide **63-67** erfolgt parallel in Glassäulen, nach dem in Kapitel 3.4.2. beschriebenen Kupplungsverfahren.

**63** Ala-His-Gly-Val-Thr-★★Ser-Ala-Pro-Asp-★★*Asn*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala

**64** Ala-His-Gly-Val-Thr-★★Ser-Ala-Pro-Asp-★★*Asn*-Arg-Pro-Ala-*Leu*-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-*Val*

**65** Ala-His-Gly-Val-Thr-★★*Asn*-Ala-Pro-Asp-★★Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala

**66** Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-★★*Asn*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-★★Thr-Ala-Pro-Prö-Ala

**67** Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-★★*Asn*-Ala

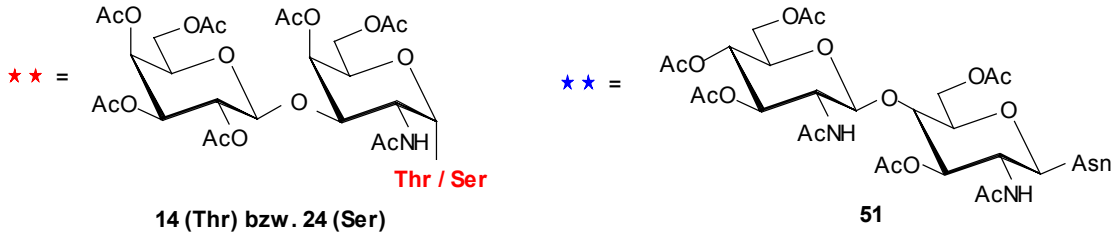



**Abb. 4.3.:** Glycopeptidstrukturen mit N- und O-Glycosylierungsstellen

Bei der Einführung des Chitobiosyl-Bausteins in die wachsende Peptidkette kann als Nebenreaktion eine unerwünschte Cyclisierung des Asparagins zum Aspartimid beobachtet werden.

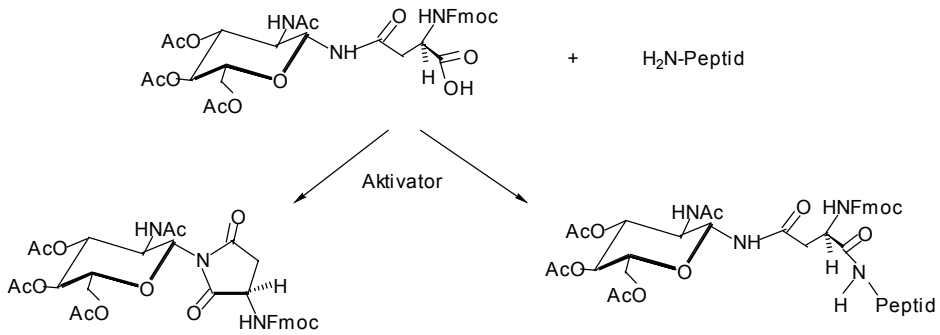



**Abb. 4.4.:** Aspartimidbildung als Nebenreaktion der N-Glycopeptidsynthese

Durch Variation der Kupplungsreagenzien läßt sich diese unerwünschte Nebenreaktion größtenteils unterdrücken (S. Meyer, Dissertation). Auch für den N-Baustein haben sich die Kupplungsbedingungen der O-Bausteine mit TBTU und DIPEA als vorteilhaft erwiesen. Dennoch konnte die Aspartimidbildung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die photometrische Überwachung der Synthese der N,O-Glycopeptide **63-67** zeigt, dass die Belegungszahl des Trägermaterials nach dem Glycosylierungsschritt mit dem Chitobiosylbaustein abnimmt, was auf die Cyclisierung des Asparagins zum Aspartimid zurückzuführen ist. Durch die beobachtete Aspartimidbildung geht Chitobiosylbaustein verloren und es entstehen Fehlsequenzen.

Die Deblockierung der Glycosyleinheiten bei diesen Glycopeptiden in letzter Stufe wurde nach Abspalten der Glycopeptide vom polymeren Träger durchgeführt. Die Abspaltung der Glycopeptide vom polymeren Träger erfolgte mit 95 %iger wässriger TFA bei Raumtemperatur.

Zur O-Deacetylierung der Glycosyleinheiten wurden die N,O-Glycopeptide nach Abspalten vom Harz unter genauem Einhalten des pH-Wertes von 8.5 mit katalytischen Mengen Natrium in Methanol behandelt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie überwacht.

Die O-deacetylierten Peptide wurden durch präparative reversed phase HPLC mit einem Wasser/Acetonitril-Gradienten unter Zusatz von 0.1 % TFA gereinigt. Die HPLC-Reinigung wurde durch das Auftreten einer Reihe von Nebenprodukten erschwert. Bei allen hier synthetisierten Glycopeptiden traten neben der Hauptsubstanz eine Reihe von Nebenprodukten auf, die nicht genauer analysiert wurden.

Die Molekularmassen aller Glycopeptide **63-67 w**urden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt.

Die Gesamtausbeute der Synthese der Glycopeptide **63-67** sind der Tabelle 3.3. zu entnehmen.

| Glycopeptid | Ausbeute |
|---|---|
| **63** | 20 % |
| **64** | 17 % |
| **65** | 17 % |
| **66** | 15 % |
| **67** | 12 % |

**Tab. 4.1.:** Gesamtausbeute der Synthese der Glycopeptide **63-67**

## 4.3. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide 63 bis 67

Von den mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifizierten Verbindungen wurden jeweils ein $^{1}$H-1D-NMR Spektrum aufgenommen. Die Integration differenzierter spektraler Bereiche zeigt die erwartete Anzahl von Protonen. Die Analyse der in Wasser aufgenommenen $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY- und $^{1}$H-$^{1}$H-NOESY-Spektren erlauben eine eindeutige Bestimmung der Peptid- und Kohlenhydratprotonen des jeweiligen Glycopeptids.

Auch hier macht die Überlagerung der Verschiebungen der Aminosäuren Gly$^{3}$ und Gly$^{15}$ eine eindeutige Bestimmung nicht möglich. Durch die ebenfalls starke Überlagerung der Protonensignale der Proline ist die Zuordnung der Signale zu den einzelnen Prolinen erheblich erschwert.

Die Protonenverschiebungen der zwei unterschiedlichen Bausteine sind im $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY-Experiment gut erkennbar. Sie liefern die erwarteten Werte für die chemischen Verschiebungen der entsprechenden Protonen.

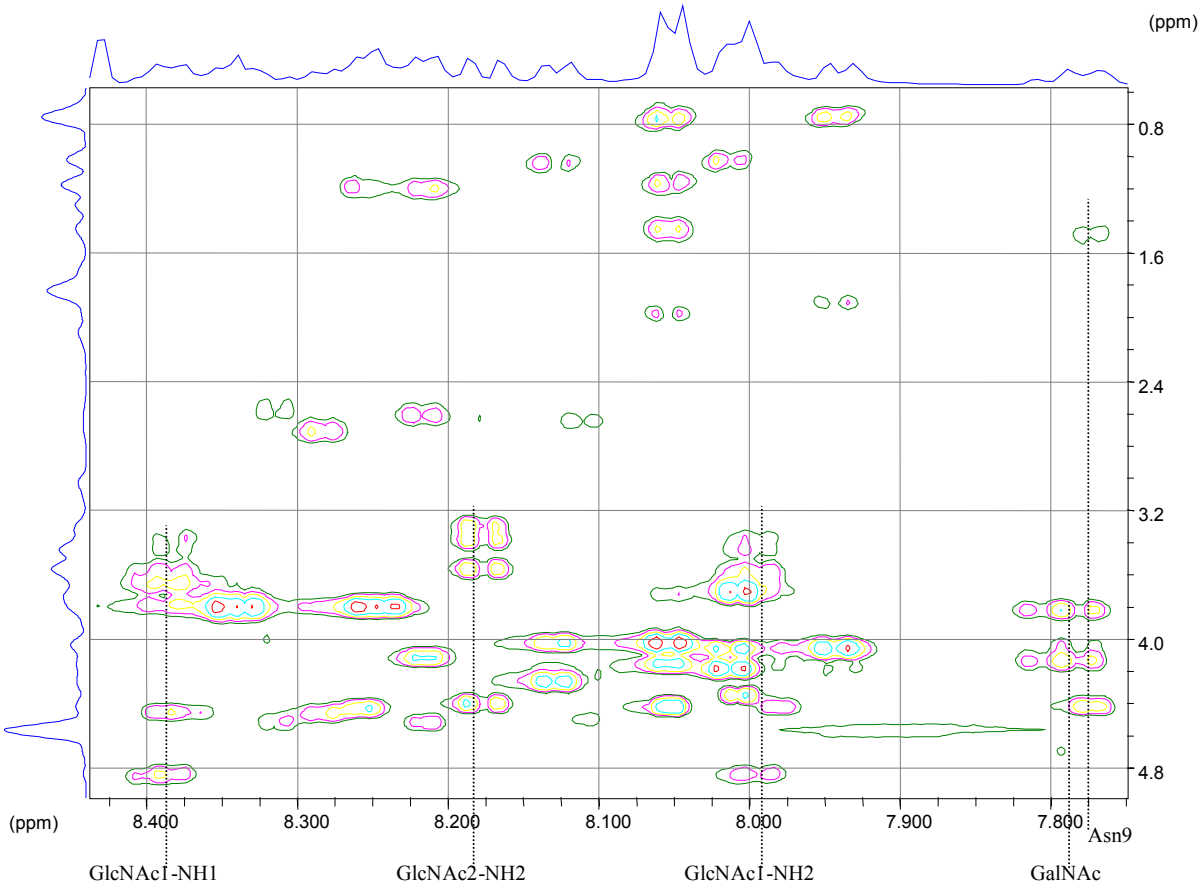



**Abb. 4.5.:** Auschnitt aus einem $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY Experiment des Glycopeptids **64** in $H_2O/D_2O$ 9:1. Es sind die Korrelationssignale der Amidprotonen des Peptidrückrats mit den Seitenkettenprotonen abgebildet

Auf die Aufnahme von von HMBC- und HMQC-Spektren wurde aufgrund der für die Anfertigung der Spektren erforderlichen langen Meßzeiten verzichtet. Die Bestimmung der Sequenz konnte aus dem NOESY-Spektrum durchgeführt werden.

# 5. Chemoenzymatische Synthese sialylierter MUC1-Glycopeptide

## 5.1. Bisherige Versuche

In den letzten Jahren wurden neben auf der Tn-Antigenstruktur basierenden synthetischen Glycokonjugaten auch deren sialylierte Form sTn als potentielle Vaccine untersucht (J. Taylor-Papadimitriou 1999, T. Toyokuni 1995, S.J. Danishefsky 2000). In diesen Glycokonjugaten ist das Antigen an ein Carrier-Protein wie das 'keyhole limpet hemocyanin' (KLH) oder an ein immunogenes synthetisches Lipopeptid gebunden. In klinischen Studien mit Brustkrebspatientinnen zeigten sTn-KLH-Konjugate in Kombination mit Cyclophosphamid einen therapeutischen Effekt, wobei die Bildung spezifischer Antikörper beobachtet wurde (G.D. MacLean 1996).

Das für die Synthese der antigenen Peptidstruktur benutzte sTn-Antigen wurde bisher in den meisten Fällen als Building Block-Einheit chemisch synthetisiert und in die wachsende Peptidkette eingeführt.

Die Einführung einer Sialylgruppe in Glycopeptide oder die Synthese entsprechender Building Block-Einheiten gestaltet sich allgemein als schwierig. Die hohe Empfindlichkeit der Sialylgruppe erschwert die rein chemische Synthese. Die negative Ladung der Neuraminsäure erfordert eine geeignete Schutzgruppe für den Einsatz in der Glycopeptidfestphasensynthese. Die Synthese eines derartigen Glycosylaminosäurebausteins mit einem Neuraminsäurerest erfordert ein Vielzahl von Reaktionsstufen. In der Literatur sind wenige vielstufige Synthesen auf organochemischem Weg für die sTn-Glycopeptide (Y. Nakahara 1991, B. Liebe 1997, M. Elofsson 1997) und 2,3-sTn-Strukur (J.B. Schwarz 1999, Y. Nakahara 1998, S. Komba 1999) beschrieben.

Eine Alternative zur organochemischen Synthese mit einem Sialylglycosylaminosäure-baustein stellt die enzymatische Einführung der Sialylgruppe in ein fertig synthetisiertes Glycopeptid in der letzten Stufe dar. Hierfür würde zunächst eine Glycopeptid, welches mit dem T- bzw. Tn-Antigen glycosyliert ist, dargestellt und anschließend als Substrat mit Cytidinmonophosphat-5-N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) unter Katalyse einer Sialyltransferase umgesetzt werden. Die enzymatische Sialylierung würde zu den komplexen sTn- bzw. 2,3-sT-Strukturen führen.

Die Übertragung von Neuraminsäure auf ein Glycopeptid mit Hilfe von CMP-Neu5Ac und der 2,6- oder 2,3-Sialyltransferase zur chemoenzymtischen Synthese im semipräparativen Maßstab wurde von Kihlberg *et. al*. untersucht (Kihlberg 2001). Gegenstand der Untersuchungen von Kihlberg war unter anderem die Übertragung von 5-N-Acetylneuraminsäure auf ein synthetisches, im DTR-Motif glycosyliertes MUC1 Glycopeptid mit einer 2,6- wie auch einer 2,3-Sialyltransferase.

Damit ist eine gute Basis für die chemoenzymatische Synthese komplexer Glycopeptide geschaffen. Die Synthese von Peptiden mit dem Tn- bzw. TF-Antigen und die anschließende

enzymatische Übertragung von 5-N-Acetylneuraminsäure auf die Saccharidreste dürfte die beste Methode zur Gewinnung von sialylierten Glycopeptiden sein.

Die enzymatische Synthese von Kihlberg wurde mit einem Glycopeptid mit einer Glycosylierungsstelle durchgeführt. Es soll hier die enzymatische Übertragung von 5-N-Acetylneuraminsäure auf synthetische MUC1-Glycopeptide mit mehreren Glycosylierungsstellen untersucht werden.

## 5.2. Aufarbeitung der 2,3-Sialyltransferase

Die verwendete 2,3-Sialyltransferase wurde in HI5-Insektenzellen exprimiert. Nach jedem Reinigungsschritt wurde die Enzymaktivität überprüft. Die Vermessung der Enzymaktivität erfolgte durch die Bestimmung der Übertragung von $^{13}$C-markiertem CMP-Neu5Ac auf das Glycoprotein Asialofetin.

Für einen Testansatz wurde jeweils zu 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 0.04 % Triton CF-54, 0.5 mg Asialofetin und 2 mM $^{13}$C-markiertem CMP-Neu5Ac (5000 cpm/ mmol) 10-20 µL der enzymhaltigen Lösung gegeben und 30 Minuten bei 37 ° C inkubiert. Durch Zugabe von 1 mL 2.5 % PTA wurde die Reaktion abgebrochen. Das Asialofetin wurde auf GF/C-Filtern von Whatman immobilisiert und mit wenig Ethanol gewaschen. Durch Bestimmung der $^{13}$C-Radioaktivität kann auf die Übertragung von 5-N-Acetylneuraminsäure auf Asialofetin geschlossen werden.

Alle Reinigungsschritte waren aufgrund der hohen Empfindlichkeit der 2,3-Sialyltransferase im Kühlraum bei 4° C durchzuführen. Es wurde nach jedem Reinigungsschritt nach der beschriebenen Methode die Enzymaktivität in allen anfallenden Lösungen überprüft.

Zur Aufarbeitung wurden zunächst die Zellen von der Mediumlösung durch Zentrifugation bei 4 °C mit 1200 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde nach Überprüfen der enzymatischen Aktivität (Silalylierung von Asialofetin unter Verwendung von $^{13}$C-markiertem CMP-Neu5Ac) auf Amberlite IRA95 in 25mM BisTris-Puffer (pH 6.5) und 10 mM NaCl gegeben und eine halbe Stunde bei 4 C geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Amberlite wurde das enzymhaltige Filtrat 1:1 (Volumenverhältnisse) mit 25mM BisTris-Puffer (pH 6.5) und 10 mM NaCl verdünnt. Zur weiteren Reinigung wurde das verdünnte enzymhaltige Filtrat über eine S-Sepharose-Säule gegeben. Die an die S-Sepharose gebundene 2,3-Sialyltransferase wurde mit einem Salzgradienten (Puffer A: 25mM BisTris-Puffer, pH 6.5, 10 mM NaCl; Puffer B: 25mM BisTris-Puffer, pH 6.5, 1,5 mM NaCl) eluiert und in mehreren Fraktionen gesammelt. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch Zentrifugenfiltration bei 4 C konzentriert. Zur Konservierung wurde 1:1 (Volumenverhältnisse) mit Glycerin und 0.03 % $NaN_3$ versetzt und vorsichtig gemischt. Es wurden je 1 ml abgefüllt und bei –80 °C tiefgefroren. Es wurden 8.37 Units 2,3-Sialyltransferase isoliert.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten wurden von mir im Laboratorium von Prof. Dr. H. Clausen, Kopenhagen, durchgeführt.

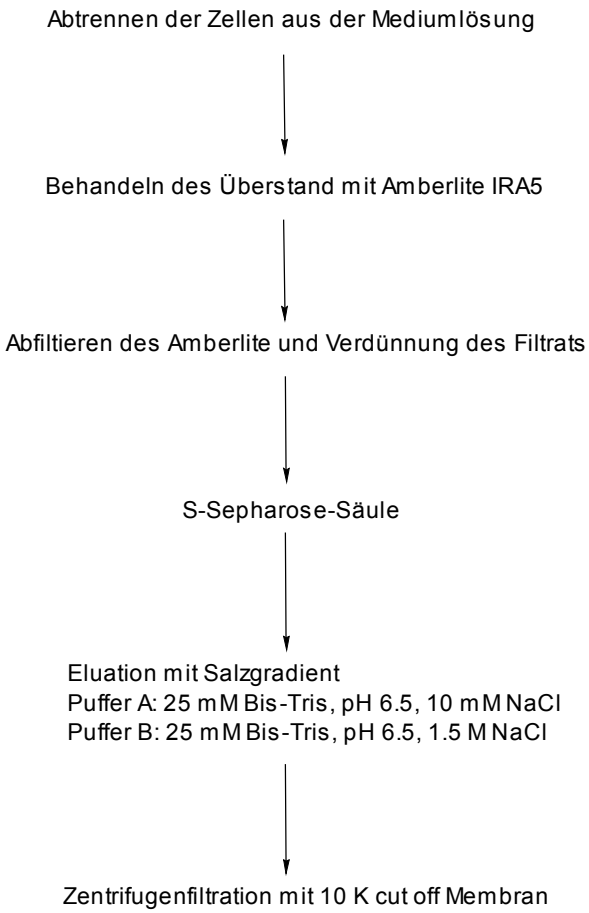



**Abb. 5.1.:** Schematische Darstellung der Reinigung der 2,3-Sialyltransferase

## 5.3. Synthese der Glycopeptidsubstrate für die 2,3-Sialyltransferase

Als Glycopeptidsubstrate wurden die in Abb. 5.2. dargestellten, mit dem T-Antigen glycosylierten Glycopeptide verwendet.

Die Glycopeptide **68** bis **75** wurden in einer multiplen Festphasensynthese in Glassäulen wie in Abschnitt 3.4.2. beschrieben, dargestellt. Die Glycosylierungsstellen wurden in die wachsende Peptidkette mit Hilfe der Disaccharidbausteine **14** und **24** eingeführt. Die Kupplung der Disaccharidbausteine erfolgte unter Katalyse von TBTU und DIPEA.

Die Deacetylierung der Kohlenhydratreste erfolgte nach der Abspaltung der Glycopeptide vom Harz mit wässriger 95 %iger TFA-Lösung. Zur O-Deacetylierung wurde das vom Harz abgespaltene Glycopeptid mit katalytischen Mengen Natriummethanolat unter genauer Einhaltung des pH-Werts (8.3–8.5) behandelt. Die Reaktion wurde dünnschicht-chromatographisch verfolgt. Bei den mehrfach glycosylierten Peptiden **74** und **75** mußte die Deacetylierung in einer verdünnteren Peptidlösung durchgeführt werden, um eine vollständige Deacetylierung der Kohlenhydrateinheiten zu erzielen. Zur Abtrennung eventueller organischer Verunreinigungen wurden die vom polymeren Träger abgespaltenen und O-deacetylierten Peptide mit kaltem *t*-Butylmethylether behandelt. Der Überstand wurde

in wenig Wasser aufgenommen und mit Hilfe eines Edelstahlaufsatzes über Sartorius-Cellulosefilter, Porengröße 0.8 µm, filtriert

Die deacetylierten Peptide wurden mittels präparativer reversed phase HPLC mit einem Wasser/Acetonitril Gradienten unter Zusatz von 0.1 % TFA gereinigt. Bei der HPLC-Reinigung der mehrfach glycosylierten Peptide **71** bis **73**, insbesondere des vierfach glycosylierten Peptids **74** und vollglycosylierten Peptids **75** traten eine Reihe von Nebenprodukten auf, die nach einer zweiten HPLC-Reinigung abgetrennt werden konnten.

**Abb. 5.2.:** Strukturen der Glycopeptidsubstrate für die 2,3-Glycosyltransferase

## 5.4. Umsatz der Glycopeptide 68 bis 75 mit 2,3-Sialyltransferase

Für die enzymatische Übertragung der 5-N-Acetylneuraminsäure mit CMP-Neu5Ac unter Katalyse der 2,3-Sialyltransferase wurden die Glycopeptide **68-75** als Substrate verwendet. Es konnten so die folgenden Glycopeptide auf chemoenzymatischem Weg synthetisiert werden:

**Abb. 5.3.:** Strukturen der chemoenzymatisch aus den Glycoeptiden **68-75** durch enzymatische Übertragung von Neuraminsäure dargestellten Glycopeptide **76-83**

Für den enzymatischen Ansatz wurde die unter Abschnitt 5.3. beschriebene, gereinigte 2,3-Sialyltransferase (30 µL ≈ 2 mU pro Glycosylierungsstelle) zu einer Lösung des Glycopeptids (0.5 mg pro Ansatz) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 0.1 % Triton X-100 gegeben. Der Tris-Puffer enthielt pro Glycosylierungsstelle 2mM CMP-Neu5Ac und 2 mM alkalische Phosphatase. Die Lösung wurde bei 37° C inkubiert.

Zur Ermittlung der Inkubationszeiten der einzelnen Glycopeptide wurden vorher Testansätze durchgeführt, von denen fortlaufend jeweils nach einer halbe Stunde eine kleine Menge

Reaktionslösung entnommen wurde, in denen der Verlauf der Umsetzung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt wurde.

Da die Salze in der Reaktionslösung die MALDI-TOF-Massenspektrometrie erheblich beeinträchtigen, ist es notwendig, die Präparation für die massenspektrometrische Vermessung mit C18-Zip Tips durchzuführen. Bei den C18-Zip Tips handelt es sich um 10 µL-Pipettenspitzen, an deren Ende reversed phase C18-Material fixiert ist. Es eignet sich besonders gut zur Reinigung und Konzentration von Glycopeptiden in femtomol bis picomol-Mengen zur Analyse. Zum Beladen wird die Probe mehrfach aufgezogen. Es wird in 0.5 µL Schritten direkt auf den mit der Matrix beladenen Probenteller eluiert. Zur Elution wird in der angegebenen Reihenfolge reines bidesttilliertes Wasser, bidestilliertes Wasser/Acetonitril 70/30, bidestilliertes Wasser/Acetonitril 50/50 und bidestilliertes Wasser/Acetonitril 30/70 unter Zusatz von 0.1 % TFA verwendet.

Die Glycopeptide **68-70** waren bereits nach drei Stunden Inkubationszeit zur entsprechenden sialylierten Verbindung **76-73** umgesetzt. Zu den Glycopeptidsubstraten **71-73** mußte nach drei Stunden Inkubationszeit erneut 2 mU 2,3-Sialyltransferase und 2 mM CMP-Neu5Ac zur Vervollständigung der Siaylierungsreaktion zugegeben werden. Bei den Glycopeptiden **74** und **75** war nach vier Stunden Inkubationszeit die erneute Zugabe von 4 mU 2,3-Sialyltransferase und 4 mM CMP-Neu5Ac notwendig. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt sechs Stunden konnte die Reaktion abgebrochen werden.

Die auf diese Weise ermittelten Bedingungen und Inkubationszeiten in den Vortests wurden angewandt zur Synthese größerer Mengen sialylierter Glycopeptide. Die Umsetzung von kleinen Mengen der Substrate mit 2,3-Sialyltransferase in den Vortests ließ sich ohne Schwierigkeiten auf größere Mengen übertragen und erwies sich als optimal.

Die Sialylierungsreaktionen wurden durch Einfrieren des Reaktionsansatzes abgebrochen. Zur Abtrennung des Triton wurde der Reaktionsansatz nach Einengen über eine LH 20-Säule gegeben und fraktioniert gesammelt. Die Ermittlung der produkthaltigen Fraktionen erfolgte mit Hilfe der MALDI-TOF-MS. Die vereinigten und eingeengten Fraktionen wurden durch eine präparative RP 18-Säule gereinigt. Bei den sialylierten Glycopeptiden **82** und **83** war zur Abtrennung der Nebenprodukte eine weitere präparative HPLC-Trennung notwendig.

Neben den vollständig sialylierten Peptiden treten im MALDI-TOF-Massenspektrum Nebenprodukte auf, deren Massen der Produkt-Masse weniger einer oder zwei Neuraminsäuren + $K^+$ entsprechen. Dies deutet darauf hin, dass bei der massenspektrometrischen Vermessung Neuraminsäure vom Produkt abgespalten wurde und das es sich um Fragmentprodukte handelt. Es wurde ein sialyliertes Glycopeptid exemplarisch weiter untersucht. Die Untersuchung des sialylierten Glycopeptids **79** mittels ESI-MS zeigte ein einheitliches Produkt, wie aus Abb. 5.4. ersichtlich.

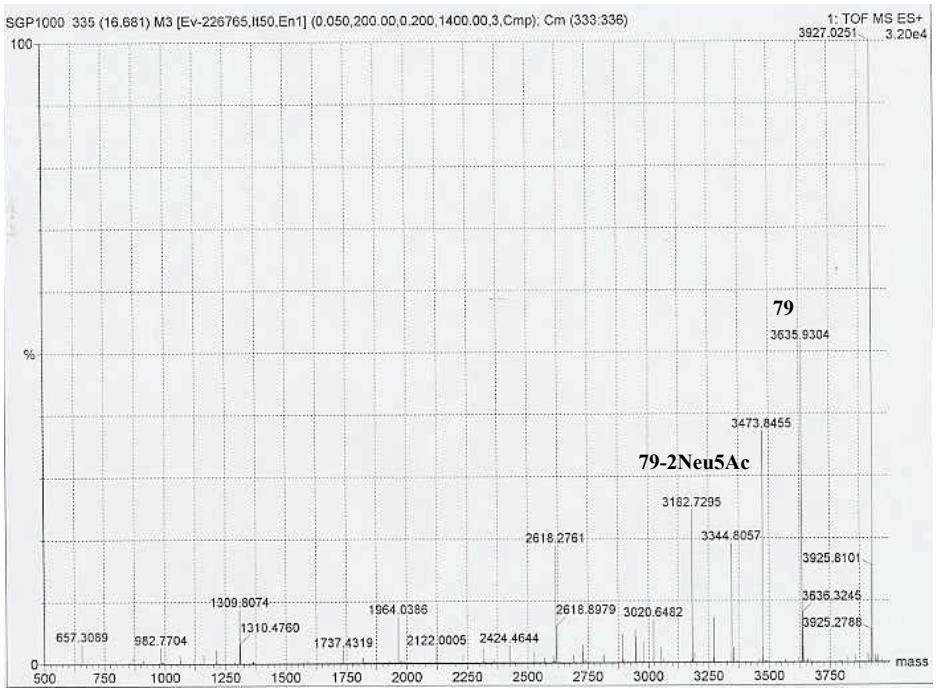



**Abb. 5.4.:** ESI-MS des sialylierten Glycopeptids **79**.

Die analytische HPLC auf einer reversed phase C18-Säule lieferte ebenfalls ein einheitliches Produkt (Abb. 5.5.).

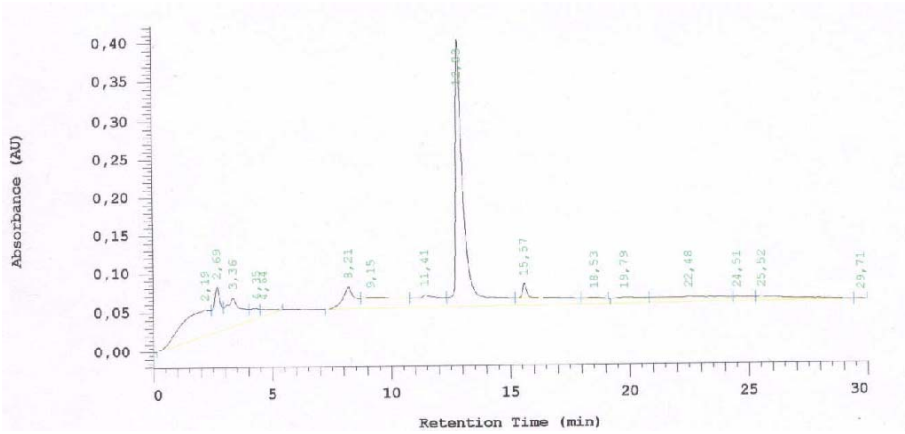



**Abb. 5.5.:** Analytische HPLC der Verbindung **79** auf einer reversed phase C18-Säule

Die ESI-Massenspektren aller weiteren sialylierten Glycopeptide zeigten die jeweils erwartete Masse für das jeweilige Produkt. Daneben waren in geringer Menge Fragmentierungspeaks zu beobachten, die den Verlust von einer 5-N-Acetylneuraminsäure-Einheit entsprachen Es ist nicht restlos auszuschließen, dass es sich bei diesen Sekundärprodukten um nicht vollständig sialylierte Peptide handelt, die durch HPLC vom Hauptprodukt nicht abtrennbar waren. Zur Klärung dieses Problems wären empfindlichere Trenn- und Meßtechniken notwendig, als bei der Ausführung dieser Arbeit zur Verfügung standen.

Die Gesamtausbeute der Synthese der Glycopeptide **76-83** sind der Tabelle 5.2. zu entnehmen.

| Glycopeptid | Ausbeute |
|---|---|
| **76** | 87% |
| **77** | 62 % |
| **78** | 92 % |
| **79** | 84 % |
| **80** | 73 % |
| **81** | 73% |
| **82** | 90 % |
| **83** | 80 % |

**Tab. 5.2.:** Gesamtausbeute der Synthese der sialylierten Glycopeptide **76-83**

## 5.5. NMR-spektroskopische Untersuchung der Glycopeptide 76 bis 83

Von den enzymatisch sialylierten Glycopeptiden **76-83** wurde zunächst ein $^{1}$H-1D-NMR-Spektrum in wässriger Lösung aufgenommen. Es wurden komplexe Spektren mit zum Teil geringer Dispersion der Signale erhalten. Die Integration differenzierter spektraler Bereiche zeigt die erwarteten Werte für die Protonen. Ausgehend von den Resonanzen der Aminprotonen der Aminosäuren wurden die Protonenverschiebungen der einzelnen Aminosäuren innerhalb der Sequenz mit Hilfe der $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY- und $^{1}$H-$^{1}$H-NOESY-Spektren ermittelt.

Eine Aufnahme von HMBC- und HMQC-Spektren konnte aufgrund der geringen Substanzmenge und der damit verbundenen langen Meßzeiten nicht vorgenommen werden. Die Ermittlung der Peptidsequenzen konnte erfolgreich durch die Auswertung der NOESY-Spektren durchgeführt werden.

Die Protonenresonanzen einzelner Aminosäuren sind stark überlagert. Die Zuordnung der Signale wird dadurch erheblich erschwert. So ist aufgrund der Überlagerung der Verschiebungen der Aminosäuren Gly$^{3}$ und Gly$^{15}$ eine eindeutige Bestimmung nicht möglich. Weiterhin erschwert die starke Überlagerung der chemischen Verschiebungen der Proline die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Aminosäuren erheblich.

Die Kohlenhydratresonanzen der sialylierten Glycopeptide treten nicht differenziert auf (vgl. Abb. 5.6.). Bei der Analyse der $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY-Spektren der sialylierten mehrfach glycosylierten Verbindungen ist bei einigen Verbindungen eine zweite Kohlenhydratspur zu erkennen.

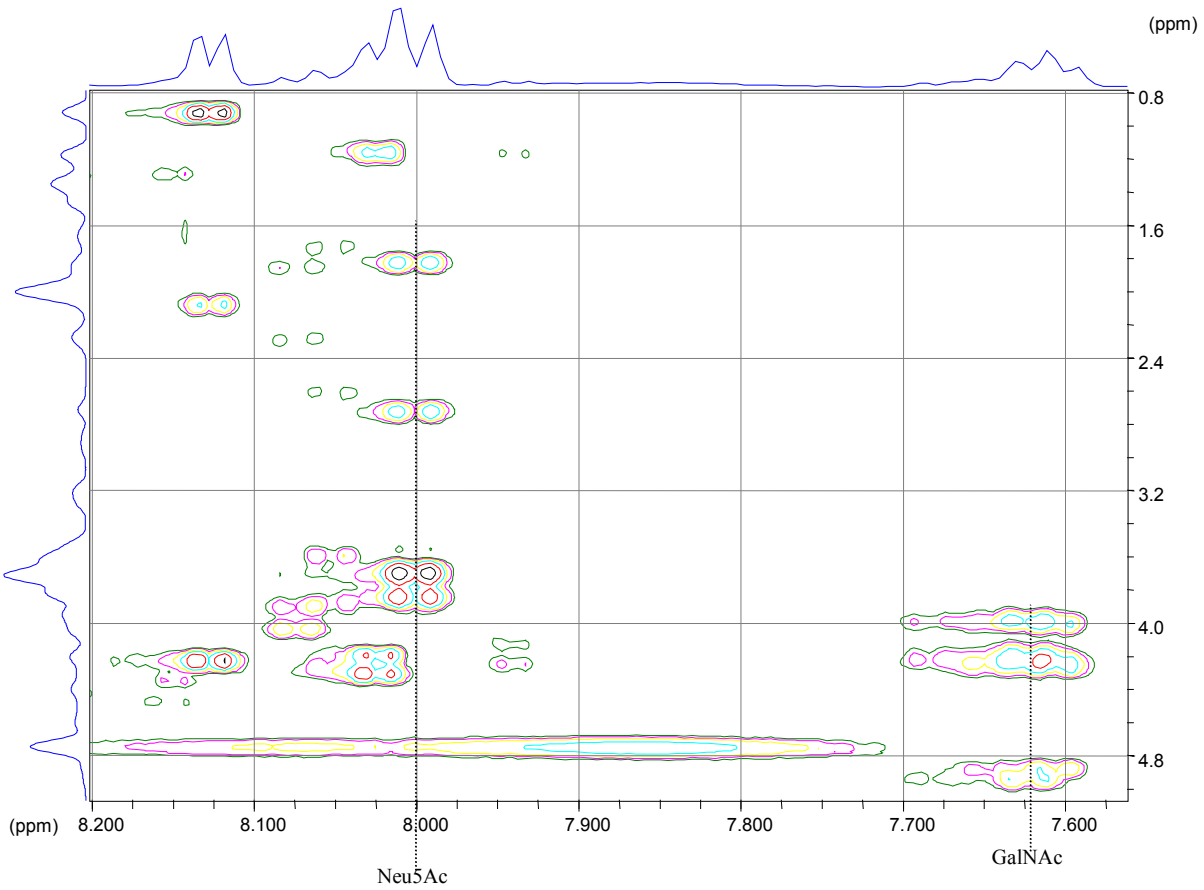



**Abb. 5.6.:** Ausschnitt aus einem $^{1}$H-$^{1}$H-TOCSY Experiment des Glycopeptids **81** in $H_2O/D_2O$ 9:1.

Es könnte möglich sein, dass diese zweite Spur von in geringer Menge vorhandenen nicht vollständig sialylierten Nebenprodukten stammen, die mit den zur Verfügung stehenden Trennmethoden nicht abgetrennt werden konnten.

Die schlechte Dispersion der Signale in den NMR-Spektren erschwert die Bestimmung der Kopplungskonstanten der peptidischen Hα- und Hβ-Protonen erheblich. Es wurde daher auf deren Bestimmung hier verzichtet.

Alle synthetisierten sialylierten Glycopeptide sind für eine biologische Testung in London und Rom vorgesehen, die in weiteren Untersuchungen erfolgen soll.

# 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Reihen von Glycopeptiden analog der aus zwanzig Aminosäuren bestehenden MUC1 Repeating Unit synthetisiert.

Im ersten Teil wurde eine Serie von MUC 1 Glycopeptiden basierend auf neuen Ergebnissen hinsichtlich der Aminosäuresequenz der Repeating Unit dargestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Glycopeptide mit N-Glycosylierungsstellen neben O-Glycosylierungsstellen dargestellt. Zur Untersuchung der Synthese wurde die Sequenz der MUC1 Repeating Unit als Modell gewählt.

Im dritten Teil der Arbeit wurden erstmals auf chemoenzymtischem Weg Glycopeptide mit dem sTF-Antigen unter Katalyse der 2,3-Sialyltransferase dargestellt.

Die Synthesen der Glycopeptide erfolgten manuell in einem multiplen 20-Loch Peptidsynthesizer oder manuell in Glassäulen, deren Ausgänge durch einen Vakuumverteiler verbunden waren. Der Einsatz der Glycosylaminosäurebausteine **8, 25, 14** und **24** ermöglichte die definierte Einführung einer Monosaccharid-Einheit (**8, 25**) bzw. einer Disaccharid-Einheit (**14, 24**) in die wachsende Peptidkette.

Alle hier synthetisierten Glycopeptide sind für eine Testung in einem T-Zellstimulationsassay vorgesehen und wurden zur Durchführung des Assays an die Laboratorien von Prof. Dr. Joyce Taylor-Papadimitriou, London und Prof. Dr. Marianna Nuti, Rom übergeben. Die bereits parallel begonnenen Untersuchungen sollen fortgesetzt werden. Prof. Dr. Hans-Georg Hanisch, Köln wird ferner das Verhalten der Glycopeptide im MHC-Komplex untersuchen.

Die Ergebnisse der einzelnen Teile sind nachfolgend zusammengefaßt.

1) Die Aminosäuresequenz der MUC1 Repeating Unit in Krebszellen, nicht aber in gesunden Zellen, weisen einen Polymorphismus bezüglich der Aminosäuresequenz auf. Es sind die Aminosäuren $Asp^{8}Thr^{9}$ gegen $Glu^{8}Ser^{9}$ und $Pro^{19}$ gegen $Ala^{19}$,$Thr^{19}$ oder $Gln^{19}$ ausgetauscht (Hanisch 2000). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden die Glycopeptide **26-30** in einem manuellen 20-Loch Peptidsynthesizer synthetisiert. Die Glycosylierungsstellen wurden mit Hilfe der Monosaccahridbausteine **8** und **25** eingeführt. Nach gelungener Synthese der Verbindungen **26-30** wurden die mit den Disaccharidbausteinen **14** und **24** glycosylierten modifizierten MUC1 Glycopeptide **36-45** synthetisiert. Die Protonenverschiebungen der Glycopeptide **26-30** und **36-45** konnten mittels $^{1}H^{1}H$-TOCSY- und $^{1}H^{1}H$-NOESY-NMR-Spektren zugeordnet werden. Die mit Hilfe der $^{1}H^{1}H$-NOESY-Spektren ermittelten Sequenzen entsprachen der angenommenen Sequenzen für die Glycopeptide.

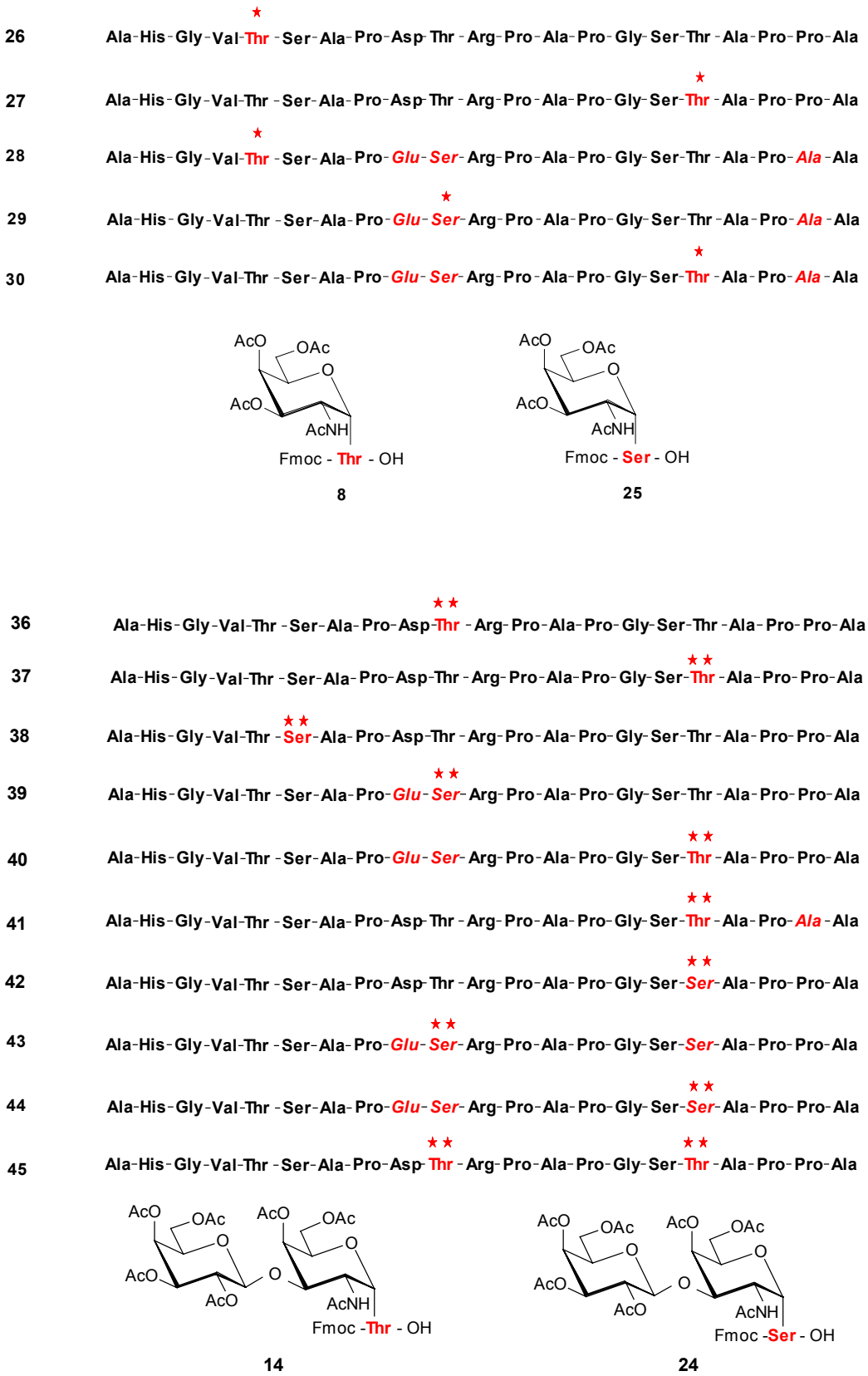



**Abb. 6.1.:** Glycopeptide **26-30** mit dem Tn-Monosaccharidbaustein **28** und **25** und Glycopeptide **36-45** mit dem TF-Disaccharidbaustein **14** und **24**.

Die synthetisierten Glycopeptide **36-45** wurden in einem T-Zellstimulationsassay in den Laboratorien von Prof. Joyce Taylor-Papadimitriou getestet. Im Stimulationsassay zeigte das Glycopeptid **38**, mit einer Glycosylierungsstelle am $Ser^5$, eine in einer weiteren Testung einigermaßen reproduzierbare Stimulierung. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die Glycopeptide **46-54** für weitere Untersuchungen synthetisiert. Alle Glycopeptide **46-54** sind am $Ser^5$ glycosyliert, einzelne Aminosäuren wurden ausgetauscht.

**46** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Ala*-Ala

**47** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-*Glu*-*Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Ala*-Ala

**48** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Gln*-Ala

**49** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-*Glu*-*Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Gln*-Ala

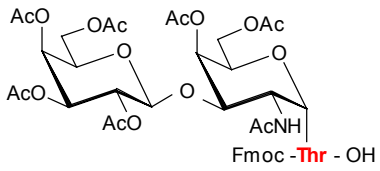
**50** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Thr*-Ala

**51** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-*Glu*-*Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Thr*-Ala

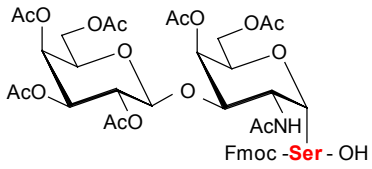
**52** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-*Ser*-Ala-Pro-Pro-Ala

**53** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-*Glu*-*Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala

**54** Ala-His-Gly-Val-Thr-**Ser**-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Thr*-Ala




**14**




**24**

**Abb. 6.2.:** Glycopeptide **46-54**

2) Recherchen in einer Proteindatenbank (Swiss Prot) zeigten, daß ein Austausch von Thr gegen Asn im DTR-Motif am Ende der Tandem Repeating Domäne bei natürlich vorkommenden MUC1-Glycoproteinen möglich ist. Ferner findet man im MUC1-Glycoprotein zwischen der Repeating Unit und der transmembranen Domäne N-Glycosylierungsstellen. Damit ist auch die Synthese von gemischten Glycopeptiden von Interesse, bei denen die Peptidkette sowohl eine N-glycosidische als auch eine O-glycosidische Saccharidseitenkette enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals derartige Verbindungen **63-67** dargestellt, bei denen die Peptidsequenz von der MUC1-Struktur abgeleitet wurde.

Für die Synthese war ein neuer Glycosylaminosäurebaustein notwendig, um entsprechend während des Glycopeptidaufbaus eine N-glycosidische Saccharidseitenkette einzuführen. Als Baustein wurde die Glycosylaminosäure aus Asparagin und Chitobiose gewählt, da zur Synthese dieses Bausteins im Arbeitskreis von Prof. Meyer bereits Erfahrungen vorlagen.

Während die Kupplung der O-Bausteine weitgehend problemlos durchgeführt werden konnte, wurde bei der Kupplung des Chitobiosylbausteins die Bildung von Aspartimid als Nebenreaktion beobachtet.

Die Bestimmung der Protonenverschiebungen der Glycopeptide **63-67** mit unterschiedlichen Glycosylierungsstellen Saccharidresten konnte aus dem $^{1}H^{1}H$-TOCSY, und $^{1}H^{1}H$-NOESY-NMR.Spektren durchgeführt werden. Die Protonenverschiebungen der Kohlenhydratprotonen der unterschiedlichen Saccharidreste konnten aus dem $^{1}H^{1}H$-TOCSY zugeordnet werden.

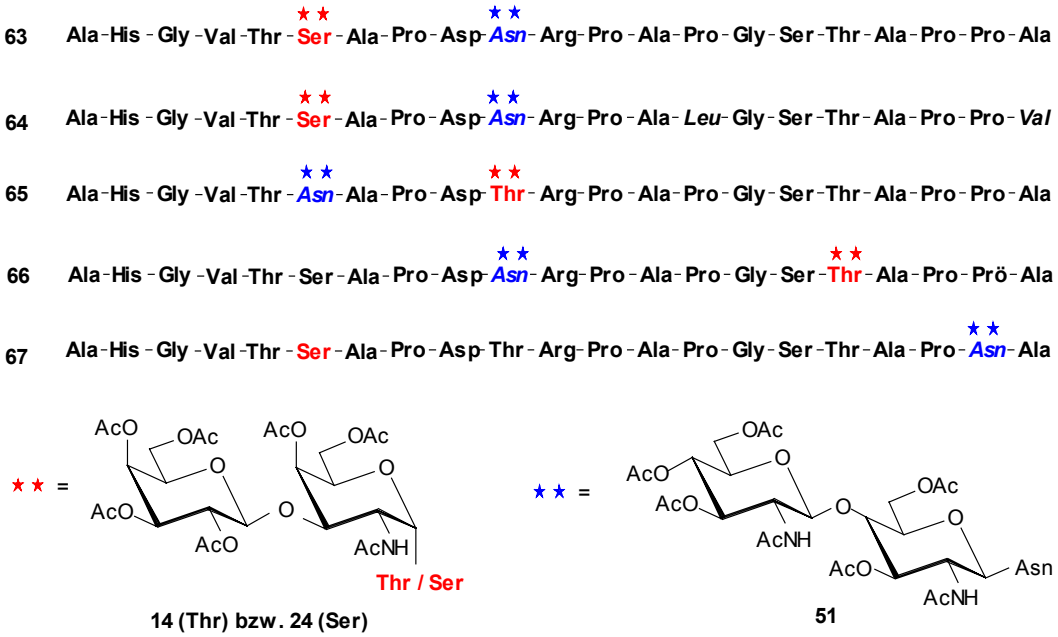



**Abb. 6.3.:** Glycopeptide **63-67** mit N-glycosidisch und O-glycosidisch gebundenen Saccharidseitenketten

3) Eine krebsbegleitende reduzierte Expression einer Glucosylaminosäuretransferase führt in carcinomen Zellinien zum Abbruch der Biosynthese der Saccharidseitenkette von MUC1, so daß dann bevorzugt das Tn-Monosaccharid und TF-Monosaccharid in der Seitenkette im MUC1-Glycoprotein auftreten. Diese verkürzten Saccharidketten dienen wiederum als Substrate für spezifische Sialyltransferasen und es kommt zur Ausbildung sialylierter Strukturen.

Die rein chemische Synthese eines Sialylglycosylaminosäurebausteins für eine entsprechende Glycopeptidsynthese ist nur über eine Vielzahl von Reaktionsstufen möglich. Die hohe Empfindlichkeit und die negative Ladung der 5-N-Acetylneuraminsäure erfordern für einen derartigen Baustein eine geeignete Schutzgruppenkombination für den Einsatz in der Glycopeptidsynthese. Eine bessere Alternative zur organochemischen Synthese stellt die enzymatische Übertragung der Sialylgruppe auf ein bereits fertig synthetisiertes Glycopeptid mit CMP-Neu5Ac unter Katalyse einer Sialyltransferase dar. In ersten Untersuchungen gelang es Kihlberg mit Hilfe einer 2,3-Sialyltransferase ein synthetisches MUC1 Glycopeptid mit einer Glycosylierungsstelle zu sialylieren (Kihlberg 2001). Mehrfach glycosylierte synthetische Peptide wurden bisher noch nicht enzymatisch sialyliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig CMP-Neu5Ac unter Katalyse von 2,3-Sialyltransferase auf eine Serie von mehrfach glycosylierten synthetischen Glycopeptiden mit dem TF-Antigen übertragen. Hierbei wurden die Verbindungen **76-83** erhalten.

**Abb. 6.4.:** Enzymatisch sialylierte Glycopeptide **76-83**

Die hierfür benötigte 2,3-Sialyltransferase wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Henrik Clausen, Kopenhagen, in HI5 Insektenzellen exprimiert und durch die Behandlung mit Amberlite IRA-95 und S-Sephadex gereinigt und durch Zentrifugenfiltration konzentriert. Die benötigten Glycopeptidsubstrate wurden in einer parallelen Festphasensynthese in Glassäulen dargestellt und anschließend mit der 2,3-Sialyltransferase sialyliert. Die Reaktionszeiten bei der enzymatischen Sialylierung der Glycopeptide mit bis zu fünf Saccharidketten war stets von gleicher Größenordnung. Eine Behinderung der Reaktion durch bereits vorhandene Saccharidseitenketten wurde nicht beobachtet. Bei den mehrfach sialylierten Verbindungen mußte entsprechend die Menge an 2,3-Sialyltransferase und CMP-Neu5Ac erhöht werden. Es wurde dann stets eine nahezu quantitative Umsetzung beobachtet.

Bei der MALDI-TOF-massenspektrometrischen Untersuchung der sialylierten Produkte **76-83** traten Fragmentierungsprodukte auf, bei denen jeweils eine Neuraminsäure abgespalten war. In daraufhin angefertigten ESI-Massenspektren wurden einheitliche Molekularpeaks erhalten. Auch die Untersuchungen mittels reversed phase HPLC an einer C-18 Säule deuten auf ein einheitliches Produkt. Bei genauerer Betrachtung der $^{1}H^{1}H$-TOCSY-Spektren ist jedoch bei einigen Verbindungen eine zweite schwache Kohlenhydratspur erkennbar. Es könnte somit möglich sein, dass diese zweite Spur von in geringer Menge vorhandenen nicht vollständig sialylierten Nebenprodukten stammen, die mit den zur Verfügung stehenden Trennmethoden nicht vollständig abgetrennt werden konnten.

# 7. Summary

In the course of this work, three series of glycopeptides were synthesised. These three series were analogous to the MUC1 repeating unit, which consists of twenty amino acids.

In the first section, a series of MUC1 glycopeptides was synthesised, based on new results regarding the amino acid sequence of the repeating unit.

In the second section of this work, glycopeptides with N-glycosylation sites next to O-glycosylation sites were made. For examination of the synthesis, the sequence of the MUC1 repeating unit was chosen as a model.

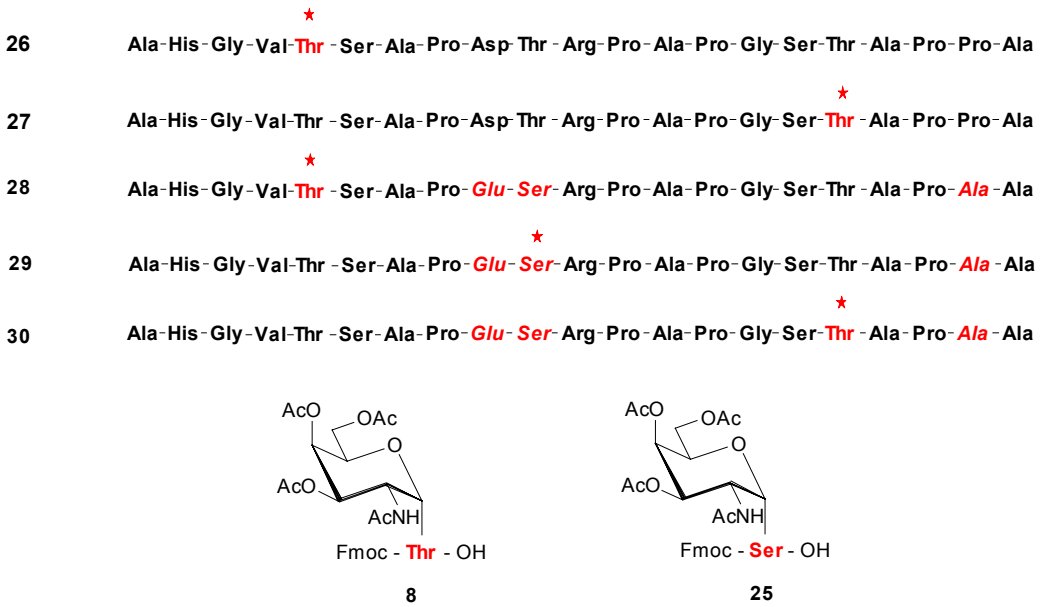
In the third section of this work, glycopeptides bearing the sTF-antigen were synthesised chemoenzymatically for the first time, using the catalysis of the 2,3-sialyltransferase.

The syntheses of the glycopeptides were performed manually, either in a multiple 20-hole peptide synthesiser or on glass columns, the outlets of which were connected via a vacuum manifold. Employment of the glycosyl amino acid building blocks **8**, **25**, **14** and **24** allowed specific introduction of a monosaccharide unit (**8**, **25**) or a disaccharide unit (**14**, **24**) to the growing peptide chain.

All of the glycopeptides synthesised here are intended to be tested in a T-cell stimulation assay, and were presented to the laboratories of Prof. Dr. Joyce Taylor-Papadimitriou (London) and Prof. Dr. Marianna Nuti (Rome) for execution of these tests. The parallel investigations, which had already begun, were to be continued. In addition, Prof. Dr. Hans-Georg Hanisch (Cologne) will also investigate the behaviour of the glycopeptides in the MHC complex.

The following is a summary of the results of the individual sections:

1) The amino acid sequence of the MUC1 repeating unit in cancer cells is subject to polymorphism, whereas the MUC1 amino acid sequence of healthy cells is not. In the cancerous MUC1 repeating units, the amino acids $Asp^{8}Thr^{9}$ are exchanged for $Glu^{8}Ser^{9}$, and $Pro^{19}$ is replaced with $Ala^{19}$, $Thr^{19}$ or $Gln^{19}$ (Hanisch 2000). Bearing this in mind, the glycopeptides **26–30** were synthesised in a manual 20-hole peptide synthesiser. The glycosylation sites were introduced using monosaccharide building blocks **8** and **25**. After the successful synthesis of compounds **26–30**, the MUC1 glycopeptides **36–45**, modified with the disaccharide building blocks **14** and **24**, were produced. The proton shifts of the glycopeptides **26–30** and **36–45** could be assigned, using $^{1}H^{1}H$-TOCSY and $^{1}H^{1}H$-NOESY NMR spectra. The sequences determined using NMR spectroscopy corresponded with the expected glycopeptide sequences.



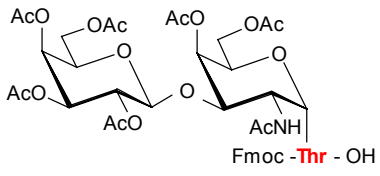




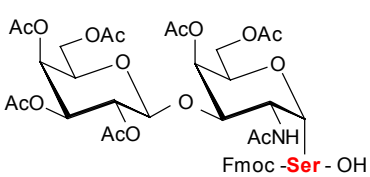
8




25




14




24

**Figure 7.1.:** Glycopeptides **26–30** with the Tn monosaccharide building block **8** and **25**, and glycopeptides **36–45** with the TF disaccharide building block **14** and **24**.

Glycopeptides **36–45** were tested using a T-cell stimulation assay in the laboratories of Professor Joyce Taylor-Papadimitriou. In this assay, glycopeptide **38**, which has a glycosylation site at Ser$^5$, resulted in stimulation which in a further test proved relatively reproducible. Based on these results, glycopeptides **46–54** were synthesised for further investigations. All glycopeptides **46–54** are glycosylated at Ser$^5$; individual amino acids were exchanged.

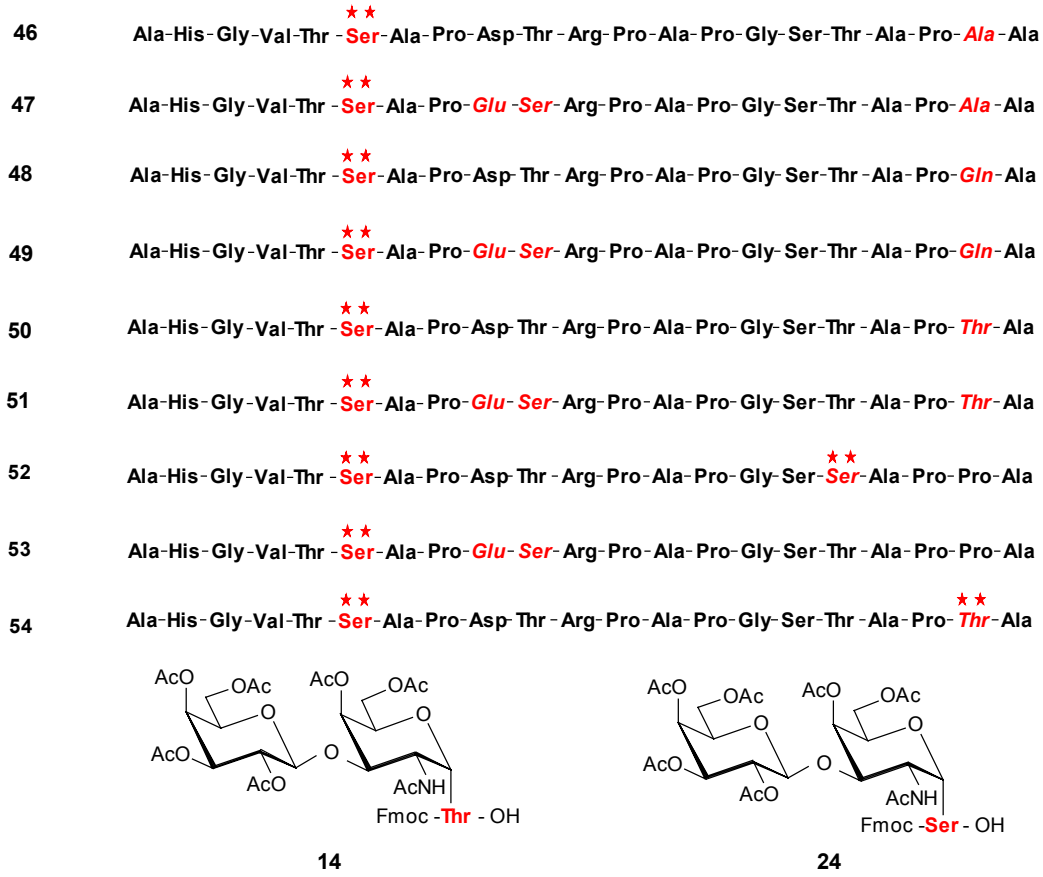



**Figure 7.2.:** Glycopeptides **46–54**

2) Investigations of a protein data bank (Swiss Prot) showed that exchange of Thr for Asn in the DTR motif at the end of the tandem repeating domain in naturally occurring MUC1 glycoproteins is possible. In addition, one finds N-glycosylation sites in MUC1 glycoproteins, between the repeating unit and the transmembrane domain. The synthesis of mixed glycopeptides, which have a peptide chain containing both an N-glycosyl and an O-glycosyl carbohydrate side chain, is therefore interesting. In the course of this work, such compounds (**63–67**), in which the peptide sequence is derived from the MUC1 structure, were made for the first time.

For the syntheses, a new glycosyl amino acid building block was necessary, in order to introduce a corresponding N-glycosidic carbohydrate side chain during the construction of the glycopeptide. The glycosyl amino acid consisting of asparagine and chitobiose was chosen as building block. The research group of Prof. Dr. Meyer already were experienced in the synthesis of this compound.

While the coupling of the O-building blocks could be mostly conducted without any problems, the coupling of the chitobiosyl building block was accompanied by the formation of aspartamide as a side reaction.

The assignation of the proton shifts of glycopeptides **63–67**, with sugar moieties at various glycosylation sites, could be made using the $^{1}H^{1}H$-TOCSY and $^{1}H^{1}H$-NOESY NMR spectra. The proton shifts of the carbohydrate protons of the various sugar residues could be assigned using the $^{1}H^{1}H$-TOCSY spectra.

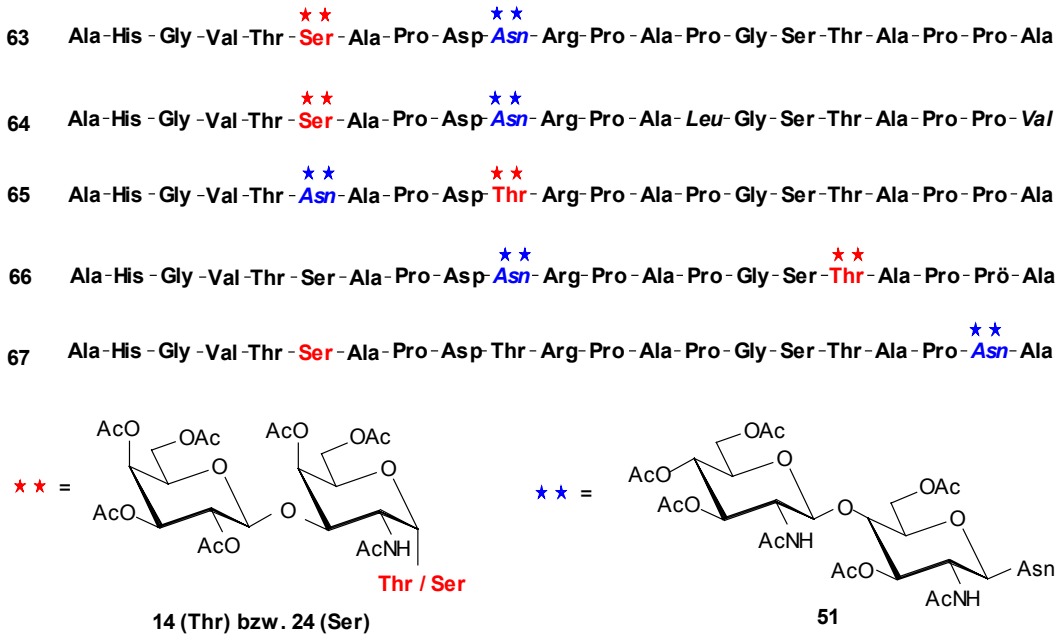



**Figure 7.3.:** Glycopeptides **63–67** with N-glycosyl and O-glycosyl-linked carbohydrate side chains

3) A cancer-associated reduction in expression of a glucosylaminoacidtransferase in carcinoma cell lines leads to termination of the biosynthesis of the sugar side chains of MUC1, so that the Tn monosaccharide and the TF monosaccharide appear in the side chain of the MUC1 glycoprotein preferentially. These shortened sugar chains in turn serve as substrate for specific sialyltransferases and this results in the formation of sialylated structures.

The purely chemical synthesis of a sialylglycosyl amino acid building block for a corresponding glycopeptide synthesis is only possible via many reaction steps. The great sensitivity and the negative charge of the 5-N-acetylneuraminic acid make a suitable protective group combination necessary so that such a building block can be used for a glycopeptide synthesis. A better alternative to organochemical synthesis is the enzymatic transfer of the sialyl group, using CMP-NeuAc under catalysis of a sialyltransferase, onto a complete glycopeptide, which has already been synthesised. In intial investigations, Kihlberg was able to sialylate a synthetic MUC1 glycopeptide using a 2,3-sialyltransferase (Kihlberg 2001). Multiply glycosylated synthetic peptides have to date not yet been enzymatically sialylated.

During this work, Neu5Ac was transfered from CMP-Neu5Ac to a series of multiply glycosylated synthetic peptides bearing the TF antigen, under catalysis of 2,3-sialyltransferase. Thus, compounds **76–83** could be achieved.

**Figure 7.4.:** Enzymatically sialylated glycopeptides **76–83**

The 2,3-sialyltransferase necessary for this was expressed in HI5 insect cells by the research group of Professor Henrik Clausen (Copenhagen), purified by treatment with Amberlite IRA-95 and S-Sephadex, and concentrated by centrifugal filtration. The required glycopeptide substrate was produced in a parallel solid phase synthesis on glass columns, and subsequently sialylated with the 2,3-sialyltransferase. The reaction times of the enzymatic sialylation of the glycopeptides with up to five glycosyl chains were always of a similar magnitude. Retardation of the reaction by the glycosyl side chains already present was not observed. In the case of the multiply sialylated compounds, a correspondingly larger amount of 2,3-sialytransferase and CMP-Neu5Ac was required. An almost quantitative conversion could then always be observed.

In the MALDI-TOF mass spectrometric investigation of the sialylated products **76**–**83**, fragmentation products arose, which resulted from the stepwise cleavage of one or more sialic acid units. In the ESI mass spectra measured as a result of this, uniform molecular peaks could be obtained. Analysis of the samples using reversed phase HPLC on a C-18 column also indicate one uniform product. Upon closer examination of the $^{1}H^{1}H$-TOCSY spectra, however, several of the samples exhibit a weak, second carbohydrate trace. Thus, it is possible that these trace substances, present in small amounts, may be incompletely sialylated side products, which could not be fully separated from the products with the available purification methods.

# 8. Experimenteller Teil

Die eingesetzten technischen Geräte und Substanzen (Synthesequalität) wurden, sofern nicht anders angegeben, von der Firma Merck KgA (Darmstadt) bezogen. Angegebene Lösungsmittelverhältnisse sind Volumenverhältnisse. Die zur Synthese eingesetzten Lösungsmittel wurden absolutiert. DMF (Peptide Grade, Perseptive Biosystems GmbH, Hamburg) wurde kühl unter Lichtausschluss aufbewahrt und vor der Benutzung mit Dhbt-OH (Fluka Sigma Aldrich Chemie GmbH, Hamburg) auf Aminfreiheit untersucht.

Peptidkupplungen wurden manuell am Wang-Harz B1250 (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Zur Kupplung wurden Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester eingesetzt (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg; Novabiochem GmbH, Bad Soden). Die Kupplung der Fmoc-Aminosäure-Pfp-Ester erfolgte mit Dhbt-Zusatz. Der Zusatz von Dhbt ermöglicht die visuelle der Kupplungsreaktion. In Gegenwart von freien Aminogruppen färbt sich das Harz tiefgelb, hervorgerufen durch Ionenpaare des Dhbt-OH mit freien Aminogruppen am Harz.

Die Kupplung der Glycosylaminosäurebausteine erfolgte über *in situ* Aktivierung mit TBTU. Der Fortschritt der Festphasensynthese wurde über die photometrische Bestimmung (Shimadzu UV-160A, UV-Visible Recording Spectrometer) des bei der Fmoc-Abspaltung entstehenden Benzofulvalenadduktes ($\varepsilon = 7.95$, $\lambda = 301$ nm) verfolgt.

Die Sialylierungsreaktionen an Glycopeptiden wurden unter Katalyse durch 2,3-Sialyltransferase durchgeführt. Die 2,3-Sialyltransferase wurde in den Laboratorien von Prof. Henrik Clausen, Kopenhagen, in Insektenzellen (HI5-Zellen) exprimiert. Die Reinigung der 2,3-Sialyltransferase erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie mit Amberlite IRA95 (Sigma) und SP-Sepharose (Sigma). Das gereinigte Enzym wurde durch Zentrifugenfiltration konzentriert, wie in Abschnitt 5.2. beschrieben.

HPLC-Trennungen wurden an einer Niederdruckgradientenpumpe von Merck-Hitachi (L-7100) und dem Diodenarraydetektor L- 7455 durchgeführt. Die Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der DAD-Manager-Software D-7000 HSM. Für die HPLC wurden ausschließlich entgaste Lösungsmittel verwendet: Eluent A: 0.1 % TFA in bidestilliertem Wasser, Eluent B: 0.1 % TFA in Acetonitril. Analytische HPLC-Trennungen wurden an einer Lichrospher RP-18 Säule (250 x 4, 5 µm, 2 $^{mL}/_{min}$), präparative HPLC-Trennungen an einer Lichrospher RP-18 Säule (250 x 25, 10 µm, 9.9 $^{mL}/_{min}$) oder einer Lichrosorb RP-18 Säule (250 x 25, 7 µm, 9.9 $^{mL}/_{min}$) durchgeführt.

Die Aufnahme von MALDI-TOF-Massenspektren erfolgte am Biflex III mit Stickstofflaser der Firma Bruker. Es wurde im positiv reflector mode gemessen. Als Matrix wurde DHB, 30 $^{\mu g}/_{\mu L}$.verwendet.

NMR-Spektren wurden am DRX 500 (Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen) bei 300 K aufgenommen. Bei Messungen in organischen Lösungsmitteln wurde Tetramethylsilan ($\delta$ = 0.000 ppm) als interner Standart zugefügt. Bei Messungen in $D_2O$ und $H_2O/D_2O$ (9:1) wurde

auf die chemische Verschiebung der DOH-Resonanz (δ = 4.75 ppm) geeicht, alle Lösungen wurden mit TFA auf pH=3.5 eingestellt. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch $^1H^1H$-COSY-, $^1H^1H$-TOCSY- und $^1H^1H$-NOESY-Experimente. Eindimensionale NMR-Spektren wurden mit der Software WINNMR (Versionen 6.0, Bruker), zweidimensionale NMR-Spektren wurden mit der Software WINNMR-2D (Version 6.0, Bruker) bearbeitet. Die Auswertung der Kopplungskonstanten erfolgte nach erster Ordnung.

### 8.1.1. Syntheseapparatur für die Festphasensynthese im Syntheseblock

Der Syntheseblock besteht aus einem Teflonblock mit 20 Reaktionszellen. Jede Reaktionszelle hat am Boden einen Teflonfilter, unterhalb dessen sich ein Auslass befindet, über den alle Reaktionszellen mit einer Vakuum- bzw. Stickstoffüberdruckkammer verbunden sind. Durch Anlegen eines Vakuums werden aus allen 20 Kammern gleichzeitig die Wasch- bzw. Reaktionslösungen abgesaugt. Während der Kupplungszeit verhindert ein leichter Stickstoffüberdruck das Einsickern der Reaktionslösung in die Druckkammer. Das Einfüllen der Wasch- und Reaktionslösungen erfolgt manuell. Während der Kupplungszeit wird der Syntheseblock zur besseren Durchmischung der Reaktionslösung auf einen Vibrator gestellt und vorsichtig geschwenkt.

### 8.1.2. Syntheseapparatur für die Festphasensynthese in Glassäulen

Die Syntheseapparatur besteht aus zwei Sätzen von Glassäulen (sechs und vier Glassäulen), deren Ausgänge durch einen Vakuumverteiler verbunden sind. Durch Anlegen eines Vakuums können Wasch- und Reaktionslösungen mit Hilfe des Vakuumverteilers gleichzeitig abgezogen werden. Diese Syntheseapparatur ermöglicht die visuelle Reaktionsverfolgung durch den Zusatz von Dhbt. Weiterhin wird die Überprüfung des Fortschritts der Synthese über die photometrische Bestimmung des bei der Fmoc-Abspaltung entstehenden Benzofulvalenadduktes (ε = 7.95, λ = 301 nm) vereinfacht.

Wasch- und Reaktionslösungen werden auch hier manuell eingefüllt.

## 8.2. Multiple Festphasensynthese der Peptide 26 bis 30

Die Verknüpfung der ersten Aminosäure an das Harz erfolgte außerhalb des Syntheseblocks in einer Glasfritte.

Zum Anknüpfen der ersten Aminosäure an das Harz wurde auf die berechnete Menge Wang-Harz (Bachem B1250, 950 μmol/g) nach dem Quellen in absolutem Dichlormethan (3 x 2 min) die erste Aminosäure (3 eq), MSNT (3 eq mmol) und Methylimidazol (1.25 eq) in absolutem Dichlormethan gegeben (2 x 2 h). Während der Reaktionszeit wurde die Glassäule sachte auf einem Schüttler geschwenkt, um eine bessere Durchmischung des Reaktionsmediums zu erzielen. Die Reaktion wurde durch Absaugen der Reaktionslösung

beendet. Das Harz wurde 5 x 2 min mit Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Bestimmung der Belegung des Harzes wurde eine kleine Menge des derivatisierten, trockenen Harzes entnommen und zur Fmoc-Abspaltung 2 x 15 min mit einer definierten Menge Piperidin (20 % in DMF) behandelt. Anschließend wurde 8 x 2 min mit einer definierten Menge DMF gewaschen. Zur Bestimmung der abgespaltenen Fmoc-Menge wurden die vereinigten Spalt- und Waschlösung photometrisch vermessen, woraus dann auf die Belegung des derivatisierten Harzes geschlossen werden kann.

Zur Verknüpfung der weiteren Aminosäuren wurden in je zwei Reaktionszellen pro Verbindung derivatisiertes, trockenes Harzes eingefüllt (insgesamt 60 μmol pro Verbindung) und zum Quellen 15 min mit DMF (800 μL/Loch) sachte geschüttelt. Zur Fmoc-Abspaltung wurde 2 x 15 min mit 20 % Piperidin in DMF (800 μL/Loch) behandelt und 10 x 2 min mit DMF (800 μL/Loch) gewaschen. Die Anknüpfung der Aminosäuren erfolgte als Pfp-Ester (3 eq) unter Zusatz von Dhbt-OH (3 eq). Die Glycosylaminosäurebausteine (1.5 eq) wurden unter Katalyse von TBTU (1.5 eq) und N-Ethyldisopropylamin (1.5 eq) verknüpft. Die Aktivester wurden außerhalb der Reaktionszelle in der entsprechenden Menge DMF gelöst und jeder Zelle zugesetzt (800 μL/Loch, Reaktionszeit 18-23 h). Nach Anknüpfen der letzten Aminosäure und Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe wurden alle Harze mit DMF (800 μL/Loch, 8 x 2 min) und Dichlormethan (800 μL/Loch, 5 x 2 min) gewaschen und im Luftstrom getrocknet. Die Harze wurden vorsichtig von den Wandungen der Reaktionszellen und den Teflonfiltern in Glassäulen überführt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte für jede Verbindung getrennt.

Zur O-Deacetylierung wurde das am Harz gebundene Glycopeptid 2 x 3 h mit Hydrazinhydrat in Methanol (130 μL 80 % Hydrazinhydrat auf 1 mL) behandelt. Es wurde 8 x 2 min mit Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die Abspaltung der Glycopeptide vom Harz erfolgte durch Behandlung mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung (2 x 1 h). Es wurde abfiltriert und 5 x 2 min mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden eingeengt und mit absolutem Toluol (3 x) und absolutem Methanol/absolutem Toluol 1:3 (3 x) codestilliert.

Die Reinigung der Glycopeptide erfolgte durch RP-HPLC mit bidestilliertem Wasser/Acetonitril unter Zusatz von 0.1 % TFA.

### *26* ***H*-Ala-His-Gly-Val-*Thr(GalNAc)*-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 9 mg (4.2 μmol) des Glycopeptids **26** erhalten (7 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{91}H_{146}N_{26}O_{33}$: M = 2160.36; gefunden: 2161.1 ($M+H^+$)

### *27* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-*Thr(GalNAc)*-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 11 mg (5.1 μmol) des Glycopeptids **27** erhalten (8 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{91}H_{146}N_{26}O_{33}$: M = 2160.36; gefunden: 2160.6 ($M+H^+$)

### *28* ***H*-Ala-His-Gly-Val-*Thr(GalNAc)*-Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Ala*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 3.1 mg (1.5 μmol) des Glycopeptids **28** erhalten (5 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{89}H_{144}N_{28}O_{33}$: M = 2134.32; gefunden: 2134.61 ($M+H^+$)

### *29* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser(GalNAc)*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Ala*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 2.9 mg (1.4 μmol) des Glycopeptids **29** erhalten (5 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{89}H_{144}N_{28}O_{33}$: M = 2134.32; gefunden: 2134.89 ($M+H^+$)

### *30* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-*Ala*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 3 mg (1.5 μmol) des Glycopeptids **30** erhalten (5 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{89}H_{144}N_{28}O_{33}$: M = 2134.32; gefunden: 2134.92

# $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Glycopeptide 26 bis 30

**$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm**

| δ | NH | Hα$_1$ | Hα$_2$ | Hβ$_1$ | Hβ$_2$ | Hγ$_1$ | Hγ$_2$ | Hδ$_1$ | Hδ$_2$ | andere |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala-1 | | 4.06 | | 1.47 | | | | | | |
| His- | 8.84 | 4.68 | | 3.25 | 3.25 | | | | | H-2: 8.58 |
| Gly-3 | 8.51 | 3.96 | 3.96 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.08 | 4.31 | | 2.07 | | 0.94 | 0.94 | | | |
| Thr-5 | 8.58 | 4.59 | | 4.28 | | 1.24 | | | | |
| Ser-6 | 8.27 | 4.43 | | 3.8 | 3.8 | | | | | |
| Ala-7 | 8.29 | 4.57 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.39 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.58 | 4.72 | | 2.91 | 2.91 | | | | | |
| Thr-10 | 8.16 | 4.30 | | 4.18 | | 1.17 | | | | |
| Arg-11 | 8.23 | 4.62 | | 1.82 | 1.73 | 1.66 | 1.66 | 3.19 | 3.19 | ε: 7.14 |
| Pro-12 | | 4.39 | | 2.24 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Ala-13 | 8.44 | 4.55 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.38 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.47 | 3.96 | 3.96 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.14 | 4.51 | | 3.88 | 3.88 | | | | | |
| Thr-17 | 8.19 | 4.35 | | 4.21 | | 1.18 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.59 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.67 | | 2.31 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.79 | 3.6 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.41 | 4.3 | | 1.38 | | | | | | |

**Kohlenhydratreste:**

| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GalNAc | 7.51 | 1.99 | 4.92 | 4.07 | 3.84 | 3.93 | 3.95 | 3.73/3.69 |

**Tab. 8.1.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **26**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.02 | | 1.43 | | | | | | |
| His-2 | 8.79 | 4.66 | | 3.21 | 3.21 | | | | | H-2: 8.52 |
| Gly-3 | 8.45 | 3.92 | 3.92 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.09 | 4.18 | | 2.05 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.30 | 4.36 | | 4.15 | | 1.47 | | | | |
| Ser-6 | 8.26 | 4.41 | | 3.78 | 3.78 | | | | | |
| Ala-7 | 8.29 | 4.57 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.54 | 4.82 | | 2.96 | 2.83 | | | | | |
| Thr-10 | 8.31 | 4.47 | | 4.31 | | 1.21 | | | | |
| Arg-11 | 8.32 | 4.55 | | 1.81 | 1.67 | 1.67 | 1.62 | 3.18 | 3.18 | ε: 7.14 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.83 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.44 | 4.52 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.38 | | 2.27 | 1.83 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Gly-15 | 8.47 | 3.96 | 3.96 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.08 | 4.58 | | 3.86 | 3.86 | | | | | |
| Thr-17 | 8.51 | 4.51 | | 4.29 | | 1.19 | | | | |
| Ala-18 | 8.26 | 4.51 | | 1.28 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.45 | 4.42 | | 1.32 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| GalNAc | 7.62 | 2.01 | 4.87 | 4.04 | 3.81 | 3.92 | 3.95 | 3.75/3.70 |

**Tab. 8.2.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **27**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.04 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.64 | | 3.20 | 3.20 | | | | | H-2: 8.52 |
| Gly-3 | 8.52 | 3.95 | 3.95 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.04 | 4.22 | | 2.07 | | 0.91 | 0.91 | | | |
| Thr-5 | 8.46 | 4.50 | | 4.26 | | 1.34 | | | | |
| Ser-6 | 8.39 | 4.44 | | 3.81 | 3.81 | | | | | |
| Ala-7 | 8.40 | 4.49 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.37 | | 2.27 | 1.88 | 1.95 | 1.95 | 3.75 | 3.64 | |
| Glu-9 | 8.26 | 4.45 | | 1.99 | 1.99 | 2.59 | 2.51 | | | |
| Ser-10 | 8.31 | 4.39 | | 3.81 | 3.81 | | | | | |
| Arg-11 | 8.42 | 4.58 | | 1.85 | 1.71 | 1.71 | 1.62 | 3.2 | 3.2 | ε: 7.19 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.27 | 1.88 | 1.95 | 1.95 | 3.75 | 3.64 | |
| Ala-13 | 8.46 | 4.55 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.38 | | 2.27 | 1.88 | 1.97 | 1.97 | 3.75 | 3.64 | |
| Gly-15 | 8.49 | 3.96 | 3.96 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.10 | 4.61 | | 3.87 | 3.87 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.55 | | 4.32 | | 1.20 | | | | |
| Ala-18 | 8.31 | 4.54 | | 1.32 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.60 | | 2.35 | 1.83 | 2.1 | 2.1 | 3.77 | 3.39 | |
| Ala-20 | 8.48 | 4..38 | | 1.5 | | | | | | |
| Ala-21 | 8.41 | 4.34 | | 1.37 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| GalNAc | 7.58 | 2.01 | 4.89 | 4.08 | 3.83 | 3.94 | 3.95 | 3.74/3.71 |

**Tab. 8.3.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **28**

**$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm**

| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala-1 | | 4.02 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.80 | 4.66 | | 3.22 | 3.22 | | | | | H-2: 8.51 |
| Gly-3 | 8.49 | 3.91 | 3.91 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.10 | 4.25 | | 2.10 | | 0.97 | 0.97 | | | |
| Thr-5 | 8.46 | 4.52 | | 4.31 | | 1.36 | | | | |
| Ser-6 | 8.41 | 4.44 | | 3.83 | 3.83 | | | | | |
| Ala-7 | 8.43 | 4.51 | | 1.39 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.39 | | 2.27 | 1.92 | 2.02 | 2.02 | 3.78 | 3.64 | |
| Glu-9 | 8.31 | 4.48 | | 2.1 | 2.1 | 2.62 | 2.62 | | | |
| Ser-10 | 8.64 | 4.62 | | 3.88 | 3.88 | | | | | |
| Arg-11 | 8.45 | 4.55 | | 1.88 | 1.75 | 1.75 | 1.62 | 3.19 | 3.19 | ε: 7.25 |
| Pro-12 | | 4.39 | | 2.27 | 1.92 | 2.02 | 2.02 | 3.78 | 3.64 | |
| Ala-13 | 8.46 | 4.52 | | 1.37 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.38 | | 2.27 | 1.88 | 1.97 | 1.97 | 3.75 | 3.64 | |
| Gly-15 | 8.46 | 3.90 | 3.90 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.18 | 4.59 | | 3.82 | 3.82 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.50 | | 4.33 | | 1.23 | | | | |
| Ala-18 | 8.35 | 4.55 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | 4.60 | | 2.33 | 1.97 | 2.01 | 2.01 | 3.72 | 3.61 | | |
| Ala-20 | 8.51 | 4.33 | | 1.31 | | | | | | |
| Ala-21 | 8.35 | 4.44 | | 1.37 | | | | | | |

Kohlenhydratreste:

| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GalNAc | 7.96 | 2.01 | 4.87 | 4.15 | 3.86 | 3.86 | 3.91 | 3.72/3.69 |

**Tab. 8.4.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **29**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.01 | | 1.39 | | | | | | |
| His-2 | 8.81 | 4.61 | | 3.22 | 3.22 | | | | | H-2: 8.49 |
| Gly-3 | 8.49 | 3.90 | 3.90 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.11 | 4.28 | | 1.98 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.42 | 4.45 | | 4.24 | | 1.33 | | | | |
| Ser-6 | 8.41 | 4.46 | | 3.84 | 3.84 | | | | | |
| Ala-7 | 8.35 | 4.43 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.37 | | 2.27 | 1.88 | 1.95 | 1.95 | 3.75 | 3.64 | |
| Glu-9 | 8.29 | 4.46 | | 1.96 | 1.96 | 2.55 | 2.54 | | | |
| Ser-10 | 8.38 | 4.41 | | 3.85 | 3.85 | | | | | |
| Arg-11 | 8.42 | 4.55 | | 1.88 | 1.75 | 1.75 | 1.62 | 3.22 | 3.22 | ε: 7.19 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.27 | 1.88 | 1.95 | 1.95 | 3.75 | 3.64 | |
| Ala-13 | 8.39 | 4.55 | | 1.39 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.38 | | 2.27 | 1.88 | 1.97 | 1.97 | 3.75 | 3.64 | |
| Gly-15 | 8.45 | 3.93 | 3.93 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.64 | | 3.87 | 3.87 | | | | | |
| Thr-17 | 8.54 | 4.55 | | 4.33 | | 1.23 | | | | |
| Ala-18 | 8.34 | 4.52 | | 1.29 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.57 | | 2.34 | 1.95 | 2.13 | 2.13 | 3.82 | 3.4 | |
| Ala-20 | 8.43 | 4.50 | | 1.33 | | | | | | |
| Ala-21 | 8.39 | 4.30 | | 1.35 | | | | | | |

| Kohlenhydratreste: | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| GalNAc | 7.72 | 2.01 | 4.90 | 4.08 | 3.84 | 3.94 | 3.96 | 3.74/3.70 |

**Tab. 8.5.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **30**

## 8.3. Multiple Festphasensynthese der Peptide 36 bis 45

Die Synthese der Peptide 36-45 erfolgte parallel in Glassäulen. Die Derivatisierung des Harzes mit der ersten Aminosäure erfolgte für jeweils eine Reihe Peptide gemeinsam in einer Glassäule. Hierfür wurde Wang-Harz (Bachem B1250, 950 μmol/g) nach dem Quellen mit DMF (3 x 2 min.) mit der ersten Aminosäure (3 eq), MSNT (3 eq) und Methylimidazol (2.25 eq) in Dichlormethan versetzt (2 x 3 h). Nach Absaugen der Reaktionslösung und Waschen des Harzes (8 x 2 min) wurde das derivatisierte Harz im Vakuum getrocknet. Vor der Verknüpfung der weiteren Aminosäuren wurde ein Teil des Harzes abgenommen zur photometrischen Bestimmung der Belegung. Hierfür wurde mit einer definierten Menge Piperidin (20 % in DMF, 2 x 15 min) die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Es wurde 8 x 2 min mit einer definierten Menge DMF gewaschen. Die Bestimmung der abgespaltenen Fmoc-Menge aus der Waschlösung ermöglicht die Bestimmung der Belegung des Harzes nach Derivatisierung mit der ersten Aminosäure.

Zur weiteren Anknüpfung von Aminosäuren wurde getrocknetes und derivatisiertes Harz in Glassäulen eingefüllt (berechnet: 80 μmol/Säule). Die Ausgänge der Glassäulen sind über einen Vakuumverteiler verbunden, so daß Wasch- und Reaktionslösungen gleichzeitig abgesaugt werden konnten.

Nach dem Quellen der überführten Harze in DMF (15 min) wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidinlösung in DMF (2 x 15 min) abgespalten und anschließend 10 x 2 min mit DMF gewaschen. Die restlichen Aminosäuren wurden als Pfp-Ester zur Synthese eingesetzt (3 eq, Reaktionszeit 15-22 h). Es wurden 3 eq Dhbt-OH zu den Pfp-Estern zugesetzt. Die Glycosylaminosäurebausteine (1.5 eq) wurden unter Katalyse von TBTU (1.5 eq) und N-Ethyldiisopropylamin (1.5 eq) verknüpft.

Nach Anknüpfen der letzten Aminosäure und Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe wurden alle Harze mit DMF (8 x 2 min) und Dichlormethan (5 x 2 min) gewaschen und getrocknet.

Zur Abspaltung der Glycopeptide vom Harz wurde 2 x 1 h mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung behandelt, abfiltriert und 5 x 2 min mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden eingeengt und mit absolutem Toluol (3 x) und absolutem Methanol/absolutem Toluol 1:3 (3 x) codestilliert.

Die Deblockierung der Rohprodukte erfolgte mit katalytischen Mengen Natriummethanolat (1 % in Methanol) in absolutem Methanol (pH 8.3, 2 – 4 h). Es wurde mit einem Tropfen Essigsäure neutralisiert, eingeengt und mit Toluol (3 x) und absolutem Methanol/absolutem Toluol 1:3 (3 x) codestilliert.

Die vom Harz abgespaltenen und O-deacetylierten Produkte wurden durch reversed phase HPLC an einer C-18 Säule gereinigt.

### *36* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 5.2 mg (2.2 μmol) des Glycopeptids **36** erhalten (3 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{155}N_{27}O_{39}$: M = 2322.48; gefunden: 2323.89 ($M+H^+$)

### *37* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr -Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 3.7 mg (1.6 μmol) des Glycopeptids **37** erhalten (2 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{155}N_{27}O_{39}$: M = 2323.48 gefunden: 2322.81 ($M+H^+$)

### *38* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 2.7 mg (2.2 μmol) des Glycopeptids **38** erhalten (3 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{155}N_{27}O_{39}$: M = 2323.48; gefunden: 2322.24 ($M+H^+$)

### *39* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-*Glu-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 2.4 mg (2.2 μmol) des Glycopeptids **39** erhalten (3 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{155}N_{27}O_{39}$: M = 2323.48; gefunden: 2323.27 ($M+H^+$)

### *40* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 5.8 mg (2.5 μmol) des Glycopeptids **40** erhalten (3 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{155}N_{27}O_{39}$: M = 2323.48; gefunden: 2323.87 ($M+H^+$)

### *41* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-*Ala*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 1.7 mg (2.2 μmol) des Glycopeptids **41** erhalten (2.1 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{95}H_{153}N_{27}O_{39}$: M = 2297.45; gefunden: 2296.88 ($M+H^+$)

### *42* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-*[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser*-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 5.1 mg (2.2 μmol) des Glycopeptids **42** erhalten (2.7 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{96}H_{153}N_{27}O_{39}$: M = 2309.46; gefunden: 2309.65 ($M+H^+$)

### *43* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-*Glu-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-*Ser*-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 2.1 mg (2 μmol) des Glycopeptids **43** erhalten (2.5 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{96}H_{153}N_{27}O_{39}$: M = 2309.46; gefunden: 2308.43 ($M+H^+$)

### *44* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-*[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser*-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 5 mg (2.2 μmol) des Glycopeptids **44** erhalten (2.7 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{96}H_{153}N_{27}O_{39}$: M = 2309.46; gefunden: 2309.84 ($M+H^+$)

### *45* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 80:20 (40) → 50:50 (20)]

Insgesamt wurden 1.9 mg (1.9 μmol) des Glycopeptids **45** erhalten (2.3 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{111}H_{178}N_{28}O_{49}$: M = 2688.83; gefunden: 2689.26 ($M+H^+$)

# $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Glycopeptide 36 bis 45

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.02 | | 1.43 | | | | | | |
| His-2 | 8.79 | 4.66 | | 3.21 | 3.21 | | | | | H-2: 8.52 |
| Gly-3 | 8.45 | 3.92 | 3.92 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.09 | 4.18 | | 2.05 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.30 | 4.36 | | 4.15 | | 1.47 | | | | |
| Ser-6 | 8.26 | 4.41 | | 3.78 | 3.78 | | | | | |
| Ala-7 | 8.29 | 4.57 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.54 | 4.80 | | 2.91 | 2.85 | | | | | |
| Thr-10 | 8.37 | 4.45 | | 4.29 | | 1.27 | | | | |
| Arg-11 | 8.33 | 4.52 | | 1.85 | 1.67 | 1.67 | 1.62 | 3.21 | 3.21 | ε: 7.25 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.44 | 4.52 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.45 | 3.92 | 3.92 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.12 | 4.55 | | 3.91 | 3.91 | | | | | |
| Thr-17 | 8.51 | 4.48 | | 4.31 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.26 | 4.52 | | 1.31 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.43 | 4.39 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.31 | 3.45 | 3.55 | 3.52 | 3.81 | 3.76/3.71 |
| GalNAc | 7.58 | 1.91 | 4.73 | 4.02 | 3.95 | 3.87 | 3.96 | 3.76/3.71 |

**Tab. 8.6.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **36**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.11 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.75 | 4.62 | | 3.24 | 3.24 | | | | | H-2: 8.49 |
| Gly-3 | 8.46 | 3.90 | 3.90 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.15 | 4.15 | | 2.05 | | 0.91 | 0.91 | | | |
| Thr-5 | 8.35 | 4.32 | | 4.15 | | 1.47 | | | | |
| Ser-6 | 8.23 | 4.44 | | 3.77 | 3.77 | | | | | |
| Ala-7 | 8.22 | 4.56 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.52 | 4.77 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.42 | | 4.31 | | 1.25 | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.52 | | 1.82 | 1.66 | 1.66 | 1.60 | 3.21 | 3.21 | ε: 7.29 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.45 | 4.49 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.42 | 3.90 | 3.90 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.52 | | 3.90 | 3.90 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.45 | | 4.29 | | 1.26 | | | | |
| Ala-18 | 8.24 | 4.50 | | 1.31 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.40 | 4.35 | | 1.33 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.29 | 3.44 | 3.55 | 3.51 | 3.83 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.61 | 2.01 | 4.71 | 4.08 | 3.95 | 3.88 | 3.97 | 3.76/3.71 |

**Tab. 8.7.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **37**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.11 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.60 | | 3.22 | 3.22 | | | | | H-2: 8.49 |
| Gly-3 | 8.45 | 3.87 | 3.87 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.12 | 4.15 | | 2.00 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.33 | 4.29 | | 4.11 | | 1.47 | | | | |
| Ser-6 | 8.29 | 4.42 | | 3.75 | 3.75 | | | | | |
| Ala-7 | 8.22 | 4.55 | | 1.39 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.50 | 4.75 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.42 | | 4.35 | | 1.29 | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.49 | | 1.82 | 1.66 | 1.66 | 1.60 | 3.21 | 3.21 | ε: 7.25 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.42 | 4.49 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.39 | 3.88 | 3.88 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.52 | | 3.92 | 3.92 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.45 | | 4.29 | | 1.26 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.49 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.39 | 4.37 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.31 | 3.45 | 3.57 | 3.51 | 3.82 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.61 | 1.98 | 4.69 | 4.09 | 3.95 | 3.87 | 3.97 | 3.76/3.70 |

**Tab. 8.8.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **38**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.75 | 4.58 | | 3.22 | 3.22 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.44 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.11 | 4.18 | | 2.01 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.34 | 4.29 | | 4.15 | | 1.46 | | | | |
| Ser-6 | 8.31 | 4.45 | | 3.72 | 3.72 | | | | | |
| Ala-7 | 8.20 | 4.51 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Glu-9 | 8.31 | 4.44 | | 1.98 | 1.98 | 2.58 | 2.55 | | | |
| Ser-10 | 8.35 | 4.35 | | 3.82 | 3.82 | | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.48 | | 1.84 | 1.65 | 1.65 | 1.60 | 3.23 | 3.23 | ε: 7.24 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.42 | 4.49 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.35 | 3.88 | 3.88 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.17 | 4.55 | | 3.91 | 3.91 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.45 | | 4.29 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.49 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.39 | 4.37 | | 1.37 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.31 | 3.45 | 3.57 | 3.51 | 3.82 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.61 | 1.98 | 4.69 | 4.09 | 3.95 | 3.87 | 3.97 | 3.76/3.70 |

**Tab. 8.9.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **39**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.76 | 4.58 | | 3.25 | 3.25 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.12 | 4.15 | | 2.01 | | 0.91 | 0.91 | | | |
| Thr-5 | 8.34 | 4.29 | | 4.15 | | 1.46 | | | | |
| Ser-6 | 8.35 | 4.41 | | 3.72 | 3.72 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.37 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Glu-9 | 8.33 | 4.44 | | 1.98 | 1.98 | 2.56 | 2.53 | | | |
| Ser-10 | 8.37 | 4.36 | | 3.82 | 3.82 | | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.48 | | 1.86 | 1.65 | 1.65 | 1.61 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.25 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.40 | 4.49 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.37 | 3.89 | 3.89 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.17 | 4.55 | | 3.90 | 3.90 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.45 | | 4.29 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.48 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.39 | 4.35 | | 1.37 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.33 | 3.46 | 3.57 | 3.52 | 3.80 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.59 | 1.98 | 4.67 | 4.09 | 3.97 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

**Tab. 8.10.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **40**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.11 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.78 | 4.55 | | 3.25 | 3.25 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.15 | 4.17 | | 2.01 | | 0.90 | 0.90 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.27 | | 4.15 | | 1.42 | | | | |
| Ser-6 | 8.31 | 4.41 | | 3.70 | 3.70 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.50 | 4.75 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.42 | | 4.35 | | 1.29 | | | | |
| Arg-11 | 8.34 | 4.48 | | 1.86 | 1.63 | 1.63 | 1.59 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.27 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.39 | 4.45 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.35 | 3.82 | 3.82 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.55 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.45 | | 4.29 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.22 | 4.48 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Ala-20 | 8.35 | 4.36 | | 1.33 | | | | | | |
| Ala-21 | 8.39 | 4.32 | | 1.37 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.33 | 3.46 | 3.57 | 3.52 | 3.80 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.59 | 1.98 | 4.67 | 4.09 | 3.97 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

**Tab. 8.11.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **41**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.78 | 4.55 | | 3.25 | 3.25 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.15 | 4.17 | | 2.01 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.27 | | 4.15 | | 1.42 | | | | |
| Ser-6 | 8.29 | 4.44 | | 3.69 | 3.69 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.73 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.33 | 4.42 | | 4.35 | | 1.27 | | | | |
| Arg-11 | 8.34 | 4.48 | | 1.86 | 1.63 | 1.63 | 1.59 | 3.25 | 3.23 | ε: 7.27 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.36 | 4.44 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.33 | 3.80 | 3.80 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.54 | | 3.88 | 3.88 | | | | | |
| Ser-17 | 8.21 | 4.49 | | 3.91 | 3.91 | | | | | |
| Ala-18 | 8.22 | 4.48 | | 1.33 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.39 | 4.35 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.33 | 3.46 | 3.57 | 3.52 | 3.80 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.59 | 1.98 | 4.67 | 4.09 | 3.97 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

**Tab. 8.12.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **42**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.55 | | 3.27 | 3.27 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.84 | 3.84 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.12 | 4.15 | | 2.01 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.25 | | 4.15 | | 1.44 | | | | |
| Ser-6 | 8.31 | 4.44 | | 3.67 | 3.67 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Glu-9 | 8.35 | 4.46 | | 1.97 | 1.97 | 2.56 | 2.55 | | | |
| Ser-10 | 8.37 | 4.36 | | 3.82 | 3.82 | | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.48 | | 1.88 | 1.63 | 1.63 | 1.60 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.35 | 4.45 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.34 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.54 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Ser-17 | 8.20 | 4.50 | | 3.91 | 3.91 | | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.48 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.31 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.35 | 3.45 | 3.56 | 3.52 | 3.78 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.56 | 1.99 | 4.67 | 4.11 | 3.99 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

**Tab. 8.13.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **43**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.55 | | 3.27 | 3.27 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.84 | 3.84 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.12 | 4.15 | | 2.01 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.25 | | 4.15 | | 1.44 | | | | |
| Ser-6 | 8.31 | 4.44 | | 3.67 | 3.67 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Glu-9 | 8.35 | 4.46 | | 1.97 | 1.97 | 2.56 | 2.55 | | | |
| Ser-10 | 8.37 | 4.36 | | 3.82 | 3.82 | | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.48 | | 1.88 | 1.63 | 1.63 | 1.60 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.35 | 4.45 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.34 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.54 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Ser-17 | 8.20 | 4.50 | | 3.91 | 3.91 | | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.48 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.31 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.35 | 3.45 | 3.56 | 3.52 | 3.78 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.56 | 1.99 | 4.67 | 4.11 | 3.99 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

Tab. 8.14.: $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **44**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.55 | | 3.27 | 3.27 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.84 | 3.84 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.12 | 4.15 | | 2.01 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.25 | | 4.15 | | 1.44 | | | | |
| Ser-6 | 8.31 | 4.44 | | 3.67 | 3.67 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.73 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.33 | 4.42 | | 4.35 | | 1.27 | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.48 | | 1.88 | 1.63 | 1.63 | 1.60 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.35 | 4.45 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.34 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.54 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.45 | | 4.29 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.48 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.31 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.35 | 3.45 | 3.56 | 3.52 | 3.78 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.56 | 1.99 | 4.67 | 4.11 | 3.99 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

Tab. 8.15.: $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **45**

## 8.4. Multiple Festphasensynthese der Peptide 46 bis 54

Die Synthese der Glycopeptide 46-54 erfolgte in Glassäulen wie unter Abschnitt 8.3. beschrieben.

Die Peptide wurden vom Harz mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung abgespalten (Abschnitt 8.3.). Die Deblockierung wurde wie in Abschnitt 8.3. beschrieben, mit katalytischen Mengen Natriummethanolat in absolutem Methanol unter genauer Einhaltung des pH-Wertes durchgeführt.

Die abgespaltenen und O-entschützten Peptide wurden zur Vorreinigung mit kaltem t-Butylmethylether behandelt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die trübe wäßrige Lösung mit einem Edelstahlfiltrationsvorsatz über einen Cellulosefilter (Porengröße 0.8 μm, Sartorius) filtriert. Die nun klare peptidhaltige Lösung wurde nach eventuellem Einengen durch reversed phase HPLC an einer C-18 Säule gereinigt.

### *46* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Ala*-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40)]

Insgesamt wurden 55 mg (23.9 μmol) des Glycopeptids **46** erhalten (24 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{156}N_{28}O_{38}$: M = 2297.4; gefunden: 2297.32 ($M+H^+$)

### *47* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-*Glu*-*Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Ala*-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (40)]

Insgesamt wurden 50 mg (21.7 μmol) des Glycopeptids **47** erhalten (21 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{95}H_{154}N_{28}O_{38}$: M = 2297.4; gefunden: 2298.09 ($M+H^+$)

### *48* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Gln*-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 72 mg (30.6 μmol) des Glycopeptids **48** erhalten (31 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{95}H_{154}N_{28}O_{38}$: M = 2353.10; gefunden: 2355.43 ($M+H^+$)

### *49* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Gln*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 62 mg (26.3 μmol) des Glycopeptids **49** erhalten (26 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{157}N_{29}O_{39}$: M = 2353.10; gefunden: 2354.52 ($M+H^+$)

### *50* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Thr*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 96 mg (41.3 μmol) des Glycopeptids **50** erhalten (41 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{96}H_{156}N_{28}O_{39}$: M = 2326.09; gefunden: 2326.02 ($M+H^+$)

### *51* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*Thr*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 94 mg (41.3 μmol) des Glycopeptids **51** erhalten (41 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{96}H_{156}N_{28}O_{39}$: M = 2326.09; gefunden: 2326.02 ($M+H^+$)

### *52* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-*[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser*-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 89 mg (33.3 μmol) des Glycopeptids **52** erhalten (33 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{110}H_{177}N_{29}O_{48}$: M = 2673.21; gefunden: 2673.4 ($M+H^+$)

### *53* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-*Glu-Ser*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 46 mg (19.7 μmol) des Glycopeptids **53** erhalten (20 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{156}N_{28}O_{38}$: M = 2324.3; gefunden: 2313.70 ($M+H^+$)

***54*** ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr*-Ala-*$NH_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 92 mg (34.2 μmol) des Glycopeptids **54** erhalten (34 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{110}H_{179}N_{29}O_{49}$: M = 2691.22; gefunden: 2691.66 ($M+H^+$)

## 8.5. Multiple Festphasensynthese der Peptide 63 bis 67

Die Glycopeptide 63 bis 67 wurden in einer multiplen Festphasensynthese in Glassäulen synthetisiert wie unter Abschnitt 8.3. beschrieben.

Die Abspaltung der Glycopeptide vom Harz erfolgte, wie in Abschnitt 8.3. beschrieben, durch Behandlung mit mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung.

Die Deblockierung der Rohprodukte erfolgte mit katalytischen Mengen Natriummethanolat (1 % in Methanol) in absolutem Methanol unter genauer Einhaltung des pH-Wertes (Abschnitt 8.3.).

Zur Vorreinigung wurden die vom Harz abgespaltenen und O-entschützten Peptide mit kaltem t-Butylmethylether behandelt. Der peptidhaltige Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die trübe wäßrige Lösung mit einem Edelstahlfiltrationsvorsatz über einen Cellulosefilter (Porengröße 0.8 μm, Sartorius) filtriert. Die klare peptidhaltige Lösung wurde nach eventuellem Einengen durch reversed phase HPLC an einer C-18 Säule gereinigt.

***63*** ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-*[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]Asn*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*$NH_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 4.7 mg (1.7 μmol) des Glycopeptids **63** erhalten (20 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{113}H_{180}N_{30}O_{49}$: M = 2742.88; gefunden: 2740.51 ($M+H^+$)

***64*** ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser(GalGalNAc)-Ala-Pro-Asp-*[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]Asn*-Arg-Pro-Ala-*Leu*-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-*Val*-*$NH_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 6 mg (2.1 μmol) des Glycopeptids **64** erhalten (21 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{116}H_{188}N_{30}O_{49}$: M = 2786.97; gefunden: 2785.35 ($M+H^+$)

### *65* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-*[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]Asn*-Ala-Pro-Asp-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 4.8 mg (1.7 μmol) des Glycopeptids **65** erhalten (17 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{114}H_{183}N_{30}O_{49}$: M = 2739.92; gefunden: 2739.22 ($M+H^+$)

### *66* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-*[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]Asn*-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 4.6 mg (1.7 μmol) des Glycopeptids **66** erhalten (17 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{114}H_{183}N_{30}O_{49}$: M = 2741.89; gefunden: 2741.22 ($M+H^+$)

### *67* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-*[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]Asn*-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 1.8 mg (1.7 μmol) des Glycopeptids **67** erhalten (218 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{112}H_{181}N_{31}O_{49}$: M = 2745.88; gefunden: 2745.92 ($M+H^+$)

## $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Glycopeptide 63 bis 67

**$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm**

| δ | NH | Hα$_1$ | Hα$_2$ | Hβ$_1$ | Hβ$_2$ | Hγ$_1$ | Hγ$_2$ | Hδ$_1$ | Hδ$_2$ | andere |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.72 | 4.52 | | 3.25 | 3.25 | | | | | H-2: 8.45 |
| Gly-3 | 8.44 | 3.84 | 3.84 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.08 | 4.12 | | 2.00 | | 0.91 | 0.91 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.22 | | 4.20 | | 1.45 | | | | |
| Ser-6 | 8.32 | 4.41 | | 3.65 | 3.65 | | | | | |
| Ala-7 | 8.23 | 4.50 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.37 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.75 | | 2.88 | 2.82 | | | | | |
| Asn-10 | 8.17 | 4.64 | | 2.74 | 2.83 | | | | | |
| Arg-11 | 8.37 | 4.45 | | 1.88 | 1.65 | 1.65 | 1.60 | 3.23 | 3.23 | ε: 7.32 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.32 | 4.45 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.34 | 3.75 | 3.76 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.52 | | 3.85 | 3.85 | | | | | |
| Thr-17 | 8.50 | 4.45 | | 4.31 | | 1.28 | | | | |
| Ala-18 | 8.23 | 4.44 | | 1.39 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.34 | 4.29 | | 1.33 | | | | | | |

**Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:**

| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gal | | | 4.35 | 3.45 | 3.56 | 3.52 | 3.78 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.56 | 1.99 | 4.67 | 4.11 | 3.99 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

**[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]**

| δ | NH1 | NH2 | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GlcNAc1 | 8.54 | 8.12 | 1.93 | 4.97 | 3.77 | 3.68 | 3.57 | 3.48 | 3.68/3.68 |
| GlcNAc2 | | 8.29 | 1.98 | 4.51 | 3.67 | 3.50 | 3.41 | 3.69 | 3.50/3.50 |

**Tab. 8.16.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **63**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.05 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.81 | 4.54 | | 3.30 | 3.30 | | | | | H-2: 8.49 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.10 | 4.19 | | 2.01 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.25 | | 4.18 | | 1.45 | | | | |
| Ser-6 | 8.33 | 4.45 | | 3.69 | 3.69 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.76 | | 2.90 | 2.85 | | | | | |
| Asn-10 | 8.20 | 4.65 | | 2.74 | 2.85 | | | | | |
| Arg-11 | 8.39 | 4.51 | | 1.88 | 1.65 | 1.65 | 1.62 | 3.24 | 3.24 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.33 | 4.45 | | 1.35 | | | | | | |
| Leu-14 | 8.20 | 4.35 | | 1.62 | 1.58 | 1.67 | | 0.94 | 0.89 | |
| Gly-15 | 8.32 | 3.81 | 3.81 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.55 | | 3.86 | 3.86 | | | | | |
| Thr-17 | 8.51 | 4.45 | | 4.31 | | 1.26 | | | | |
| Ala-18 | 8.26 | 4.48 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Val-21 | 8.21 | 4.19 | | 2.10 | | 0.92 | 0.92 | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.37 | 3.45 | 3.55 | 3.50 | 3.78 | 3.76/3.74 |
| GalNAc | 7.57 | 2.01 | 4.65 | 4.10 | 3.97 | 3.85 | 3.95 | 3.75/3.69 |

| **[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH1 | NH2 | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| GlcNAc1 | 8.56 | 8.10 | 1.97 | 4.97 | 3.79 | 3.68 | 3.58 | 3.48 | 3.68/3.68 |
| GlcNAc2 | | 8.28 | 1.98 | 4.50 | 3.67 | 3.51 | 3.39 | 3.65 | 3.52/3.52 |

**Tab. 8.17.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **64**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.54 | | 3.27 | 3.27 | | | | | H-2: 8.51 |
| Gly-3 | 8.45 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.15 | 4.19 | | 2.01 | | 0.85 | 0.85 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.27 | | 4.15 | | 1.45 | | | | |
| Asn-6 | 8.20 | 4.64 | | 2.75 | 2.85 | | | | | |
| Ala-7 | 8.22 | 4.49 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.75 | | 2.89 | 2.81 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.42 | | 4.34 | | 1.25 | | | | |
| Arg-11 | 8.34 | 4.47 | | 1.90 | 1.63 | 1.63 | 1.68 | 3.26 | 3.26 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.35 | 4.45 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.36 | 3.81 | 3.81 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.13 | 4.55 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.45 | | 4.31 | | 1.27 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.47 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.35 | 4.33 | | 1.34 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.35 | 3.44 | 3.55 | 3.52 | 3.78 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.56 | 1.97 | 4.66 | 4.11 | 4.01 | 3.84 | 3.95 | 3.79/3.72 |

| **[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH1 | NH2 | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| GlcNAc1 | 8.55 | 8.15 | 1.96 | 4.97 | 3.79 | 3.69 | 3.57 | 3.47 | 3.66/3.66 |
| GlcNAc2 | | 8.29 | 1.99 | 4.51 | 3.66 | 3.50 | 3.42 | 3.69 | 3.51/3.51 |

**Tab. 8.18.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **65**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.10 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.78 | 4.55 | | 3.28 | 3.28 | | | | | H-2: 8.58 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.84 | 3.84 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.11 | 4.15 | | 1.99 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.34 | 4.24 | | 4.15 | | 1.47 | | | | |
| Ser-6 | 8.33 | 4.47 | | 3.66 | 3.66 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.52 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.73 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Asn-10 | 8.19 | 4.64 | | 2.75 | 2.83 | | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.48 | | 1.89 | 1.65 | 1.65 | 1.60 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.34 | 4.47 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.34 | 3.77 | 3.77 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.54 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.46 | | 4.31 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.29 | 4.45 | | 1.39 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.35 | | 2.28 | 1.90 | 2.01 | 2.01 | 3.77 | 3.4 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.31 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.35 | 3.45 | 3.55 | 3.52 | 3.77 | 3.75/3.73 |
| GalNAc | 7.56 | 1.98 | 4.67 | 4.13 | 3.99 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

| **[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH1 | NH2 | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| GlcNAc1 | 8.54 | 8.13 | 1.93 | 4.97 | 3.78 | 3.67 | 3.57 | 3.48 | 3.68/3.68 |
| GlcNAc2 | | 8.31 | 1.98 | 4.52 | 3.66 | 3.51 | 3.41 | 3.69 | 3.51/3.51 |

**Tab. 8.19.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **66**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.11 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.56 | | 3.29 | 3.29 | | | | | H-2: 8.53 |
| Gly-3 | 8.44 | 3.84 | 3.84 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.10 | 4.17 | | 2.00 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.35 | 4.27 | | 4.15 | | 1.46 | | | | |
| Ser-6 | 8.34 | 4.46 | | 3.68 | 3.68 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.51 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.45 | 4.71 | | 2.91 | 2.85 | | | | | |
| Thr-10 | 8.32 | 4.45 | | 4.35 | | 1.28 | | | | |
| Arg-11 | 8.34 | 4.48 | | 1.89 | 1.63 | 1.63 | 1.62 | 3.25 | 3.24 | ε: 7.28 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.36 | 4.45 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.36 | 3.77 | 3.77 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.15 | 4.55 | | 3.88 | 3.88 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.45 | | 4.27 | | 1.25 | | | | |
| Ala-18 | 8.24 | 4.48 | | 1.37 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Asn-20 | 8.19 | 4.63 | | 2.74 | 2.85 | | | | | |
| Ala-21 | 8.39 | 4.33 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]:** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| Gal | | | 4.35 | 3.45 | 3.56 | 3.52 | 3.78 | 3.76/3.73 |
| GalNAc | 7.56 | 1.99 | 4.67 | 4.11 | 3.99 | 3.85 | 3.97 | 3.76/3.70 |

| **[GlcNAc-β(1-4)GlcNAc-β(1-O)]** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH1 | NH2 | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6a/H-6b |
| GlcNAc1 | 8.54 | 8.15 | 1.92 | 4.97 | 3.78 | 3.69 | 3.56 | 3.48 | 3.68/3.68 |
| GlcNAc2 | | 8.30 | 1.99 | 4.50 | 3.67 | 3.51 | 3.41 | 3.69 | 3.50/3.50 |

**Tab. 8.20.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **67**

## 8.6. Multiple Festphasensynthese der Peptidsubstrate 68 bis 75

Die Peptidsubstrate 68 bis 75 wurden in einer multiplen Festphasensynthese in Glassäulen synthetisiert wie unter Abschnitt 8.3. beschrieben.

Die Abspaltung der Glycopeptide vom Harz erfolgte mit 95 %iger wässriger TFA-Lösung (Abschnitt 8.3.). Zur Deblockierung der Rohprodukte wurde mit katalytischen Mengen Natriummethanolat (1 % in Methanol) in absolutem Methanol unter genauer Einhaltung des pH-Wertes behandelt(Abschnitt 8.3.).

Die abgespaltenen und O-entschützten Peptide wurden zur Vorreinigung mit kaltem t-Butylmethylether behandelt. Der peptidhaltige Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die trübe wäßrige Lösung mit einem Edelstahlfiltrationsvorsatz über einen Cellulosefilter (Porengröße 0.8 μm, Sartorius) filtriert. Die nun klare peptidhaltige Lösung wurde nach eventuellem Einengen durch reversed phase HPLC an einer C-18 Säule gereinigt.

### *68* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 43 mg (18.5 μmol) des Glycopeptids **68** erhalten (37 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{97}H_{156}N_{28}O_{38}$: M = 2322.5; gefunden: 2323.22 ($M+H^+$)

### *69* ***H*-Ala-His-Gly-Val-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 34 mg (12.6 μmol) des Glycopeptids **69** erhalten (25 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{111}H_{179}N_{29}O_{48}$: M = 2687.84; gefunden: 2688.36 ($M+H^+$)

### *70* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH$_2$***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 42 mg (15.6 μmol) des Glycopeptids **70** erhalten 31 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{111}H_{179}N_{29}O_{48}$: M = 2687.84; gefunden: 2689.70 ($M+H^+$)

***71*** **_H_-Ala-His-Gly-Val-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-$NH_2$**

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 24 mg (7.9 μmol) des Glycopeptids **71** erhalten (16 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{125}H_{202}N_{30}O_{58}$: M = 3053.19; gefunden: 3053.31 ($M+H^+$)

***72*** **_H_-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-$NH_2$**

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 16 mg (5.2 μmol) des Glycopeptids **72** erhalten (10 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{125}H_{202}N_{30}O_{58}$: M = 3053.19; gefunden: 3053.50 ($M+H^+$)

***73*** **_H_-Ala-His-Gly-Val-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-$NH_2$**

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 27 mg (8.8 μmol) des Glycopeptids **73** erhalten (17 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{125}H_{202}N_{30}O_{58}$: M = 3053.19; gefunden: 3054.42 ($M+H^+$)

***74*** **_H_-Ala-His-Gly-Val-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-$NH_2$**

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 15 mg (4.4 μmol) des Glycopeptids **74** erhalten (9 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{139}H_{225}N_{31}O_{68}$: M = 3418.53; gefunden: 3418.92 ($M+H^+$)

***75*** ***H*-Ala-His-Gly-Val-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 24 mg (6.3 μmol) des Glycopeptids **75** erhalten (13 % bezogen auf die Belegung des Harzes).

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{153}H_{248}N_{32}O_{78}$: M = 3783.87; gefunden: 3787.02 ($M+H^+$)

## 8.7. Enzymatische Sialylierung der Glycopeptide 76 bis 83

Pro Verbindung wurden jeweils sechs Ansätze wie unten beschrieben durchgeführt und anschließend vereinigt.

***76*** ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

Gereinigte ST3-Gal I (30 μL ≈ 2 mU) wurde zu einer Lösung des Glycopeptids **68** (0.5 mg, 0.21 μmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) gegeben, welche 2 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 2 mU calf intestinal Phosphatase enthielt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 37 C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einfrieren der Reaktionslösung unterbrochen.

Nach Überprüfen der einzelnen Ansätze durch MALDI-TOF-MS (Auftragen mit ZipTip C-18, Matrix DHB) wurden die Ansätze vereinigt und vorsichtig eingeengt. Zur Abtrennung der Salze wurde die eingeengte Reaktionslösung über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser) und erneut eingeengt. Das so vorgereinigte Produkt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 3 mg (1.1 μmol, 87 %) des Glycopeptids **76** erhalten.

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{108}H_{173}N_{28}O_{47}$: M = 2614.2; gefunden: 2614.76 ($M+H^+$)

***77*** ***H*-Ala-His-Gly-Val-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

ST3-Gal I (60 μL ≈ 4 mU) wurde zu einer Lösung des Glycopeptids **69** (0.5 mg, 0.18 μmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) gegeben, welche 4 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 4 mU calf intestinal Phosphatase enthielt. und 3 h bei 37 C inkubiert. Zur

Vervollständigung der Reaktion wurde noch 20 µL ST3-Gal I und 2 mM CMP-Neu5Ac hinzugefügt und nochmals 2 h bei 37 C inkubiert.

Die vereinigten Ansätze wurden vorsichtig eingeengt und über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser). Das auf diese Weise vorgereinigte Produkt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 2.2 mg (0.67 µmol, 62 %) des Glycopeptids **77** erhalten.

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{119}H_{190}N_{29}O_{54}$: M = 3271.3; gefunden: 3273.5 ($M+H^+$)

### *78* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

ST3-Gal I (60 µL ≈ 4 mU) wurde zu einer Lösung des Glycopeptids **70** (0.5 mg, 0.18 µmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 4 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 4 mU calf intestinal Phosphatase gegeben und 3 h bei 37 C inkubiert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde nochmals 20 µL ST3-Gal I und 2 mM CMP-Neu5Ac hinzugefügt und 2 h bei 37 C inkubiert.

Die vereinigten Ansätze wurden vorsichtig eingeengt und über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser). Das vorgereinigte Produkt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 3.4 mg (1.01 µmol, 92 %) des Glycopeptids **78** erhalten.
MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{119}H_{190}N_{29}O_{54}$: M = 3271.3; gefunden: 3273.32 ($M+H^+$)

### *79* ***H*-Ala-His-Gly-Val-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH₂***

Zu einer Lösung des Glycopeptids **71** (0.5 mg, 0.16 µmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 6 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 6 mU calf intestinal Phosphatase wurde ST3-Gal I (90 µL ≈ 6 mU) gegeben und 3 h bei 37 C inkubiert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde nochmals 20 µL ST3-Gal I und 2 mM CMP-Neu5Ac hinzugefügt und 2 h bei 37 C inkubiert.

Die vereinigten Ansätze wurden vorsichtig eingeengt und über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 3.2 mg (0.81 μmol, 84 %) des Glycopeptids **79** erhalten.

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{130}H_{207}N_{30}O_{61}$: M = 3927.9; gefunden: 3930.16 ($M+H^+$)

### *80* ***H*-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*$NH_2$**

Zu einer Lösung des Glycopeptids **72** (0.5 mg, 0.16 μmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 6 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 6 mU calf intestinal Phosphatase wurde ST3-Gal I (90 μL ≈ 6 mU) gegeben und 4 h bei 37 C inkubiert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde nochmals 20 μL ST3-Gal I und 2 mM CMP-Neu5Ac hinzugefügt und 2 h bei 37 C inkubiert.

Die vereinigten Ansätze wurden vorsichtig eingeengt und über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 3 mg (0.7 μmol, 73 %) des Glycopeptids **80** erhalten.

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{130}H_{207}N_{30}O_{61}$: M = 3927.9; gefunden: 3930.23 ($M+H^+$)

### *81* ***H*-Ala-His-Gly-Val-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*$NH_2$**

Zu einer Lösung des Glycopeptids **73** (0.5 mg, 0.16 μmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 6 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 6 mU calf intestinal Phosphatase wurde ST3-Gal I (90 μL ≈ 6 mU) gegeben und 4 h bei 37 C inkubiert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurd nochmals 20 μL ST3-Gal I und 2 mM CMP-Neu5Ac hinzugefügt und 2 h bei 37 C inkubiert.

Die vereinigten Ansätze wurden vorsichtig eingeengt und über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 3 mg (0.7 μmol, 73 %) des Glycopeptids **81** erhalten.

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{130}H_{207}N_{30}O_{61}$: M = 3927.9; gefunden: 3929.11 ($M+H^+$)

### *82* ***H*-Ala-His-Gly-Val-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH*$_2$**

Zu einer Lösung des Glycopeptids **74** (0.5 mg, 0.11 μmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 8 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 8 mU calf intestinal Phosphatase wurde ST3-Gal I (90 μL ≈ 8 mU) gegeben und 4 h bei 37 C inkubiert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde nochmals 40 μL ST3-Gal I, 4 mM CMP-Neu5Ac und 4 mU Phosphatase hinzugefügt und weitere 2 h bei 37 C inkubiert.

Die vereinigten Ansätze wurden eingeengt und über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 3 mg (0.6 μmol, 90 %) des Glycopeptids **82** erhalten.

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{141}H_{224}N_{31}O_{68}$: M = 4584.5; gefunden: 4587.6 ($M+H^+$)

### *83* ***H*-Ala-His-Gly-Val-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-Ala-Pro-Asp-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-[Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Ser-[Neu5Ac-α(2 -3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-*NH*$_2$**

Zu einer Lösung des Glycopeptids **75** (0.5 mg, 0.13 μmol) in 25 mM Tris-HCl Puffer (pH 6.5, 1 mL) mit 10 mM CMP-Neu5Ac, 0.1 % Triton X-100 und 10 mU calf intestinal Phosphatase wurde ST3-Gal I (120 μL ≈ 10 mU) gegeben und 4 h bei 37 C inkubiert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde nochmals 40 μL ST3-Gal I, 4 mM CMP-Neu5Ac und 4 mU Phosphatase hinzugefügt und weitere 2 h bei 37 C inkubiert.

Die vereinigten Ansätze wurden eingeengt und über ein LH-20 Säule gegeben (Elution mit bidestilliertem Wasser). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels reversed phase HPLC mit einer C-18 Säule gereinigt.

HPLC [Eluent A – Eluent B, 100:0 → 90:10 (5) → 70:30 (45)]

Insgesamt wurden 3 mg (0.6 μmol, 80 %) des Glycopeptids **83** erhalten.

MALDI-TOF-MS kalkuliert für $C_{152}H_{241}N_{32}O_{75}$: M = 5241.1; gefunden: 5245.8 ($M+H^+$)

# $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Glycopeptide 76 bis 83

**$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm**

| δ | NH | Hα$_1$ | Hα$_2$ | Hβ$_1$ | Hβ$_2$ | Hγ$_1$ | Hγ$_2$ | Hδ$_1$ | Hδ$_2$ | andere |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ala-1 | | 4.10 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.76 | 4.55 | | 3.25 | 3.25 | | | | | H-2: 8.54 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.80 | 3.80 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.09 | 4.19 | | 2.08 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.38 | 4.25 | | 4.11 | | 1.48 | | | | |
| Ser-6 | 8.36 | 4.46 | | 3.70 | 3.70 | | | | | |
| Ala-7 | 8.19 | 4.51 | | 1.40 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.75 | | 2.90 | 2.85 | | | | | |
| Thr-10 | 8.31 | 4.45 | | 4.35 | | 1.30 | | | | |
| Arg-11 | 8.36 | 4.46 | | 1.90 | 1.63 | 1.63 | 1.58 | 3.24 | 3.24 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.33 | 4.44 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.34 | 3.80 | 3.80 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.12 | 4.56 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.45 | | 4.31 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.24 | 4.46 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.33 | | 1.35 | | | | | | |

**Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]**

| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gal | | | 4.51 | 3.56 | 4.06 | 3.98 |
| GalNAc | 8.11 | 2.02 | 4.84 | 4.21 | 4.01 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.14 | 1.98 | 2.75/1.78 | 3.65 | 3.84 | 3.61 |

**Tab. 8.21.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **76**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.06 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.79 | 4.57 | | 3.25 | 3.25 | | | | | H-2: 8.54 |
| Gly-3 | 8.45 | 3.86 | 3.86 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.15 | 4.15 | | 2.03 | | 0.87 | 0.87 | | | |
| Thr-5 | 8.35 | 4.27 | | 4.19 | | 1.48 | | | | |
| Ser-6 | 8.29 | 4.46 | | 3.68 | 3.68 | | | | | |
| Ala-7 | 8.21 | 4.55 | | 1.40 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.48 | 4.75 | | 2.87 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.42 | | 4.36 | | 1.29 | | | | |
| Arg-11 | 8.37 | 4.48 | | 1.87 | 1.63 | 1.63 | 1.58 | 3.27 | 3.27 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.34 | 4.46 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.32 | 3.81 | 3.81 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.17 | 4.55 | | 3.87 | 3.87 | | | | | |
| Thr-17 | 8.53 | 4.47 | | 4.30 | | 1.25 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.47 | | 1.37 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.32 | | 1.36 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)]*** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Gal | | | 4.51 | 3.54 | 4.05 | 3.98 |
| GalNAc | 8.08 | 2.08 | 4.84 | 4.23 | 4.02 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.12 | 2.01 | 2.77/1.78 | 3.65 | 3.85 | 3.64 |

* Die $^1$H-NMR-Verschiebungen der einzelnen Kohlenhydratreste treten in den Spektren überlagert auf.

**Tab. 8.22.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **77**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.11 | | 1.46 | | | | | | |
| His-2 | 8.75 | 4.55 | | 3.29 | 3.29 | | | | | H-2: 8.51 |
| Gly-3 | 8.44 | 3.86 | 3.86 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.10 | 4.16 | | 2.03 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.37 | 4.25 | | 4.17 | | 1.46 | | | | |
| Ser-6 | 8.30 | 4.46 | | 3.66 | 3.66 | | | | | |
| Ala-7 | 8.19 | 4.53 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.48 | 4.75 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.34 | 4.44 | | 4.37 | | 1.30 | | | | |
| Arg-11 | 8.36 | 4.46 | | 1.90 | 1.65 | 1.65 | 1.61 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.32 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.34 | 4.44 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.36 | 3.78 | 3.78 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.19 | 4.56 | | 3.91 | 3.91 | | | | | |
| Thr-17 | 8.56 | 4.47 | | 4.31 | | 1.26 | | | | |
| Ala-18 | 8.28 | 4.50 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.38 | 4.35 | | 1.37 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)] *** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Gal | | | 4.53 | 3.58 | 4.06 | 4.01 |
| GalNAc | 8.10 | 2.00 | 4.86 | 4.21 | 4.03 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.14 | 1.98 | 2.75/1.78 | 3.65 | 3.84 | 3.62 |

* Die $^1$H-NMR-Verschiebungen der einzelnen Kohlenhydratreste treten in den Spektren überlagert auf.

**Tab. 8.23.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **78**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.40 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.57 | | 3.26 | 3.26 | | | | | H-2: 8.51 |
| Gly-3 | 8.44 | 3.86 | 3.86 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.12 | 4.18 | | 1.99 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.38 | 4.27 | | 4.15 | | 1.46 | | | | |
| Ser-6 | 8.34 | 4.46 | | 3.69 | 3.69 | | | | | |
| Ala-7 | 8.23 | 4.53 | | 1.39 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.45 | 4.70 | | 2.88 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.36 | 4.42 | | 4.33 | | 1.27 | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.47 | | 1.90 | 1.64 | 1.64 | 1.62 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.29 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.55 | |
| Ala-13 | 8.36 | 4.45 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.33 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.17 | 4.55 | | 3.88 | 3.88 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.45 | | 4.28 | | 1.26 | | | | |
| Ala-18 | 8.24 | 4.46 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.33 | | 1.36 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)] *** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Gal | | | 4.55 | 3.56 | 4.04 | 3.97 |
| GalNAc | 8.15 | 2.00 | 4.85 | 4.20 | 4.03 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.12 | 2.01 | 2.77/1.76 | 3.66 | 3.84 | 3.62 |

* Die $^1$H-NMR-Verschiebungen der einzelnen Kohlenhydratreste treten in den Spektren überlagert auf.

**Tab. 8.24.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **79**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.45 | | | | | | |
| His-2 | 8.77 | 4.55 | | 3.27 | 3.27 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.10 | 4.15 | | 2.03 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.25 | | 4.17 | | 1.45 | | | | |
| Ser-6 | 8.33 | 4.45 | | 3.67 | 3.67 | | | | | |
| Ala-7 | 8.23 | 4.52 | | 1.40 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.45 | 4.75 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.45 | | 4.35 | | 1.30 | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.48 | | 1.86 | 1.65 | 1.65 | 1.61 | 3.26 | 3.26 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.34 | 4.44 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.34 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.17 | 4.55 | | 3.88 | 3.88 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.45 | | 4.30 | | 1.26 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.48 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.37 | 4.31 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)] *** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Gal | | | 4.50 | 3.55 | 4.06 | 3.98 |
| GalNAc | 8.11 | 2.02 | 4.84 | 4.22 | 4.03 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.16 | 1.98 | 2.75/1.78 | 3.67 | 3.86 | 3.63 |

* Die $^1$H-NMR-Verschiebungen der einzelnen Kohlenhydratreste treten in den Spektren überlagert auf.

**Tab. 8.25.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **80**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.11 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.75 | 4.57 | | 3.27 | 3.27 | | | | | H-2: 8.52 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.84 | 3.84 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.15 | 4.17 | | 2.01 | | 0.90 | 0.90 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.25 | | 4.19 | | 1.47 | | | | |
| Ser-6 | 8.35 | 4.46 | | 3.69 | 3.69 | | | | | |
| Ala-7 | 8.25 | 4.55 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.75 | | 2.88 | 2.80 | | | | | |
| Thr-10 | 8.33 | 4.42 | | 4.35 | | 1.29 | | | | |
| Arg-11 | 8.34 | 4.48 | | 1.89 | 1.65 | 1.65 | 1.60 | 3.24 | 3.24 | ε: 7.31 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.34 | 4.44 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.36 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.19 | 4.56 | | 3.91 | 3.91 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.47 | | 4.29 | | 1.26 | | | | |
| Ala-18 | 8.26 | 4.48 | | 1.37 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.34 | | 1.38 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)] *** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Gal | | | 4.50 | 3.54 | 4.02 | 3.96 |
| GalNAc | 8.11 | 2.00 | 4.84 | 4.20 | 4.05 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.12 | 1.99 | 2.75/1.79 | 3.66 | 3.85 | 3.62 |

* Die $^1$H-NMR-Verschiebungen der einzelnen Kohlenhydratreste treten in den Spektren überlagert auf.

**Tab. 8.26.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **81**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.09 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.78 | 4.55 | | 3.29 | 3.29 | | | | | H-2: 8.50 |
| Gly-3 | 8.43 | 3.85 | 3.85 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.10 | 4.17 | | 2.01 | | 0.89 | 0.89 | | | |
| Thr-5 | 8.36 | 4.29 | | 4.17 | | 1.44 | | | | |
| Ser-6 | 8.34 | 4.47 | | 3.69 | 3.69 | | | | | |
| Ala-7 | 8.25 | 4.52 | | 1.40 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.75 | | 2.89 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.46 | | 4.35 | | 1.27 | | | | |
| Arg-11 | 8.35 | 4.50 | | 1.88 | 1.64 | 1.64 | 1.61 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.34 | 4.45 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.35 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.19 | 4.57 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Thr-17 | 8.55 | 4.45 | | 4.31 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.25 | 4.48 | | 1.35 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.36 | 4.30 | | 1.33 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)] *** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Gal | | | 4.50 | 3.56 | 4.05 | 3.95 |
| GalNAc | 8.10 | 2.00 | 4.85 | 4.23 | 4.01 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.12 | 2.00 | 2.77/1.78 | 3.66 | 3.84 | 3.63 |

* Die $^1$H-NMR-Verschiebungen der einzelnen Kohlenhydratreste treten in den Spektren überlagert auf.

**Tab. 8.27.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **82**

| **$^1$H-NMR (500 MHz) δ in ppm** | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | $H\alpha_1$ | $H\alpha_2$ | $H\beta_1$ | $H\beta_2$ | $H\gamma_1$ | $H\gamma_2$ | $H\delta_1$ | $H\delta_2$ | andere |
| Ala-1 | | 4.11 | | 1.42 | | | | | | |
| His-2 | 8.79 | 4.54 | | 3.27 | 3.27 | | | | | H-2: 8.49 |
| Gly-3 | 8.40 | 3.83 | 3.83 | | | | | | | |
| Val-4 | 8.10 | 4.15 | | 2.03 | | 0.88 | 0.88 | | | |
| Thr-5 | 8.35 | 4.27 | | 4.15 | | 1.46 | | | | |
| Ser-6 | 8.34 | 4.45 | | 3.69 | 3.69 | | | | | |
| Ala-7 | 8.24 | 4.53 | | 1.38 | | | | | | |
| Pro-8 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Asp-9 | 8.46 | 4.74 | | 2.87 | 2.82 | | | | | |
| Thr-10 | 8.35 | 4.44 | | 4.35 | | 1.30 | | | | |
| Arg-11 | 8.37 | 4.50 | | 1.89 | 1.65 | 1.65 | 1.60 | 3.25 | 3.25 | ε: 7.30 |
| Pro-12 | | 4.32 | | 2.24 | 1.85 | 1.97 | 1.97 | 3.70 | 3.56 | |
| Ala-13 | 8.34 | 4.45 | | 1.36 | | | | | | |
| Pro-14 | | 4.35 | | 2.26 | 1.86 | 1.98 | 1.98 | 3.77 | 3.62 | |
| Gly-15 | 8.33 | 3.79 | 3.79 | | | | | | | |
| Ser-16 | 8.19 | 4.56 | | 3.89 | 3.89 | | | | | |
| Thr-17 | 8.56 | 4.46 | | 4.27 | | 1.24 | | | | |
| Ala-18 | 8.28 | 4.48 | | 1.34 | | | | | | |
| Pro-19 | | 4.62 | | 2.33 | 1.85 | 2.01 | 2.01 | 3.75 | 3.4 | |
| Pro-20 | | 4.37 | | 2.26 | 1.93 | 1.99 | 1.99 | 3.77 | 3.6 | |
| Ala-21 | 8.38 | 4.35 | | 1.35 | | | | | | |

| **Kohlenhydratreste [Neu5Ac-α(2-3)Gal-β(1-3)GalNAc-α(1-O)] *** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| δ | NH | Ac | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 |
| Gal | | | 4.52 | 3.57 | 4.00 | 3.97 |
| GalNAc | 8.12 | 2.02 | 4.86 | 4.23 | 4.03 | |

| δ | NH | Ac | H-3eq/H-3ax | H-4 | H-5 | H-6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neu5Ac | 8.17 | 1.99 | 2.75/1.77 | 3.68 | 3.81 | 3.62 |

* Die $^1$H-NMR-Verschiebungen der einzelnen Kohlenhydratreste treten in den Spektren überlagert auf.

**Tab. 8.28.:** $^1$H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung **83**

# 9. Literaturverzeichnis

S. Anisfield, P.T. Landsbury, Jr., *J. Org. Chem*. **1990**, 55, 5560-5567

E. Atherton, E. Brown, R.C. Sheppard, A. Rosevear, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. **1981**,1151-1157

E. Atherton, J.L. Holder, M. Meldal, R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1988**, 1, 2887-2895

E. Atherton, R.C. Sheppard (Hrsg.), *Solid phase peptide synthesis- a practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo **1989**

W.P. Aue, E. Bartholdi,R.R. Ernst, *J. Chem. Phys*., **1976**, 64, 2229-2246

E. Bardaji, J.L. Torres, P. Clapes, F. Albericio, G. Barany, R.E. Rodriguez, M.P. Sacristan, G. Valencia, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1991**, 1, 1755-1769

E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 117-123

A. Bax, R. Freeman, *J. Magn. Reson*., **1983**, 51, 169-173

E.G. Berger, E. Buddecke, J.P. Kamerling, A. Kobata, J.C. Paulson, J.F.G Vliegenthart, *Experimenta* **1985**, 38, 1129-1139

C. Braunschweiler, R.R. Ernst, *J. Magn Reson*., **1983**, 53, 521-528

I. Brockhausen, W. Kuhns, *Glycoproteins and human disease*, Springer Verlag, Heidelberg **1997**

L.A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993,** 115, 4397-4398
L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3413

C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E.O. Lundell, J.D. Haug, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1980**, 15, 59-64

W.G. Chai, E.F. Hounsell, G.C. Cashmore, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 203, 257-268

S.K. George, B. Holm, C.A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, 880-885

S.K. George, T. Schwientek, C.A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, J. Kihlberg*, J. Am. Chem. Soc.,* **2001**, 123, 11117-11125

H.M. Geysen, R.H. Meloen und S.J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984,** 81, 3998-4002

S.J. Danishefsky and J.R. Allen, *Angew. Chem., Int. Ed.,* **2000**, 39, 836

D.G. Davies, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc*., **1985**, 107, 2821-2823

K. Denda-Nagai, T. Irimura, *Glycoconjugate J*. **2000**, 17, 649-658

J. Dojahn, Diplomarbeit., **1998**, Universität Hamburg

M.W. Edwards, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc*., **1985**, 108, 918-923

M. Elofsson, L.A. Salvador, J. Kihlberg, *Tetrahedron,* **1997**, 53, 369

J.D. Fontenot, *J. Biol. Structure & Dynamics*, **1993**, 13, 245-260

L.-A. Fransson, in: G.O. Aspinall (Hrsg.)*The Oligosaccharides*, Academic Press, New York **1985**

J.S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 817-952

H.M. Geysen, R.H.Meloen, S.J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 3998-4002

H. van Halbeek, A.-M. Strang, M. Lhermitte, *Glycobiol.* **1994**, 4, 203-219

F.-G. Hanisch, *Glycobiol.* **2000**, 10, 439-449

E.F. Hounsell, M.J. Davies, D.V. Renouf, *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 19-26

U. Karsten, C. Diotel, G. Klich, H. Paulsen, S. Goletz. S. Müller, F.-G- Hanisch, *Cancer Res.* **1998**, 58, 2541-2549

J. Kihlberg, S. K. George, B. Holm, C.A. Reis, T. Schwientek, H. Clausen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1,* **2001**, 880-885

Y.S. Kim, J. Gum Jr., I. Brockhausen, *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 693-707

Y.J. Kim, A. Varki, *Glycoconj. J.* **1997**, 14, 569-576-483

N.K. Kochetkov, L.M. Likhosherstov, O.S. Novikova, V.A. Deresvitskaja, *Carbohydr. Res.* **1986,** 146, C1-C4

S. Komba, M. Meldal, O. Werdelin, T. Jensen, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1,* **1999**, 415

H. Kunz, M. Dombo, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 731-733

A. Kurosaka, H. Nakajima, I. Funakoshi, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 11594-11598

L. Lapatsanis, G. Milias, K. Froussios, M. Kolovos, *Synthesis*, **1983**, 671-673

B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.,* **1997,** 36, 618

L.M. Likhosherstow, O.S. Novikova, V.A. Deresvitskaja, N. Kothetkov, *Carbohydr. Res.* **1986**, 146, C1-C4

K.O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B.W. Jin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325-33334

G.D. MacLean, D.W. Miles, R.D. Rubens, M.A. Reddish, B.M. Longenecker, *J. Immunother*. **1996**, 19, 309-316

M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 33, 3077-3080

M. Meldal, K.J. Jensen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 483-496

M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4005-4009

R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 65, 2149-2154

S. Meyer, Dissertation, Universität Hamburg 1999

J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Cem. Biochem.* **1980**, 37, 157-170

J. Montreuil, *Pure and Appl. Chem.,* **1984**, 56, 859-865

S. Müller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A.M. Lawson, F.-G. Hanisch*, J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24780-24793

Y. Nakahara, H. Iijima, S. Shibayama, T. Ogawa, *Carbohydr. Res*., **1991**, 216, 211-225

Y. Nakahara, Y. Nakahara, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 309, 287-296

H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem*., **1989**, 751, 771-780

H. Paulsen, M. Schulz, J.-D. Klamann, B. Waller, M. Paal, *Liebigs Ann. Chem*. 1985, 2028-2041

J. Perez-Villar, R.L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1983**, 274, 31751-31754

D. Piveteau, M.-A. Delsuc, E. Guittet, J.-Y. Lallemand, *J. Mgn. Reson*., **1987**, 71, 347-348

M. Rose, *Am. J. Physiol.* **1992**, 7, 413-429

H. Schachter, I. Brockhausen, in H.J. Allen, E.C. Kisailus (Hrsg.), *Glycoconjugates*, Marcel Dekker, New York **1992**, 263-332

H. Schachter, *Glycoconjugate J*. **2000**, 17, 465-483

O. Scheel, Dissertation, Universität Hamburg 1996

J.B. Schwarz, S.D. Kuduk, X.-T. Chen, D. Sames, P.W. Glunz, S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2662-2673

Y. Shimizu, S. Shaw, *Nature,* **1993**, 366, 630-631

M. Shimizu, K. Yamauchi, *J. Biochem. (Tokyo),* **1982**, 91, 515-524

P.W. Small, D.C. Sherrington, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1589-1594

R.G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 4813-4821

G.J. Strous, J. Dekker, *Crit. Rev. in Biochem. and Molec. Biol.*, **1992**, 27, 57-76

D.K. Struck, W.J. Lennarz in: W.J. Lennarz (Hrsg.) *The Biochemistry of Glycoproteins and proteoglycans*, Plenum Press, New York, N.Y., **1980**

M. Summers, L.G. Marzilli, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc*., **1986**, 108, 4285-4294

J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D.W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1455, 301

T. Toyokuni, A.K. Singhal, *Chem. Soc. Rev*., **1995**, 24, 231

M. Verma, E.A. Davidson, *Glycoconj. J*. **1994**, 172-179

A.M. Vlad, S. Muller, M. Cudic, H. Paulsen, L. Otvos, F.-G. Hanisch, O. Finn, *J. Exp. Med*, **2002**, 196, 1435-1446

D. Voet, J.G. Voet, *Biochemie*, VCH-Verlag, Weinheim **1994**

S.S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 1328-1335

K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids, Wiley*, New York, **1986**

# 10. Sicherheitshinweise

| Substanz | Gefahren-symbole | R-Sätze | S-Sätze |
|---|---|---|---|
| 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 |
| Benzaldehyddimethylacetal | Xn | 22 | 24 |
| Chloroform | Xn | 22-38-40-48/20/22 | 36-37 |
| Dichlormethan | Xn | 40 | 23.2-24/25-36/37 |
| Diethylether | F+, Xn | 12-19-22-66-67 | (2-)9-16-29-33 |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure | | | 24/25 |
| N,N‘-Diisopropylethylamin | F, C | 11-22-34-52/53 | 16-26-36/37/39-45-61 |
| N,N‘-Dimethylformamid | T | 61-E20/21-36 | 53-45 |
| Ethanol | F | 11 | 7-16 |
| Essigsäureethylester | F | 11 | 23.2-29-33 |
| 9-Flourenylsuccinimidyl-carbonat | | | 22-24/25 |
| O-(Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N‘,N‘-tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat | Xi | 36/37/38 | 26-36 |
| Hydrazinhydrat | T | 45-23/24/25-34-43 | 53-26-36/37/39-45 |
| Isobuten | F | 13 | 9-16-33 |
| Natrium | F, C | 14/15-34 | 5.3-8-43.7-45 |
| Natriumazid | T+, N | 28-32-50/53 | 28.1-45-60-61 |
| Natriummethanolat | C, F | 11-14-34-36/37/38 | 26-36 |
| Natriumnitrit | O, T | 8-25 | 44 |
| O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N‘,N‘-tetramethyl-uroniumtetrafluoroborat | Xi | 36/37/38 | 26-36 |
| p-Toluolsulfonsäure | Xi | 36/37/38 | 26-37 |
| Methanol | F, T | 11-23/24/25-39/23/24/25 | 7-16-36/37-45 |

| Substanz | Gefahren-symbole | R-Sätze | S-Sätze |
|---|---|---|---|
| Methylimidazol | C | 21/22-34 | 26-36-45 |
| 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 |
| Schwefelsäure (95-97 %) | C | 35 | 26-30-45 |
| Tetrahydrofuran | Xi | 11-19-36/37 | 16-29-33 |
| Toluol | Xn | 11-20-47 | 16-25-29-33 |
| Trifluoressigsäure | C | 20-35-52/53 | 9-26-27-28.1-45-61 |

# Danksagung

Ich danke Frau Nürnberger und Meike Jungclaus für die netten Unterhaltungen und natürlich für die Synthese eines Teiles der Glycosylaminosäuren.

Herrn Prof. Dr. Paulsen danke ich für seine Geduld und gute Führung durch die Doktorarbeit.

Ich danke dem AK Meyer und AK Thiem für die gute Zusammenarbeit und ihren fachmännischen als auch nicht-fachmännischen Ratschläge.
Martina Krasova und Ilona Müller danke ich dafür, dass sie immer da waren (Der Tee ist echt klasse!).

Herrn Dr. Sinnwell danke ich für die vorzüglichen NMR-Spektren (Ich bräuchte mal wieder ein Satz Spektren. Ich hab aber nur ganz wenig Substanz!).

Für die gute Kooperation im Rahmen der Projekte danke ich Prof. Dr. J. Taylor-Papdimitriou (London), Prof. Dr. M. Nuti (Rom), Prof. Dr. H. Clausen (Kopenhagen) und Prof. Dr. F.-G. Hanisch (Universität Köln).

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Familie, meinem Mann und meiner Tochter sowie meinen Eltern und Schwestern für ihre Unterstützung.

# Lebenslauf

| | |
|---|---|
| **Persönliche Angaben:** | Name: Nida Serttas (geb. Öztürk) |
| | Geburtsort: Hamburg |
| | Geburtstag: 13.10.1973 |

**Schulausbildung:**

| | |
|---|---|
| 08/1980-07/1984 | Grundschule Alter Teichweg, Hamburg |
| 08/1984-07/1990 | Gesamtschule Alter Teichweg, Hamburg |
| 08/1990-05/1993 | Gymnasiale Oberstufe der Gesamtschule Alter Teichweg, Hamburg |

**Studium/Promotion:**

| | |
|---|---|
| 04/1994-03/1999 | Studium der Chemie an der Universität Hamburg |
| 05/1996 | Vordiplom |
| 03/1999 | Diplom |
| | Diplomarbeit bei Prof. Dr. B. Meyer am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg. |
| | Titel: *Synthese von Glycopeptiden der einfachen, zweifachen, dreifachen und vierfachen MUC1 tandem repeating unit bis zu 80 Aminosäuren* |
| Seit 04/1999 | Promotion bei Prof. Dr. H. Paulsen am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg:<br>Titel: *Chemische und enzymochemische Synthese von krebs-assoziierten Glycopeptidstrukturen des Mucins MUC1* |

**Anstellungverhältnisse:**

| | |
|---|---|
| 04/1999-01/2002 | Universität Hamburg, wissenschaftliche Mitarbeiterin |

**Publikationen:**

Heiko Möller, Nida Serttas, Hans Paulsen, Joy M. Burchell, Joyce Taylor-Papadimitriou and Bernd Meyer, "NMR-based determination of binding epitope and conformational analysis of MUC-1 glycopeptides and peptides bound to the breast cancer selective antibody SM3", *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269, 1444-1455

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Hamburg, den 05.11.2003