

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**SYNTHESE VON SIALYLIERTEN KOHLENHYDRAT- UND
GLYCOPEPTIDEPITOPEN DES MUC1 MIT DEREN
FLUORIERTEN ANALOGA**

von

Markus Daum

aus

Mainz

2015

ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder betreut.

Eidesstattliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 19.11.2015

.....
Markus Daum

Dissertation eingereicht am:	19.11.2015
1. Gutachterin:	Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder
2. Gutachter:	Prof. Dr. Thomas Carell
Mündliche Prüfung am:	09.12.2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von August 2012 bis September 2015
an der Fakultät für Chemie und Pharmazie
im Department Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

FÜR MEINE FAMILIE

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

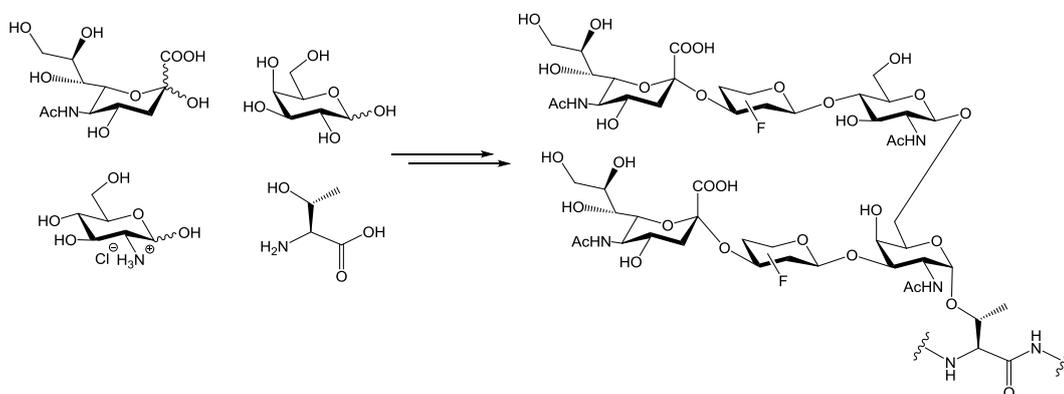
Albert Einstein

ABSTRACT

Die Gegenwart von Kohlenhydraten in biologischen Systemen ist von großer Bedeutung für eine Reihe von zellulären Zyklen, so z.B. die Zell-Zell-Erkennung, die Regulation von Proteinaktivitäten oder die Funktion von Kohlenhydraten als Liganden für die Zelladhäsion.^[1] Ferner besitzen eine Reihe von mucinartigen *O*-Glycanen vielfältige Funktionen in immunologischen Prozessen, welche mit unterschiedlichsten Krankheitsbildern, wie z.B. der Karzinogenese sowie Autoimmun- und Infektionskrankheiten einhergehen.^[2] Im Besonderen nehmen viele mucinartige Glycane mit funktionellen Oligosaccharidketten, einschließlich Sialinsäure-tragenden Strukturen wie z.B. Glycophorin, Leukosialin (CD 43 oder auch Sialophorin), Sialyl-Le^x und Sialyl-Le^a eine entscheidende Rolle als Liganden in Zell-Zell-Erkennungsmechanismen bei inflammatorischen Prozessen, T-Zell-Differenzierung und Krebsmetastasierung ein.

Jüngst wurde eine Reihe innovativer Ansätze für die Immuntherapie von Krebs durch ein besseres Verständnis der abweichenden Glycosylierungsmuster von Glycoproteinen und Glycolipiden auf der Oberfläche von Krebszellen entwickelt, wobei ein Schwerpunkt der Arbeiten auf der Herstellung von kohlenhydrat-basierten Krebsvakzinen ruht.^[3]

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die folgende Arbeit mit der Synthese von Epitopen des Sialophorin (CD 43), einem bedeutenden *O*-Glycan-enthaltenden Sialoglycoprotein, welches auf Leukozyten exprimiert vorliegt und mit einer Reihe von Krankheitsbildern, wie rheumatoider Arthritis, Leukämie, dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) und dem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS), einhergeht.^[4-7] Der Aufbau komplexer Hexasaccharid-tragender Glykokonjugate konnte hierbei ausgehend von kommerziell erhältlichen Startmaterialien erfolgen (Schema 1).



Schema 1: Synthese des mucinartigen *O*-Glycans Sialophorin ausgehend von kommerziell erhältlichen Startmaterialien.

Im Vordergrund stand dabei die Entwicklung eines biomimetischen Synthesewegs, mit dessen Hilfe neben der natürlichen Struktur auch eine Reihe fluorierter Sialophorin-Derivate mit unterschiedlich fluorierten D-Galactose-Bausteinen in den beiden Trisaccharid-Einheiten hergestellt werden können. Dabei sollten sämtliche Glycosylaminosäuren mit einem zur Festphasensynthese kompatiblen Schutzgruppenmuster ausgestattet vorliegen, um einen Einbau in die *N*-terminale Partialsequenz des Glycoproteins Sialophorin (CD 43) zu erlauben. Beginnend mit der Synthese der unterschiedlich fluorierten D-Galactose-Derivate, der Glucosamin- und der Sialinsäure-Bausteine sollten die regio- und stereoselektiv notwendigen Di- und Trisaccharid-Bausteine chemisch verknüpft werden. Zu diesem Zweck wurden literaturbekannte *Königs-Knorr*- und

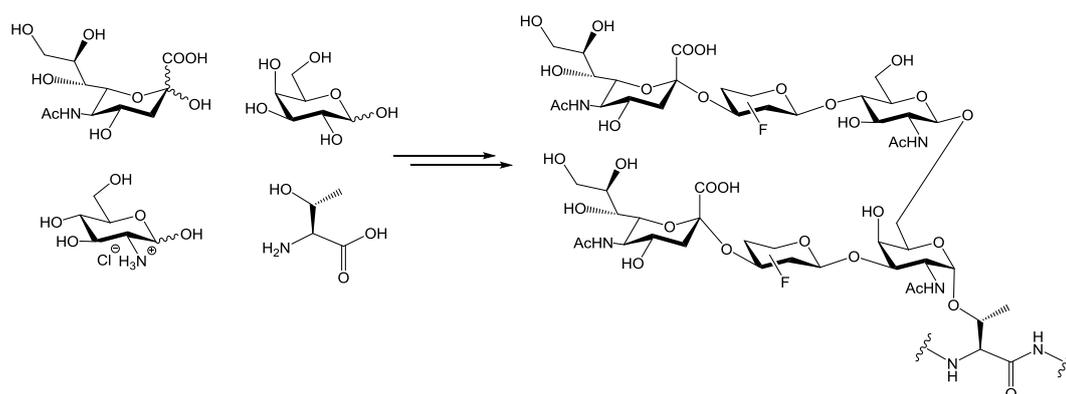
Schmidt-Glycosylierungsreaktionen sowie stereoselektive Sialylierungsreaktionen unter Ausnutzung des *Nitrileffekts* genutzt. Ein weiterer Meilenstein war die regioselektive Glycosylierung der beiden Trisaccharid-Bausteine zu den geschützten Hexasaccharid-Threonin-Konjugaten, die damit für den Einbau in die *N*-terminale Partialsequenz des Sialoglycoproteins Sialophorin zur Verfügung stehen. Zudem wurden fluorierte sialylierte Trisaccharid-Threonin-Konjugate in die *tandem repeat*-Sequenz des epithelialen Mucins MUC1 eingebaut, die als potentielle Kandidaten neuer Antitumorvakzine eingesetzt werden können.

ABSTRACT

The presence of carbohydrates in biological systems is of great importance for different kinds of cellular cycles, like cell-to-cell recognition, the regulation of protein activity or as ligands in cell adhesion.^[1] For instance, various mucin-type *O*-glycans play important roles in immunological processes crucial to many health issues, e.g. carcinogenesis, autoimmune and infectious diseases.^[2] In particular, many types of mucin-type glycans carrying functional oligosaccharide branches with sialic acid residues such as glycophorin, leukosialin (CD 43 or sialophorin), sialyl-Le^x and sialyl-Le^a which are ligands for cell-cell interaction events, play essential roles in inflammatory processes, T-cell development and cancer metastasis.

Recently, innovative approaches for cancer immunotherapy based on the fundamentals of aberrant glycosylation patterns of glycoproteins and glycolipids on the surface of cancer cells were accomplished, that allow for the syntheses of various carbohydrate-based cancer vaccines.^[3]

In this context, the following work deals with the synthesis of sialophorin epitopes (CD 43), a major *O*-glycan-containing sialoglycoprotein which is expressed widely in various leukocytes and associated with a number of diseases like rheumatoid arthritis, leukemia, the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), and acquired immune deficiency syndrome (AIDS).^[4-7] The assembly of these complex hexasaccharide-bearing glycoconjugates has been achieved starting from commercially available starting materials (Scheme 1).



Scheme 1: Synthesis of the mucin-type *O*-glycan sialophorin starting from commercially available starting materials.

More precisely, the research project focuses on the development of a biomimetic synthesis for the assembly of sialophorin-derived SPPS building blocks, by employing a compatible protection group pattern to a series of fluorinated sialophorin derivatives with different fluorinated D-galactose moieties in both trisaccharide units. Particularly challenging is the biosynthetic connection of the simple monosaccharide building blocks starting with the assembly of different fluorinated D-galactose derivatives, the glucosamine and sialic acid building blocks as well as the regio- and stereoselective chemical linkage to more complex di- and trisaccharide compounds. For this purpose, well-known glycosylation reactions, according to *Königs-Knorr*, *Schmidt* and the stereoselective “solvent-assisted” sialylation (*nitrile effect*) were employed, providing the desired products for subsequent conversion to trichloroacetimidate donors. A further milestone was the regioselective glycosylation of both trisaccharide building blocks to the protected hexasaccharide. The final step in the syntheses of hexasaccharic sialophorin epitope should be its incorporation into the *N*-terminal peptide sequence of the sialoglycoprotein sialophorin. Furthermore, the syntheses of fluorinated sialylated tri-

saccharide threonine conjugates and their incorporations into the *tandem repeat* units of epithelial mucin MUC1 were accomplished, thus representing novel potential building blocks for the development of alternative carbohydrate-based anti-tumor vaccines.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder für die interessante Themenstellung und die Betreuung dieser Arbeit, die guten Arbeitsbedingungen und die herzliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis bedanken. Insbesondere danke ich ihr für die Freiheiten in der Bearbeitung der komplexen Themenstellung und ihre immer währende Ansprechbarkeit zu auftretenden Fragen der Chemie.

Prof. Dr. Thomas Carell möchte ich dafür danken, dass er sich bereit erklärt hat die Zweitkorrektur meiner Doktorarbeit zu übernehmen. Ebenso möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern der Promotionskommission für Ihre Teilnahme an meiner Prüfung bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises Hoffmann-Röder aussprechen, aus dessen guter und produktiver Arbeitsatmosphäre mehr als nur Kollegen hervorgegangen sind. Ebenso möchte ich mich bei allen aktuellen sowie ehemaligen Mitgliedern des „Großarbeitskreises“ Opatz/Kunz/Hoffmann-Röder in Mainz für die tolle Zeit während meiner Diplomarbeit bedanken.

Ich möchte mich weiterhin bei Tanja Lüdtker, Thomas Wloka, Julia Bek, Ilya Jourjine und Frederik Broszeit für ihren engagierten Beitrag im Rahmen von Forschungspraktika und Abschlussarbeiten bedanken. Sie alle haben einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Gute Arbeit.

Den Analytikabteilungen der Ludwig-Maximilians-Universität um Dr. Stephenson und Dr. Spahl danke ich für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren sowie die Messung von Massenspektren.

Ebenso möchte ich Amrei Deutsch, Andreas Baumann und Maximilian Reindl für die Durchsicht dieser Arbeit danken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, die mich während meiner gesamten Studienzzeit, über die Diplomarbeit und die Promotion hinweg, stets unterstützt hat und so einen wichtigen Teil zum Gelingen meines Studiums in dieser Form geleistet hat.

Mein größter Dank richtet sich aber an meine Freundin Svenja Gärtner, die mich in allen Lebenslagen und turbulenten Zeiten unterstützt hat und mir stets viel Geduld entgegengebracht hat. Vielen Dank!

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	spezifischer Drehwert
Å	Angström
Abb.	Abbildung(en)
absol.	absolut
Ac	Acetyl
Ala	L-Alanin
Arg	L-Arginin
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
äq	äquatorial
Äquiv.	Äquivalent(e)
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
ax	axial
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
bspw.	beispielsweise
Bzn	Benzyliden
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
°Hex	Cyclohexan
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
δ	chemische Verschiebung
Da	Dalton
DAST	(Diethylamino)schwefeltrifluorid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
dest.	destilliert
DIPEA	<i>N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOAc	Essigsäureethylester
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
Et	Ethyl
Fmoc	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl
g	Gramm
Gal	D-Galactose

GalN	D-Galactosamin
ges.	gesättigt
Gew.-%	Gewichtsprozent
GlcN	D-Glucosamin
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutaminsäure
Gly	Glycin
Grad.	Gradient
h	Stunden
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
His	L-Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HR-ESI	<i>High Resolution Electrospray Ionisation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
Ile	L-Isoleucin
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
i. Vak.	im Vakuum
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kat.	Katalysator
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
Leu	L-Leucin
Lit.	Literaturangabe
Lys	L-Lysin
<i>m</i>	meta
M	Molar
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mol	Mol
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MS	Molsieb, Massenspektrometrie
MsCl	Methansulfonyl-/Mesylchlorid
MUC	Mucin
NeuNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
<i>o</i>	ortho
OTf	Triflat, Trifluormethansulfonat
<i>p</i>	para
p.a.	<i>pro analysi</i>
Ph	Phenyl
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
ppm	<i>parts per million</i>
Pro	L-Prolin
quant.	quantitativ
R_f	Retentionsfaktor
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
S.	Seite
Smp.	Schmelzpunkt
Ser	L-Serin
Selectfluor [®]	1-Chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane-bis(tetrafluoroborate)
SG	Schutzgruppe
Si	Silyl
Sia	Sialinsäure/ <i>N</i> -Acetyl-D-neuraminsäure
Su	Succinimidyl
T	Temperatur
<i>tert</i>	tertiär
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr	L-Threonin
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
Troc	2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl
Trt	Trityl
Tyr	L-Tyrosin

<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett
Val	L-Valin
vgl.	vergleiche
Xan	Xanthogenat
Xtal-Fluor-E [®]	(Diethylamino)difluorosulfoniumtetrafluoroborat
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1. 1: Das humane Immunsystem in schematischer Darstellung nach <i>Morelli et al. 2011</i>	2
Abb. 1. 2: Core-Strukturen der mucinartigen <i>O</i> -Glycane.	4
Abb. 1. 3: Schematische Biosynthese von mucinartigen <i>O</i> -Glycoproteinen im <i>Golgi</i> -Apparat nach <i>Hang et al. 2005</i>	4
Abb. 1. 4: Tumorassoziierte <i>O</i> -Glycosylierung des Mucins MUC1 in Anlehnung an <i>Taylor-Papadimitriou und Epenetos 1994</i>	6
Abb. 1. 5: Die Reihe der tumorassoziierten sialylierten Antigene des Mucins MUC1.....	8
Abb. 1. 6: Die Tetrasaccharide Sialyl-Lewis ^x und Sialyl-Lewis ^a	8
Abb. 1. 7: Die Ganglioside GD2, GD3, GM2 und Fucosyl-GM1 als Vertreter der Glycosphingolipide..	9
Abb. 1. 8: Exprimierte Glycoformen des Sialophorins und des Glycophorins... ..	10
Abb. 1. 9: Die Totalsynthese eines SLe ^x -enthaltenen Gangliosids nach <i>Hasegawa et al.</i>	15
Abb. 1. 10: Die Synthese von Sialyl-Lewis ^x nach <i>Nicolaou et al.</i>	15
Abb. 1. 11: Die Synthese von Sialyl-Lewis ^x nach <i>Danishefsky et al.</i>	16
Abb. 1. 12: Die Synthese der Sialyl-Lewis ^x -Derivate nach <i>Kunz et al.</i>	17
Abb. 1. 13: Chemoenzymatische Sialyl-Lewis ^x -Mimetika nach <i>Opatz et al.</i>	18
Abb. 1. 14: Die Synthese von Sialophorin nach <i>Singh et al.</i>	19
Abb. 1. 15: Synthetische Mehrkomponentenvakzine mit multivalenter Präsentation.	20
Abb. 1. 16: Multivalentes Neoglycopeptid nach <i>Brimble et al.</i>	21
Abb. 1. 17: Sialylierte Glycokonjugatvakzine nach <i>Sahabuddin et al.</i> und <i>Wu et al.</i>	22
Abb. 1. 18: Übersicht über strukturell modifizierte Kohlenhydratmimetika.	22
Abb. 1. 19: Fluorierte MUC1-Glycopeptidvakzine nach <i>Hoffmann-Röder et al.</i>	23
Abb. 1. 20: Fluorierte (2,6)-ST-MUC1-Glycopeptidvakzine nach <i>Hoffmann-Röder et al.</i>	23
Abb. 1. 21: Übersicht über den Einsatz fluorierter Kohlenhydratmimetika.....	24
Abb. 2. 1: Die zu synthetisierenden Oligosaccharid-Threonin-Konjugate mit Fluorierung strategischer Positionen.	25
Abb. 2. 2: Retrosynthese der fluorierten Glycosylaminosäuren.....	26
Abb. 2. 3: Schematischer Aufbau eines fluorierten vollsynthetischen Vakzins.....	27
Abb. 3. 1: Nucleophile Fluorierungsmittel DAST [®] , Deoxofluor [™] und XtalFluor-E [®]	39
Abb. 3. 2: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des Trisaccharid-Bausteins 90	54
Abb. 3. 3: Der Orthoester 118 als „Nebenprodukt“ der Galactosylierung.	62
Abb. 3. 4: Der fluorierte (2,3)-Sialyl-Trisaccharid-Akzeptor 144	72
Abb. 3. 5: Das Hexasaccharid-Threonin-Konjugat 146 als Konkurrenzprodukt der Glycosylierung.....	74
Abb. 3. 6: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum vom Hexasaccharid 145	75
Abb. 3. 7: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum vom Hexasaccharid 146	75
Abb. 3. 8: Sekundäre Schutzgruppen der Fmoc-geschützten Aminosäuren in der Festphasensynthese.	80

Abb. 3. 9: Übersicht über verwendete Kupplungsreagenzien sowie die zugehörigen Additive.....81

Abb. 4. 1: Die synthetisierten fluorierten Oligosaccharidbausteine **130**, **132**, **134** und **148**.....90

SCHEMATAVERZEICHNIS

Schema 3. 1: Die Retrosynthese der Oligosaccharid-Threonin-Konjugate und der fluorierten Analoga.	30
Schema 3. 2: Die Synthese des Glucosamin-Bausteins 9	33
Schema 3. 3: Die regioselektive Öffnung des Benzylidenacetal geschützten Glucosamin-Bausteins 9	34
Schema 3. 4: Der Mechanismus der regioselektiven Benzylidenacetalöffnung unter Bildung der primären bzw. sekundären Benzylether.	35
Schema 3. 5: Die Synthese des modifizierten Glucosamin-Bausteins 11	35
Schema 3. 6: Die Synthese des natürlichen Galactose-Bausteins 17	36
Schema 3. 7: Die Synthese des an der 2-Position fluorierten benzyl-geschützten Galactose-Bausteins 21 . ..	37
Schema 3. 8: Der Mechanismus der elektrophilen Fluorierung mit Selectfluor [®] in Anlehnung an <i>Vincent et al.</i> 1999	37
Schema 3. 9: Die Synthese des an der 2-Position fluorierten acetyl-geschützten Galactose-Bausteins 25	38
Schema 3. 10: Die Synthese des an der 6-Position fluorierten acetyl-geschützten Galactose-Bausteins 29 . .	38
Schema 3. 11: Der Mechanismus der nucleophilen Fluorierung mit DAST [®]	39
Schema 3. 12: Die Synthese der 2,6-difluorierten Galactose-Bausteine 34 und 37	40
Schema 3. 13: Die Synthese der 6,6-difluorierten Galactose-Bausteine 41 und 43	41
Schema 3. 14: Die Synthese des Neuraminsäure-Bausteins 48	42
Schema 3. 15: Die Synthese des modifizierten Neuraminsäure-Bausteins 56	43
Schema 3. 16: Versuch der Fluorierung an der 9-Position unter Verwendung von DAST bzw. TBAF.	44
Schema 3. 17: Synthese des Phasentransferkatalysators IPrCuOTf.	44
Schema 3. 18: Versuch der Fluorierung unter Verwendung von IPrCuOTf und Kaliumfluorid.	45
Schema 3. 19: Angestrebte difluorierte Neuraminsäure-Bausteine 61 und 64	46
Schema 3. 20: Die Synthese des natürlichen Disaccharid-Bausteins 68	47
Schema 3. 21: Die Galactosylierungen der fluorierten Disaccharid-Bausteine 69 , 70 , 71 und 72	48
Schema 3. 22: Schematische Darstellung des Nitrileffekts bei der Glycosylierung in 2-Position fluorierter Galactosyldonoren.	48
Schema 3. 23: Die Zemplén-Verseifung zur Bildung der fluorierten Disaccharide 73 – 76	49
Schema 3. 24: Die Galactosylierungen der modifizierten Disaccharid-Bausteine 77 und 78	50
Schema 3. 25: Darstellung der modifizierten Disaccharid-Bausteine 83 und 84	50
Schema 3. 26: Der Nitrileffekt bei Sialylierungsreaktionen mit resultierender Stereoselektivität und Bildung des Glycals der Neuraminsäure 49 als Nebenreaktion.	52
Schema 3. 27: Die Synthese des natürlichen Sialyl-Trisaccharid-Bausteins 91	53
Schema 3. 28: Die Synthese des natürlichen Sialyl-Trisaccharid-Donors 93	55
Schema 3. 29: Die Synthese der Sialyl-Trisaccharid-Bausteine 96 – 99	56
Schema 3. 30: Die Synthese des fluorierten Sialyl-Trisaccharid-Donors 103	57
Schema 3. 31: Die Synthese des orthogonal geschützten Glycosylakzeptors Fmoc-Thr- <i>Or</i> Bu 104	58
Schema 3. 32: Die Synthese des Galactals 18	59
Schema 3. 33: Die Synthesen der Galactosylhalogenide 110 und 111	59
Schema 3. 34: Der Mechanismus der Azidonitratisierung nach <i>Lemieux</i>	60

Schema 3. 35: Die Synthese des Galactosamin-Threonin-Konjugats 112 .	60
Schema 3. 36: Die Synthese des Galactosamin-Threonin-Konjugats 115 .	61
Schema 3. 37: Die Synthese des natürlichen Disaccharid-Threonin-Konjugats 117 .	62
Schema 3. 38: Die Synthese des einfach-fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats 119 .	63
Schema 3. 39: Schutzgruppenmanipulation zur Synthese des fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats 122 für die Festphasenglycopeptidsynthese.	64
Schema 3. 40: Die Synthese des 2,6-difluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats 125 .	65
Schema 3. 41: Die Synthese der difluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugate 127 und 128 .	65
Schema 3. 42: Synthese des einfach-fluorierten sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats 128 .	67
Schema 3. 43: Synthese des zweifach-fluorierten sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats 132 .	68
Schema 3. 44: Synthese des zweifach-fluorierten sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats 134 .	69
Schema 3. 45: Synthese des natürlichen (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats 136 .	69
Schema 3. 46: Versuch der regioselektiven Acetalöffnung des (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats 137 mit Dichlorphenylboran und Triethylsilan.	70
Schema 3. 47: Alternative Route zur Darstellung des sialylierten Glycosylakzeptors 140 .	71
Schema 3. 48: Die Synthese des difluorierten (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats 143 .	71
Schema 3. 49: Die Synthese des fluorierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugats 145 .	73
Schema 3. 50: Die Synthese des vollständig blockierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugats 148 .	76
Schema 3. 51: Die Synthese der fluorierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugate 149 und 150 .	76
Schema 3. 52: Alternative Darstellung der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate 149 und 150 unter Bildung von 151 .	77
Schema 3. 53: Die Synthese des natürlichen Hexasaccharid-Threonin-Konjugats 152 .	78
Schema 3. 54: Das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie.	79
Schema 3. 55: Der Mechanismus der Peptidkupplung unter der Verwendung von HBTU und HOBT.	82
Schema 3. 56: Der Mechanismus der Peptidkupplung unter der Verwendung von HATU und HOAt.	83
Schema 3. 57: Die Synthese des Triethylenglycol-Spacers 159 .	84
Schema 3. 58: Synthese des modifizierten Triethylenglycol-Spacer 160 .	85
Schema 3. 59: Festphasenglycopeptidsynthese der fluorierten MUC1-Glycopeptide 161 , 162 und 163 .	86
Schema 3. 60: Synthese des Quadratsäure-funktionalisierten Glycopeptids 166 .	87
Schema 4. 1: Die Synthese des einfach-fluorierten Galactosyldonors 21 .	90
Schema 4. 2: Die Synthesen der zweifach-fluorierten Galactosyldonoren 37 und 41 .	90
Schema 4. 3: Die Synthesen der sialylierten Festphasenbausteine 130 , 132 und 134 .	91
Schema 4. 4: Die Synthese des zentralen Glucosamin-Bausteins 9 .	91
Schema 4. 5: Die Synthese des natürlichen Galactosyldonors 17 .	92
Schema 4. 6: Die Synthesen der einfach-fluorierten Trichloracetimidate 25 und 29 .	92
Schema 4. 7: Die Synthesen der zweifach-fluorierten Galactosyldonoren 34 und 43 .	93
Schema 4. 8: Die Synthesen der Disaccharide 68 , 73 – 76 .	93
Schema 4. 9: Die Synthesen der sialylierten Trisaccharide 91 , 98 – 101 .	94

Schema 4. 10: Die Darstellung der Trichloracetimide 93 und 103	94
Schema 4. 11: Die Synthesen der Trisaccharid-Threonin-Akzeptoren 138 und 143	95
Schema 4. 12: Die Synthesen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate 145, 149, 150 und 152	95
Schema 4. 13: Die Synthese des Glycosylaminosäure-Bausteins 148	96
Schema 4. 14: Die Synthesen der Glycopeptide 161, 162 und 163	97
Schema 4. 15: Sialyliertes 6,6-F ₂ -MUC1-Glycokonjugat 166 für den Aufbau von Vakzinen.	98

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Signaltransduktion – Grundlagen der Immuntherapie	1
1.2	Mucinartige Glycoproteine	3
1.3	Kohlenhydratepitope mit sialylierten Partialstrukturen	7
1.4	Mucine in Signaltransduktionsprozessen und deren Relevanz für die Immuntherapie	12
1.5	Synthesen zum Aufbau sialylierter Kohlenhydrate und davon abgeleitete Struktur motive	14
1.6	Kohlenhydratmimetika für den Einsatz in Vakzinen	20
2	ZIELSETZUNG	25
3	ALLGEMEINER TEIL	29
3.1	Die Synthesestrategien zum Aufbau der Oligosaccharid-Threonin-Konjugate	29
3.1.1	Die konvergente Synthesestrategie zum Aufbau der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate des epithelialen MUC1	29
3.1.2	Die Synthesestrategie zum Aufbau der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate und der fluorierten Analoga des Sialophorins	31
3.2	Die Synthesen der Monosaccharid-Bausteine	33
3.2.1	Synthese der Glucosamin-Bausteine	33
3.2.2	Synthese des Galactose-Bausteins und der fluorierten Analoga	36
3.2.3	Synthese der Neuraminsäure-Bausteine	42
3.3	Die Synthesen der Disaccharid-Bausteine	47
3.3.1	Synthese des natürlichen Lactosamins	47
3.3.2	Synthese der fluorierten Lactosamin-Analoga	48
3.4	Die Synthesen der Trisaccharid-Bausteine	51
3.4.1	Synthese des natürlichen Bausteins	51
3.4.2	Synthese der fluorierten Bausteine	56
3.5	Die Synthesen der Saccharid-Threonin-Konjugate	58
3.5.1	Synthese des Galactosamin-Bausteins (T _N -Antigen)	58
3.5.2	Synthese der Disaccharid-Threonin-Konjugate	62
3.5.3	Synthese der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate	67
3.6	Die Synthesen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate	73
3.7	Synthese der Glycopeptidantigene mit fluorierten Kohlenhydrat-Epitopen	79
3.7.1	Grundlagen der Peptidsynthese und das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasensynthese	79
3.7.2	Synthese der Triethylenglycol-Spacer	84
3.7.3	Festphasensynthese der Glycopeptide des epithelialen Mucins MUC1	85
4	ZUSAMMENFASSUNG	89
5	EXPERIMENTELLER TEIL	99
5.1	Messgeräte und allgemeine Arbeitsweisen	99
5.2	Die Synthesen der Monosaccharid-Bausteine	103
5.2.1	Synthese der Glucosamin-Bausteine	103
5.2.2	Synthese des Galactose-Bausteins und der fluorierten Analoga	112
5.2.3	Synthese der Neuraminsäure-Bausteine	137
5.3	Die Synthesen der Disaccharid-Bausteine	149
5.3.1	Synthese des natürlichen Lactosamins	149
5.3.2	Synthese der fluorierten Lactosamin-Analoga	151

5.4	Die Synthesen der Trisaccharid-Bausteine	164
5.4.1	Synthese des natürlichen Bausteins	164
5.4.2	Synthese der fluorierten Bausteine	170
5.5	Die Synthesen der Saccharid-Threonin-Konjugate	183
5.5.1	Synthese des Galactosamin-Bausteins (T _N -Antigen).....	183
5.5.2	Synthese der Disaccharid-Threonin-Konjugate	195
5.5.3	Synthese der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate	214
5.6	Die Synthesen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate.....	230
5.7	Die Synthesen der Glycokonjugate des epithelialen Mucin MUC1	241
5.7.1	Das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasenpeptidsynthese	241
5.7.2	Synthese der Triethylenglycol-Spacer	242
5.7.3	Synthese der Glycopeptide mit einer Partiaalsequenz aus der <i>tandem repeat</i> -Einheit des MUC1	248
6	LITERATUR	257
7	ANHANG	I
7.1	NMR-Spektren	I
7.2	Übersicht über erstmalig synthetisierte Verbindungen	XLII
7.3	Alternative Synthesevorschläge.....	LIII

THEORETISCHER TEIL

1 EINLEITUNG

1.1 Signaltransduktion – Grundlagen der Immuntherapie

Signaltransduktionsprozesse sind von fundamentaler Bedeutung für eine Vielzahl biologischer Abläufe und stellen zugleich einen essentiellen Bestandteil lebensnotwendiger zellulärer Kommunikationswege dar. So bilden diese unter anderem die Grundlage für die Funktionsweise des Immunsystems, die Freisetzung von Hormonen oder auch die embryonale Entwicklung und spielen eine zentrale Rolle bei der Koordination physiologischer Prozesse.

Das menschliche Immunsystem stellt das wertvollste Instrument höherer Organismen zum Schutz vor körperfremden Substanzen wie z.B. Pathogenen und anderen Umwelteinflüssen dar. Hierbei steht dem Organismus zur Bekämpfung von Krankheitserregern neben dem evolutionär angeborenen Immunsystem auch eine adaptierte Immunantwort zur Verfügung, welche sich über komplexe Modulationsmechanismen über Jahre hinweg stufenweise aufbaut und somit ein spezifisches, körpereigenes und unverwechselbares Gedächtnis ermöglicht. So werden beispielsweise eingedrungene Infektionserreger den phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems wie Granulocyten und Makrophagen („Fresszellen“) präsentiert, was zur Auslösung einer ersten Immunreaktion führt.

Die Funktionsweise des menschlichen Immunsystems lässt sich wie folgt beschreiben und kann in der hier angegebenen Literatur vertieft werden.^[8-11] Spezifische Pathogenstrukturen der Erreger (*PAMP, pathogene-associated molecular pattern*) werden durch eine Reihe von Rezeptoren (*PRR, pattern recognition receptor*) dendritischer Zellen (DC) bzw. Monocyten und Makrophagen erkannt. Infolge einer Freisetzung löslicher Botenstoffe kommt es zur Aktivierung dieser Zellen, wodurch eine Rekrutierung von Lymphocyten herbeigeführt wird (Abb. 1.1). Diese zum adaptiven Immunsystem zählenden Lymphocyten lassen sich wiederum in zwei spezifische Klassen aufgrund ihres Prägungsortes einteilen. Zum einen handelt es sich hierbei um T-Lymphocyten, welche eine Reifung im Thymus erfahren, und zum anderen um die Gruppe der B-Lymphocyten. Diese reifen im Knochenmark heran und sind durch die Sezernierung spezifischer Antikörper charakterisiert, welche gegen entsprechende Antigene gerichtet sind.

Eine T_H1 -(T-Helferzellen)-zellvermittelte Makrophagenaktivierung löst hierbei unter Ausschüttung von Interferon- γ ($IFN-\gamma$) die Induktion weiterer Effektormechanismen, einschließlich der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies aus, so dass letztendlich die Zerstörung des Infektionserregers erreicht wird. Im Gegensatz hierzu sind für die T_H2 -zellvermittelte B-Lymphocytenaktivierung zwei essentielle Schritte notwendig.

Zunächst kommt es durch membranständige Immunglobuline vom Typ der IgM- bzw. IgG-Antikörper (B-Zellrezeptoren, BCR) zur Antigenerkennung. Nach Endocytose und proteolytischem Abbau (Prozessierung) können entsprechende Proteinfragmente über MHC-II-Komplexe (*major histocompatibility complex*) an der Oberfläche der B-Zellen präsentiert werden. Diese MHC-II-Komplexe können nun von membranständigen T-Zellrezeptoren (TCR) erkannt werden.

Über weitere costimulierende Signale, so z. B. die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zwischen dem CD40-Rezeptor der antigenpräsentierenden Zelle mit dem CD40-Liganden (CD 154) der T-Helferzelle oder die des B7-Rezeptor der B-Zelle mit dem CD28-Liganden der T-Zelle, kommt es in der Folge zur Ausschüttung

einer Reihe von Cytokinen, vor allem der Interleukine IL-4, IL-5, IL-10 sowie der beiden Tumornekrosefaktoren TNF- α und TNF- β . Diese Cytokine lösen eine Proliferation unter Differenzierung der B-Lymphocyten aus und liefern die notwendigen Signale für eine spätere Antikörperproduktion. Letztere sind in der Lage, die jeweiligen Antigene auf der Oberfläche der Erreger selektiv zu erkennen, eine Bindung mit diesen einzugehen, und somit eine Phagozytose durch Makrophagen einzuleiten.

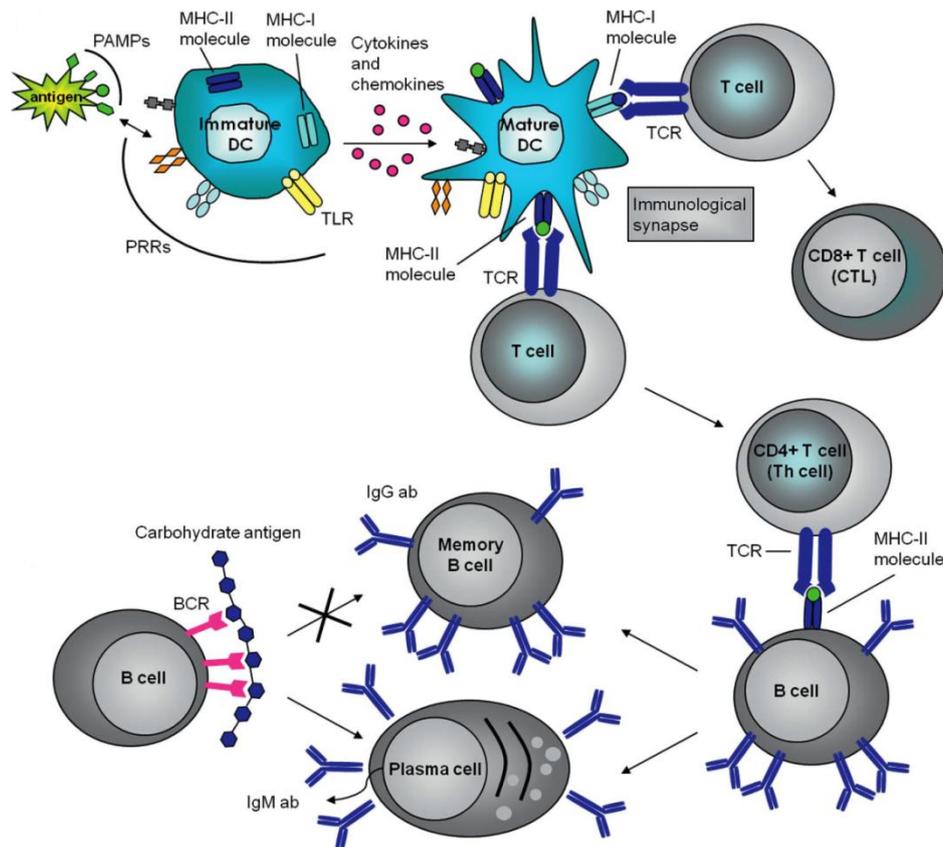


Abb. 1. 1: Das humane Immunsystem in schematischer Darstellung nach Morelli et al. 2011.^[12]

Über weitere Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen kommt es neben der Proliferation der B-Zellen auch zu einer Differenzierung in zirkulierende Gedächtniszellen und Plasmazellen, welche bei einem erneuten Antigenkontakt eine schnelle Immunreaktion sicherstellen. In einer Vielzahl von Immunreaktionen lösen die freigesetzten Antikörper bzw. T-Lymphocyten nachgeschaltete Effektormechanismen in Gang, die infolge der Freisetzung von Interleukinen eine Opsonisierung von Pathogenen einleiten und eine Aktivierung des Komplementsystems nach sich ziehen. Hierbei kommt es durch eine Reihe von Komplementfaktoren zur Auslösung von Entzündungsreaktionen bzw. der Rekrutierung weiterer Immunzellen, wie den Phagozyten. Der zweiten Klasse von T-Zellen des humoralen Immunsystems gehören die CD8⁺-positiven (*cluster of differentiation antigen*) cytotoxischen T-Zellen an. Für diese Effektorzellen ergibt sich ein vergleichbarer Aktivierungsmechanismus. Nach Antigenerkennung über MHC-I-präsentierte Proteinf фрагmente, kommt es an der Oberfläche von T-Zellrezeptoren unter Einbeziehung vergleichbarer costimulierender Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen (B7-Rezeptor der B-Lymphocyten mit dem CD28-Liganden der T-Zelle) zur Produktion apoptotischer Faktoren. Diese äußern sich in einer Perforation der Zelle oder über die Induktion lysierender Faktoren, wodurch die Bekämpfung der Pathogene ermöglicht wird.

Im Gegensatz zu diesen T-Zell-abhängigen Mechanismen von Immunreaktionen werden Kohlenhydratantigene lediglich über ihre Präsentation durch B-Zellrezeptoren (BCR) erkannt. Dadurch induzieren sie eine temporäre Immunantwort und sind nicht in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis in Form entsprechender B-Zellen aufzubauen.

Die grundlegenden Kenntnisse der Funktionsweise zellulärer Immunreaktionen und deren nachgeschalteten Effektormechanismen bieten die Möglichkeit zur Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung zahlreicher Krankheitsbilder. So werden hierfür insbesondere mucinartige Glycopeptide untersucht, da diese als polymorphe Zelloberflächenproteine in einer Vielzahl zellulärer Wechselwirkungsmechanismen und Zell-Zell-Interaktionen involviert sind und damit für die Entwicklung einer aktiven Immuntherapie von herausragender Bedeutung sind.

1.2 Mucinartige Glycoproteine

Die Familie der Mucine als hochgradig *O*-glycosylierte, polymorphe Zelloberflächenglycoproteine stellt einen essentiellen Bestandteil epithelialer Schleimhautsekrete dar.^[13] Mucine werden von einer Vielzahl an Geweben auf der apicalen Zelloberfläche des Bronchial- und Verdauungstrakts als protektive Schicht gegenüber der Einwirkung von Enzymen, Säuren sowie Pathogenen exprimiert und üben wichtige Funktionen im Zuge von Zell-Zell-Wechselwirkungen bzw. Signaltransduktions- und Adhäsionsprozessen aus.^[14-15]

Die Reihe der bisher bekannten über 150 mucinartigen Glycoproteine lässt sich hinsichtlich ihrer Funktion in zwei generelle Klassen, die sekretorischen (schleimbildenden) und die membrangebundenen Vertreter unterteilen, wobei das Mucin MUC1^[16] zu letzteren gezählt wird.^[17-18] Während sekretorische Mucine durch die Bildung eines über intermolekulare Disulfidbrücken^[19] verknüpften viskosen Mucinsekrets als Bestandteile der Glycocalyx dem Schutz der Epithelien des Gastrointestinal- sowie des Respirationstrakts dienen, sind die membrangebundenen Vertreter über hydrophobe Domänen an der Zelloberfläche der Epithelzellen verankert. Beiden Gruppen von Mucinen kommen hierdurch – wie bereits zuvor erwähnt – vielfältige Aufgaben in der Signaltransduktion sowie der Zell-Zell-Interaktion zu.^[20-21]

Alle Mucine lassen sich durch einen gemeinsamen Aufbau ihrer Protein-Kernstruktur in Form einer variablen Anzahl repetitiver Sequenzeinheiten, den sogenannten *tandem repeat*-Domänen, kennzeichnen. Obgleich die Zusammensetzung der verschiedenen Aminosäuren für das jeweilige Mucin unterschiedlich und charakteristisch ist, zeichnen sich diese *tandem repeats* (*variable number of tandem repeats*, VNTR)^[22] durch einen hohen Anteil an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin aus.^[23] Die extrazelluläre Domäne des Mucins MUC1 besteht beispielsweise aus den für Mucinen charakteristischen 20-125 repetitiven Wiederholungseinheiten und ist durch eine Sequenz von 20 Aminosäuren (*HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA*) gekennzeichnet, die jeweils fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen pro VNTR umfasst. Durch ihre gewebespezifischen *O*-Glycosylierungsmuster sind mucinartige Glycoproteine weiterhin in Liganden-Rezeptor-Interaktionen involviert.^[24] Zudem weisen sie einen großen Anteil komplexer, strukturell unterschiedlicher oligomerer Kohlenhydratstrukturen auf, welche in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums der jeweiligen Zelle variieren können und auf acht zentralen Kernstrukturen (*Core 1* bis *Core 8*) beruhen (Abb. 1.2).^[25]

Core 1: β Gal-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Core 2: β Gal-(1,3)-[β GlcNAc-(1,6)]- α GalNAc-O-Protein

Core 3: β GlcNAc-(1,3)]- α GalNAc-O-Protein

Core 4: β GlcNAc-(1,3)-[β GlcNAc-(1,6)]- α GalNAc-O-Protein

Core 5: α GalNAc-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Core 6: β GlcNAc-(1,6)- α GalNAc-O-Protein

Core 7: α GalNAc-(1,6)- α GalNAc-O-Protein

Core 8: α Gal-(1,3)- α GalNAc-O-Protein

Abb. 1. 2: Core-Strukturen der mucinartigen O-Glycane.^[25]

Der hohe Anteil an Prolin und die große Anzahl an komplexen Kohlenhydratseitenketten bedingen eine starre, büstenförmige Konformation des MUC1, wodurch dieses weit über die Glycocalyx hinaus in das extrazelluläre Lumen reicht, dort seine protektiven Eigenschaften erfüllt und weiterhin wichtige Funktionen in den durch β -Catenin vermittelten Wechselwirkungen mit dem Cytoskelett ausübt.^[26] Ebenso lassen die potentiellen Phosphorylierungsstellen auf eine wesentliche Beteiligung von Mucinen an Signaltransduktionsmechanismen schließen.^[27] Nach der Transkription und dem Transport durch das endoplasmatische Retikulum (ER) und die verschiedenen Kompartimente des Golgi-Apparats werden die komplexen Kohlenhydratstrukturen von Mucinen aufgebaut (Abb. 1.3)^[14], bevor das Mucin MUC1 in zwei Einheiten gespalten wird.

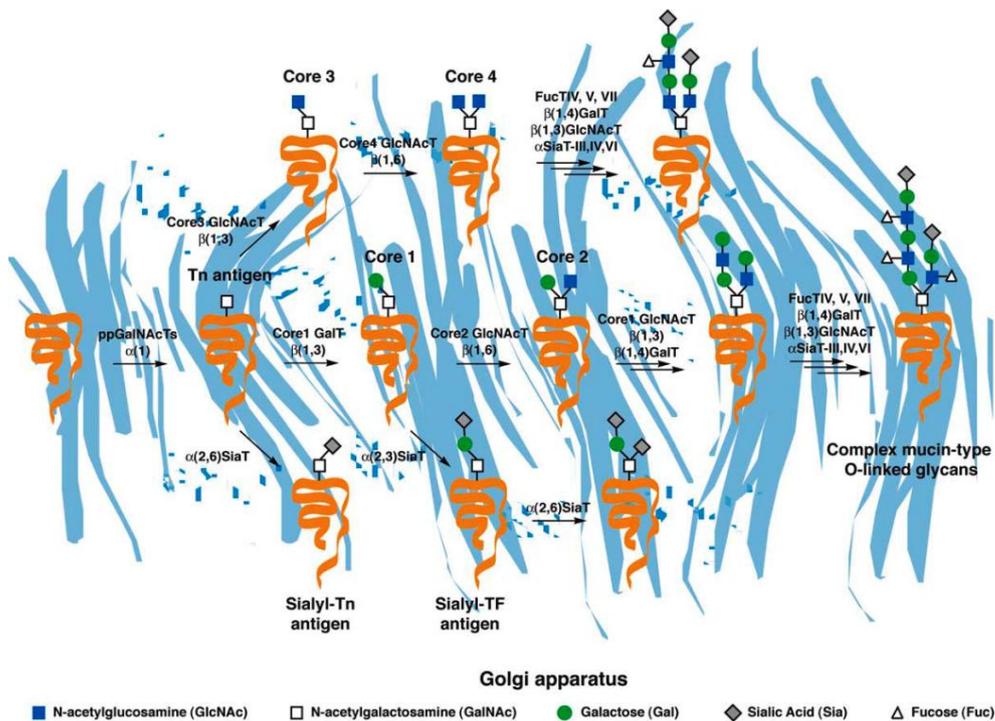
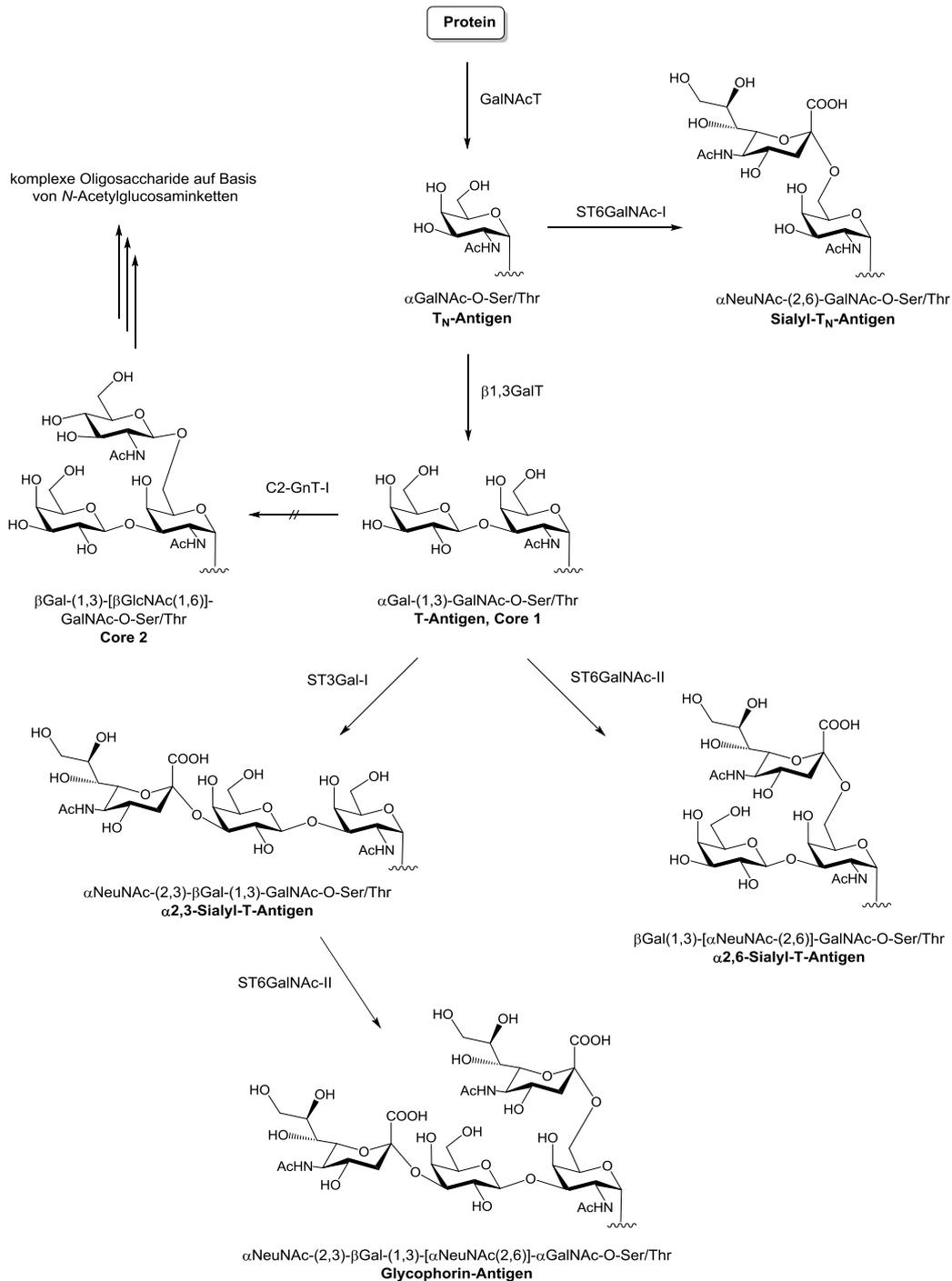


Abb. 1. 3: Schematische Biosynthese von mucinartigen O-Glycoproteinen im Golgi-Apparat nach Hang et al. 2005.^[14]

Diese in Form eines Transmembran-Heterodimers exprimierten Untereinheiten unterscheiden sich in ihrer Größe, wobei das größere der nicht kovalent miteinander verbundenen Fragmente die zuvor bereits erwähnte aus *tandem repeats* aufgebaute extrazelluläre Domäne bildet. Die Glycosylierung an den Hydroxylgruppen von Serin bzw. Threonin wird durch die Übertragung einer *N*-Acetylgalactosamin-Einheit (GalNAc) über eine Polypeptidyl-GalNAc-Transferase initiiert. Die weiterführende β 1,3-Verknüpfung einer Galactoseeinheit resultiert in der Bildung der *Core 1*-Struktur (Abb. 1.4). Die nachfolgende Übertragung von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) führt zum Aufbau der *Core 2*-Struktur, welche in gesunden/normalen Epithelzellen durch weitere Glycosyltransferasen hin zu komplexen Kohlenhydraten umgewandelt werden. Die Elongation der Oligosaccharide erfolgt während des Transports durch die einzelnen Kompartimente des *Golgi*-Apparats unter stetiger Anknüpfung weitere Glucose- bzw. Galactosebausteine. Im *trans*-Golgi erfolgt letztendlich die Terminierung des Kettenwachstums durch enzymatische Sulfatierung an der 3-Position von Galactose bzw. der 6-Hydroxylgruppe von *N*-Acetylglucosamin sowie durch entständige Sialylierung und Fucosylierung.^[28-32]

Der Expressionsstatus des Mucins MUC1 konnte mit einer Reihe verschiedener Krebsarten in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz zu gesunden Zellen zeigen mucinartige Glycoproteine der Tumorzellen charakteristische Veränderungen der einzelnen Glycosylierungsmuster, welche auf eine veränderte Expression von Glycosyl- und Sialyltransferasen zurückzuführen sind. Gleiches gilt auch für die Expression solcher Mucine im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen.^[33-36] Dabei korreliert der Status an verkürzten Kohlenhydratseitenketten vom Typ der ST_N - und T_N -Antigenstrukturen mit einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, so z.B. bei Brust- und Eierstockkrebs und findet im Falle von Brustkrebszelllinien Anwendung als Biomarker.^[37] Interessanterweise zeigen die beiden Enzyme der β 1,3-Galactosyltransferase und der β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase im Vergleich zu den Sialyltransferasen eine verminderte Aktivität, während letztere (α 3-ST- bzw. α 6-ST-Transferase) überexprimiert werden. Dies führt neben den stark verkürzten Glycanstrukturen auch zu einem frühzeitigen Abbruch des Kettenwachstums der komplexen Oligosaccharidstrukturen, wodurch vermehrt *Core 1*-Strukturen beziehungsweise davon abgeleitete Kohlenhydratepitope mit sialylierten Partialstrukturen erhalten werden.



GalNAcT: UDP-*N*-Acetyl- α -D-galactosamin: Polypeptid *N*-Acetylgalactosaminyltransferase

β 1,3GalT: *Core 1* β 1,3-Galactosyltransferase

C2GnT-I: *Core 2* β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase-I

ST6GalNAc-I: CMP-NeuNAc: GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-I

ST6GalNAc-II: CMP-NeuNAc: GalNAc-R α 2,6-Sialyltransferase-II

ST3Gal-I: CMP-NeuNAc: Gal β 1,3-GalNAc-R α 2,3-Sialyltransferase-I

Abb. 1. 4: Tumorassoziierte O-Glycosylierung des Mucins MUC1 in Anlehnung an Taylor-Papadimitriou und Epenetos 1994.^[16]

1.3 Kohlenhydratepitope mit sialylierten Partialstrukturen

Die Vielfältigkeit zellulärer Kommunikationswege im Zuge von Zell-Zell-Wechselwirkungen bzw. Signaltransduktionsprozessen spiegelt sich in einer Vielzahl sialylierter mucinartiger Glycolipide und Oligosaccharide mit zellspezifischen Funktionen wider. In Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums einzelner Zellen und den ihnen zuteilwerdenden Aufgaben können diese zudem im Sialyierungsgrad variieren und daher in einer Vielzahl physiologischer sowie pathophysiologischer Prozesse eine wesentliche Rolle einnehmen.^{[4, 38-}

^{40]} Diese Fülle zellulärer Kommunikation äußert sich in mehr als 50 unterschiedlichen Sialinsäurederivaten, denen allen eine α 2,3- bzw. α 2,6-Verknüpfung an eine Galactose- bzw. eine Galactosamin-Einheit gemein ist.^[41] Solche Struktur motive finden sich auf einer Reihe mucinartiger Glycane wieder, die mit zahlreichen Krankheitsbildern wie rheumatoider Arthritis, myocardialer Ischämie, Sichelzellenanämie und weiteren Immunerkrankungen in Verbindung gebracht werden können.^[42-45] Bedingt durch die negative Ladungsdichte von endständigen Neuraminsäuren üben sialylierte Kohlenhydrate zudem wichtige Aufgaben bei der Vermittlung von Zellkontakten im Zuge der Immunreaktionen aus.^[46] Als herausragende Mitglieder solcher Adhäsionsmoleküle ist die Gruppe der **Selektine** zu nennen, eine Klasse von kohlenhydratbindenden Lektinen,^[47] die aufgrund der hochselektiven Vermittlung von Zellkontakten im Gegensatz zu anderen Glycopeptidrezeptoren ausschließlich auf das vaskuläre System beschränkt sind und Wechselwirkungen zwischen Leukocyten, Endothelien und Thrombocyten vermitteln.

Neben diesen für das Immunsystem wichtigen Glycopeptiden zeichnet sich eine weitere Reihe von mucinartigen *O*-Glycanen mit sialylierten Partialstrukturen durch einen veränderten Expressionsstatus aus, welcher mit abweichenden Glycosylierungsmustern maligner Zellen in Verbindung gebracht werden kann. Die tumorassoziierten Antigene des Sialyl-T_N-Antigens, des (2,3)-ST-Antigens und des (2,6)-ST-Antigens stellen hierbei charakteristische Vertreter der in Kapitel 1.2 beschriebenen mucinartigen Glycoproteine dar und werden vermehrt auf einer Reihe von Tumoren, infolge der veränderten Aktivität verschiedener Glycosyl- und Sialyltransferasen, überexprimiert (Abb. 1.5). Hierbei kann die Expression dieser Kohlenhydratepitope mit einer Vielzahl an Tumorerkrankungen korrelieren und findet sich bspw. bei Brust-, Magen-, Darm-, Prostata-, Ovarial- und Pankreascarcinomen wieder.^[48-50]

Wie bereits im vorherigen Kapitel 1.2 beschrieben kommt es während des Aufbaus der komplexen Oligosaccharidepitope in den Kompartimenten des *Golgi*-Apparats bedingt durch die veränderte Aktivität von Glycosyl- und Sialyltransferasen sowie einer stark verminderten und in einigen Tumorzellen fehlenden Expression^[51] der β -1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase zu einem fast vollständigen Erliegen der Synthese komplexer, auf der *Core* 2-Struktur basierenden Kohlenhydratepitopen und der bereits dargestellten frühzeitigen Terminierung der Glycosylierung (vgl. Abb. 1.4). Diese in Krebszellen auftretenden verkürzten Epitope haben zur Folge, dass Teilsequenzen des Peptidrückgrats des Apomucins freigelegt werden. Hierdurch kann der Zugang zu tumorspezifischen Peptidepitopen wie der immundominanten *PDTRP*-Sequenz ermöglicht werden, der eine Präsentation gegenüber dem Immunsystem und damit eine Erkennung durch monoklonale Antikörper, wie den SM3-Antikörper, erlaubt.^[52]

Im Gegensatz zu gesunden Zellen liegt das Mucin MUC1 in Tumorzellen stark überexprimiert vor und weist zudem ein Expressionsmuster auf, welches nicht mehr auf die apikale Zelloberfläche beschränkt ist. Da hierdurch die Zell-Zell-Adhäsion maßgeblich beeinflusst wird, ist das Mucin MUC1 entscheidend an der Entwicklung, Metastasierung sowie der Ausbreitung von Tumoren beteiligt. Von großer Bedeutung ist hierbei

ein Polarisationsverlust auf der Oberfläche maligner Zellen infolge des hohen Anteils entständiger Neuraminsäuren, wodurch Zell-Matrix-Wechselwirkungen über Integrine^[53] destabilisiert und die durch E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte blockiert werden.^[54] Letzteres kann das Ablösen des Tumors aus einem geschlossenen Zellverband initiieren, was die nachfolgende Metastasierung in das umliegende Gewebe ermöglicht.

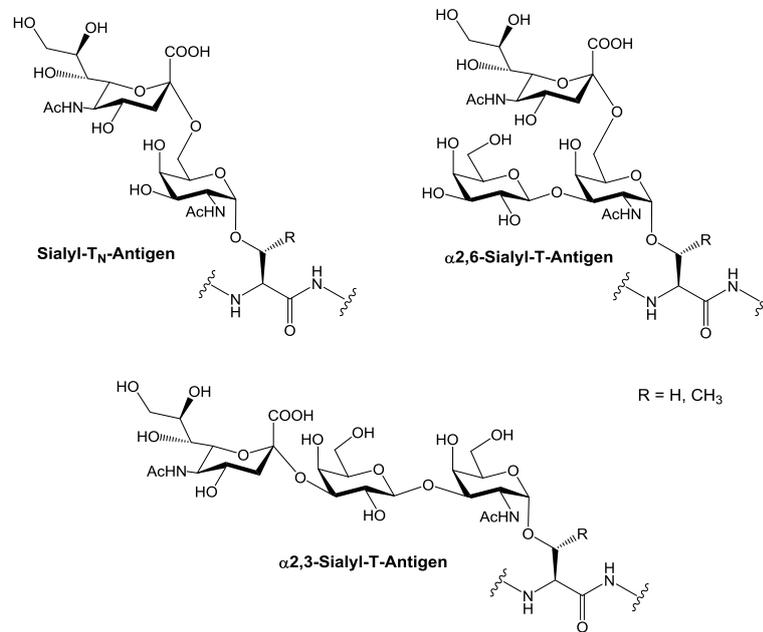


Abb. 1. 5: Die Reihe der tumorassoziierten sialylierten Antigene des Mucins MUC1.

In ähnlicher Weise nehmen in diesem Zusammenhang die beiden Oligosaccharidteilstrukturen des *Sialyl-Lewis^x* (SLe^x)^[47, 55-57] und sein regioisomere Vertreter, das *Sialyl-Lewis^a* (SLe^a)^[58] auf der Basis von *N*-Acetylglucosamin (*Core 2*-Struktur) eine wichtige Rolle für die Vermittlung von Zellkontakten ein (Abb. 1.6). Diese durch Selektine vermittelten Adhäsionsprozesse können hierbei auf die Wechselwirkung dieser Rezeptoren mit unterschiedlichen mucinartigen Kohlenhydratstrukturen, so z.B. mit T_N-Antigen-Epitopen entsprechender Glycopeptide zurückgeführt werden.^[59] Auf die genauen Mechanismen und Funktionen derartiger Selektinliganden soll im Detail nicht weiter eingegangen werden, jedoch sei hier angemerkt, dass es sich bei diesen Tetrasacchariden um essenzielle Struktur motive aus natürlichen hochaffinen Selektinliganden für das membranständige Glycoprotein PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), handelt.^[60-62]

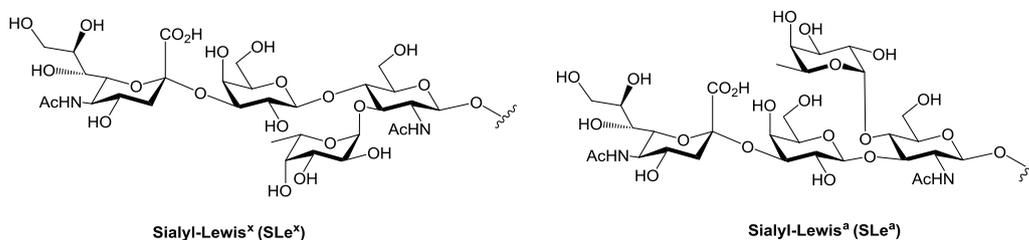


Abb. 1. 6: Die Tetrasaccharide *Sialyl-Lewis^x* und *Sialyl-Lewis^a*.

Die komplexen Wechselwirkungsmechanismen des PSGL-1 mit seinen natürlichen Liganden können zudem über die Sulfatierung von Tyrosinresten verstärkt werden und führen neben der fundamentalen Bedeutung für die Immunabwehr und die Bekämpfung körperfremder Stoffe bei einer übermäßigen Rekrutierung von Leu-

kocyten zu schweren Gewebeschädigungen.^[63-64] Dieser Befund kann daher im Zusammenhang mit chronischen Entzündungsreaktionen wie rheumatoider Arthritis und weiteren Autoimmunerkrankungen gestellt werden.^[65] Ferner konnte gezeigt werden, dass das Potential zur Metastasierung von Krebszellen mit einer verstärkten Expression des PSGL-1 auf der Zelloberfläche von Tumoren korrelieren kann.^[66-67]

Weitere wichtige Vertreter von Kohlenhydratepitopen mit sialylierten Partialstrukturen stellen die **Ganglioside** dar, welche zur Gruppe der Glycosphingolipide gezählt werden. Bei diesen handelt es sich um eine Klasse von Glycolipiden, die als Amphiphile über ein Ceramidrückgrat fest in der Plasmamembran verankert sind und am Aufbau von Zellmembranen sowie der Signaltransduktion, infolge ihrer auf der Zelloberfläche präsentierten Kohlenhydratepitope, beteiligt sind.^[68] Als sialylierte Vertreter dieser Glycosphingolipide sind hier das GD2, GD3, GM2 und Fucosyl-GM1 zu nennen, wobei diese bei Krebserkrankungen ebenfalls in einem veränderten Expressionsstatus vorliegen können, jedoch auch auf gesunden Zellen exprimiert werden (Abb. 1.7).

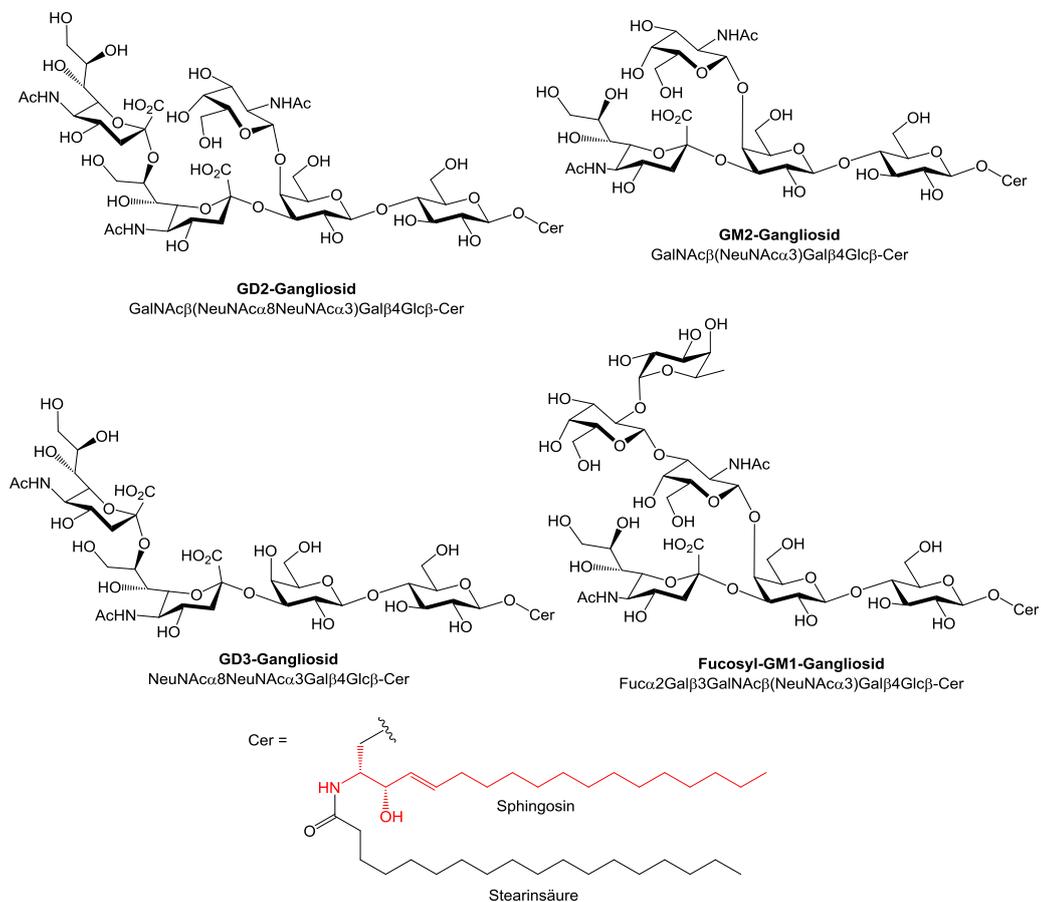


Abb. 1. 7: Die Ganglioside GD2, GD3, GM2 und Fucosyl-GM1 als Vertreter der Glycosphingolipide.

Die Nomenklatur der Ganglioside erfolgt anhand ihres Neuraminsäuregehalts und ihrer spezifischen Eigenschaften in chromatographischen Trennungen. So werden beispielsweise „M“ mono- und „D“ disialylierte Vertreter unterschieden. Ferner sind in diesem Kontext auch trisialylierte Vertreter zu nennen. Ganglioside erfüllen neben Aufgaben im Zusammenhang mit Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen auch essentielle Funktionen hinsichtlich des Zellwachstums, der kontrollierten Apoptose oder der Inhibierung einer Metastasierung.^[2] Aufgrund der Expression auf malignen Zellen eignen sie sich zudem als spezifische Targetstrukturen für die Entwicklung von Antitumorvakzinen. Daneben konnte gezeigt werden, dass Ganglioside

wesentliche regulatorische Funktionen im Zusammenhang mit physiologischen Zellprozessen wie z.B. der Freisetzung des *Epidermal-Growth-Factor* (EGF) als Wachstumsfaktor oder der Regulation von Insulinrezeptoren wahrnehmen.^[69] Zudem sind sie unter pathophysiologischen Bedingungen maßgeblich an der Karzinogenese und Progression von Tumoren beteiligt.^[70] So kommt es durch die Freisetzung von tumorassoziierten Gangliosiden in die direkte Umgebung des Tumors^[71] zu einer Interaktion mit benachbarten Zellen.^[72] *In vitro*-Experimente konnten beispielsweise belegen, dass Ganglioside in zahlreiche Prozesse der Immunantwort eingreifen und z.B. Immunzellen wie T-Helferzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T- sowie B-Lymphocyten in ihrer Funktion stark beeinträchtigen beziehungsweise inhibieren können.^[73-76] Infolgedessen kommt es zu einer Hemmung der Proliferation dieser Immunzellen, was wiederum die Freisetzung von Cytokinen wie den Interleukinen IL-1 β und IL-6 bzw. TNF α bewirkt.^[74] Die genauen immunsuppressiven Mechanismen tumorassoziiertes Ganglioside sind jedoch aufgrund ihrer Komplexität noch nicht vollständig aufgeklärt.

Von essentieller Bedeutung für die Funktionsweise des Immunsystems, insbesondere im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen, sind die beiden sialylierten Kohlenhydratepitope **Sialophorin** und **Glycophorin**, welche auf einer Reihe hämatopoetischer Zellen wie Leukocyten, Makrophagen, Granulocyten oder T-Lymphocyten exprimiert werden (Abb. 1.8).^[77-78]

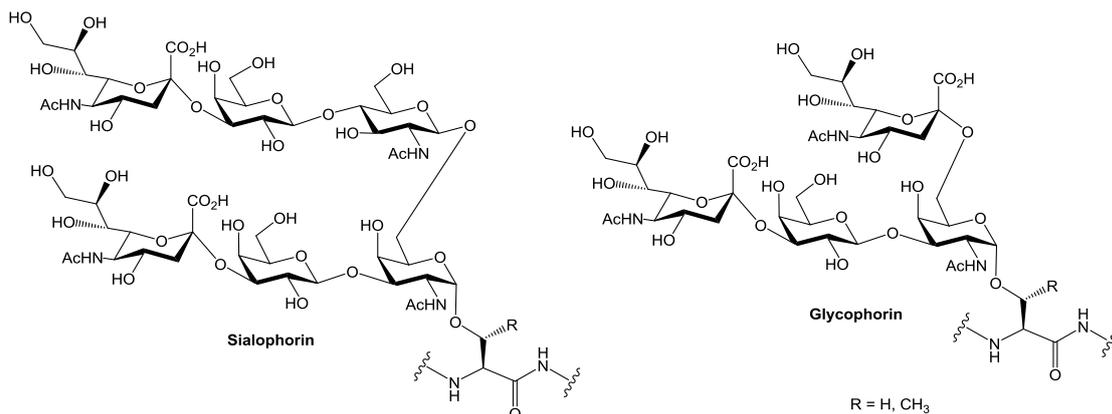


Abb. 1. 8: Exprimierte Glycoformen des Sialophorins und des Glycophorins.

Charakteristische Merkmale dieser als mucinartige *O*-Glycane bezeichneten Oberflächenproteine sind deren Aufbau aus drei unterschiedlichen Domänen, wobei die mit 235 Aminosäuren große extrazelluläre Domäne mit ihren 93 potentiellen Glycosylierungsstellen erneut eine gestreckte, bürstenartige Konformation einnimmt. Die evolutionär konservierte cytoplasmatische Domäne weist zudem eine Vielzahl potentieller Phosphorylierungsstellen^[79-80] auf, welche auf eine Beteiligung dieser Glycopeptide in wichtigen Prozessen der Signaltransduktion schließen lassen.^[81] Sowohl das Tetrasaccharid Glycophorin als auch die Hexasaccharidform des Sialophorins (CD 43 oder auch Leukosialin genannt) werden bei der Regulation der T-Zellaktivierung sowie deren Migration^[82-83] infolge einer Variation der Glycosylierungsmuster auf der Zelloberfläche exprimiert und nehmen hierbei zentrale Aufgaben bei Zell-Zell-Wechselwirkungen sowie adhäsiven bzw. antiadhäsiven Phänomenen ein.^[84-85] Weiterhin zeigen diese beiden Epitope, wie auch andere mucinartige Glycopeptide, ein verändertes Expressionsmuster im Fall von Krebserkrankungen.^[86-87]

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Sialophorin einen wichtigen Hinweis für dessen Beteiligung bei der Entwicklung von Tumoren aufgrund stimulierender Effekte für die Zellproliferation einnimmt.^[88] Zudem führt die Anwesenheit von Sialophorin auf der Oberfläche von T-Lymphocyten zu wichtigen initialen Kontakten, welche die Erkennung und Modulation antigenpräsentierender Zellen verstärken und diese gegenüber Cytokinen wie IFN- γ und IL-4 sensibilisieren.^[89] Ferner wurde beschrieben, dass die Expression des Sialophorins auf der Oberfläche von *Jurkat-Zellen* zu einer Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden führt und in einer Erkennung durch phagozytierende Zellen resultiert.^[90]

Die Aktivierung von T-Lymphocyten wird über die verstärkte Expression bzw. Hemmung zweier zentraler Transferasen reguliert und führt dazu, dass auf unreifen Thymocyten das Hexasaccharid-Epitop Neu5NAc(α 2 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)-[Neu5NAc(α 2 \rightarrow 3)-Gal(β 1 \rightarrow 4)]-GlcNAc(β 1 \rightarrow 6)-GalNAc-Ser/Thr und größere Oligosaccharide exprimiert werden, wohingegen gereifte T-Lymphocyten das Glycophorin-Epitop Neu5NAc(α 2 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 3)-[Neu5NAc(α 2 \rightarrow 6)]-GalNAc-Ser/Thr tragen.^[91] Kommt es infolge einer Immunreaktion zur Aktivierung von T-Lymphocyten, so führt dies wiederum zur Expression des Sialophorin-Epitops. Diese verstärkte Expression des Sialophorins kann mit einer Reihe von Krankheitsbildern wie z.B. dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS),^[6] einer X-chromosomal rezessiven Immuninsuffizienz, AIDS^[44] und Leukämie in Verbindung gebracht werden und tritt bei akuter myeloischer Leukämie zusammen mit weiteren sialylierten Kohlenhydratantigenen (vgl. Kapitel 1.2) auf.

Obwohl die genauen Funktionen von Sialophorin in der Tumorgenese sowie im Zuge von Immunreaktionen aufgrund der komplexen Wechselwirkungsmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, zeigt sich jedoch, dass eine fehlgeleitete Expression dieses mucinartigen Glycopeptids weitreichende zelluläre Folgen im Zusammenhang mit der Regulation von Immunreaktionen, der Signaltransduktion und dem Zellwachstum nach sich zieht. Die große Bedeutung von Kohlenhydratepitopen mit sialylierten Partialstrukturen kann anhand der zuvor besprochenen Beispiele eindrucksvoll belegt werden und zeigt die Notwendigkeit des Verständnisses der grundlegenden Funktionen dieser Oligosaccharide im menschlichen Organismus für die Entwicklung neuer, verbesserter therapeutischer Ansätze weiter auszubauen.

1.4 Mucine in Signaltransduktionsprozessen und deren Relevanz für die Immuntherapie

Mucine mit ihren vielfältigen Aufgaben in zellulären Signaltransduktions- und Adhäsionsprozessen sind unter anderem von fundamentaler Bedeutung für Zell-Zell-Wechselwirkungen und die Funktionsweise des Immunsystems. Pathologische Erscheinungen wie Krebs- und Autoimmunerkrankungen lassen sich bedingt durch Veränderungen der Expressionsmuster wichtiger Enzyme kennzeichnen und führen infolgedessen zu Abweichungen der Glycosylierungsmuster sialylierter Kohlenhydratepitope.

In den letzten Jahrzehnten konnte eine Vielzahl unterschiedlicher tumorspezifischer Antigene identifiziert werden, welche sich durch charakteristische Abweichungen der Glycosylierungsmuster auf der Oberfläche von Tumorzellen kennzeichnen lassen. Neben ihrer Funktion als Biomarker bieten solche Strukturen einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie von Krebserkrankungen. Ebenso können diese zellspezifischen Expressionsmuster von Oligosacchariden für neue Therapieansätze in der Behandlung chronischer Entzündungsreaktionen bzw. Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sein. Wie zuvor bereits angesprochen wurde, nimmt das auf der Oberfläche zahlreicher Epithelien exprimierte Mucin MUC1 mit seinen verkürzten Oligosaccharidseitenketten hierbei eine herausragende Stellung ein (vgl. Abb. 1.4).

Infolge der verkürzten Oligosaccharidseitenketten des MUC1 sind diese von entscheidender Bedeutung für mögliche Fehlfunktionen der entsprechenden Zellen und begünstigen hierdurch die Promotion und Progression von Magen-, Darm-, Prostata-, Ovarial- und Mammakarzinomen.^[92] Zudem kann das Auftreten von komplexen sialylierten Oligosacchariden des Sialophorins/Glycophorins mit einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS), dem angeborenen Immunschwächesyndrom (AIDS) und Leukämie korreliert werden.

Zur Bekämpfung von Krebserkrankungen bedient sich die moderne Medizin unterschiedlicher Behandlungsansätze, welche sich an den vorliegenden Gegebenheiten der einzelnen Patienten hinsichtlich des Entwicklungsstadiums sowie der Therapierbarkeit orientieren. So lassen sich eine Vielzahl von Behandlungsformen für Krebserkrankungen anhand von Lokalisation und Tumorumfang unterscheiden, wobei gegebenenfalls auch Kombinationen der einzelnen Methoden erforderlich sein können. So wird beispielsweise die Resektion tumorösen Gewebes oder die Strahlentherapie in Kombination mit einer Zytostatikabehandlung durchgeführt. Als weitaus schonendere Therapieform mit geringeren Nebenwirkungen kann eine Radioimmuntherapie, unter Ausnutzung spezifischer Rezeptor-Radionuklid-Wechselwirkungen basierend auf markierten Antikörpern, angesehen werden.^[93] Die gegenwärtigen Entwicklungen zur Behandlung von Krebserkrankungen lassen erkennen, dass eine gezieltere und für Patienten schonendere Therapie in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses rückt, da die bisherigen konventionellen Behandlungsformen einen massiven Eingriff in die physiologischen Prozesse des Organismus darstellen. So konnte die gezielte Immuntherapie in den letzten Jahren stetig an Bedeutung gewinnen und wird auch in der Zukunft eine maßgebliche Rolle in der Behandlung zahlreicher Erkrankungen spielen.^[94] In diesem Kontext stellen die auf einer Reihe von Tumorzellen exprimierten mucinartigen Kohlenhydratepitope mit sialylierten Partialstrukturen vielversprechende Zielstrukturen für die gezielte Immuntherapie dar. Da es sich bei diesen Kohlenhydratepitopen um körpereigene Struktur motive handelt und diese vom Immunsystem aufgrund der Selbsttoleranz nicht bzw. nur unzureichend erkannt und bekämpft werden können, bedarf es jedoch zur Durchbrechung dieser Toleranzschwelle sowohl einer Adressierung des humoralen, als auch des zellularen Teils des Immunsystems. Hierbei

sollte neben der Aktivierung des Komplementsystems und der spezifischen Antikörperproduktion auf humoraler Ebene vor allem eine über T-Helferzellen-vermittelte Immunantwort auf zellulärer Ebene erreicht werden, um eine gewünschte Stimulierung des immunologischen Gedächtnisses zu erreichen. Des Weiteren veranlassen diese Mechanismen die Chemotaxis zusätzlicher Effektorzellen des Immunsystems, einschließlich cytotoxischer T-Zellen, wodurch eine effiziente Immunreaktion sichergestellt wird.

Die Immuntherapie auf Basis spezifischer, tumorassoziierter Antigene muss hierbei also Anforderungen hinsichtlich der gleichzeitigen Stimulation von B- und T-Lymphocyten sicherstellen und eine lang andauernde Immunantwort unter Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gewährleisten. Weiterhin muss eine eindeutige Differenzierung zwischen gesundem und malignem Gewebe sichergestellt werden, da eine fehlende Antigenspezifität im Zuge einer Immuntherapie die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen begünstigt. Daneben besteht die Notwendigkeit, dass die applizierten Antigene vom Immunsystem als körperfremde Substanzen erkannt werden, um überhaupt eine starke Immunantwort auslösen zu können. Der Aufbau der Kohlenhydratvakzine kann jedoch, bedingt durch die Mikroheterogenität von Zellgewebe, nicht aus natürlichen Quellen erfolgen. Folglich nimmt die organische Synthese dieser komplexen Strukturen eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Antitumorvakzinen und Tumormarkern ein.^[95] Der Aufbau vollsynthetischer Vakzine erfordert zum einen das Vorhandensein geeigneter Kohlenhydratantigene als stimulierende B-Zellepitope und zum anderen den Einbau eines immunogenen *Carrier*-Proteins, durch das die selektive Aktivierung cytotoxischer T-Zellen erreicht wird.^[96]

Vollsynthetische Vakzine für die Immuntherapie haben hierbei in den vergangenen Jahrzehnten eine tiefgreifende Entwicklung durchlaufen, wobei sich unterschiedliche Strategien unterscheiden lassen. So sind neben protein- oder peptidbasierten Vakzinen auch solche auf der Basis von DNA und RNA beziehungsweise entsprechender Vektoren bekannt.^[97-98] Im Besonderen konnten sich Vakzine, welche gegen tumorassozierte, mucinartige Strukturen gerichtet sind, für die Entwicklung einer Tumorimmuntherapie unter der Induktion spezifischer Antikörper bewähren.^[99-104] Diese Konstrukte zeichnen sich nicht nur durch eine hohe Spezifität aus, sondern orientieren sich zudem an einem biomimetischen Zugang zu diesen komplexen Glykokonjugaten. Weiterhin können für die Synthese komplexer Antitumorvakzine neben den natürlichen Antigenstrukturen auch Konstrukte auf der Basis von Kohlenhydratanaloga bzw. -mimetika zum Einsatz kommen, welche neben dem Vorteil einer potentiell erhöhten Bioverfügbarkeit zudem verbesserte immunogene Eigenschaften besitzen können. So kann die Verwendung entsprechender Kohlenhydratmimetika für eine verbesserte Antigenpräsentation von entscheidender Bedeutung sein, wodurch sich die notwendigen Substanzmengen für eine Vakzinierung reduzieren lassen. Auf diese Gegebenheiten und deren Verwendung für den Einsatz in Vakzinen wird in Kapitel 1.6 näher eingegangen.

1.5 Synthesen zum Aufbau sialylierter Kohlenhydrate und davon abgeleitete Struktur motive

Ein besseres Verständnis über die genaue Funktion von Kohlenhydraten und deren Relevanz bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern führt dazu, dass kohlenhydrat-basierte Therapieansätze eine immer größere Rolle einnehmen. Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat hierbei eine ganze Reihe synthetischer Ansätze zum Aufbau von sialylierten Kohlenhydraten und davon abgeleiteter Struktur motive hervorgebracht.^[105-107] Neben chemisch-basierten Synthesen, kommen in jüngster Zeit vielfach chemoenzymatischen und enzymatischen Syntheserouten, die auf dem Einsatz von Glycosyltransferasen und Glycosidasen beruhen, eine zunehmende Bedeutung zu.^[108-112]

Die enzymatische Synthese^[113-114] kann hierbei die stereo- und regioselektive Darstellung komplexer Oligosaccharide erreichen, wodurch der Zugang zu definierten Produkten gewährleistet ist. Vielfach kann jedoch lediglich der Zugang zu kleineren Substanzmengen gewährt werden, da zum einen die Enzymaktivität einen limitierenden Faktor darstellt und zum anderen die Substratspezifität die Verwendung in der Synthese begrenzt. Allerdings zeigen aktuelle Arbeiten, dass ein vielversprechender Zugang für die Darstellung (2,3)-sialylierter mucinartiger Kohlenhydratepitope geschaffen werden konnte, der zudem auch die Synthese fluorierter Antigenanaloga ermöglicht.^[115-116]

Aufgrund der großen biologischen Bedeutung sialylierter Kohlenhydratepitope wurden in den letzten beiden Jahrzehnten zahlreiche Totalsynthesen^[117-120] beschrieben. Neben der allgemein bei der Synthese von Oligosacchariden geforderten Regio- und Stereoselektivität, wird die Synthese sialylierter Kohlenhydrate durch die besondere Struktur der Neuraminsäure erschwert. Das Fehlen einer partizipierenden Nachbargruppe in der 3-Position erlaubt keinen Einfluss auf die Stereoselektivität der Glycosylierung, wodurch der synthetische Zugang zu α -sialylierten Bausteinen deutlich erschwert wird. Neben der fehlenden Nachbargruppe führen zudem elektronische sowie sterische Effekte der dem anomeren Zentrum benachbarten Carboxylfunktion zu Problemen. Die Aktivierung von Neuraminsäureendonoren erfolgt mithilfe reaktiver Bausteine, welche *in situ* in die entsprechenden Glycosylkationen überführt werden, so dass durch Ausnutzung von Lösungsmittel-effekten bzw. geeigneter Reaktionstemperaturen stereoselektive Umsetzungen erreicht werden müssen.

Grundsätzlich lassen sich zwei Synthesestrategien zum Aufbau sialylierter Oligosaccharide unterscheiden. In einem konvergenten Verlauf erfolgt die Darstellung komplexer Saccharidepitope in voneinander getrennten Syntheserouten über entsprechende Monosaccharid-Vorläufer, welche z.B. im Fall von Sialyl-Lewis^x (SLe^x)-Derivaten nachfolgend zu zwei Disaccharid-Bausteinen verknüpft werden, die ihrerseits zum Zielmolekül gekuppelt werden. Als Beispiel hierfür ist die von Hasegawa *et al.* im Jahr 1991 beschriebene Totalsynthese eines Sialyl-Lewis^x-Derivats (SLe^x) zu nennen, die einen geeigneten sialylierten Disaccharid-Donor **A1** und einem Akzeptor-Baustein **A2** in Gegenwart von Dimethyl(methylthio)sulfonyltriflat (DMTST) zum Gangliosid-Baustein **A3** verknüpft (Abb. 1.9).^[121-122] Da die teure Neuraminsäure für die Synthese des Donor-Bausteins **A1** in relativ großen Mengen zu Beginn benötigt wird, findet diese Methode nur noch selten Anwendung. Daneben kann der Aufbau eines Tetrasaccharids auch unter Verwendung einer linearen Strategie, das heißt durch sukzessive Verknüpfung einzelner Monosaccharid-Bausteine erfolgen. Diese Methode bietet den entscheidenden Vorteil, dass der wertvolle Neuraminsäure-Baustein erst zu einem relativ späten Zeitpunkt der Synthese benötigt wird.

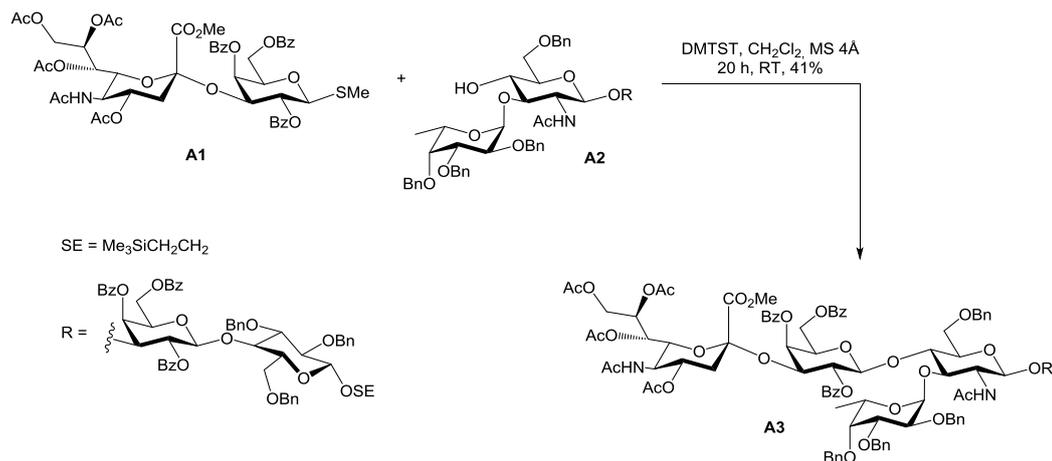


Abb. 1. 9: Die Totalsynthese eines SLe^x-enthaltenen Gangliosids nach Hasegawa et al.^[121-122]

Jüngere Arbeiten in der Synthese sialylierter Kohlenhydratepitope und davon abgeleiteter Struktur motive fokussierten sich daher auf die zuvor angesprochene lineare Synthesestrategie, so z.B. in der von Nicolaou et al.^[106] publizierte Sialyl-Lewis^x-Synthese von 1991 (Abb. 1.10).

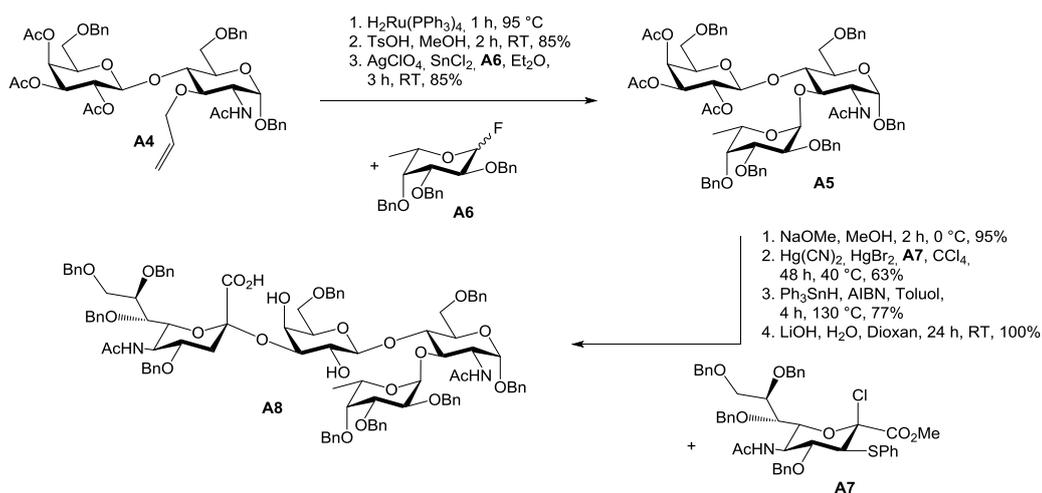


Abb. 1. 10: Die Synthese von Sialyl-Lewis^x nach Nicolaou et al.^[106]

Hierbei wurde das Lactosamin **A4** zunächst aus einem Galactosylfluorid sowie einer orthogonalen Allylether-geschützten *N*-Acetylglucosamin-Einheit aufgebaut. Diese Funktionalisierung an der 3-Position der Lactosamin-Einheit **A4** ermöglichte nach Isomerisierung des Allylrests und saurer Hydrolyse die α -selektive Helferich-Glycosylierung zum Trisaccharid-Derivat **A5** unter Verwendung des Fucosyl donors **A6**. Der von Nicolaou et al.^[106] eingesetzte Sialinsäure donor **A7** zeichnete sich durch eine α -dirigierende Thiophenylgruppe in der Nachbarposition des anomeren Zentrums aus, die die stereoselektive Produktbildung gewährleistete. Im weiteren Syntheseverlauf musste diese dann unter reduktiven Bedingungen entfernt werden, wodurch die Darstellung des Tetrasaccharids **A8** gelang. Da jedoch alternative Methoden zur stereoselektiven Produktbildung, so z.B. durch die Wahl geeigneter Bedingungen (Lösungsmittel bzw. Temperatur) in gleicher Weise erreicht werden können und weiterhin der Einsatz von Schwermetallsalzen meist vermieden wird, findet dieser synthetische Zugang kaum noch Anwendung. Mittlerweile lassen sich eine Reihe effizienter Methoden zur Sicherstellung stereoselektiver Glycosylierungen heranziehen. Jüngere Arbeiten

von *Takahashi* und Mitarbeitern^[123] sowie *Crich* und *Li*^[124] aus den Jahren 2006 und 2007 konnten dies für Sialylierungen durch den Einsatz Oxazolidinonen als Schutzgruppen erreichen. Diese Neuraminsäurebausteine zeichneten sich durch eine Modifikation des Aminogruppe in der 5-Position aus, wodurch diese *N*-Acetyl-5-*N*,4-*O*-Carbonyl-blockierten Thioglycosidbausteine unter dem Einsatz eines NIS/TfOH-Promotorsystems^[125] deutlich bessere Selektivitäten in den untersuchten Glycosylierungsreaktionen erzielten. Zudem zeigen Methodiken im Zusammenhang mit Sialylierungsreaktionen vielfältige Möglichkeiten zur Steigerung der Reaktivität bzw. Selektivität solcher Neuraminsäurebausteine durch die Verwendung entsprechender anomerer Abgangsgruppen^[126-129], auxiliärer Nachbargruppen in der 3-Position^[124, 130-131] sowie den Einsatz unterschiedlicher Promotorsysteme.^[132-134]

Mit Bezug auf die Arbeiten von *Nicolaou et al.* ist beispielsweise von *Danishefsky et al.*^[105, 135] eine Synthese bekannt, die auf Verwendung eines Fucosylfluorids **A9** mit einem Silylglucal **A10** beruht (Abb. 1.11). Hierbei wird zunächst aufgrund der höheren Reaktivität der Hydroxylgruppe in der 3-Position des Glucals **A10** die α -fucosidische (1,3)-Verknüpfung aufgebaut, bevor in einem weiteren Reaktionsschritt das Disaccharid **A11** an der verbliebenen freien 4-Position durch das Trichloracetimidat **A12** galactosyliert wird, was die Zahl der notwendigen Schutzgruppenmanipulationen in der Synthese des Disaccharid-Bausteins **A11** reduzierte. Nach Entfernung der Acetatschutzgruppen von Baustein **A13** erfolgte dann die stereoselektive *Koenigs-Knorr*-Sialylierung unter Einsatz des Neuraminsäurechlorids **A14** zum Tetrasaccharid-Baustein **A15**. Dieser erlaubt im weiteren Verlauf der Synthese eine Funktionalisierung des Glucals zum Aufbau komplexerer Oligosaccharidkonjugate.

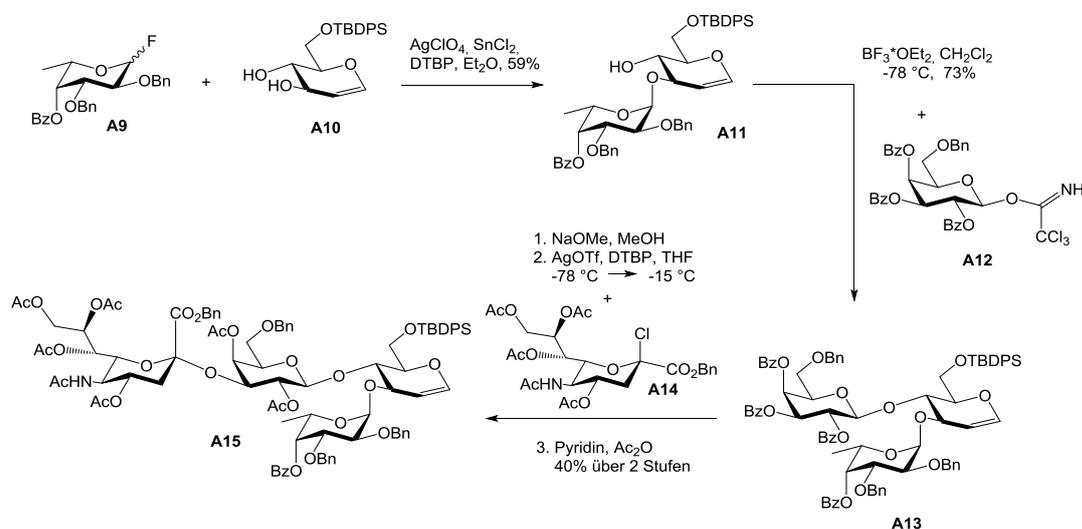


Abb. 1. 11: Die Synthese von Sialyl-Lewis^x nach *Danishefsky et al.*^[105, 135]

Alternativen zu „teuren“ Funktionalisierungen auf der Stufe dieser komplexen Tetrasaccharide wurden durch *Kunz et al.*^[107, 118, 136] beschrieben, wobei hier orthogonal-funktionalisierte Glucosamin-Einheiten zum Einsatz kamen. So wurde auch hier eine lineare Synthesestrategie zum Aufbau von Sialyl-Lewis^x-Derivaten und davon abgeleiteter Struktur motive herangezogen, welche sich trotz anderer Schutzgruppenmuster der Monosaccharid-Bausteine an der Route von *Danishefsky et al.*^[105, 135] orientierten (Abb. 1.12). Neben einer Azid-funktionalisierten Glucosamin-Einheit wurden beispielsweise auch verschiedene Allyl- und Silylglycoside als zentrale Monosaccharideinheiten für den Aufbau der komplexen Oligosaccharide eingesetzt. Dabei

machte die Verwendung Allyl-funktionalisierter Glucosamin-Bausteine eine Schutzgruppenmanipulation auf der Stufe der Sialylierung erforderlich, da erstere in Gegenwart des eingesetzten, elektrophilen Promotors (AgOTf/MeSBr) angegriffen werden. Alternativ hierzu konnte diese Problematik durch den Aufbau eines Silylglycosids umgangen werden, wodurch auch Schutzgruppenmanipulationen auf der Stufe der entsprechenden Disaccharide vermieden werden konnten.

So kam ein zentrales Silylglycosid **A17** für den Aufbau des Disaccharids **A18** zum Einsatz, welches wiederum aus der Glycosylierung mit einem Fucosyldonor **A16** hervorgegangen war. Nach regioselektiver Öffnung des Benzylidenacetals konnte der Aufbau des Trisaccharids **A20** durch den Galactosyldonor **A19** erfolgen. Die anschließende stereoselektive Sialylierung zum Tetrasaccharid **A22** wurde durch Sialinsäure-xanthogenat **A21** unter Ausnutzung des Nitrileffekts bei niedriger Temperatur bewerkstelligt.

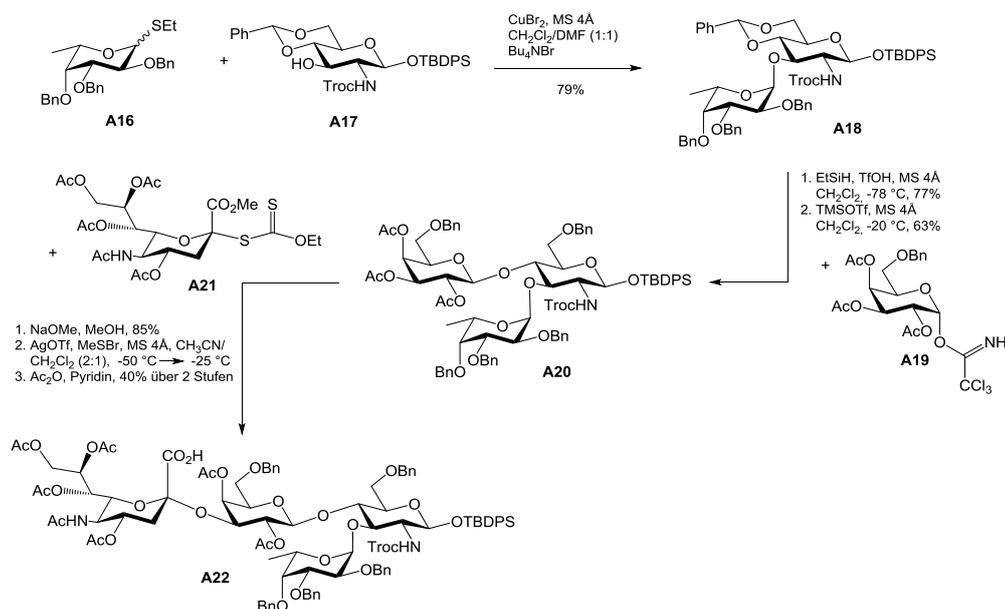


Abb. 1. 12: Die Synthese der Sialyl-Lewis^x-Derivate nach Kunz et al.^[107, 118, 136]

Die hier beschriebenen Routen zum Aufbau von Sialyl-Lewis^x-Derivaten legten das Hauptaugenmerk der Synthese vor allem auf einen effizienten Zugang zu diesen komplexen Oligosacchariden. Daneben galt die Annahme, dass jede einzelne Monosaccharideinheit an der Wechselwirkung mit den entsprechenden Rezeptoren beteiligt ist. Kristallstrukturen von E- und P-Selektinliganden mit Sialyl-Lewis^x-Derivaten zeigten jedoch, dass die zentrale Glucosamineinheit eine untergeordnete Rolle bei der Interaktion mit den Rezeptoren spielt.^[137] Infolgedessen zielten Arbeiten von Opatz et al.^[138] aus dem Jahr 2014 auf eine chemoenzymatische Synthese von funktionellen Sialyl-Lewis^x-Mimetika mit heteroaromatischer Kernstruktur anstelle der Glucosamineinheit ab (Abb. 1.13). Diesem Ansatz nach erfolgte der lineare Aufbau der Sialyl-Lewis^x-Mimetika basierend auf der chemoenzymatischen Synthese sialylierter Disaccharid-Bausteine. Hierbei wurden zunächst Galatosylazide mit *para*-Nitrophenylsialosiden in Gegenwart einer Transsialidase vom Typ *Trypanosoma cruzi* zu den (2,3)-sialylierten Bausteinen umgesetzt.^[138] Die entsprechenden Disaccharide ließen sich wiederum mit den unterschiedlichen Acetylenbausteinen in Gegenwart von Kupfer(I)-iodid zu den entsprechenden Triazolen umsetzen, welche nach abschließender Schutzgruppenmanipulation zur Evaluation der Inhibition von Selektinrezeptoren eingesetzt wurden.

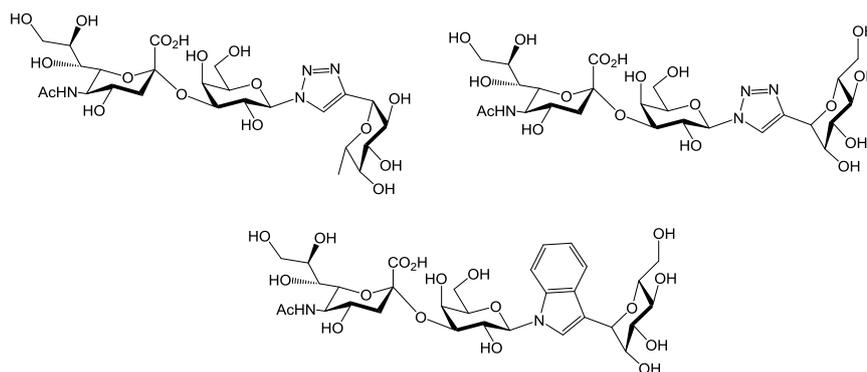


Abb. 1. 13: Chemoenzymatische Sialyl-Lewis^x-Mimetika nach Opatz *et al.*^[138]

Die vorgestellten Synthesen zum Aufbau sialylierter Kohlenhydratepitope und der davon abgeleiteten Struktur motive stellen nur eine Auswahl an literaturbekannten Herstellungswegen dar. Weitere Synthesen sialylierter Derivate konzentrierten sich unter anderem auf den Aufbau sialylierter Kohlenhydratepitope, die im Zusammenhang mit dem auf malignen Zellen exprimierten, tumorassoziierten Mucin MUC1 vorgefunden werden. Hierbei konnten die Erkenntnisse im Zusammenhang der vielfältigen Syntheserouten von Sialyl-Lewis^x-Derivaten genutzt werden, um den Aufbau entsprechender Glycosylaminosäure-Bausteine für die Darstellung funktioneller Glycopeptide zu bewerkstelligen. So beschrieben *Ogawa et al.*^[139-140] sowie *Kunz et al.*^[141-142] den biomimetischen Zugang zu komplexen Glycosylaminosäure-Bausteinen (vgl. Kapitel 1.2) und darauf aufbauend zu sialylierten Vertretern wie dem (2,3)-ST-Antigen, dem regioisomeren (2,6)-ST-Antigen und dem disialylierten Glycophorin-Epitop in Form funktioneller Glycopeptide.^[143-145]

Singh et al.^[146] beschrieben in diesem Kontext erstmals die Synthese eines disialylierten, auf der Core 2-Struktur basierenden, Hexasaccharid-Bausteins (Abb. 1.14). Den Zugang zu diesem sogenannten Sialophorin (Leukosialin, CD 43)^[4, 43, 85] konnten sie über eine konvergente Synthesestrategie ausgehend von einem Neuraminsäurebaustein mit dirigierender Thiophenylgruppe in der 3-Position und einem Galactose-Akzeptor bewerkstelligen. Die Darstellung des sialylierten Disaccharid-Donors **A23** konnte hierbei über eine zwei-stufige Sequenz unter Entfernung der Thiophenylgruppe sowie der Lactonbildung beschriftet werden. Im weiteren Verlauf konnte die Synthese der beiden Trisaccharide **A26** und **A27** unter Verwendung des sialylierten Disaccharid-Donors **A23** und eines Galactosamin-Akzeptors **A24** bzw. eines Glucosamin-Akzeptors **A25** erfolgen. Der Baustein **A26** ließ sich anschließend durch Schutzgruppenmanipulation in den Glycosyldonor **A28** überführen, welcher in der nachfolgenden *Schmidt*-Glycosylierung zur Bildung des Hexasaccharids **A29** eingesetzt wurde. Von Nachteil ist in der vorliegenden Synthese dieses komplexen Kohlenhydratepitops jedoch die fehlende stereoselektive Kontrolle bei der Bildung der beiden Bausteine **A26** und **A27**, wodurch eine spätere Verwendung des Festphasenbausteins **A29** aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht möglich war. Weiterhin wurde auch hier der wertvolle Neuraminsäurebaustein zu Beginn der Synthese eingesetzt. Alternativ hierzu stellten *Singh et al.* in einer Folgearbeit den chemoenzymatischen Zugang zum Sialophorin-Epitop ausgehend von einem Tetrasaccharid-Baustein vor, welcher unter Verwendung zweier Sialyltransferasen in den gewünschten Hexasaccharid-Threonin-Baustein überführt werden konnte.

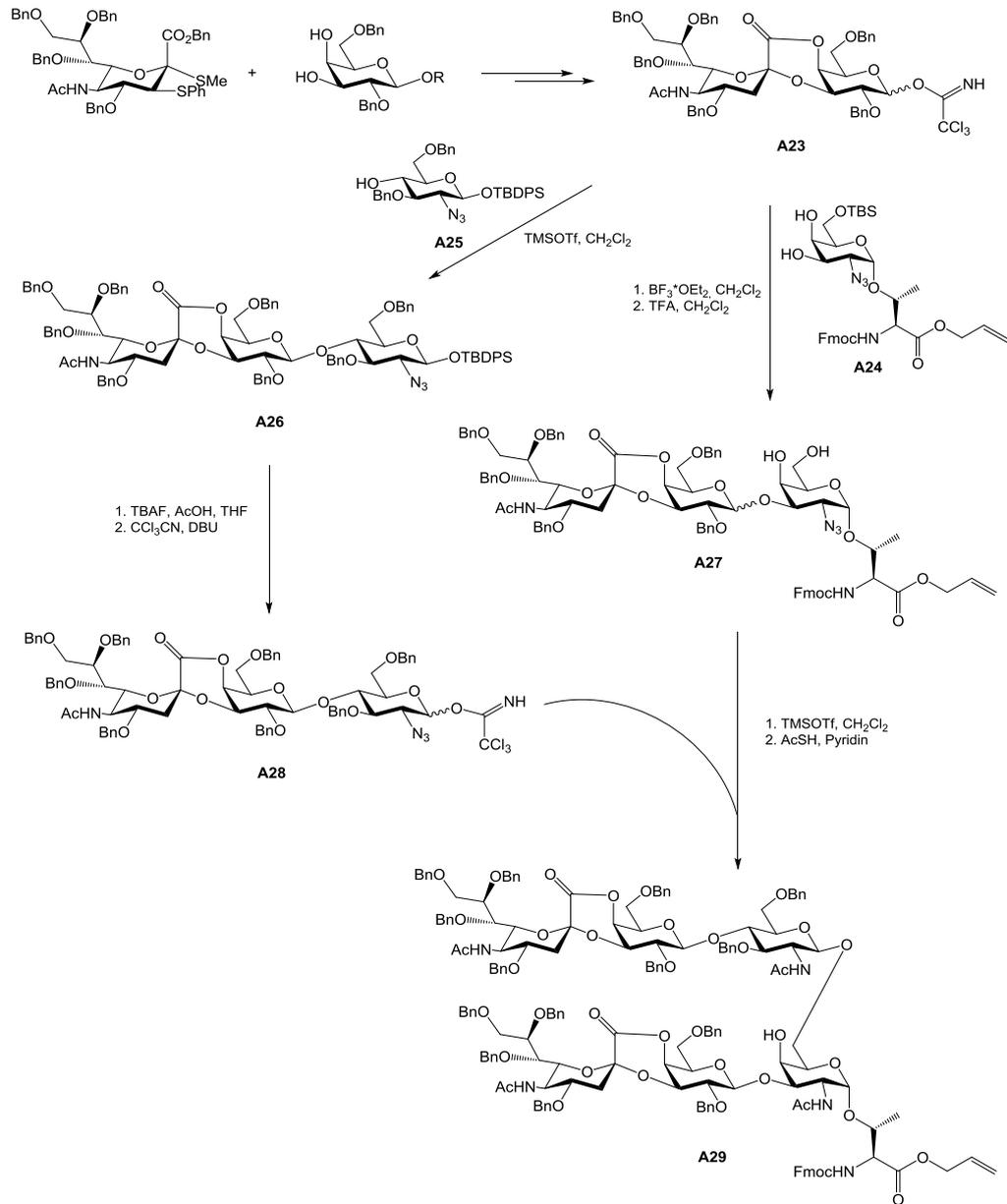


Abb. 1. 14: Die Synthese von Sialophorin nach Singh et al. ^[146]

Weitere Arbeiten unter Berücksichtigung einer rein chemischen Syntheseroute zu diesem komplexen Kohlenhydratepitop sind nicht bekannt. Zudem wurde der Einsatz fluorierter Analoga des Sialophorins unter Verwendung eines orthogonalen Schutzgruppenmusters sowie die Einführung der Sialinsäure zum Ende der Syntheseroute noch nicht untersucht, obwohl dieser Glycosylaminosäure-Baustein ein vielversprechendes Epitop für die Entwicklung neuer, fluorierter Kohlenhydratanaloga darstellt.

1.6 Kohlenhydratmimetika für den Einsatz in Vakzinen

Die Entwicklungen der vergangenen Jahrzehnte zeigen die immer größer werdende Bedeutung von Wirkstoffen, welche sowohl in Stoffwechselprozesse als auch in die Aktivierung des Immunsystems eingreifen können. Komplexe Kohlenhydrate wie z.B. Teilstrukturen der Selektine erweisen sich hierbei als interessante Leitstrukturen, da sie wichtige Aufgaben in molekularen Erkennungsmechanismen übernehmen. In den letzten Jahren wurden zudem eine Vielzahl von Transportmechanismen sowie Mechanismen zur Aktivierung und Inhibierung von Enzymen mit Hilfe von Kohlenhydratmimetika untersucht. Daneben wurden Kohlenhydrat-Mimetika auch für die Aufklärung zahlreicher Signalwege eingesetzt, indem mit ihrer Hilfe wichtige Rezeptor-Substrat-Wechselwirkungen aufgezeigt werden konnten. Die geringe metabolische Stabilität natürlicher Kohlenhydratepitope gegenüber einem enzymatischen Abbau wirkt sich nachteilig auf deren Verwendung in biologischen Studien und als Pharmazeutika, z.B. in entsprechenden Vakzinen aus. Ferner beeinträchtigen die allgemeinen Toleranzmechanismen des Immunsystems infolge der schwachen Immunogenität solcher Strukturen maßgeblich deren Wirksamkeit. Die schwache Immunogenität kohlenhydrat-basierter niedermolekularen Haptene wurde durch die Entwicklung einer Vielzahl unterschiedlicher Ansätze kompensiert. Einen geeigneten Ansatz zur Verstärkung einer gewünschten Immunreaktion unter Induktion einer T-Zell-abhängigen Immunantwort bietet beispielsweise die Konjugation an immunogene Carrier-Proteine, wie z.B. das *Tetanus-Toxoid* oder die Verwendung des Toll-like Rezeptors 2 *Pam₃CysSer*. So gelang mit letzterem und unter Verwendung eines dimären T_N-Antigen-Lipopeptidkonjugats die Induktion spezifischer muriner anti-MUC1-Antikörper.^[147-148] Neben der monovalenten Präsentation von Antigenen in entsprechenden Vakzinen, gibt es zudem vielversprechende Ansätze zur Verbesserung der Immunantwort durch die Verwendung multivalent präsentierter Haptene (Abb. 1.15).

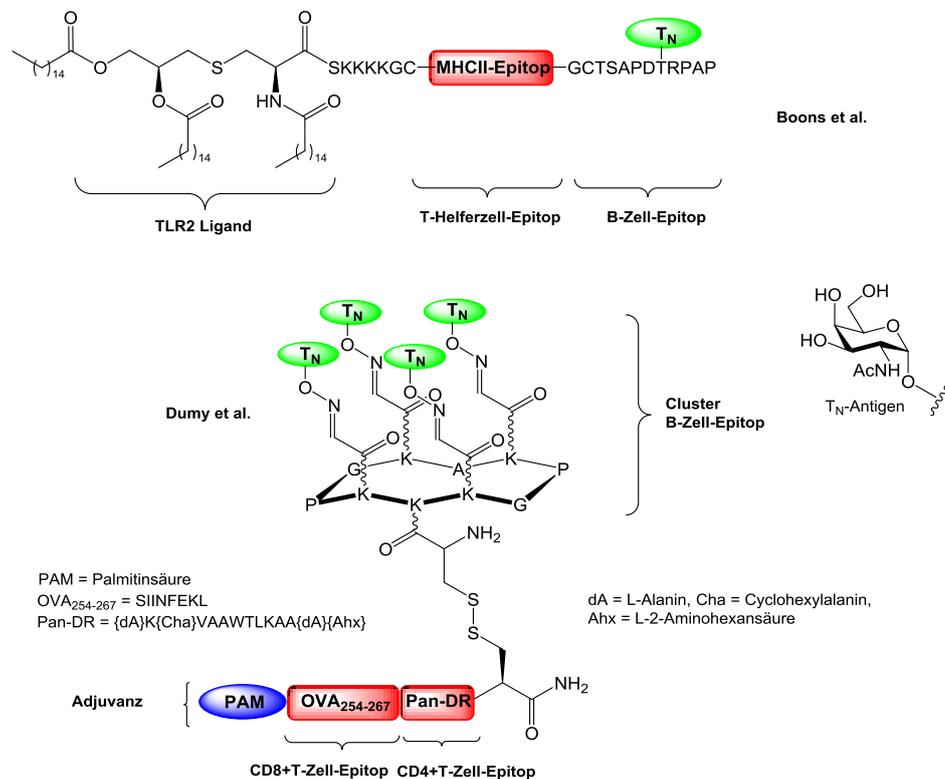


Abb. 1. 15: Synthetische Mehrkomponentenvakzine mit multivalenter Präsentation.

Boons et al.^[100, 149] konnten in diesem Zusammenhang über die Synthese von multivalenten Vakzinen berichten, wie beispielsweise die eines Dreikomponenten-Vakzins, bei dem neben einem MUC1-T_N-B-Zell-epitop zudem eine MHCII-Peptidsequenz und der Toll-like Rezeptor 2 (TLR 2) *Pam*₃Cys-SK₄ zur Verstärkung der Immunreaktion eingebaut wurden. Die Konjugation an den TLR2-Liganden führte dabei zu einer gesteigerten Freisetzung von Cytokinen und costimulierenden Proteinen, sowie zu einer starken Induktion von IgG-Antikörpern, welche mit hoher Spezifität die entsprechenden T_N-Antigen-exprimierenden Zellen erkennen konnten.^[150] Einen weiteren Ansatz verfolgten *Dumy*^[151-152] und Mitarbeiter, die eine multivalente Präsentation des T_N-Antigens in Form eines geclusterten B-Zellepitops auf der Basis eines nicht-immunogenen cyclischen Decapeptids aus Glycin, Prolin und Lysin für den Aufbau eines Vierkomponenten-vakzins verwendeten. Weiterführende Arbeiten um *Brimble et al.*^[153] nutzten zur multivalenten Präsentation der niedermolekularen Haptene zentrale triazolverknüpfte Kohlenhydratcluster auf der Basis von MUC1-Glycopeptiden, welche über entsprechende Alkin-Azid-Clickreaktionen zugänglich sind (Abb. 1.16). Vergleichbare Synthesen zur Verknüpfung von tetravalenten Glycopeptidkonjugaten unter Einsatz eines TLR 2-Liganden konnten durch *Li et al.* beschrieben werden.^[154-155]

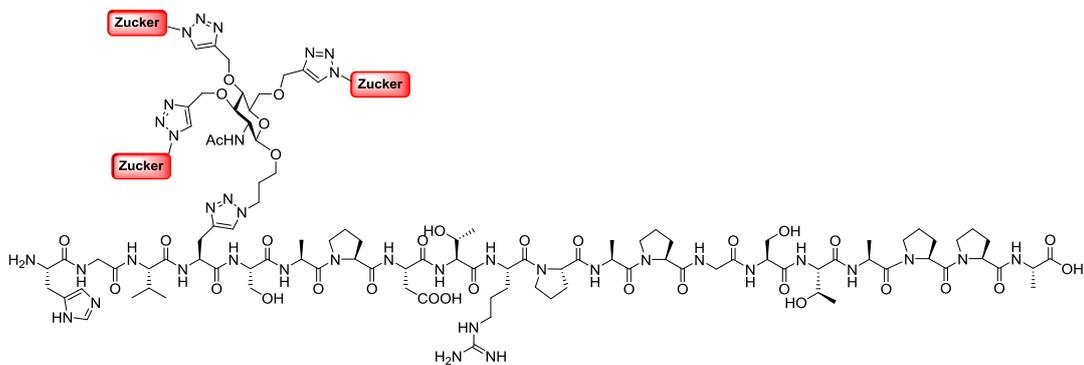


Abb. 1.16: Multivalentes Neoglycopeptid nach *Brimble et al.*^[153]

In gleicher Weise konnten für eine Reihe von sialylierten Kohlenhydratepitopen in den letzten Jahren zahlreiche Vakzine erfolgreich aufgebaut und auf ihre immunologischen Eigenschaften hin untersucht werden. *Chefalo et al.*^[156] beschrieben in diesem Zusammenhang die besondere Funktion von Neuraminsäuren als Zielstrukturen für die Entwicklung neuartiger Krebsvakzine. Zur Untersuchung der chemischen Einflüsse dieser Modifikationen verwendeten sie eine Reihe von Sialinsäurederivaten mit unterschiedlichen Alkylsubstituenten an der Aminogruppe in der 5-Position. Die resultierenden Glycokonjugate wurden auf ihre immunologischen Eigenschaften hin evaluiert und zeigten deutliche Immunantworten mit der Bildung einer Vielzahl unterschiedlicher Antikörperisotypen. Diese Ergebnisse eröffneten neue Wege in der Darstellung von modifizierten Kohlenhydratvakzinen über die Derivatisierung von Neuraminsäure-Einheiten in entsprechenden Oligosacchariden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnten durch *Sahabuddin et al.*^[157] beziehungsweise *Wu et al.*^[158] unter Verwendung sialylierter Glycokonjugatvakzine Immunisierungsstudien an Mäusen durchgeführt werden (Abb. 1.17). Hierbei setzten sie neben natürlichen Neuraminsäurebausteinen wiederum auch solche mit modifizierten Acetamideinheiten ein. Wie zuvor schon von *Chefalo et al.* gezeigt, konnten auch für diese Vakzine T-Zell-abhängige Immunreaktionen in Kombination mit immunogenen Carrier-Proteinen wie dem KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) und dem Ovalbumin (OVA) beobachtet werden.

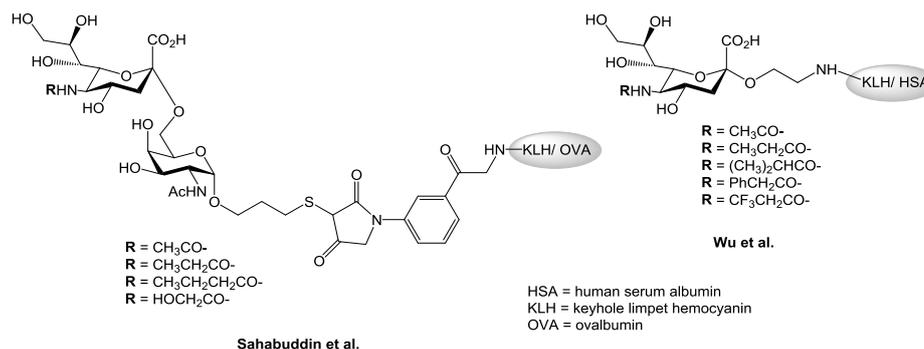


Abb. 1. 17: Sialylierte Glykokonjugatvakzine nach Sahabuddin et al. und Wu et al.

So erzielten Wang und Guo^[159] aufbauend auf diesen Resultaten entsprechende Immunisierungen unter Einsatz von ST_N-Derivaten mit substituierten Phenylacetylsialinsäuren, wobei diese Konjugate im Vergleich zu einem unsubstituierten Phenylacetat-Derivat deutlich höhere Immunogenitäten aufwiesen und somit interessante Kandidaten für die Entwicklung von Krebsvakzinen darstellen. Die vorliegenden Beispiele stellen lediglich eine kleine Auswahl an Arbeiten zum Aufbau vollsynthetischer Vakzine dar und können durch weiterführende Literatur vertieft werden.^[160-166]

Die geringe *in vivo*-Stabilität von Glycopeptid-basierten Vakzinen, welche für eine Antikörperspezifität von entscheidender Bedeutung ist, da ein vorzeitiger Haptenverlust die Spezifität der Immunantwort negativ beeinflussen kann, ist damit ein kritischer Faktor in der Entwicklung und dem Design solcher Vakzine. Vielversprechende Möglichkeiten kohlenhydrat-basierte Epitope zu stabilisieren, umfassen beispielsweise die Modifikation in Form von C- oder S-glycosidisch verknüpfter Analoga,^[167-171] die Substitution strategischer Hydroxylgruppen durch Fluoratome^[172-173] und die Synthese carbaanaloger Mimetika (Abb. 1.18).^[174-175] All diese Modifikationen können neben der höheren chemischen und metabolischen Stabilität auch eine erhöhte Immunogenität nach sich ziehen und führen somit zu besonders attraktiven Zielstrukturen für den Einsatz in Tumorvakzinen.^[167]

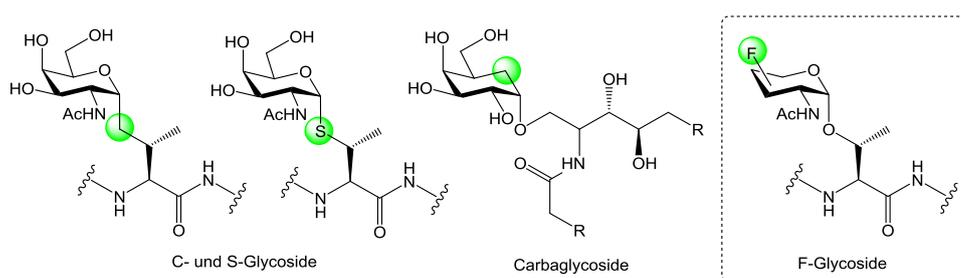


Abb. 1. 18: Übersicht über strukturell modifizierte Kohlenhydratmimetika.

Von großem Interesse sind in diesem Kontext fluorsubstituierte Derivate, da Fluor aufgrund seines ähnlichen *van der Waals*-Radius zu Sauerstoff als Bioisoster für Hydroxylgruppen fungieren kann. Zudem resultiert in der größeren Elektronegativität bei geringerem Atomradius sowie der schlechteren Polarisierbarkeit der Kohlenstoff-Fluor-Bindung eine Verschiebung der Elektronendichteverteilung im Molekül, wodurch eine veränderte Reaktivität von Nachbargruppen beobachtet werden kann.^[176] Der Einbau von Fluor kann dabei der Stabilisierung von Biomolekülen dienen und bietet weiterhin die Möglichkeit fluorierte Kohlenhydrate als spektroskopisch gut zu verfolgende Sonden zur Aufklärung von Enzymaktivitäten bzw. Stoffwechsel-

wegen für mechanistische Studien einzusetzen.^[177-180] Vor diesem Hintergrund spielen modifizierte Kohlenhydrate eine zentrale Rolle bei der Suche nach effektiven Inhibitoren für eine Vielzahl zellulärer Prozesse.^[181-183]

In den vergangenen Jahren konnten um *Hoffmann-Röder et al.*^[184-187] auf der Basis von Glycopeptiden des tumorassoziierten Mucins MUC1 synthetische Vakzine mit einer Reihe fluorierter T-Antigen-Bausteine dargestellt werden und auf ihre immunologischen Eigenschaften in Impfstudien im Mausmodell bzw. entsprechenden Neutralisationsassays untersucht werden (Abb. 1.19). Hierbei konnten sowohl für natürliche als auch modifizierte, fluoridierte Vakzine vergleichbare Immunreaktionen unter Erhalt der MUC1-Antikörperspezifität nachgewiesen werden.

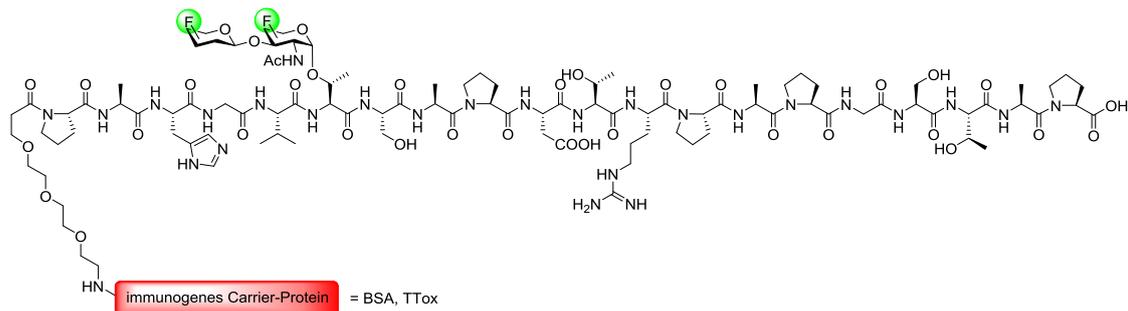


Abb. 1. 19: Fluorierte MUC1-Glycopeptidvakzine nach *Hoffmann-Röder et al.*^[184-187]

Diese und die Ergebnisse von *Lee et al.*^[188] und *Zheng et al.*^[189] bestätigten die Annahme, dass auch mit kohlenhydrat-basierten Vakzinen, in denen das Hapten strukturell verändert wurde, starke toleranzbrechende und selektive Immunantworten erzielt werden können. Zudem lieferten diese Arbeiten neben Hinweisen auf eine gesteigerte Immunogenität der Konstrukte auch Belege für eine Steigerung der metabolischen Stabilität der fluoridierten Antigenanaloga.^[186]

Weiterhin konnte in diesem Zusammenhang erstmals die Darstellung von modifizierten, fluoridierten (2,6)-ST-MUC1-Glycopeptidvakzinen durch *Hoffmann-Röder* und Mitarbeiter beschrieben werden (Abb. 1.20).^[190]

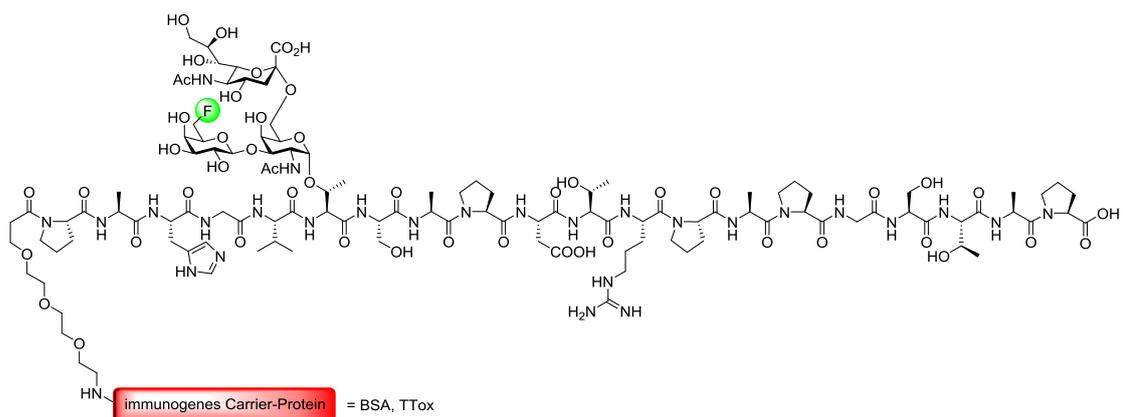


Abb. 1. 20: Fluorierte (2,6)-ST-MUC1-Glycopeptidvakzine nach *Hoffmann-Röder et al.*

Wie zuvor bereits erwähnt, wurden ebenfalls durch *Chefalo et al.*^[156] sowie *Yang et al.*^[191] die Darstellung von fluoridierten ST_N-Glycokonjugatvakzinen erzielt, die fluoridierte Acetamideinheiten enthielten. Jüngste Arbeiten auf dem Gebiet der modifizierten Kohlenhydrate konzentrierten sich neben der Darstellung von

potentiellen Sialidaseinhibitoren^[192] auch auf die Synthese und Evaluation fluorierter Kohlenhydratanaloga sowie davon abgeleiteter Mimetika mit fluorierten Partialstrukturen. So konnte durch *Leclerc*^[193] und Mitarbeiter die Darstellung fluorierter C-Manno-peptide als potentielle Sialyl-Lewis^x-Mimetika zur Inhibition selektinvermittelter Adhäsionsprozesse beschrieben werden (Abb. 1.21).

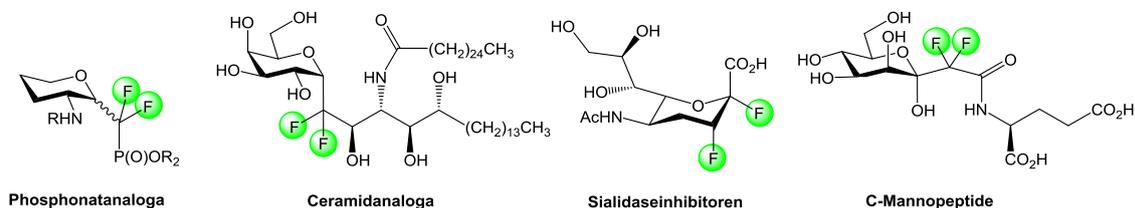


Abb. 1. 21: Übersicht über den Einsatz fluorierter Kohlenhydratmimetika.

Das Hauptaugenmerk dieses synthetischen Zugangs zu den Sialyl-Lewis^x-Mimetika basierte auf vorangegangenen Arbeiten um *Wong* und *Kaila* zur Darstellung von C-Mannosylpeptiden als effiziente Inhibitoren für die Interaktion mit den beiden Rezeptoren des E- und P-Selektins.^[194-195] Die synthetisierten fluorierten C-Mannosylpeptide sollten in diesem Zusammenhang Mimetika mit besseren Eigenschaften im Vergleich zu den entsprechenden C-Glycosiden darstellen. Die anschließende Evaluation in Zellassays mit rekombinanten E- und P-Selektinen zeigte eine vergleichbare inhibitorische Aktivität dieser Mimetika mit den entsprechenden C-Glycosiden.

Einen weiteren Ansatz zur Modulation von mikrobiellen Infektionen, Autoimmunerkrankungen sowie die Behandlung von Tumoren verfolgten *Leclerc*^[196] und Mitarbeiter mit der Synthese fluorierter C-Galactosylceramidanaloga, welche auf ihre immunologischen Eigenschaften gegenüber *iNKT-Zellen* aus Mäusen untersucht wurden. Bei diesen invarianten natürlichen Killer-T-Zellen handelt es sich um eine Untergruppe regulatorischer T-Zellen mit vielfältigen Funktionen im Zuge von Immunantworten.^[197-198] Basierend auf dem spezifischen Liganden KRN 7000^[199], einem synthetischen Analogon des natürlichen Glycosphingolipids Agelasphin-9b^[200], sollten diese fluorierten Analoga vielversprechende Kandidaten für die Modulation einer Cytokinproduktion im Zuge der frühen Immunantwort darstellen. Diese Derivate stellen lediglich eine Auswahl von möglichen Modifikationen, so auch solchen mit fluoriertem Kohlenhydratepitop in unterschiedlichen Positionen, dar.^[68, 201-204] Die vorliegenden Ergebnisse konnten jedoch in diesem Fall keinen positiven Einfluss der fluorierten Verbindungen feststellen, wofür das Fehlen einer wichtigen Wechselwirkungen der Hydroxylgruppe in der 2-Position des Galactosylrests verantwortlich gemacht wird. Diese stellt kein Strukturmerkmal der natürlichen Galactosylceramide dar, wurde aber für die Erkennung des synthetischen Analogons KRN 7000 als essentiell eingestuft. Als abschließendes Beispiel für den Einsatz fluorierter Kohlenhydratmimetika wurde durch *Delaunay et al.*^[205] erstmals die Synthese C-glycosidisch verknüpfter Difluorophosphonate als potentielle Mimetika natürlicher Phosphate beschrieben, die einen Zugang zu *in vivo*-hydrolyseresistenten Glycosidphosphonaten für biologisch relevante Verbindungen ermöglichen.

2 ZIELSETZUNG

Die Anwendung kohlenhydratbasierter Vakzine stellt – wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben – einen erfolgversprechenden Ansatz zur Immuntherapie von Erkrankungen dar, welche mit der Anwesenheit mucinartiger Glycopeptide in Verbindung gebracht werden. So nehmen diese aufgrund ihrer biologischen Bedeutung an einer Fülle von Adhäsionsprozessen und zellulären Wechselwirkungsmechanismen teil. Die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden auf der Basis kohlenhydratbasierter Wirkstoffe kann hierbei durch das bessere Verständnis über die genauen Funktionen von Kohlenhydraten im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern für die Therapie genutzt werden.

Die Mikroheterogenität von Glycopeptiden aus natürlichen Quellen erfordert jedoch in diesem Kontext auf Grund abweichender Glycosylierungsmuster entarteter Zellen die synthetische Darstellung von Tumorkonzinen, da hierdurch deren selektiver Einsatz in Vakzierungen gewährleistet werden kann.

Daneben kann zur Steigerung der Bioverfügbarkeit solcher Glycokonjugate die gezielte Substitution strategischer Positionen mit Fluoratomen im Kohlenhydratepitop erfolgen, wodurch der Zugang zu vielversprechenden Mimetika gelegt werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher exemplarisch auf Grundlage von fluorierten Analoga der zentralen Galactoseeinheit der synthetische Zugang zu mucinartigen Glycopeptiden für die Immuntherapie zellulärer Signaltransduktions- bzw. Adhäsionsprozessen geschaffen werden (Abb. 2.1).

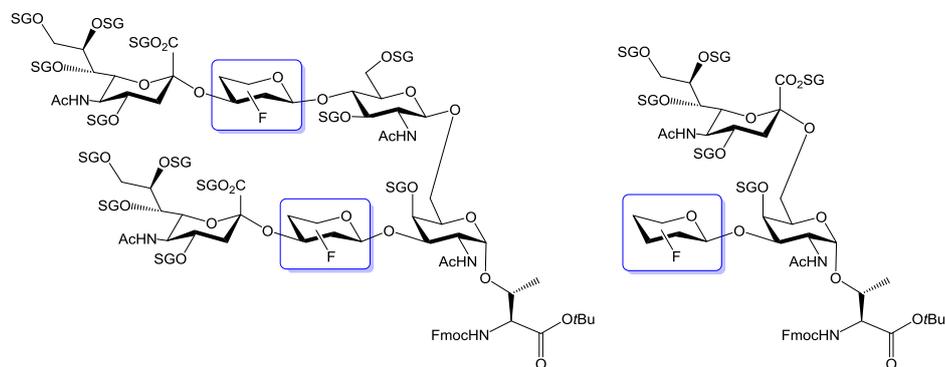


Abb. 2. 1: Die zu synthetisierenden Oligosaccharid-Threonin-Konjugate mit Fluorierung strategischer Positionen.

Der Aufbau der an die Aminosäure L-Threonin gebundenen Oligosaccharide soll hierbei nach einem linearen Konzept in Anlehnung an biomimetische Synthesen erfolgen. Hierbei soll zum einen ein Neuraminsäure-Baustein mit fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugaten zum Aufbau von (2,6)-ST-Antigenanaloga verknüpft wird. Zum anderen soll der Zugang zu sialylierten, fluorierten Trisaccharidglycosyldonoren geschaffen werden, welche mit (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugaten zum Aufbau des Oligosaccharids Sialophorin verknüpft werden sollen (Abb. 2.2). Die Spaltung der *tert*-Butylester der Glycosylaminosäuren führt schließlich zu den vollständig blockierten Bausteinen, welche für die Glycopeptidfestphasensynthese eingesetzt werden sollen. Neben den natürlichen Derivaten soll die zuvor angesprochene Synthesestrategie unter Substitution funktioneller Hydroxylgruppen mit Fluor die Darstellung potentieller Mimetika unter Einsatz unterschiedlich-fluorierter Galactose-Bausteine ermöglichen. In diesem Zusammenhang soll die vorliegende Arbeit aufzeigen inwieweit sich das vorhandene Schutzgruppenmuster für die

Darstellung der komplexen Oligosaccharid-Threonin-Konjugate in Kombination mit der Substitution strategischer Hydroxylgruppen unter Berücksichtigung der Reaktivität der resultierenden Oligosaccharid-Bausteine in Einklang bringen lässt.

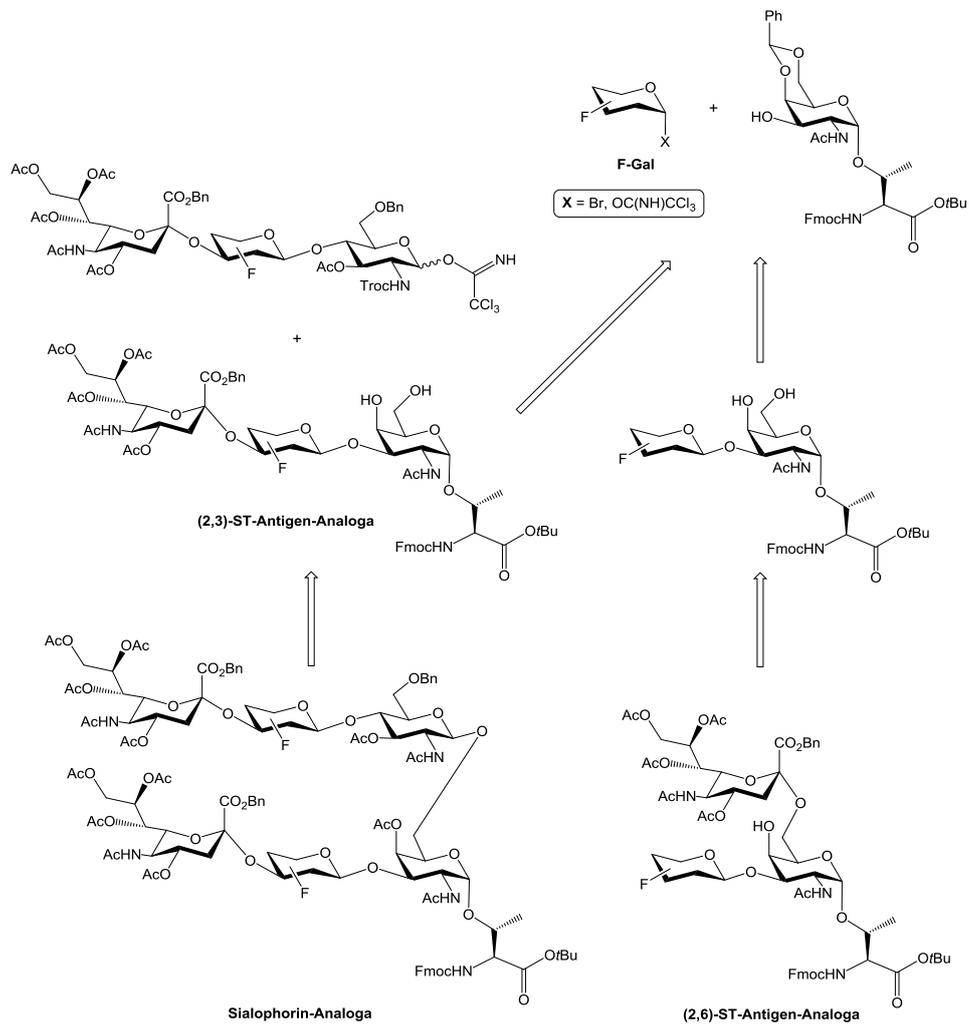


Abb. 2. 2: Retrosynthese der fluorierten Glycosylaminosäuren.

Zum Abschluss der geplanten Synthesen sollen die jeweiligen (2,6)-ST-Antigenanaloga zum einen in die zwanzig Aminosäuren umfassende *tandem repeat*-Sequenz aus dem epithelialen Mucin MUC1 beziehungsweise die fluorierten Analoga des Sialophorins in eine *N*-terminale Partialsequenz des Glycoproteins eingebaut werden. Daneben sollen die resultierenden Glycopeptide in einem nachfolgenden Schritt an immunogene Carrier-Proteine zum Aufbau vollsynthetischer Vakzine konjugiert werden um somit den Zugang zu potentiellen Antitumorvakzinen bereit zu stellen.

Jüngere Arbeiten um *Hoffmann-Röder et al.* konnten bereits belegen, dass durch die strategische Substitution mit Fluor neben einer Erhöhung der metabolischen Stabilität gegenüber enzymatischer Degradation auch eine Steigerung der immunogenen Eigenschaften der resultierenden MUC1-basierten Antitumorvakzine unter Induktion spezifischer Antikörper in Immunisierungsstudien erzielt werden konnte (Abb. 2.3).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen können die hier synthetisierten Oligosaccharidkonjugate prinzipiell als neue Kandidaten kohlenhydratbasierter Vakzine angesehen werden. Weiterhin liefern die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate vielversprechende Rückschlüsse für die Synthesen modifizierter Oligosaccharide und deren Einsatz in der Darstellung potentieller Antitumorvakzine.

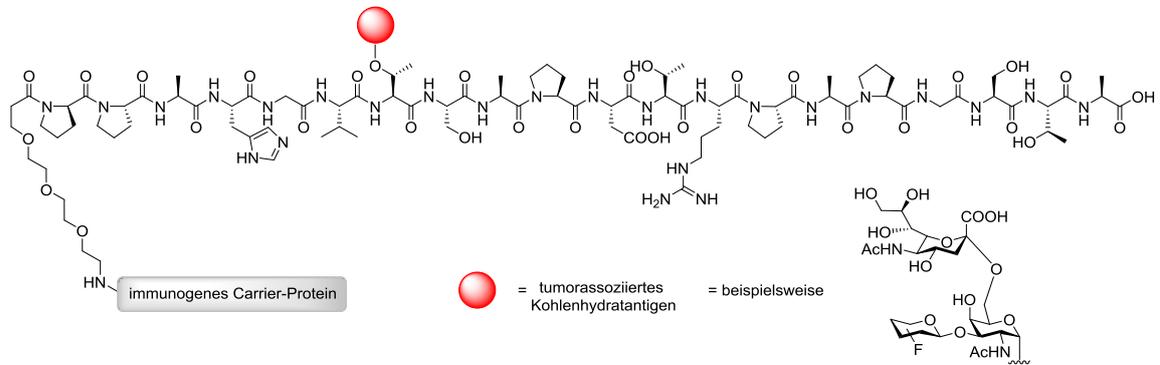


Abb. 2. 3: Schematischer Aufbau eines fluorierten vollsynthetischen Vakzins.

3 ALLGEMEINER TEIL

3.1 Die Synthesestrategien zum Aufbau der Oligosaccharid-Threonin-Konjugate

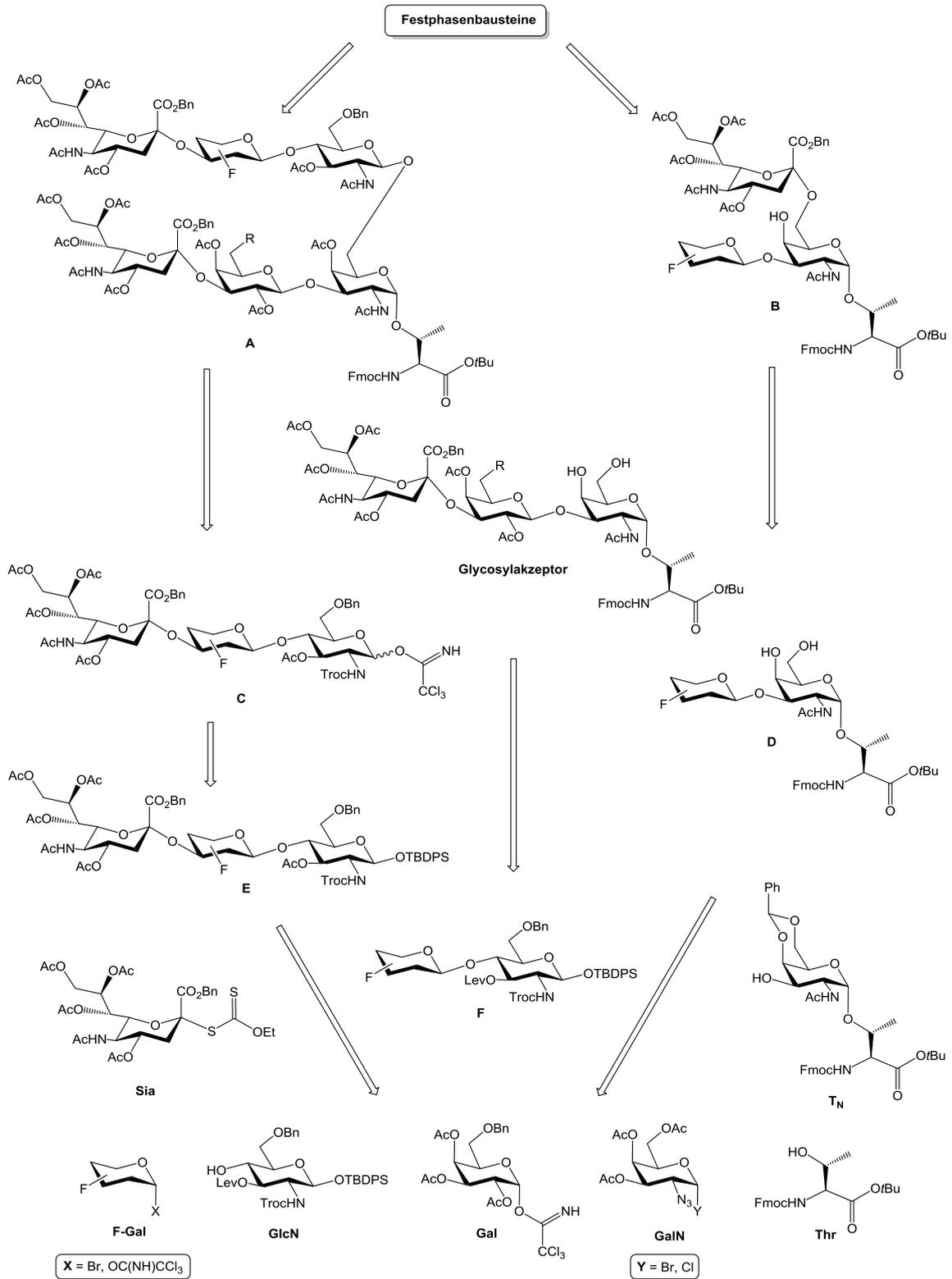
Der Aufbau der komplexen Oligosaccharid-Threonin-Konjugate sowie der fluorierten Analoga erfolgte – wie bereits in Kapitel 2 angesprochen – nach einer konvergenten Synthesestrategie (Schema 3.1) in Anlehnung an literaturbekannte Synthesen unter Verwendung etablierter Glycosylierungsmethoden.^[206]

Hierzu wurden sowohl für die Synthesen der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate (**B**) als auch für den Aufbau des Hexasaccharid-Threonin-Bausteins (**A**) zunächst die jeweiligen Monosaccharid-Bausteine in geeignet blockierter Form, i. d. R. durch Acetatschutzgruppen, dargestellt und in entsprechende Glycosyldonoren überführt. Letztere wurden zum stereoselektiven Aufbau der komplexeren Disaccharid- bzw. Trisaccharid-Bausteine (**D/F**) und (**E**) eingesetzt und für nachfolgende Synthesen weiter funktionalisiert. Im Anschluss an die Glycosylierungsreaktionen wurden die erhaltenen, an die Aminosäure L-Threonin gebundenen Oligosaccharide weiteren Schutzgruppenmanipulationen unterzogen, um deren Einsatz in der Glycopeptid-Festphasensynthese zu ermöglichen.

3.1.1 Die konvergente Synthesestrategie zum Aufbau der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate des epithelialen MUC1

Für den Aufbau der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate (**B**) wurde ein zentrales Galactosamin-Threonin-Konjugat (**T_N-Antigen**) herangezogen, welches bereits als Akzeptor in Glycosylierungsreaktionen zum Aufbau der tumorassoziierten MUC1-Kohlenhydratantigene eingesetzt wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte die Synthese dieses Bausteins nach einer literaturbekannten Route und in Anlehnung an *Paulsen* und *Hölck* bewerkstelligt werden.^[141, 207] Der Aufbau der fluorierten Disaccharid-Bausteine (**D**) erfolgte unter Verwendung von funktionalisierten Monosaccharid-Bausteinen (**F-Gal**)^[190, 208-209], welche in geeignete Glycosyldonoren überführt wurden. Die resultierenden fluorierten T-Antigen-Analoga konnten mit Hilfe des Sialinsäurexanthogenats (**Sia**)^[210-211] in die fluorierten (2,6)-ST-Antigen-Bausteine (**B**) überführt werden, welche nach Schutzgruppenmanipulation und Deblockierung des *tert*-Butylesters der Glycosylaminosäure mittels Glycopeptid-Festphasensynthese zum Aufbau von mucinartigen Glycopeptiden verwendet werden konnten.

Daneben sollte auch ein Zugang zu einer Reihe von regioisomeren (2,3)-ST-Antigen-Bausteinen geschaffen werden, welche als zentrale Akzeptorbausteine (**Glycosylakzeptor**) für den Aufbau der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate (**A**) eingesetzt wurden. Diese konnten wiederum aus den vier monosaccharidischen Bausteinen **GalN**, **Gal/F-Gal**, **Sia** sowie der orthogonal-funktionalisierten Aminosäure (**Thr**) aufgebaut werden.



Schema 3. 1: Die Retrosynthese der Oligosaccharid-Threonin-Konjugate und der fluorierten Analoga.

3.1.2 Die Synthesestrategie zum Aufbau der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate und der fluorierten Analoga des Sialophorins

Der Aufbau der komplexen Hexasaccharid-Threonin-Derivate (**A**) sowie der fluorierten Analoga erfolgte in Analogie zu den sialylierten Trisaccharid-Bausteinen (**B**) nach einer konvergenten Synthesestrategie. Besondere Bedeutung bei der Erarbeitung eines geeigneten Schutzgruppenkonzeptes für die vorgestellten Synthesen kam einerseits der Wahl der anomeren Schutzgruppe des Glucosamin-Bausteins (**GlcN**) als auch der Aminogruppe dieser zentralen Einheit zu. Zudem musste das Schutzgruppenmuster mit Blick auf die geringere Reaktivität der fluorierten Monosaccharid-Bausteine (**F-Gal**) angepasst werden:

So kamen zum einen benzylether-geschützte Monosaccharid-Bausteine zum Einsatz, welche die höhere Reaktivität dieser blockierten Bausteine im Vergleich zu solchen mit Acetatschutzgruppen ausnutzten und zum anderen bessere Selektivitäten in den durchgeführten Glycosylierungen sicherstellten. Entsprechende Vorarbeiten unter anderem durch *C. Mersch*^[209] konnten diese Annahmen bestätigen.

Demgegenüber sind Kohlenhydratbausteine mit Acetylgruppen für die Glycopeptidsynthese von Vorteil, da sie sich leicht unter den Bedingungen einer *Zemplén*-Umesterung^[212] entfernen lassen und zudem zu einer Erhöhung der Säurestabilität von glycosidischen Bindungen führen.^[213] Eventuellen Beeinträchtigungen der Reaktivität solcher acetyl-geschützter Bausteine für den Aufbau von Oligosaccharid-Konjugaten konnte durch eine geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen sowie der eingesetzten Lösungsmittel in den Glycosylierungsreaktionen begegnet werden.

Für die Synthesen der fluorierten Glycosyldonoren (**F-Gal**)^[190, 208-209] wurde daher ein Schutzgruppenkonzept vorgesehen, welches zur Blockierung der reaktiven Hydroxylgruppe an der 6-Position einen Benzylether in Kombination mit Acetylschutzgruppen für die anderen Positionen vorsah. Zudem ließ sich dieses Schutzgruppenkonzept mit dem zentralen Glucosamin-Baustein (**GlcN**)^[214] auf diese Weise in Einklang bringen.

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Konzeption der einzelnen Schutzgruppen mussten für den zentralen Glucosamin-Baustein geeignete Bedingungen gefunden werden, welche sowohl die stereoselektive Produktbildung unter Einbeziehung partizipierender Nachbargruppen in der 2-Position der Kohlenhydratbausteine berücksichtigten sowie dirigierende Einflüsse durch die Wahl geeigneter Lösungsmittel („*Nitrileffekt*“)^[215] ausnutzten. Weiterhin musste die Erhaltung der übrigen Funktionalitäten im Zusammenhang mit späteren Schutzgruppenmanipulationen sichergestellt werden. Die Synthese des zentralen Glucosamin-Bausteins (**GlcN**) erforderte hierbei sowohl eine geeignete Schutzgruppe der anomeren Position als auch der Aminofunktion in der 2-Position des Kohlenhydrats. Hierfür geeignete Schutzgruppen stellen sowohl Glycoside auf Basis von allyl-geschützten Bausteinen^[216-217] sowie Thiodonoren^[218-221], so z.B. unter Verwendung eines *para*-Methylthiophenols, dar. Ferner können sterisch anspruchsvolle silyl-basierte Schutzgruppen wie das *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS)^[222]-Glycosid zum Einsatz kommen. All diese Funktionalitäten lassen sich unter einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen selektiv in Gegenwart anderer Schutzgruppen spalten bzw. werden nicht infolge von Schutzgruppenmanipulationen angegriffen.^[223-225] Die Verwendung eines Allyl-Glycosids anstelle des teureren und sterisch anspruchsvolleren Silylglycosids zu Beginn der vielstufigen Synthese wurde durchaus in Betracht gezogen, erwies sich jedoch für die späteren Synthesen der Trisaccharid-Bausteine (**E**) unter Einsatz des Sialinsäuredonors (**Sia**) als ungeeignet, da Allylglycoside durch den verwendeten weichen elektrophilen Promotor, welcher für die Aktivierung des Xanthogenats genutzt wird, angegriffen werden können. Ähnliche Beobachtungen werden bei der Verwendung eines Glucosamin-Bausteins

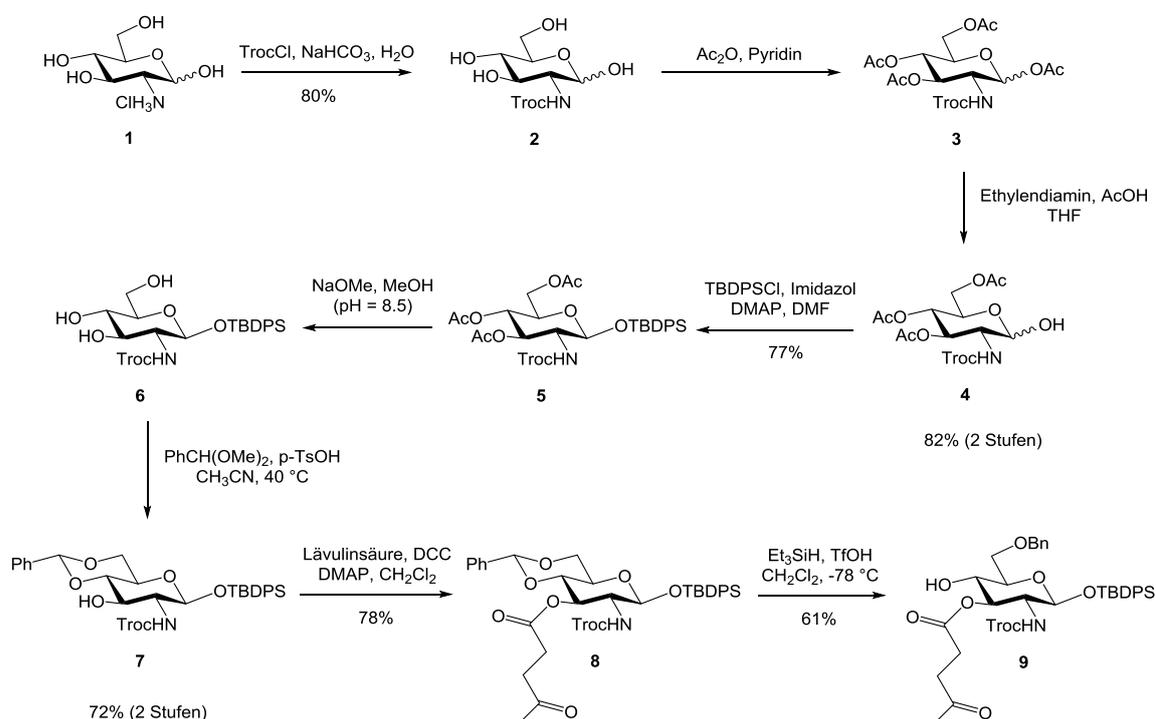
als Thioglycosid gemacht.^[218] Zudem bestand die Möglichkeit einer Schutzgruppenmanipulation auf der Stufe der Disaccharid-Bausteine (**F**) unter Spaltung des Allyl- bzw. Thioglycosids und der darauffolgenden Einführung der TBDPS-Schutzgruppe. Aufgrund des bereits erwähnten großen sterischen Anspruchs der Silylschutzgruppe wurde in Anbetracht eines eventuellen Verlusts der Disaccharid-Bausteine im Zuge einer unzureichenden Umsetzung diese Manipulation nicht in Erwägung gezogen. In dieser Arbeit fiel daher die Wahl auf diese Silylschutzgruppe zur Blockierung des anomeren Kohlenstoffatoms des Glucosamin-Bausteins zu Beginn der vielstufigen Synthese, da die entsprechenden Reaktionsschritte auf der Stufe der wertvollen Disaccharid-Bausteine (**F**) sich so vermeiden lassen konnten. Wie zuvor bereits erwähnt, erforderte ebenso die Blockierung der Aminofunktion der Glucosamin-Einheit gesonderte Beachtung, da für die gewünschten β -glycosidisch verknüpften Hexasaccharid-Threonin-Konjugate (**A**) eine partizipierende Schutzgruppe bei der Aktivierung des Glycosyldonors zum Einsatz kommen musste. Eine vielversprechende Schutzgruppe für die Aminofunktion bot die Verwendung einer Carbamat-Schutzgruppe, genauer der *N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonyl(Troc)^[226-227]-Gruppe, welche sich im Verlauf der Synthese unter milden reduktiven Reaktionsbedingungen in Gegenwart einer Vielzahl anderer funktioneller Gruppen selektiv spalten ließ und in das entsprechende Acetamid überführt werden konnte.

Der Aufbau der sialylierten Trisaccharid-Einheiten (**E**) und ihrer fluorierten Analoga erfolgte ebenfalls in linearen Syntheserouten, die sich an Arbeiten für die Herstellung von Sialyl-Lewis^x-Derivaten^[214, 228] orientierten und welche auf bewährte Strategien für die Synthese fluorierter Galactosyldonoren^[190, 208-209] fußten. Für die Darstellung der neuartigen Hexasaccharid-Threonin-Konjugate mit den fluorierten Analoga wurde auf literaturbekannte Strategien zum Aufbau tumorassoziierter Kohlenhydratantigene des MUC1 zurückgegriffen,^[141, 173, 187, 210, 229] bevor die Trisaccharid-Glycosyldonoren (**C**) – unter Verwendung der (2,3)-ST-Antigen-Bausteine (**Glycosylakzeptor**) – letztendlich zu den komplexen, an die Aminosäure gebundenen Oligosaccharid-Threonin-Konjugaten und ihrer fluorierten Analoga umgesetzt werden konnten.

3.2 Die Synthesen der Monosaccharid-Bausteine

3.2.1 Synthese der Glucosamin-Bausteine

Für die Synthese des Glucosamin-Bausteins **9** mit *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS)-Schutzgruppe wurde von α -D-Glucosamin-Hydrochlorid (**1**) ausgegangen. Die Synthese des Silylglucosids **9** startete zunächst mit der Blockierung der Aminofunktion von **1** als Carbamat **2**, indem das Hydrochlorid **1** mit Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester (Trichlorethoxycarbonylchlorid, TrocCl) in einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung (Schema 3.2) umgesetzt wurde.^[230]

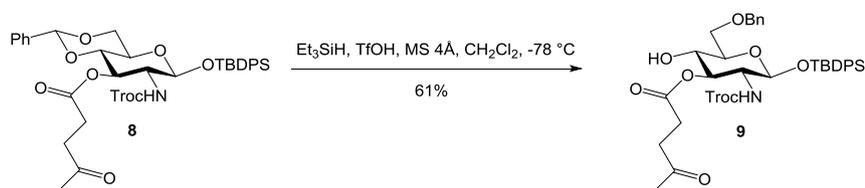


Schema 3. 2: Die Synthese des Glucosamin-Bausteins **9**.

Das an der Aminogruppe als Carbamat blockierte Produkt **2** wurde nach Filtration der Lösung als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 80% erhalten und konnte im Anschluss vollständig acetyliert werden.^[230] Das peracetylierte Glucosaminderivat **3** wurde dabei als Anomerengemisch erhalten, wobei dies für die weitere Reaktionskaskade nicht von Bedeutung war. Für die Einführung der anomeren TBDPS-Schutzgruppe wurde zunächst die selektive Spaltung der anomeren Acetylgruppe der Glucosamin-Einheit durch Bildung eines Imins mit Ethylendiamin und dessen sauren Hydrolyse durchgeführt.^[231] Das deblockierte Glucosaminderivat **4** wurde in einer Ausbeute von 82% bezogen auf die Troc-geschützte Verbindung **2** und in Form eines Anomerengemischs erhalten. Im Anschluss wurde Verbindung **4** mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid) und Imidazol in Gegenwart katalytischer Mengen an 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP)^[232] zur Reaktion gebracht.^[222, 233] Die Einführung der TBDPS-Gruppe erfolgte aufgrund des sterischen Anspruchs der Silylschutzgruppe selektiv und unter Bildung des β -Anomers **5** in einer Ausbeute von 77% nach flash-chromatographischer Reinigung erfolgen. Der Darstellung des Silylglucosids **5** schloss sich eine Umesterung

unter *Zemplén*-Bedingungen^[212] mit einer frisch hergestellten methanolischen Natriummethanolat-Lösung und unter sorgfältiger pH-Kontrolle an, da höhere pH-Werte als 8.5 zu einem Verlust der Troc-Schutzgruppe führen.^[234] Die erhaltene Verbindung **6** konnte im nächsten Reaktionsschritt in Gegenwart von Benzaldehyddimethylacetal sowie katalytischen Mengen an 4-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (p-TsOH) zum 4,6-Benzylidenacetal geschützten Baustein **7** umgesetzt werden (72% über zwei Stufen). Der geschützte Glucosamin-Baustein **7** wurde anschließend durch Veresterung der freien Hydroxylgruppe mit Hilfe von *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Lävulinsäure sowie katalytischer Mengen an 4-DMAP in der 3-Position vollständig blockiert.

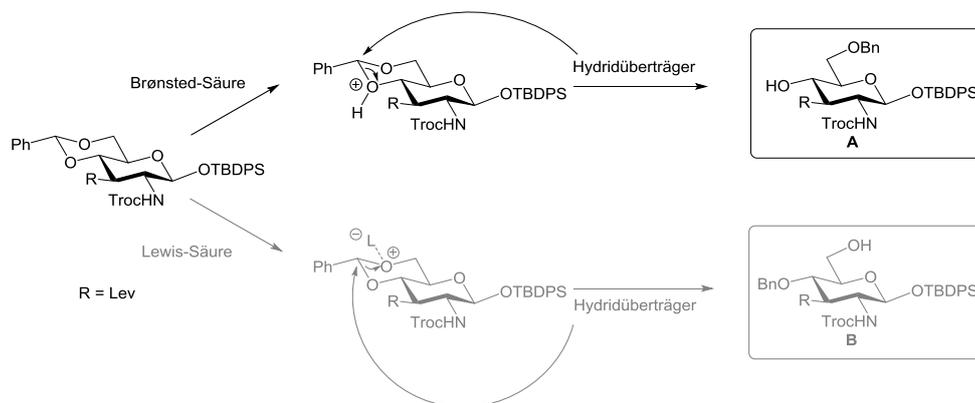
Um den Glucosamin-Baustein **8** als einen geeigneten Glycosylakzeptor für die nachfolgenden Glycosylierungen mit den funktionalisierten Galactosyldonoren einsetzen zu können (vgl. Kapitel 3.3), musste das 4,6-Benzylidenacetal von Verbindung **8** regioselektiv unter Bildung des primären Benzylethers geöffnet werden. Hierzu wurde eine von *DeNinno et al.*^[235] vorgestellte Methode unter Verwendung von Trifluormethansulfonsäure (TfOH) und Triethylsilan (Et₃SiH) als Reduktionsmittel eingesetzt, die eine Variante der von *Sakagami et al.*^[236] verwendeten Methode darstellt (Schema 3.3).



Schema 3. 3: Die regioselektive Öffnung des Benzylidenacetal geschützten Glucosamin-Bausteins **9**.

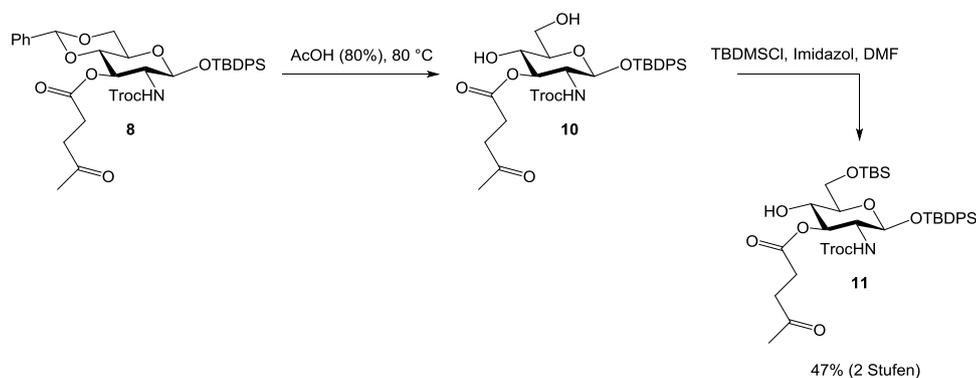
Diese Methode der Acetalöffnung stellt jedoch lediglich eine von vielen bewährten Varianten dar.^[237] Eine alternative Umsetzung, so z.B. mit Kupfer(II)-trifluormethansulfonat (Cu(OTf)₂) sowie Dimethylethylsilan (Me₂EtSiH)^[238] als Reduktionsmittel bietet bei ähnlichem präparativen Aufwand jedoch keine eindeutige Regioselektivität weshalb Produktgemische aus primären und sekundären Benzylethern resultieren können.^[238] Die Regioselektivität der Acetalöffnung kann hierbei in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen kontrolliert werden. Es sei hier jedoch angemerkt, dass bei der Verwendung von Cu(OTf)₂ als Lewis-Säure die Regioselektivität der Hydridübertragung vom eingesetzten Reduktionsmittel stark beeinflusst wird.^[238-239] Eine weitere Variante zur regioselektiven Acetalöffnung stellt die *Garegg-Methode* unter Verwendung von Natriumcyanoborhydrid und einer gesättigten Lösung von Chlorwasserstoff in Diethylether^[240] dar, die jedoch durch Borverunreinigungen im späteren Verlauf für die hier beabsichtigten Synthesen nicht praktikabel war. So lassen sich mit dieser Lewis-Säure in Gegenwart eines voluminösen Hydridüberträger wie z.B. Dimethylethylsilan (Me₂EtSiH) Benzylidenacetale mit hoher Selektivität zu den primären Benzylethern umsetzen, wohingegen der Einsatz eines Boran-THF-Komplexes vorrangig zur Öffnung des Acetals unter Bildung des sekundären Ethers führt. Die Regioselektivität der Acetalöffnung des Glucosamin-Bausteins **8** kann auf die Verwendung von Trifluormethansulfonsäure (TfOH) als Brønsted-Säure zurückgeführt werden, da es im Verlauf der Reaktion zu einer Protonierung des Sauerstoffatoms an der 4-Position des Kohlenhydrats kommt, so dass die Hydridübertragung durch das Reduktionsmittel „von der Oberseite“ erfolgt und in einer Öffnung des Acetals unter Bildung des entsprechenden primären Benzylethers **A** resultiert (Schema 3.4).^[239] Wird hingegen eine voluminöse Lewis-Säure wie z.B. Aluminiumtrichlorid (AlCl₃) oder Bortrifluorid-Diethyletherat (BF₃·Et₂O) eingesetzt, so greift diese am sterisch weniger gehinderten Sauerstoffatom

an der 6-Position des Kohlenhydrats an, woraufhin die anschließende Hydridübertragung, welche in diesem Fall „von der Unterseite“ erfolgt, zur Ausbildung des sekundären Benzylethers **B** führt.



Schema 3. 4: Der Mechanismus der regioselektiven Benzylidenacetalöffnung unter Bildung der primären bzw. sekundären Benzylether.

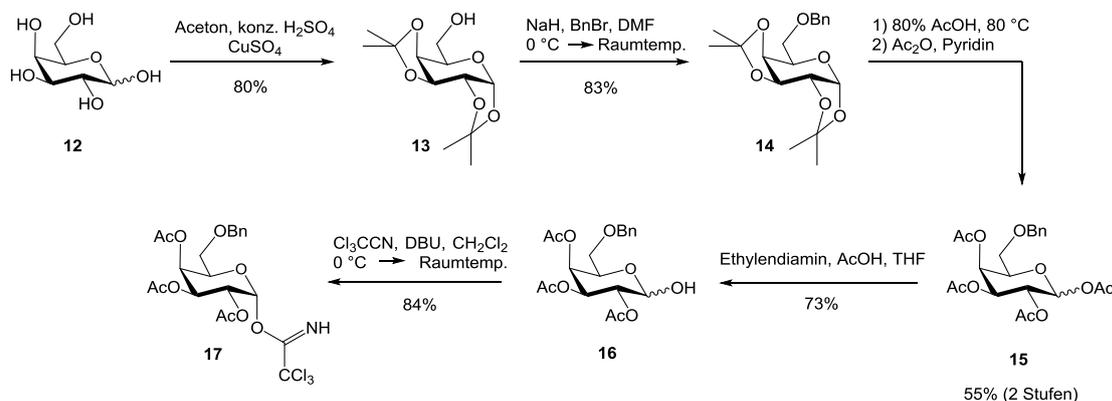
Die regioselektive Acetalöffnung mit der Brønsted-Säure Trifluormethansulfonsäure und Triethylsilan unter Bildung des an der 4-Position unsubstituierten Glucosamin-Bausteins **9** konnte in einer Ausbeute von 61% bewerkstelligt werden. Für die spätere Darstellung an der 6-Position der Glucosamin-Einheit fluorierter Disaccharid-Derivate (vgl. Kapitel 3.3.2) wurde ausgehend von Verbindung **8** das Benzylidenacetal entfernt (Schema 3.5). Hierzu wurde Verbindung **8** in 80%-iger Essigsäure aufgenommen und das Rohprodukt **10** im nächsten Reaktionsschritt selektiv in Gegenwart von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) sowie Imidazol zum primären Silylether **11** in einer Ausbeute von 47% über zwei Stufen umgesetzt.



Schema 3. 5: Die Synthese des modifizierten Glucosamin-Bausteins **11**.

3.2.2 Synthese des Galactose-Bausteins und der fluorierten Analoga

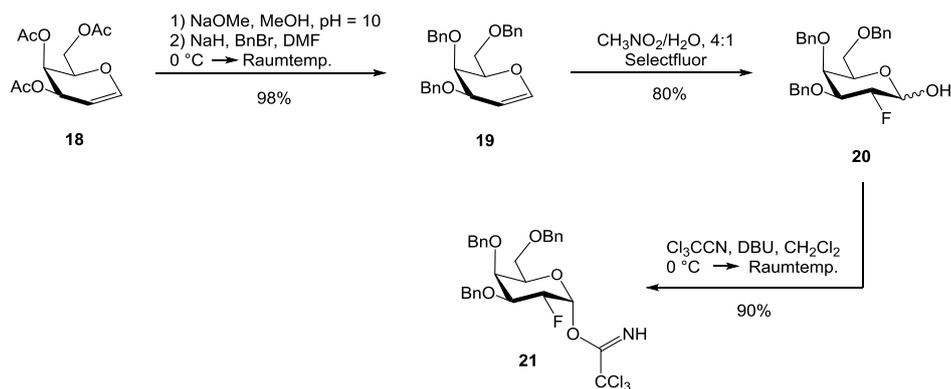
Der natürliche Galactose-Baustein **17** konnte über fünf Stufen nach einer literaturbekannten Route ausgehend von D-Galactose (**12**) aufgebaut werden (Schema 3.6).^[135, 241] Hierzu wurde D-Galactose (**12**) zunächst in einer durch Schwefelsäure katalysierten Umsetzung mit Aceton in Gegenwart von wasserfreiem Kupfer(II)-sulfat als Diisopropylidenacetal **13** blockiert.



Schema 3. 6: Die Synthese des natürlichen Galactose-Bausteins **17**.

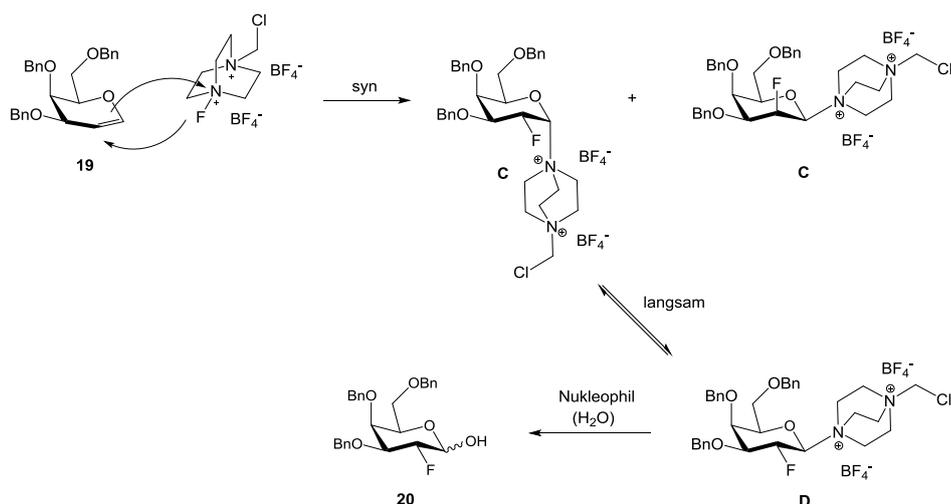
Die primäre Hydroxylfunktion konnte anschließend mit Natriumhydrid sowie Benzylbromid in den Benzylether **14** in einer Ausbeute von 83% überführt werden. Die darauffolgende saure Hydrolyse der Acetalfunktion führte zur vollständigen Deblockierung der eingesetzten Verbindung **14**, welche im zweiten Reaktionsschritt einer Acetylierung in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) unterworfen wurde. Das Produkt **15** wurde als Anomerengemisch mit einer Ausbeute von 55% bezogen auf den eingesetzten Benzylether **14** erhalten. Für die geplanten Glycosylierungsreaktionen musste die anomere Acetylgruppe selektiv entfernt werden. Hierzu wurde Verbindung **15** mit Ethylendiamin in Gegenwart von Essigsäure in den reduzierenden Zucker **16** überführt, welcher nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 73% als Anomerengemisch erhalten werden konnte. Im letzten Reaktionsschritt dieser Sequenz wurde die Pyranose **16** durch basenkatalysierte Addition an Trichloroacetonitril^[117, 241] α-selektiv in das Trichloroacetimidat **17** in 84% Ausbeute überführt. Die Bildung des Glycosyldonors **17** konnte hierbei selektiv unter thermodynamischen Reaktionsbedingungen für solche Trichloroacetimidate erfolgen. Der natürliche Galactose-Baustein **17** konnte somit für die späteren Galactosylierungen zum Aufbau des Disaccharid-Bausteins **65** (vgl. Kapitel 3.3.1) bzw. für die Synthese des Disaccharid-Threonin-Konjugats **116** (vgl. Kapitel 3.5.2) eingesetzt werden.

Neben der Synthese des natürlichen Galactose-Bausteins **17** erfolgte weiterhin der Aufbau von unterschiedlich fluorierten Monosaccharid-Bausteinen, um deren Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften des Kohlenhydratepitops zu untersuchen. Der Aufbau des einfach-fluorierten Galactosyldonors **21** mit Benzyletherschutzgruppen erfolgte über drei Stufen ausgehend von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**18**) (Kapitel 3.5.1) nach einer literaturbekannten Syntheseroute, welche von *C. Mersch* beschrieben wurde (Schema 3.7).^[209]



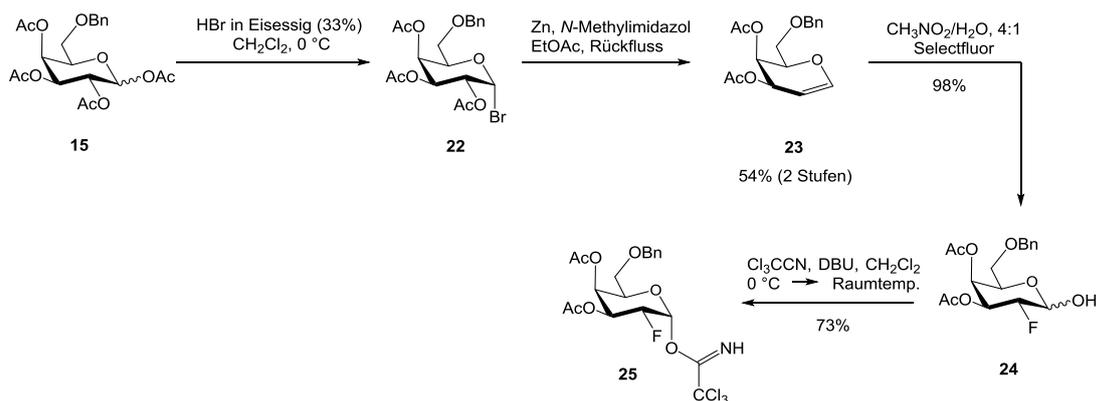
Schema 3. 7: Die Synthese des an der 2-Position fluorierten benzyl-geschützten Galactose-Bausteins **21**.

Zunächst wurde das Galactal **18** durch Behandlung mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung unter *Zemplén*-Bedingungen^[212] vollständig deblockiert und im zweiten Schritt in Gegenwart von Natriumhydrid sowie Benzylbromid in das Benzylgalactal **19** überführt. Dieses wurde anschließend einer Umsetzung mit Selectfluor[®]^[242] in einer Mischung aus Nitromethan/Wasser (4:1) unterworfen und lieferte das Fluorierungsprodukt **20** als Anomerengemisch in einer Ausbeute von 80% nach flashchromatographischer Reinigung (Schema 3.8).^[178, 243-244]



Schema 3. 8: Der Mechanismus der elektrophilen Fluorierung mit Selectfluor[®] in Anlehnung an Vincent et al. 1999.^[178]

Die Einführung des Fluorsubstituenten in der 2-Position des Kohlenhydrats konnte hierbei über eine elektrophile Fluorierung des eingesetzten Galactals **19** bewerkstelligt werden. Dem zugrundeliegenden Mechanismus nach kommt es zunächst zur Bildung eines anomeren *N*-Glycosids **C**, welches aus der syn-Addition von Selectfluor[®] an das Glycal **19** gebildet wird. Dieses Intermediat unterliegt einer Anomerisierung infolge der höheren Stabilität des β -anomeren *N*-Glycosids **D**, welches in Gegenwart des anwesenden Nucleophils, zum anomeren Gemisch der Pyranose **20** abgefangen werden kann. Das erhaltene Anomerengemisch **20** konnte abschließend durch basenkatalysierte Addition an Trichloracetnitril^[117, 241] in einen geeigneten Galactosyldonor überführt und als Trichloracetimidat **21** α -selektiv mit einer Gesamtausbeute von 71% über drei Stufen erhalten werden. Die Synthese des analogen 2-Fluorgalactosyldonors **25**, der nur einen Benzylether an C6 trägt, erforderte einen leicht abgewandelten Reaktionsweg und erfolgte ausgehend von 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α / β -D-galactopyranose (**15**) über vier Stufen (Schema 3.9).

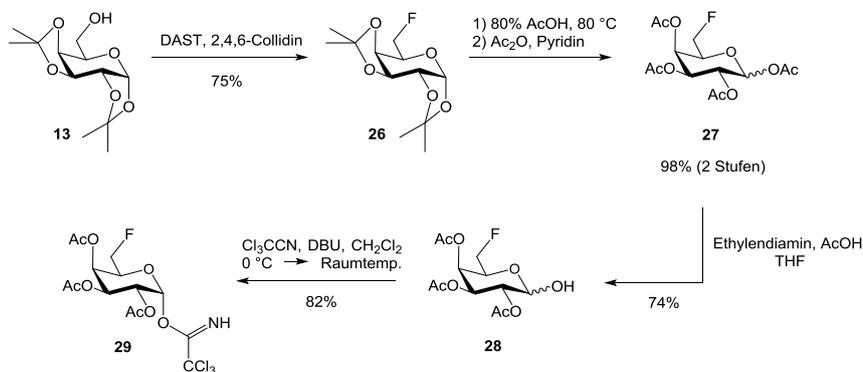


Schema 3. 9: Die Synthese des an der 2-Position fluorierten acetyl-geschützten Galactose-Bausteins **25**.

Das Bromid **22** konnte hierbei durch Reaktion von Verbindung **15** mit einer Lösung von Bromwasserstoff (33%-ig in Eisessig) in absol. Dichlormethan erhalten werden. Durch die erhöhte Reaktivität des eingesetzten Bromids **22** musste die Umsetzung im Zuge des Reaktionsverlaufs streng kontrolliert werden. Um eine sauerkatalysierte *O*-Debenzylierung unter Zersetzung der Verbindung zu vermeiden, musste die Reaktion bereits nach einer Dauer von 30 Minuten abgebrochen werden. Die erhaltene Verbindung **22** konnte im Anschluss in einer reduktiven Zink-vermittelten Eliminierungsreaktion in Gegenwart von *N*-Methylimidazol in das Galactal **23** in einer Ausbeute von 54% (bezogen auf Tetraacetat **15**) überführt werden.

Die bereits zuvor beschriebene Einführung des Fluorsubstituenten in der 2-Position der Galactose konnte auch hier durch elektrophile Addition in Gegenwart von Selectfluor[®] sowie Wasser unter Bildung des gewünschten Produkts **24** erfolgen. Zum Abschluss der Reaktionssequenz wurde die Galactopyranose **24** in das entsprechende Trichloracetimidat **25** durch basenkatalysierte Addition an Trichloracetonitril in einer Ausbeute von 73% unter Bildung des thermodynamisch stabileren α -Anomers überführt. Die beiden in der 2-Position fluorierten Monosaccharid-Bausteine **21** und **25** konnten nun für den Aufbau des entsprechenden Disaccharid-Bausteins (vgl. Kapitel 3.3) bzw. das Disaccharid-Threonin-Konjugat (vgl. Kapitel 3.5.2) eingesetzt werden.

Daneben wurde ein an der 6-Position fluorierter Galactosyldonor ausgehend von Diisopropylidenacetalgeschützter Galactose **13** als Trichloracetimidat **29** über vier Stufen hergestellt (Schema 3.10).



Schema 3. 10: Die Synthese des an der 6-Position fluorierten acetyl-geschützten Galactose-Bausteins **29**.

Zur Einführung von Fluoratomen durch nucleophile Substitution kommen häufig Reagenzien wie Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST[®])^[243], dessen Analogon das Bis(2-methoxyethyl)-aminoschwefeltrifluorid (DeoxofluorTM)^[245] sowie das entsprechende Tetrafluorborat ((Diethylamino)-difluorsulfoniumtetrafluoroborat, XtalFluor-E[®]) zum Einsatz (Abb. 3.1).

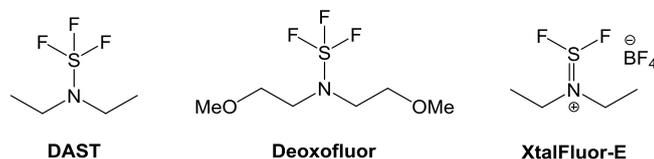
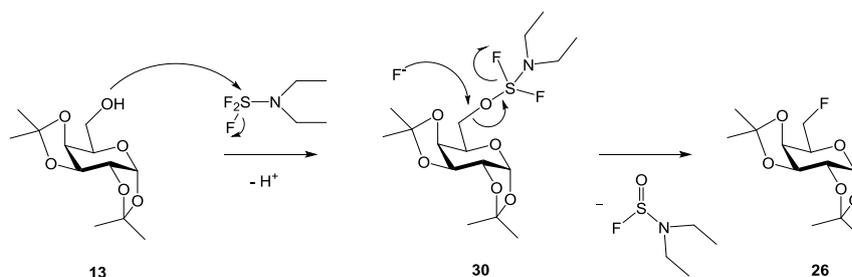


Abb. 3. 1: Nucleophile Fluorierungsmittel DAST[®], DeoxofluorTM und XtalFluor-E[®].

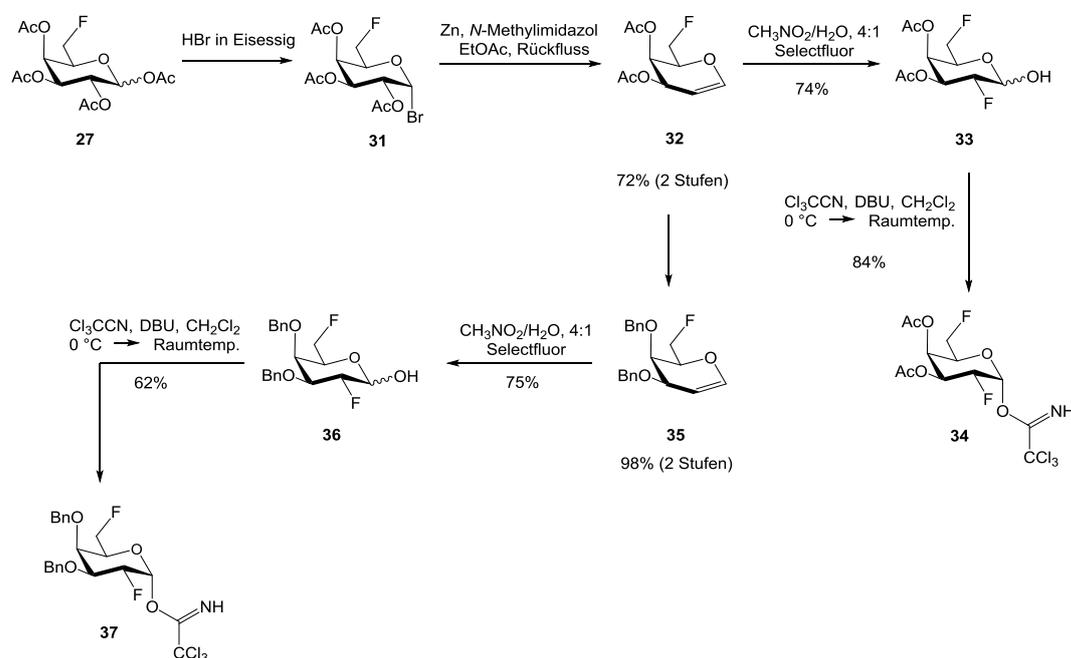
Beispielsweise wurde Verbindung **13** in einer nucleophilen Fluorierung mit DAST[®] und in Gegenwart von 2,4,6-Collidin zum Fluorierungsprodukt **26** umgesetzt. Die Fluorierung verläuft zunächst unter nucleophilem Angriff der freien primären Hydroxylgruppe an das Schwefelzentrum des Diethylaminoschwefeltrifluorids unter Freisetzung eines Fluorid-Anions (Schema 3.11).



Schema 3. 11: Der Mechanismus der nucleophilen Fluorierung mit DAST[®].^[243]

Das so erzeugte Intermediat **30** kann infolge der erhöhten Austrittstendenz der OSF₂NEt₂-Gruppe in einer Substitutionsreaktion nach S_N2-Mechanismus durch das Fluoridanion unter Bildung des Produkts **26** reagieren. Zur weiteren Umsetzung wurde die fluoridierte Verbindung **26** in 80%-iger Essigsäure aufgenommen und unter Spaltung der Isopropylidenacetale zunächst deblockiert, bevor im zweiten Reaktionsschritt die freien Hydroxylgruppen mit einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) vollständig zum Produkt **27** acetyliert wurden. Für die Darstellung des Galactosyldonors **29** erfolgte nun noch die selektive Deblockierung der anomeren Acetylgruppe durch Umsetzung mit Ethylendiamin in Gegenwart von Essigsäure, bevor die basenkatalysierte Addition an Trichloracetonitril wie zuvor das gewünschte Trichloracetimidat **29** in einer Ausbeute von 82% lieferte. Ausgehend von Verbindung **27** konnten zudem die beiden difluorierten Bausteine **34** und **37** erhalten werden. Hierzu wurde **27** mit Bromwasserstoff in Eisessig (33%-ig) in das α -anomere Bromid **31** überführt, bevor anschließend in einer reduktiven Eliminierung mit aktiviertem Zink und *N*-Methylimidazol das Galactal **32** hergestellt wurde (Schema 3.12). Letzteres konnte erneut durch elektrophile Fluorierung mit Selectfluor[®] in einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) das Produkt **33** liefern, aus welchem nach Addition an Trichloracetonitril in Gegenwart von DBU der fluoridierte Galactosyldonor **34** resultierte.

Die Synthese der benzylether-geschützten Verbindung **37** ließ sich durch Deblockierung des Galactals **32** unter *Zemplén*-Bedingungen bewerkstelligen, bevor unter Verwendung von Natriumhydrid und Benzylbromid das entsprechend benzylierte Produkt **35** in einer Ausbeute von 98% erhalten wurde.

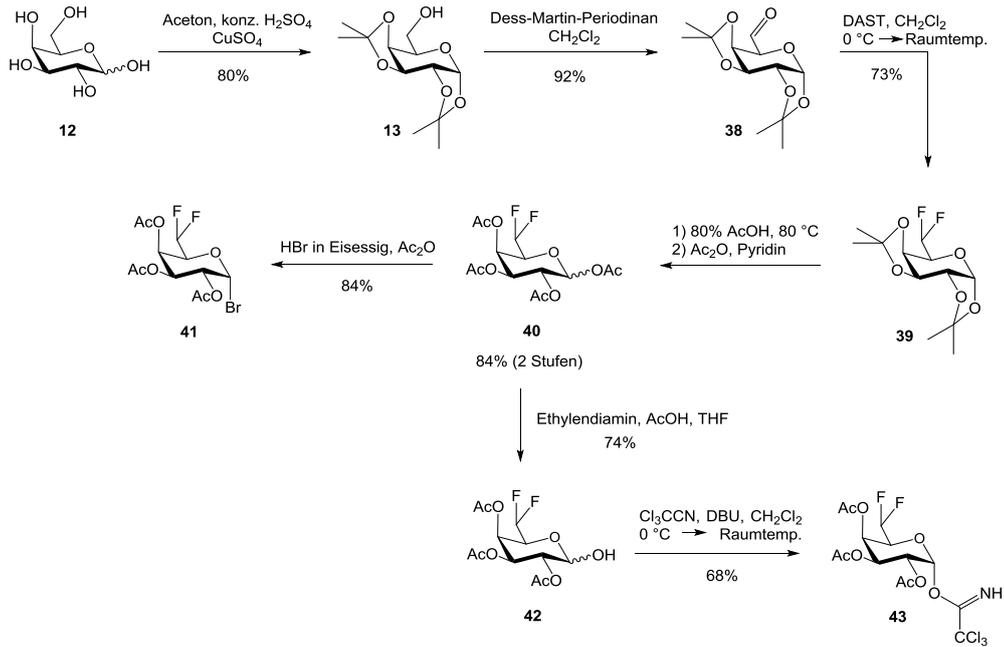


Schema 3. 12: Die Synthese der 2,6-difluorierten Galactose-Bausteine **34** und **37**.

Die Benzylether-Schutzgruppen ermöglichen hierbei eine erhöhte Stereoselektivität in den späteren Glycosylierungsreaktionen zum Aufbau der Disaccharid-Threonin-Konjugate (vgl. Kapitel 3.5.2). Die elektrophile Fluorierung mit Selectfluor[®] sowie die Einführung des Trichloracetimidatrests lieferte den benzylether-geschützten Galactosyldonor **37** in einer Ausbeute von 62%. Die geringere Ausbeute im Vergleich zum acetyl-geschützten Baustein **34** resultierte aus Substanzverlusten bei der säulenchromatographischen Abtrennung von Benzylbromidresten. Analog zur Darstellung des Trichloracetimidats **34** wurde auch hier nahezu ausschließlich das thermodynamisch stabilere α -anomere Produkt **37** erhalten. Die fluorierten Galactosyldonoren **34** und **37** standen somit für die Glycosylierungen zum Aufbau der entsprechenden Disaccharid-Bausteine zur Verfügung.

Die Synthese der in 6-Position difluorierten Bausteine **41** und **43** konnte ausgehend von D-Galactose (**12**) bewerkstelligt werden (Schema 3.13). Hierzu wurde zunächst erneut D-Galactose (**12**) durch sauer-katalysierte Umsetzung mit Aceton und Kupfer(II)-sulfat in das Diisopropylidenacetal **13** überführt, bevor die verbliebene freie OH-Gruppe an C6 in Gegenwart des milden Oxidationsmittels Dess-Martin-Periodinan (DMP)^[246-247] zum Aldehyd **38** oxidiert wurde (92%).

Alternative Umsetzungen so z.B. unter den Bedingungen einer *Swern-Oxidation*^[248] oder bei der Verwendung eines DMSO-Ph₃P×X₂-Komplexes^[249] (X = Br, Cl) führen zum Teil zu aufwändigen Reinigungsschritten und damit zu Substanzverlusten, weshalb sie hier nicht weiter in Betracht gezogen wurden.

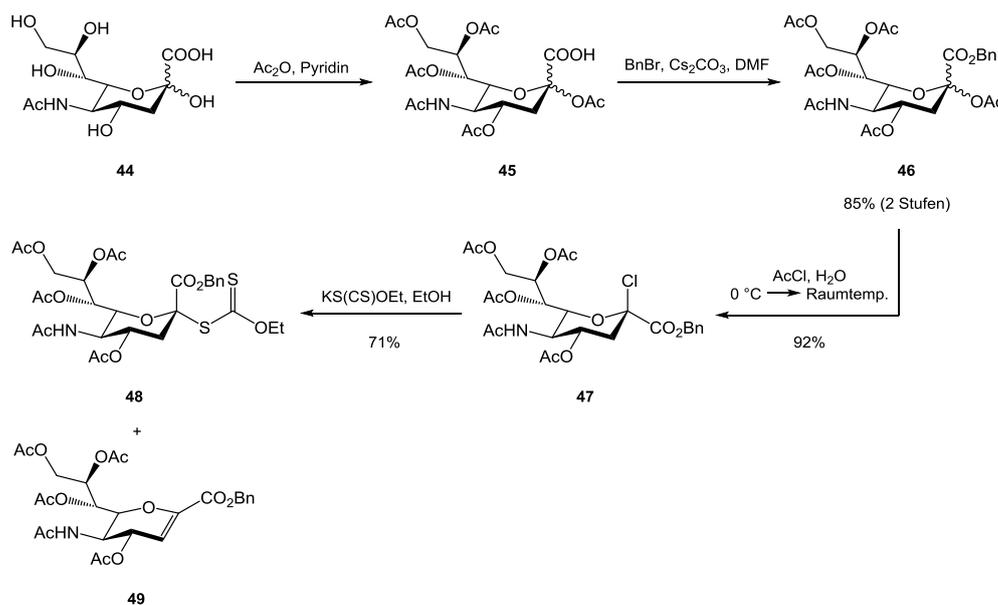


Schema 3. 13: Die Synthese der 6,6-difluorierten Galactose-Bausteine **41** und **43**.

Die doppelte DAST-vermittelte Desoxyfluorierung von Verbindung **38** konnte in Gegenwart von zwei Äquivalenten des Fluorierungsreagenzes^[229] und mit einer Ausbeute von 73% bewerkstelligt werden. Im weiteren Verlauf der Synthese wurde Produkt **39** in 80%-iger Essigsäure zunächst vollständig deblockiert, bevor es mit Pyridin und Essigsäureanhydrid^[208] in das fluoriierte Tetraacetat **40** überführt wurde (84%). Anschließend Umsetzung mit Bromwasserstoff (33%-ig in Eisessig) sowie Essigsäureanhydrid lieferte das α-anomere Bromid **41**,^[208] welches als Donor in einer *Helferich*-Glycosylierung^[250] (vgl. Kapitel 3.5.2) eingesetzt werden sollte. Zudem wurde Verbindung **40** in einer zweistufigen Reaktionssequenz zunächst durch Deblockierung mit Ethylendiamin in Gegenwart von Essigsäure^[231] in den reduzierenden Zucker **42** überführt, welcher durch basenkatalysierte Addition an Trichloracetonitril mit einer Ausbeute von 68% in den analogen *Schmidt*-Galactosyldonor **43** überführt wurde.

3.2.3 Synthese der Neuraminsäure-Bausteine

Für die Darstellung des Neuraminsäurexanthogenats **48** wurde eine lineare Syntheseroute in Anlehnung an *Marra und Sinay*^[210-211] herangezogen, in welcher ausgehend von *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**44**) zunächst die freien Hydroxylgruppen in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) in quantitativer Ausbeute peracetyliert wurden.^[211, 251] Das dabei resultierende Anomerengemisch **45** wurde anschließend in Gegenwart von Cäsiumcarbonat in das entsprechende Carbonsäuresalz überführt und mit Benzylbromid zum anomeren Benzylester **46**^[252] umgesetzt (Schema 3.14).

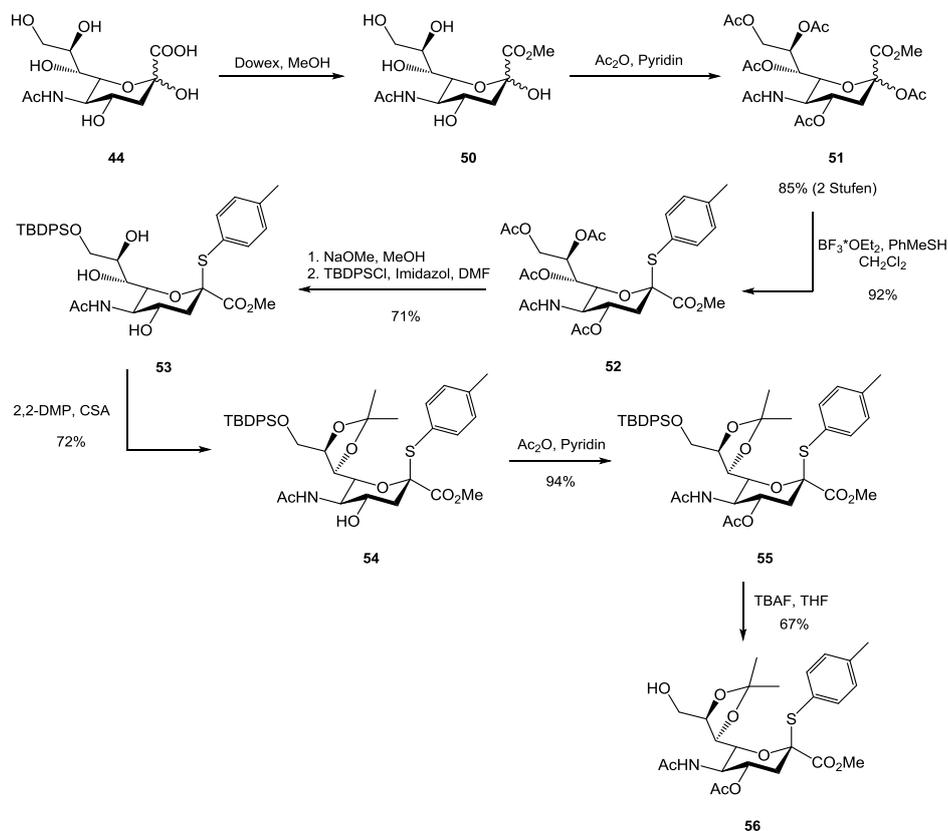


Schema 3. 14: Die Synthese des Neuraminsäure-Bausteins **48**.

Letzterer reagierte mit Acetylchlorid, dem eine geringe Menge an Wasser zugesetzt wurde, zum Chlorid **47**^[210, 251], welches aufgrund des anomeren Effekts ausschließlich als β -Anomer erhalten wurde. Aufgrund der geringen Stabilität des Chlorids **47** wurde das Rohprodukt ohne weitere Reinigung in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Kaliummethylxanthogenat^[211, 251] umgesetzt, wobei der gewünschte Sialinsäuredonor **48** in einer Ausbeute von 71% resultierte. Im Zuge dieses letzten Reaktionsschritts kommt es neben der Bildung des Sialinsäurexanthogenats **48** auch zur Bildung des entsprechenden Glycals **49**, welches sich trotz flashchromatographischer Reinigung nicht vollständig abtrennen ließ. Da das Eliminierungsprodukt **49** jedoch auch während den später anstehenden Sialylierungsreaktionen gebildet wird und es keinen negativen Einfluss auf die Reaktionen ausübt, wurde auf eine vollständige Abtrennung per HPLC verzichtet. Stattdessen wurde in den nachfolgenden Glycosylierungsreaktionen ein 2.5-facher Überschuss an **48** eingesetzt, um dem verminderten Stoffmengenanteil Rechnung zu tragen.

Neben der Synthese dieses natürlichen Neuraminsäure-Bausteins sollte auch ein Zugang zu fluorierten Analoga geschaffen werden, wobei eine Fluorierung der Hydroxylgruppen in der Glycerinseitenkette der Neuraminsäure erreicht werden sollte. Als am einfachsten zugängliche Position bot sich hierzu die primäre Hydroxylgruppe in der 9-Position an. So wurde in Anlehnung an Arbeiten von *Wu et al.*^[253] und ausgehend von *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**44**) zunächst die Einführung eines Methylsters erreicht, indem **44** in Gegenwart des sauren Ionenauschers Dowex[®] 40WX-200 mit Methanol reagierte (Schema 3.15).^[254] Die anschließende Acetylierung von Verbindung **50** erfolgte in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäure-

anhydrid (2:1) und lieferte nach flashchromatographischer Reinigung das vollständig blockierte Produkt **51** in einer Ausbeute von 85% über zwei Stufen.



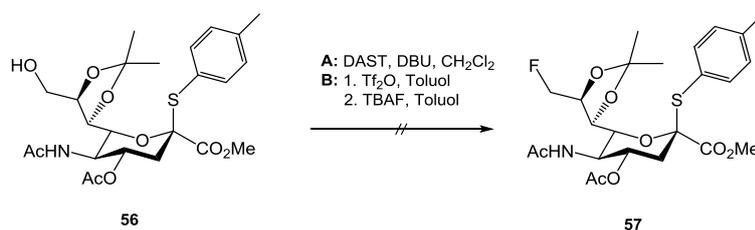
Schema 3. 15: Die Synthese des modifizierten Neuraminsäure-Bausteins **56**.

Die anschließende Einführung eines Thioglycosids an der anomeren C2-Position der Neuraminsäure gelang durch Umsetzung von Verbindung **51** mit *para*-Methylthiophenol (PhMeSH) in Gegenwart der Lewis-Säure Bortrifluorid-Diethyletherat (BF₃*OEt₂), wobei das thermodynamisch stabilere β-Glycosid resultierte. Nach flashchromatographischer Reinigung wurde Verbindung **52** in einer Ausbeute von 92% erhalten und einer Umesterung durch methanolische Natriummethanolat-Lösung bei einem pH-Wert von 11 unterworfen. Der vollständig deblockierte Baustein konnte dann ohne weitere Reinigung in Gegenwart von *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCI) und Imidazol zum primären Silylether **53** umgesetzt werden. Die Einführung der TBDPS-Gruppe gelang aufgrund des sterischen Anspruchs der Silylschutzgruppe sowie der höheren Reaktivität der primären Hydroxylfunktion selektiv an der 9-Position, wobei jedoch auf die sonst übliche Zugabe des *Steglich*-Katalysators 4-DMAP verzichtet werden musste. Die flashchromatographische Reinigung lieferte Verbindung **53** in einer Ausbeute von 71%. Die sauer-katalysierte Blockierung der sekundären Hydroxylgruppen in der 7- und 8-Position der Neuraminsäure erfolgte durch Umsetzung mit 2,2-Dimethoxypropan (2,2-DMP) und Camphersulfonsäure (CSA). Das erhaltene Diol **54** konnte anschließend einer Acetylierung mit einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) unterworfen werden.

Ein alternatives Schutzgruppenmuster, bei dem anstelle des Isopropylidenacetals ebenfalls Acetylgruppen in den Positionen 7 und 8 verwendet werden, wurde nicht berücksichtigt da Wanderungen von Acetatgruppen leicht unter physiologischen Bedingungen an vergleichbaren Bausteinen zu beobachten sind und unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen als wahrscheinlich erachtet werden können.^[255] Für die angestrebte Einführung eines Fluorsubstituenten in der 9-Position der Neuraminsäure wurde Verbindung **55**

in Gegenwart von Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in Tetrahydrofuran umgesetzt. Trotz der an sich starken Triebkraft der Reaktion, die aus der Bildung einer Silizium-Fluorid-Bindung resultiert, erfolgte die Spaltung des Silylglycosids **55** so langsam, dass die Reaktionszeit auf 24 h ausgedehnt werden musste. Der deblockierte Baustein **56** konnte nach flashchromatographischer Reinigung schließlich in einer Ausbeute von 67% erhalten werden.

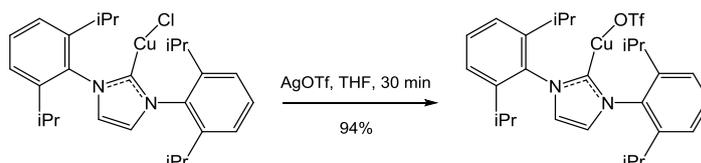
Die nucleophile Einführung des Fluorsubstituenten sollte zunächst durch das bereits in Kapitel 3.2.2 vorgestellte Fluorierungsreagenz DAST[®] erfolgen. Der Einsatz dieses Reagenzes in Gegenwart der Hilfsbase DBU in absol. Dichlormethan führte aber nur zur Bildung eines Eliminierungsprodukts, welches massenspektroskopisch nachgewiesen werden konnte (Schema 3.16). Die fluorierte Verbindung **57** konnte nicht erhalten werden und auch Edukt **56** konnte nicht zurückgewonnen werden. Daher wurde versucht, den Fluorsubstituenten über ein intermediäres Triflat, gefolgt von einer S_N2-Substitution mit TBAF, einzuführen.



Schema 3. 16: Versuch der Fluorierung an der 9-Position unter Verwendung von DAST bzw. TBAF.

Leider führten auch diese Reaktionsbedingungen nicht zum gewünschten Produkt **57** obwohl die Einführung des Triflats zunächst problemlos gelang. Bei der Zugabe von TBAF bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde jedoch erneut die Eliminierung beobachtet.

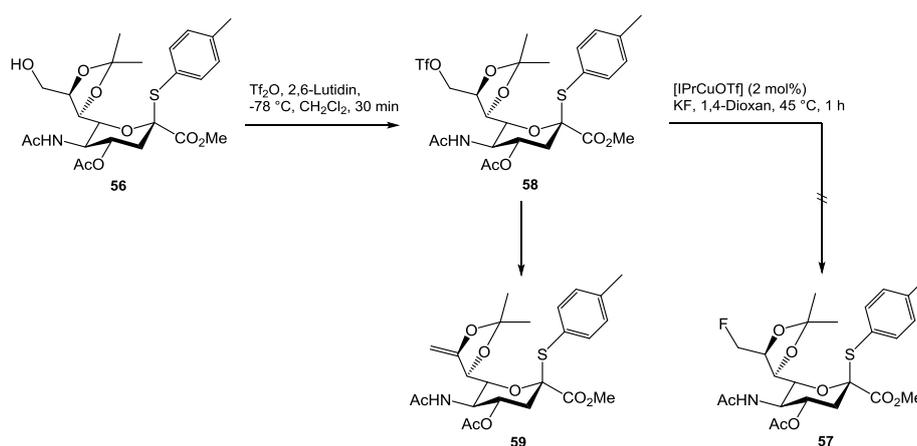
Selbst eine milde Fluorierungsvariante nach *Lalic et al.*^[256] bei der eine milde Kupfer-katalysierte Fluorierung entsprechender Alkyltriflate mit Kaliumfluorid und einem NHC-Liganden verwendet wird, brachte keinen Erfolg. *Lalic et al.* konnten unter Verwendung des NHC-Liganden IPrCuOTf, welcher aus einer Reaktion von IPrCuCl und Silbertrifluormethansulfonat (AgOTf) hervorgeht, als Phasentransferkatalysator eine Kaliumfluorid vermittelte Fluorierung entsprechender Alkyltriflate beschreiben (Schema 3.17). Diese Synthese zeichnet sich durch den Verzicht freier Fluoridionen aus, da diese aus einem Transfer von unlöslichem Kaliumfluorid mit dem IPrCuOTf resultieren. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich Alkyltriflate mit einer hohen Eliminierungstendenz in die entsprechende Fluoride überführen lassen. Das IPrCuCl wurde hierzu in einer Lösung aus absol. Tetrahydrofuran nach einer literaturbekannten Vorschrift in Gegenwart von AgOTf^[257] in den NHC-Liganden überführt, welcher nach Fällung als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 94% erhalten wurde und für die anschließende Fluorierung von Verbindung **56** eingesetzt werden konnte (Schema 3.17).



Schema 3. 17: Synthese des Phasentransferkatalysators IPrCuOTf.

Der an der 9-Position deblockierte Baustein **56** wurde hierfür zunächst in absol. Dichlormethan gelöst, bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zunächst 2,6-Lutidin zugegeben und anschließend bei dieser Temperatur tropfenweise mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf_2O) versetzt. Auf ein nachfolgendes Quenchen des Reaktionsansatzes mit Base, so z.B. mit Natriumhydrogencarbonat bzw. die Zugabe von wässriger Salzsäure wurde in Anbetracht möglicher Ausbeuteverluste verzichtet.

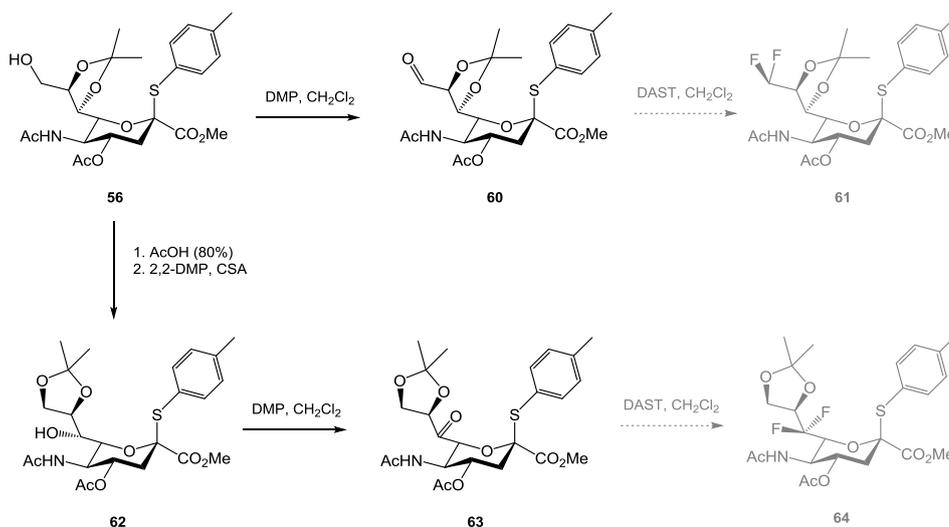
So erfolgte die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes lediglich durch Zugabe einer verd. Schwefelsäure (0.5 M) und anschließende Extraktion mit Dichlormethan. Das intermediäre Triflat **58** wurde für die nachfolgende Substitution einer milden Kupfer-katalysierten Fluorierung in Gegenwart von IPrCuOTf sowie Kaliumfluorid unterworfen (Schema 3.18).



Schema 3. 18: Versuch der Fluorierung unter Verwendung von IPrCuOTf und Kaliumfluorid.

Hierzu wurde ausgeheiztes Kaliumfluorid sowie der Phasentransferkatalysator in einer Lösung aus absol. 1,4-Dioxan vorgelegt und im Anschluss das Triflat **58** in absol. 1,4-Dioxan zugetropft. Dem von *Lalic et al.* postulierten Mechanismus nach kommt es zunächst zu einer *in situ* Bildung des aktivierten Katalysators iPrCuF aus einer Reaktion des Liganden IPrCuOTf mit dem unlöslichen Kaliumfluorid, gefolgt von der Fluorierung des Triflats **58** in Gegenwart von IPrCuF. Die Bildung des gewünschten Produkts **57** resultiert in der Regeneration des Phasentransferkatalysators, welcher in den nächsten Zyklus eintreten kann. Die Darstellung des gewünschten Bausteins **57** konnte auch über diesen Ansatz nicht bewerkstelligt werden und führte abermals zur Bildung des Eliminierungsprodukts **59**.

Der Zugang zu einem solchen Baustein scheint damit lediglich über eine chemoenzymatische Aldolreaktion unter Verwendung eines fluorierten Mannosamin-Derivats sowie Pyruvat zugänglich zu sein. Derartige Reaktionen wurden bereits in der Literatur beschrieben.^[258] Weiterhin kann unter Einsatz fluorierter Pyruvat-derivate eine Substitution innerhalb des Sechsrings erfolgen.^[259] Ausgehend von Baustein **56** sollte weiterhin in Zusammenarbeit mit *Frederik Broszeit* im Rahmen seiner Masterarbeit^[260] der Zugang zu zwei modifizierten Bausteinen geschaffen werden. Zum einen sollte durch Oxidation der primären Hydroxylgruppe mit Dess-Martin-Periodinan die Synthese eines difluorierten Derivats **61** bewerkstelligt werden. Hierbei sollte untersucht werden ob durch Oxidation zum Aldehyd **60** und anschließender Fluorierung der Zugang zu einem difluorierten Derivat **61** möglich ist. Weiterhin sollte in gleicher die Oxidation von Baustein **62** unter Darstellung eines difluorierten Neuraminsäure-Bausteins **64** ermöglicht werden (Schema 3.19).



Schema 3. 19: Angestrebte difluorierte Neuraminsäure-Bausteine **61** und **64**.

Die Darstellung des Bausteins **60** konnte ohne Probleme in Gegenwart von DMP bewerkstelligt werden. Ebenso führte die Schutzgruppenmanipulation von Verbindung **56** unter Spaltung des Isopropylidenacetals mit 80%-iger Essigsäure und erneuter Einführung des Acetals über die 8- und 9-Position zur Darstellung des Neuraminsäure-Bausteins **62**. Abermalige Oxidation von **62** lieferte schließlich Verbindung **63** für eine spätere Fluorierung.

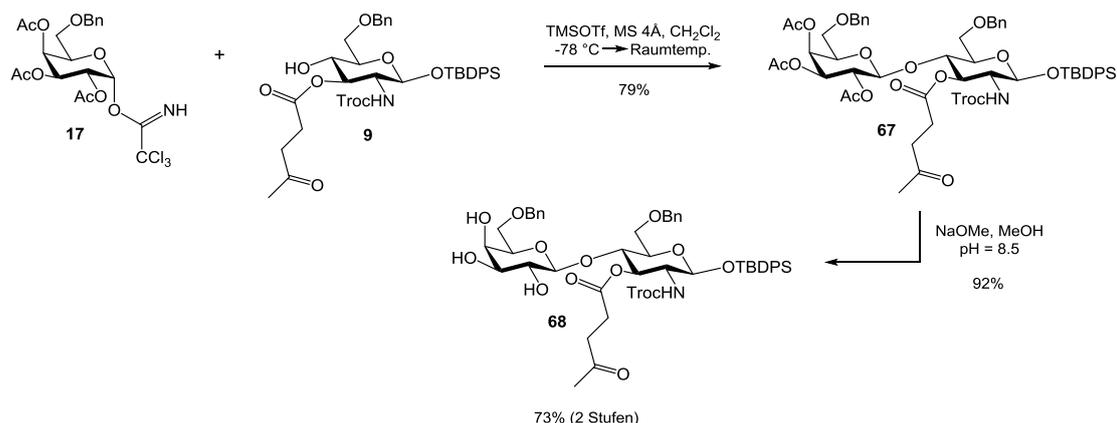
Die beiden Neuraminsäure-Bausteine **61** und **64** konnten im Rahmen der Masterarbeit von Frederik Broszeit nach mehrfacher Umsetzung unter diversen Reaktionsbedingungen nicht dargestellt werden. Überraschenderweise wurden die entsprechenden Carbonylverbindungen **60** bzw. **63** im Zuge der Umsetzung mit dem Fluorierungsreagenz DAST[®] nicht angegriffen bzw. das anomere Thioglycosid bei ausgedehnten Reaktionszeiten substituiert.

3.3 Die Synthesen der Disaccharid-Bausteine

Die zugrundeliegende Synthesestrategie zum Aufbau der Disaccharid-Bausteine bzw. im späteren Verlauf zur Darstellung der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate sah – wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben wurde – zunächst die Galactosylierung des an der 4-Position selektiv deblockierten Glucosamin-Akzeptors **9** mit den funktionalisierten Galactosyldonoren **17**, **25**, **29**, **34** und **43** zum Aufbau der Disaccharid-Bausteine vor. Letztere sollten dann nach Schutzgruppenmanipulation in den Glycosylierungsreaktionen zum Aufbau der regioisomeren (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Bausteine (vgl. Kapitel 3.4) eingesetzt werden.

3.3.1 Synthese des natürlichen Lactosamins

Die Galactosylierung zum natürlichen Disaccharid-Baustein **67** gelang mit dem zuvor beschriebenen Trichloracetimidatdonor **17** unter *Schmidt*-Bedingungen^[261-262], d. h. in Gegenwart der Lewis-Säure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) als Promotor. Das gewünschte Disaccharid **67** konnte hierbei in einer Ausbeute von 79% erhalten werden (Schema 3.20).



Schema 3. 20: Die Synthese des natürlichen Disaccharid-Bausteins **68**.

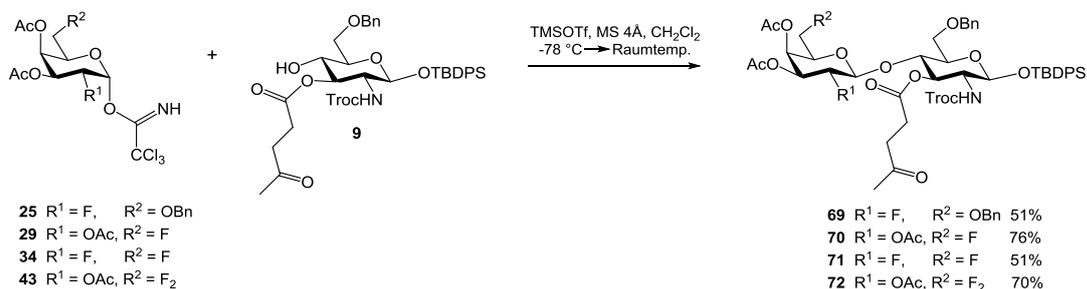
Die ausschließliche Bildung des gewünschten β -glycosidisch verknüpften Produkts **67** konnte aufgrund des dirigierenden Einflusses der nachbargruppenaktiven Acetylgruppe in der 2-Position des Glycosyldonors **17** anhand der NMR-spektroskopisch bestimmten großen Kopplungskonstanten $^3J_{H1,H2}$ von 7.9 Hz für das anomere Proton des Galactosylrests bestimmt werden. Weiterhin konnte im HMBC-Experiment durch eine entsprechende Kopplung zwischen dem Proton in der 4-Position des Glucosamins (H4-GlcN) und dem Kohlenstoffatom-1 der Galactose (C1-Gal) sowie durch einen Kreuzpeak zwischen dem anomeren Proton der Galactose (H1-Gal) und dem Kohlenstoffatom-4 des Glucosamins (C4-GlcN) die gewünschte β -Verknüpfung zweifelsfrei belegt werden.

Um den Disaccharid-Baustein **67** in der nachfolgenden Sialylierungsreaktion (vgl. Kapitel 3.4) einsetzen zu können, mussten zunächst die Acetylschutzgruppen des Galactosylrests unter den Bedingungen einer *Zemplén*-Umesterung^[212] gespalten werden, wobei der deblockierte Disaccharid-Baustein **68** in einer Ausbeute von 92% nach flashchromatographischer Reinigung resultierte. Die Wanderung von Acetylschutzgruppen^[263] an die reaktivere Hydroxyfunktion in der 6-Position war bei deren Spaltung durch die Blockierung mit einem Benzylether nicht möglich. Daher mussten unter Berücksichtigung der ebenfalls basenlabilen

Carbamat-Schutzgruppe des Glucosamin-Bausteins **67** geringe Einbußen in der Ausbeute durch höhere pH-Werte in Kauf genommen werden. Der natürliche Disaccharid-Baustein **68** konnte dennoch in einer Gesamtausbeute von 73% über zwei Stufen bezogen auf den eingesetzten Glucosamin-Akzeptor **9** erhalten werden.

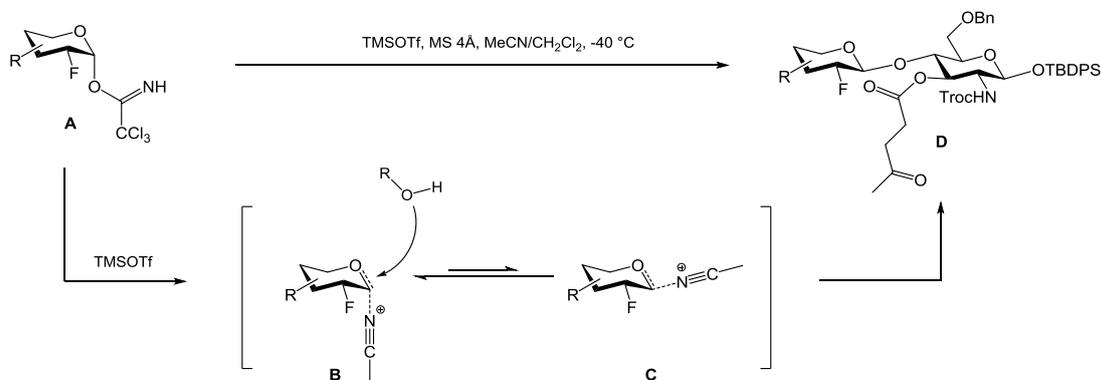
3.3.2 Synthese der fluorierten Lactosamin-Analoga

In Analogie zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Synthese des natürlichen Disaccharid-Bausteins **68** wurden die vier unterschiedlich fluorierten Trichloracetimide **25**, **29**, **34** und **43** mit **9** in Gegenwart der Lewis-Säure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) als Promotor zur Reaktion gebracht (Schema 3.21).



Schema 3. 21: Die Galactosylierungen der fluorierten Disaccharid-Bausteine **69**, **70**, **71** und **72**.

Das häufig verwendete Protokoll für die Umsetzung der Trichloracetimide nach *Schmidt* in einer Lösung aus absol. Dichlormethan wurde für die Synthese der Disaccharid-Bausteine **25** und **34** dahingehend angepasst, so dass die Verwendung eines geeigneten Lösungsmittelgemisches aus Dichlormethan und Acetonitril („Nitrileffekt“)^[215] den fehlenden Nachbargruppeneffekt der eingesetzten Galactosyldonoren **25** und **34** kompensieren sollte, um eine ausreichende stereoselektive Produktbildung in den Galactosylierungen zu gewährleisten. Hierbei kommt es durch Aktivierung der Trichloracetimide (**A**) in Gegenwart der Lewis-Säure TMSOTf zur Bildung der entsprechenden Oxycarbeniumionen, welche unter Koordinierung von Acetonitril in stabilisierte Nitrilium-Addukte (**B/C**) überführt werden und letztendlich unter Kontrolle der Stereoselektivität in die gewünschten β -glycosidischen Produkte überführt werden können (Schema 3.22).

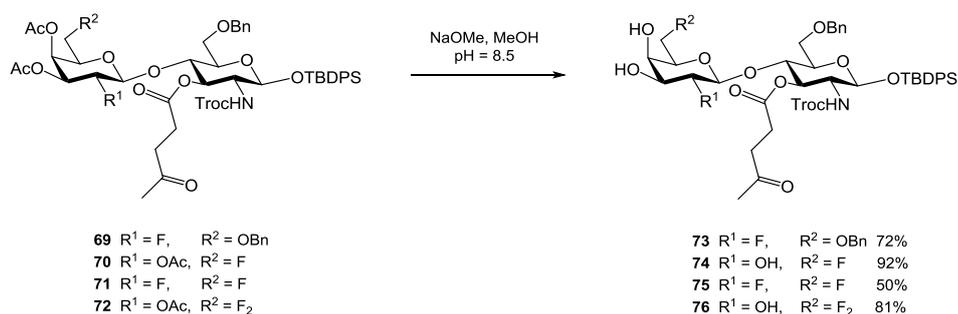


Schema 3. 22: Schematische Darstellung des Nitrileffekts bei der Glycosylierung in 2-Position fluorierter Galactosyldonoren.

Die Bildung der intermediär auftretenden Nitrilium-Addukte kann hierbei sowohl axial als auch äquatorial erfolgen, wobei das Gleichgewicht zwischen den beiden Übergangszuständen durch eine Änderung der Temperatur verschoben werden kann. Die Bildung eines äquatorial-koordinierten Nitrilium-Addukts (**C**) erfolgt vornehmlich bei höheren Reaktionstemperaturen. Hingegen führt die Erniedrigung der Reaktionstemperatur z.B. auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu einer Verschiebung des Gleichgewichts und liefert das axiale α -Nitrilium-Addukt (**B**), welches nach Reaktion mit dem glycosylierenden Alkohol zur favorisierten Bildung des gewünschten β -Glycosids (**D**) führt. Die alleinige Verwendung von Acetonitril zeigt teils nachteilige Effekte hinsichtlich einer wesentlich stärkeren Stabilisierung der intermediären Nitrilium-Addukte **B** und **C**, wobei diese somit nicht vom glycosylierenden Alkohol angegriffen werden können und eine maßgebliche Reduzierung der Ausbeute zur Folge haben.

Unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen konnten die Disaccharid-Bausteine **69** und **71** jeweils in einer Ausbeute von 51% nach flashchromatographischer Reinigung erhalten werden. Für die beiden anderen Disaccharid-Bausteine **70** und **72** verliefen die Galactosylierungen in zufriedenstellenden Ausbeuten von 76% bzw. 70%.

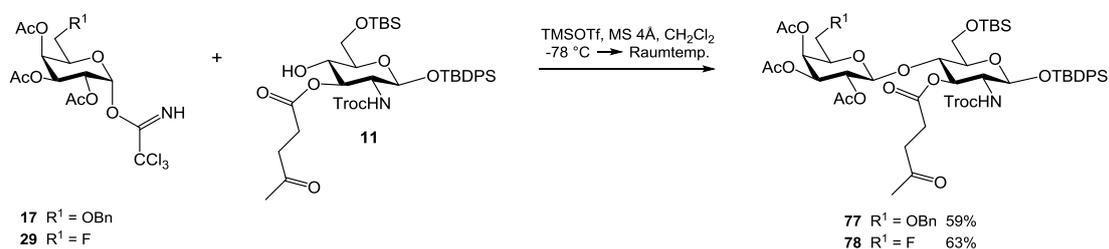
Im Anschluss an die Darstellung der Disaccharid-Bausteine erfolgte die Abspaltung der Acetylenschutzgruppen wiederum mit Hilfe einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung, wobei die vollständig entschützten Disaccharid-Bausteine **73**, **74**, **75** und **76** in Ausbeuten von 50% bis 92% nach Flashchromatographie an Kieselgel erhalten wurden (Schema 3.23). Als mögliche Ursachen für die Differenzen der Ausbeuten für die fluorierten Disaccharid-Bausteine **73** und **75** können zum einen in den beschriebenen Reaktivitätsverlusten solcher Derivate gesehen werden, welche in der Umsetzung mit Natriummethanolat höhere pH-Werte erfordern und somit die basenlabile Carbamat-Schutzgruppe beeinträchtigen. Entsprechende Beobachtungen konnten in massenspektrometrischen Proben nachgewiesen werden. Zudem können die Fluorsubstituenten aufgrund ihres elektronenziehenden Charakters die gewünschte Umesterung erschweren. Weiterhin können mögliche Substanzverluste bei den flashchromatographischen Reinigungsschritten hierfür von Bedeutung sein und beispielsweise eine Passivierung des Kieselgels unter Zusatz von Triethylamin auf dieser Stufe erforderlich machen.



Schema 3. 23: Die Zemplén-Verseifung zur Bildung der fluorierten Disaccharide **73** – **76**.

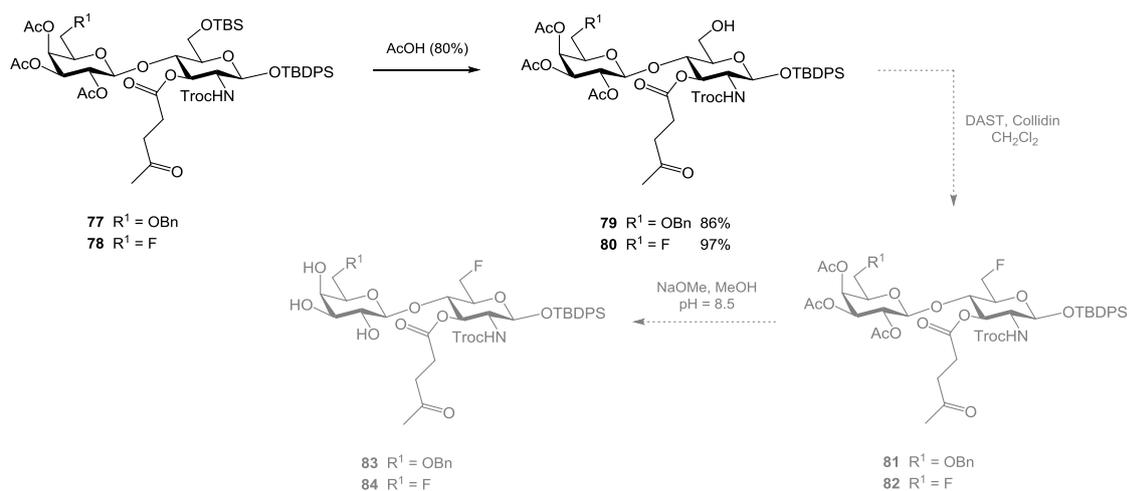
Unter Verwendung des modifizierten Glucosamin-Bausteins **11** (vgl. Kapitel 3.2.1) konnte zudem die Synthese der Disaccharid-Bausteine **77** und **78** erfolgen, welche die Einführung eines Fluorsubstituenten an der 6-Position des Glucosamins ermöglichen (Schema 3.24). Die Glycosylierung zu den Disaccharid-Bausteinen erfolgte nach der zuvor vorgestellten Methode nach *Schmidt* unter Verwendung der Galactosyltrichloracetimidate **17** und **29** in Gegenwart der Lewis-Säure TMSOTf bei einer Temperatur von $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die ausschließ-

liche Bildung der gewünschten β -glycosidisch verknüpften Produkte unter dem dirigierenden Einfluss der nachbargruppenaktiven Acetylenschutzgruppe konnte NMR-spektroskopisch bestätigt werden.



Schema 3. 24: Die Galactosylierungen der modifizierten Disaccharid-Bausteine **77** und **78**.

Die darauffolgende Entfernung der temporären TBS-Schutzgruppe der beiden Disaccharid-Bausteine **77** und **78** konnte durch Behandlung mit Essigsäure (80%) bewerkstelligt werden und lieferte die Bausteine **79** bzw. **80** in Ausbeuten von 86% bzw. 97%. Eine nachfolgende Einführung eines Fluorsubstituenten in der 6-Position des Glucosamins kann durch nucleophile Fluorierung mit $\text{DAST}^{\text{®}}$ in Gegenwart von 2,4,6-Collidin durchgeführt werden (Schema 3.25). Um die beiden fluorierten Disaccharid-Bausteine **81** und **82** in späteren Sialylierungsreaktionen einsetzen zu können, müssten diese wiederum unter Spaltung der Acetylgruppen der Galactosylreste unter den Bedingungen einer *Zemplén*-Umesterung^[212] mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung bei einem pH-Wert von 8.5 gespalten werden. Die deblockierten Disaccharid-Baustein **83** und **84** sollten sich dann für eine Sialylierung zu den entsprechenden Trisaccharid-Bausteinen eignen, was jedoch aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgte. Erste Resultate von *Maximilian Reindl* im Zuge seiner Dissertation zeigen jedoch, dass eine nucleophile DAST -vermittelte Fluorierung solcher funktionalisierter Lactosaminderivate erfolgreich beschrritten werden kann und daher für die Bausteine **83** und **84** prinzipiell in gleicher Weise möglich sein sollte.



Schema 3. 25: Darstellung der modifizierten Disaccharid-Bausteine **83** und **84**.

3.4 Die Synthesen der Trisaccharid-Bausteine

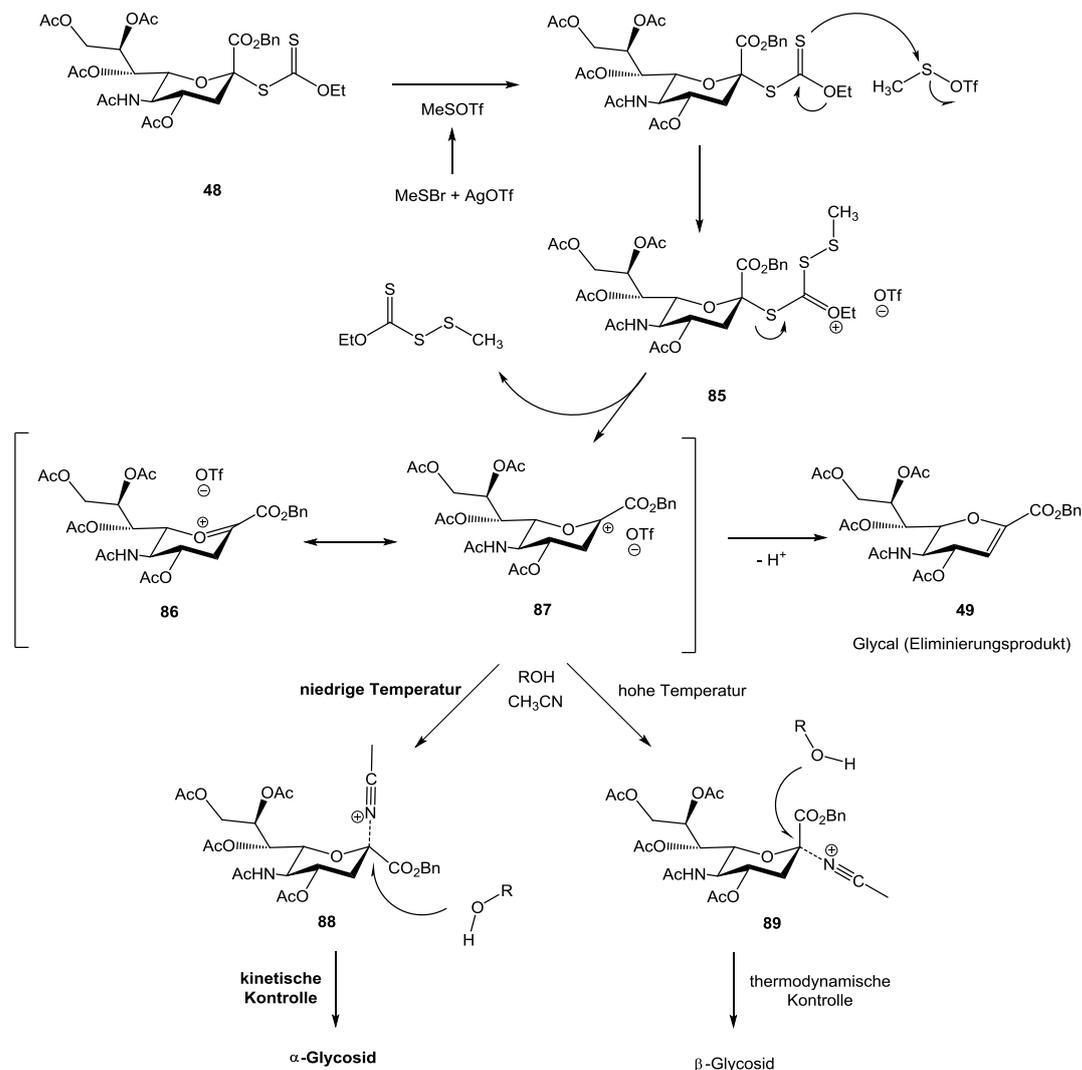
Die im Galactosylrest deblockierten Disaccharide-Bausteine **68**, **73** – **76**, deren Synthesen im Kapitel zuvor beschrieben wurden, konnten in den Sialylierungsreaktionen zum Aufbau des natürlichen Trisaccharid-Bausteins (vgl. Kapitel 3.4.1) bzw. den Umsetzungen der fluorierten Derivate zum Aufbau der (2,3)-sialylierten Trisaccharide (vgl. Kapitel 3.4.2) eingesetzt werden.

3.4.1 Synthese des natürlichen Bausteins

Die Durchführung von Sialylierungsreaktionen unter der Verwendung des in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Neuraminsäuredonors **48** geht mit einigen strukturellen Merkmalen von Sialinsäure in den entsprechenden Glycosylierungsreaktionen^[264-265] einher: Die Benzylesterfunktion des Neuraminsäurexanthogenats **48** führt zum einen aufgrund ihrer Größe zu einer sterischen Hinderung des anomeren Zentrums, welche den Angriff der Disaccharid-Akzeptoren maßgeblich erschwert. Zum anderen führen elektronische Effekte der Carboxylfunktion zu einer Destabilisierung des infolge der Aktivierung durch das Promotorsystem gebildeten Glycosylkations **85** (Schema 3.26). Hierdurch kommt es leicht zur Eliminierung des Protons H_{3ax}-Sia in der 3-Stellung des Neuraminsäuredonors, wobei als Nebenprodukt das Glycal **49** gebildet wird. Zudem erschwert der fehlende nachbargruppenaktivierende Substituent in der benachbarten 3-Position der Neuraminsäure die α -stereoselektive Produktbildung. Zur Kompensation dieser nachteiligen Effekte müssen daher spezielle Reaktionsbedingungen gewählt werden, um eine stereoselektive Bildung des Trisaccharid-Bausteins zu erlauben.

Eine vielversprechende Möglichkeit den stereochemischen Verlauf von Sialylierungsreaktionen gezielt zugunsten des gewünschten Produkts zu beeinflussen, beruht auf der Kontrolle der Reaktionstemperatur sowie der Wahl eines geeigneten Lösungsmittels. Bei der Verwendung eines Gemisches aus Acetonitril und Dichlormethan in einem Verhältnis von 2:1 kann unter der Ausnutzung des *Nitrileffekts*^[215] die Bildung des gewünschten α -Glycosids begünstigt werden. Der Zusatz von Dichlormethan wird hierbei zum einen benötigt um ein Einfrieren des Reaktionsansatzes bei einer Temperatur von $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu verhindern und zum anderen um einer zu starken Stabilisierung der intermediären Nitrilium-Addukte entgegenzuwirken (siehe Seite 52). Die Aktivierung der Sialinsäurexanthogenate erfolgt unter der Einwirkung thiophiler Promotoren, so z.B. durch Methylsulfonyltrifluormethansulfonat (MeSOTf). Der Promoter lässt sich hierzu *in situ* aus Silbertrifluormethansulfonat (AgOTf) und Methylsulfonylbromid (MeSBr) erzeugen, wobei das benötigte Methylsulfonylbromid aus einer Umsetzung von Dimethyldisulfid und Brom in 1,2-Dichlorethan resultiert. Bei der Aktivierung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sialinsäurexanthogenats **48** kommt es zunächst zu einer Koordinierung des Methylsulfonyltrifluormethansulfonats (MeSOTf) an das Thiocarbonat unter Bildung des Disulfids **85**. Der anschließende Austritt der Abgangsgruppe überführt den Sialinsäuredonor in das eigentliche Reaktionsintermediat **86/87**, wobei es zugleich zu einer Koordination durch Acetonitril kommt.^[266] Die Bildung der intermediär auftretenden Nitrilium-Addukte **88** und **89** kann hierbei sowohl axial als auch äquatorial erfolgen, wobei sich der Gleichgewichtszustand zwischen diesen Übergangszuständen durch eine Änderung der Temperatur beeinflussen lässt. So führen höhere Reaktionstemperaturen bevorzugt zur Bildung des thermodynamischen, äquatorial-koordinierten Nitrilium-Addukts **89**, so dass der nachfolgende Angriff des glycosylierenden Alkohols zur Bildung eines β -Glycosids führt. Im Gegensatz dazu liegt

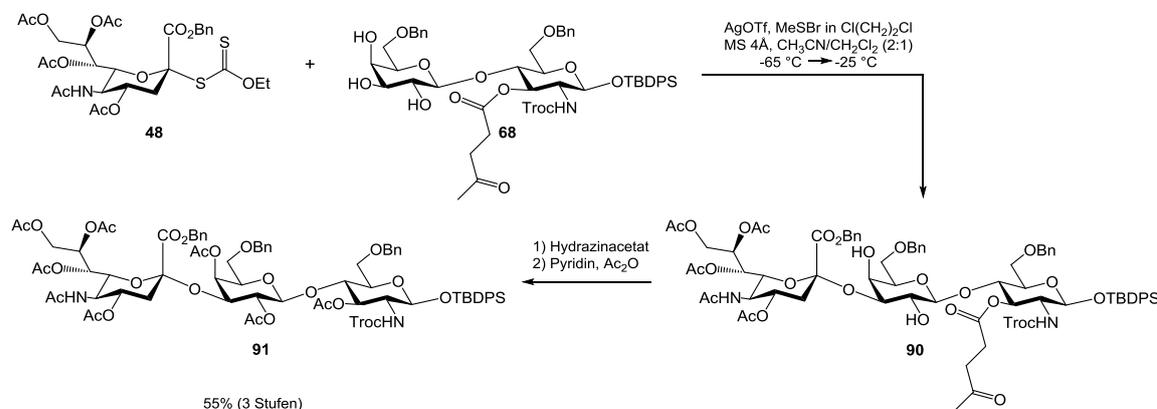
bei tieferen Temperaturen bevorzugt das kinetisch-kontrollierte axiale β -Nitrilium-Addukt **88** vor, das zur Bildung des gewünschten α -Glycosids führt. Zudem besteht die Möglichkeit die Stereoselektivität bei der Produktbildung durch die temporäre Einführung einer dirigierenden Nachbargruppe in der 3-Position des eingesetzten Donors positiv zu beeinflussen,^[264-265] jedoch erfordert dies die Synthese über zusätzliche Manipulationen zur Einführung eines geeigneten Substituenten bzw. zur späteren Entfernung desselbigen, weshalb auf diese Methodik hier nicht zurückgegriffen wurde.



Schema 3. 26: Der Nitrileffekt bei Sialylierungsreaktionen mit resultierender Stereoselektivität und Bildung des Glycals der Neuraminsäure **49** als Nebenreaktion.

Infolge der Aktivierung kommt es zur Ausbildung eines tertiären, anomeren Kohlenstoffatoms (C2-Sia) der Neuraminsäure. Das durch Austritt der Abgangsgruppe gebildete sterisch gehinderte Oxocarbenium-Ion **86/87** kann in Gegenwart von Acetonitril einerseits das gewünschte α -Glycosid bilden und andererseits zum Glycal **49** eliminieren. Letzteres ist aufgrund der destabilisierenden Wirkung der Carboxylfunktion sowie deren sterische Hinderung begünstigt. In Folge dieser Gegebenheit musste für die hier beschriebenen Sialylierungsreaktionen der Sialinsäuredonor **48** in einem großen Überschuss (2.5 Äquivalente) eingesetzt werden und bei einer leicht erhöhten Temperatur von $-45\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Gemisch aus absol. Acetonitril und

Dichlormethan (2:1) umgesetzt werden. Die Erzeugung des thiophilen Promotors erfolgte nach Zugabe von Silbertrifluormethansulfonat (AgOTf) und tropfenweiser Zugabe einer vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in 1,2-Dichlorethan) und führte zur Bildung des gewünschten (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Baustein **90** (Schema 3.27).



Schema 3. 27: Die Synthese des natürlichen Sialyl-Trisaccharid-Bausteins **91**.

Die bei der Sialylierungsreaktion ausschließlich beobachtete regioselektive Anknüpfung der Neuraminsäure an der 3-Position des Galactosylrests kann auf die jeweiligen Reaktivitätsunterschiede der sekundären Hydroxylgruppen in den Positionen 2, 3 und 4 erklärt werden. Während die Blockierung der primären Hydroxylgruppe an der 6-Position des Galactosylrests sicherstellte, dass ausschließlich die Bildung des regioisomeren (2,3)-Glycosids **90** erfolgt, ist eine selektive Blockierung der OH-Gruppen an C2-Gal/C4-Gal nicht vonnöten.

So weist die äquatoriale Hydroxylfunktion in der 3-Position des Galactosylrests nukleophilere Eigenschaften auf was zusammen mit einer geringeren sterischen Hinderung als die beiden anderen freien Hydroxylfunktionen zur ausschließlichen Bildung des angestrebten Regioisomers führt. Eindeutig belegen lässt sich die Position der Verknüpfung im NMR-Spektrum (HMBC-Experiment) anhand der Kopplung zwischen dem quartären Kohlenstoffatom C2-Sia der Neuraminsäure und dem in der 3-Position des Galactosylrests befindlichen Protons H3-Gal (Abb. 3.2). Für das α -Anomer kann zudem entsprechend der *Karplus*-Beziehung^[267-268] aufgrund des vorliegenden Winkels von 180° zwischen dem Kohlenstoffatom-1 der Sialinsäure (C1-Sia) und dem axial orientierten Proton H3_{ax}-Sia eine starke Kopplung erwartet werden, die in Form eines Kreuzpeaks im HMBC-Spektrum auftritt. Hingegen resultiert bei einem β -Glycosid durch eine axial-äquatoriale Wechselwirkung zwischen den betreffenden Kernen eine schwache *Karplus*-Beziehung, welche sich durch eine schwache Kopplung äußert und im HMBC-Spektrum nicht zu sehen ist. Da für den Trisaccharid-Baustein **90** ein entsprechender Kreuzpeak zwischen dem H3_{ax}-Sia und dem C1-Sia im HMBC-Spektrum gefunden wird, kann die notwendige α -glycosidische Verknüpfung bestätigt werden.

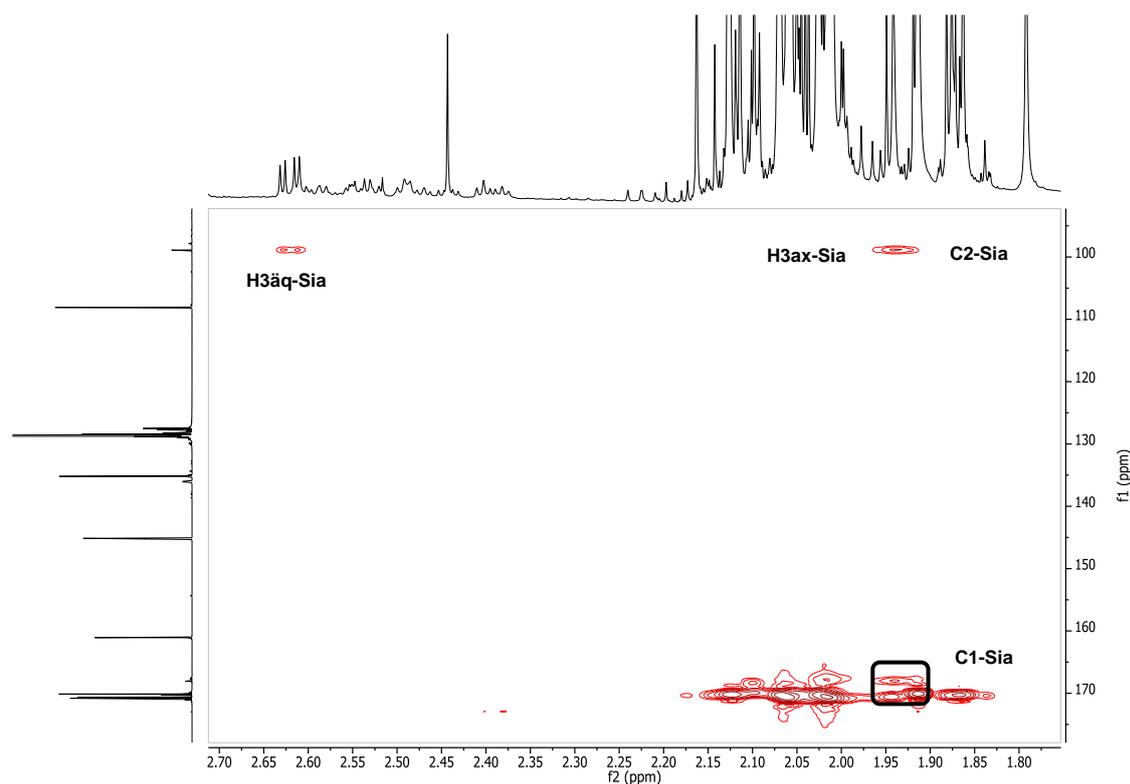


Abb. 3. 2: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum des Trisaccharid-Bausteins **90**.

In der Literatur finden sich zudem einige empirische Regeln^[269] die für die Zuordnung der anomeren Konfiguration peracetylierter Neuraminsäureglycoside herangezogen werden können. So ist bei diesem, da es sich hierbei um ein quartäres Kohlenstoffatom handelt, die Bestimmung der Konfiguration aufgrund der im Spektrum fehlenden Kopplungskonstante $^3J_{H1,H2}$ signifikant erschwert. Allerdings sind die in diesen Regeln formulierten Werte nur als Orientierungswerte zu betrachten und besitzen keine Allgemeingültigkeit.

$$1)^{[270]} \delta_{H3aq} (\alpha\text{-Anomer}) > \delta_{H3aq} (\beta\text{-Anomer})$$

$$2)^{[271]} \delta_{H4} (\alpha\text{-Anomer}) < \delta_{H4} (\beta\text{-Anomer})$$

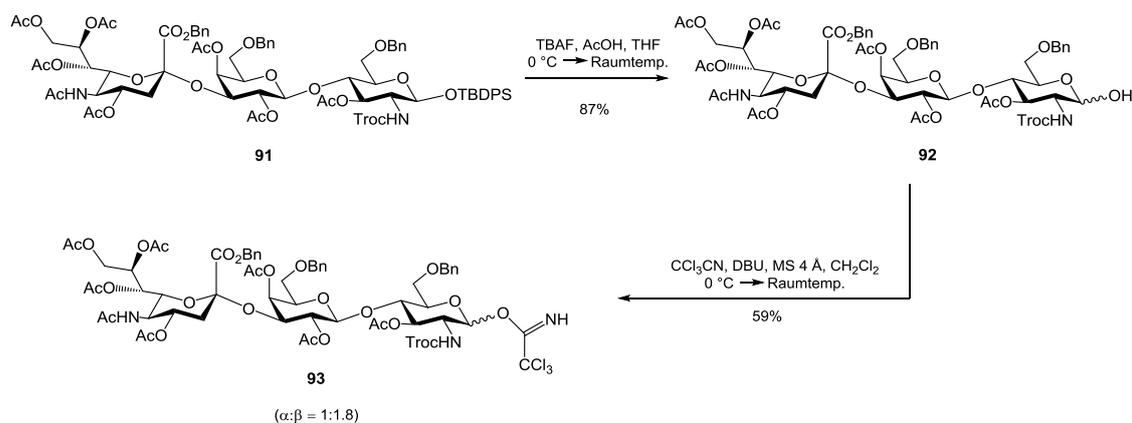
$$3)^{[272-273]} |\delta_{H9a} - \delta_{H9b}| (\alpha\text{-Anomer}) < |\delta_{H9a} - \delta_{H9b}| (\beta\text{-Anomer})$$

$$4)^{[272-273]} J_{H7,H8} (\alpha\text{-Anomer}) < J_{H7,H8} (\beta\text{-Anomer})$$

Durch die zuvor angesprochene geringere Reaktivität der sekundären OH-Gruppe konnte bei der Umsetzung des Disaccharid-Bausteins **68** mit dem Neuraminsäuredonor **48** trotz verlängerter Reaktionsdauer und einer Erhöhung der Temperatur von $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ kein vollständiger Umsatz über analytische RP-HPLC beobachtet werden, so dass stets auch Disaccharid **68** zurückgewonnen werden konnte. Es gelang leider auch selbst bei zweimaliger flashchromatographischer Reinigung nicht, das gewünschte Produkt vollständig vom gebildeten Glycal **49** zu befreien. Für analytische Zwecke konnte jedoch reines Produkt über semipräparative RP-HPLC isoliert werden. Da für die nachfolgende Reaktion eine weitere Reinigung nicht erforderlich war, wurde das leicht verunreinigte Sialyl-Trisaccharid **90** in Gegenwart von Hydrazinacetat in einem Gemisch aus Toluol und Ethanol (2:1) unter Spaltung der Lävulinsäure-Schutzgruppe deblockiert. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend einer Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin in Gegenwart einer

katalytischen Menge an 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) unterzogen, wodurch nach flashchromatographischer Reinigung die vollständig acetylierte Verbindung **91** in einer Ausbeute von 55% über drei Stufen erhalten werden konnte.

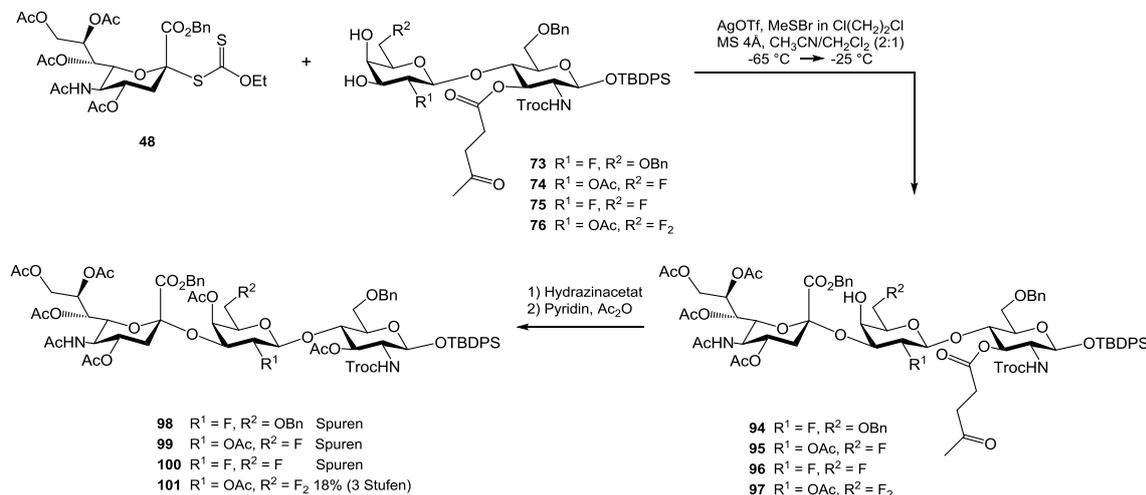
Die Überführung des natürlichen Sialyl-Trisaccharid-Bausteins **91** in einen geeigneten Glycosyldonor **93**, welcher anschließend zur Herstellung des angestrebten Hexasaccharid-Threonin-Konjugats (vgl. Kapitel 3.6.1) eingesetzt wurde, konnte durch Spaltung des Silylglycosids **91** an der anomeren Hydroxylgruppe in Gegenwart von Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in Tetrahydrofuran bewerkstelligt werden. Der Reaktionsmischung wurden als Puffer äquimolare Mengen an Essigsäure zugesetzt (Schema 3.28). Trotz der an sich starken Triebkraft der Reaktion im Zuge der Bildung einer Silizium-Fluorid-Bindung erfolgte die Spaltung des Silylglycosids **91** sehr langsam, so dass die Reaktionszeit auf 48 h ausgedehnt werden musste. Dennoch gelang die Spaltung des Silylglycosids unter Freisetzung des reduzierenden Zuckers **92** in einer Ausbeute von 87%. Das dabei resultierende Anomerengemisch **92** wurde durch basenkatalysierte Addition an Trichloracetonitril und unter Zusatz von aktiviertem Molsieb in den Glycosyldonor **93** überführt, welcher in einer Ausbeute von 59% nach Flashchromatographie und in einem Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta$, 1:1.8 (über analytische RP-HPLC bestimmt) erhalten wurde. Es ist hier anzumerken, dass der Verzicht auf Molekularsieb bei diesem Trisaccharid-Baustein zu keiner nennenswerten Produktbildung sowie exzessive Reaktionszeiten zu einer langsamen Zersetzung des Edukts **92** führten.



Schema 3. 28: Die Synthese des natürlichen Sialyl-Trisaccharid-Donors **93**.

3.4.2 Synthese der fluorierten Bausteine

Die fluorierten Trisaccharid-Bausteine **94** – **97** konnten entsprechend der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Herstellung des natürlichen Trisaccharid-Bausteins **90** unter Verwendung der unterschiedlich fluorierten Disaccharide **73** – **76** mit dem Xanthogenat **48** der Neuraminsäure und Silbertrifluormethansulfonat (AgOTf) sowie Methylsulfenylbromid zur Reaktion gebracht werden (Schema 3.29).



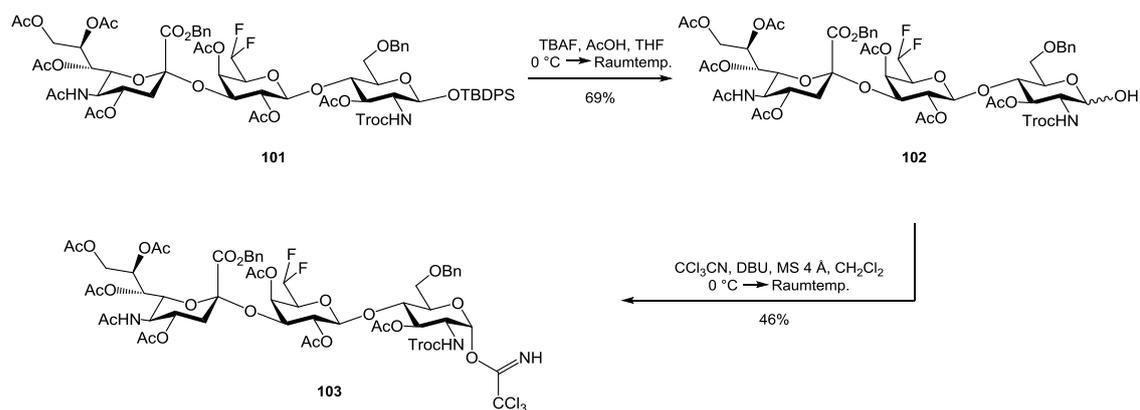
Schema 3. 29: Die Synthese der Sialyl-Trisaccharid-Bausteine **96** – **99**.

Wiederum konnten die so hergestellten Trisaccharide **94** – **97** nach flashchromatographischer Reinigung nicht vollständig vom Glycal **49** abgetrennt werden. Jedoch lieferte die anschließende Schutzgruppenmanipulation unter Spaltung der Lävulinsäure-Schutzgruppe mit Hydrazinacetat, gefolgt von der Acetylierung der freien Hydroxylgruppen mit Pyridin und Essigsäureanhydrid in Gegenwart von 4-DMAP das Trisaccharid **101** in reiner Form in einer Ausbeute von 18% bezogen auf den eingesetzten Disaccharid-Baustein **76**. Der einfach fluorierte Trisaccharid-Baustein **99** konnte nach der anschließenden Reinigung (einschließlich RP-HPLC) aufgrund vergleichbarer polarer Eigenschaften nicht vom Eliminierungsprodukt **49** getrennt werden, wurde jedoch massenspektroskopisch eindeutig nachgewiesen. Die entsprechenden Trisaccharide **98** und **100** konnten ebenfalls massenspektroskopisch nachgewiesen werden, jedoch wurden hier lediglich Spuren erhalten, die keine weitere Umsetzung zuließen. Eine mögliche Ursache hierfür kann auf den stark elektronenziehenden Charakter der Substituenten und dem damit verbundenen Reaktivitätsverlust der entsprechenden Disaccharid-Bausteine **73** und **75** zurückgeführt werden. Dieser starke negativ induktive Effekt der Fluorsubstituenten in der 2-Position konnte bereits im Zuge der Galactosylierungen zu den Lactosamin-Derivaten (vgl. Abschnitt 3.3.2) beobachtet werden. Allgemein kann festgehalten werden, dass für die fluorierten Disaccharid-Akzeptorbausteine **73** – **76** signifikant schlechtere Umsatzzraten in den Sialylierungsreaktionen beobachtet wurden bzw. keine nennenswerte Reaktivität/Nucleophilie gegenüber dem eingesetzten Neuraminsäurexanthogenat **48** auftrat. Für zukünftige Arbeiten scheint daher ein angepasstes Schutzgruppenmuster notwendig zu sein, bei dem zur Kompensation der geringeren Nucleophilie fluorierter Akzeptorbausteine der Einsatz elektronenschiebender Substituenten im Sialinsäuredonor erforderlich sein kann. Zudem kann eine Maskierung der Carboxylgruppe oder auch die Verwendung entsprechender Neuraminsäuremimetika zum Aufbau dieser fluorierten Trisaccharid-Bausteine notwendig zu sein. Weiterhin kann die Einführung von

Benzyletherschutzgruppen die Reaktivität der hier eingesetzten Bausteine unter Umständen steigern, jedoch ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass die Verwendung solcher Bausteine eine eingeschränkte Säurestabilität während der Festphasenpeptidsynthese nach sich ziehen kann. Aus Zeitgründen konnten im Rahmen dieser Arbeit leider keine weiteren Synthesen zum Aufbau der fluorierten Trisaccharid-Bausteine **98** – **100** unter Verwendung eines modifizierten Schutzgruppenmusters durchgeführt werden.

Aufgrund der besseren Zugänglichkeit der an der 6-Position fluorierten Derivate sowie deren stabilisierenden Wirkung auf benachbarte glycosidische Bindungen wurde daher das Augenmerk auf die Synthese des an der 6-Position difluorierten Trisaccharid-Derivats **101** gelegt.

Im weiteren Verlauf der Synthese wurde Verbindung **101** durch Umsetzung mit Tetra-*n*-butylammonium-fluorid (TBAF) in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Essigsäure in das reduzierende Derivat **102** überführt, wobei letzteres in einer Ausbeute von 69% erhalten werden konnte (Schema 3.30). Die nachfolgende Überführung in den Trichloracetimidatdonor, welcher zur Herstellung von Hexasaccharid-Threonin-Konjugaten (vgl. Kapitel 3.6) eingesetzt werden sollte, wurde erneut durch basenkatalysierte Addition an Trichloracetonitril erzielt und lieferte den Glycosyldonor **103** als reines α -Anomer in einer Ausbeute von 46% nach flashchromatographischer Reinigung.



*Schema 3. 30: Die Synthese des fluorierten Sialyl-Trisaccharid-Donors **103**.*

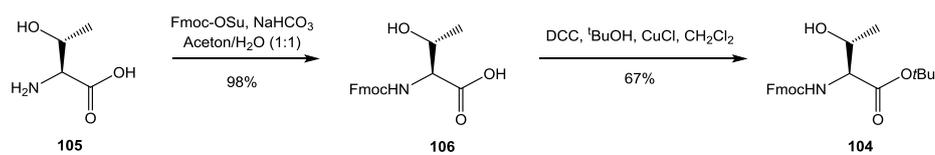
Mit dem difluorierten Donor-Baustein **103** standen somit neben dem natürlichen Trisaccharid-Baustein **93** zwei unterschiedlich substituierte Trisaccharid-Glycosyldonoren für den Aufbau der entsprechenden Hexasaccharid-Threonin-Konjugate zur Verfügung.

3.5 Die Synthesen der Saccharid-Threonin-Konjugate

Die biomimetische Synthese des zentralen Galactosamin-Threonin-Bausteins, der als Akzeptor in den nachfolgenden Glycosylierungsreaktionen dienen sollte, orientierte sich – wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt – an einer literaturbekannten Synthese von *Paulsen* und *Hölck*.^[142, 207, 274] Hierzu wurde zunächst ein geeignet geschützter Galactosyldonor mit einem orthogonal blockierten Threonin-Baustein **104** (vgl. Kapitel 3.5.1) verknüpft, welcher anschließend nach Schutzgruppenmanipulationen mit den fluorierten Galactose-Bausteinen zu den entsprechenden Disaccharidderivaten (vgl. Kapitel 3.5.2) bzw. den sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugaten (vgl. Kapitel 3.5.3) umgesetzt wurde.

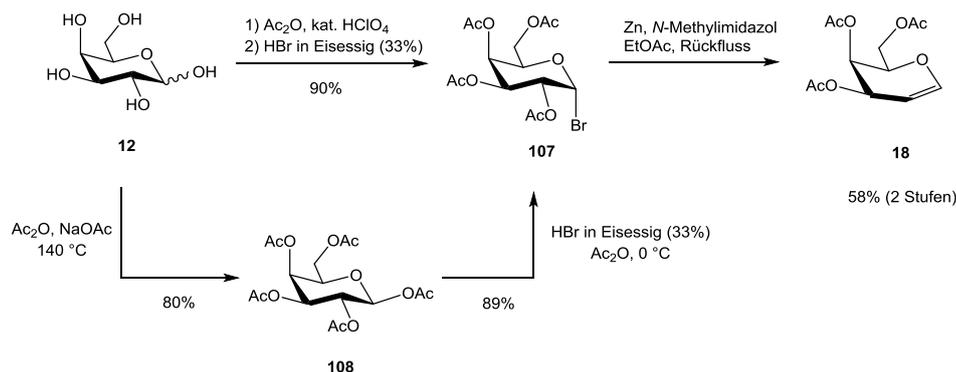
3.5.1 Synthese des Galactosamin-Bausteins (T_N-Antigen)

Als Glycosylakzeptor für die Synthesen zum Aufbau der Oligosaccharid-Threonin-Konjugate fungierte ein orthogonal blockiertes L-Threonin-Derivat **104**, welches als Baustein für die Festphasenglycopeptidsynthese zunächst an der Aminofunktion von L-Threonin (**105**) mit *N*-(9*H*-Fluorenylmethoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (Fmoc-OSu) unter Bildung des Carbamats **106** umgesetzt wurde (Schema 3.31).^[275]



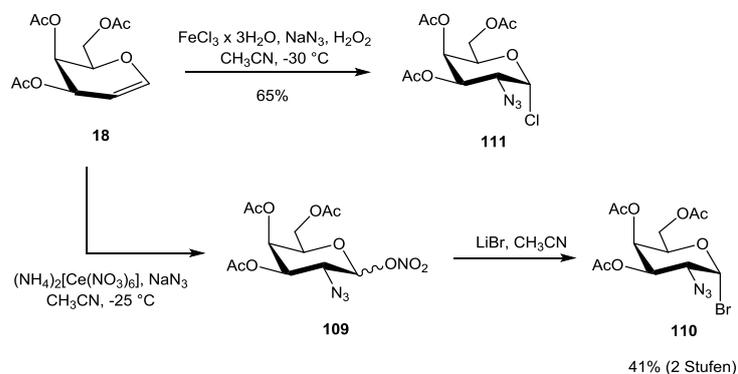
Schema 3. 31: Die Synthese des orthogonal geschützten Glycosylakzeptors *Fmoc-Thr-OtBu* **104**.

Das in quantitativer Ausbeute erhaltene *N*-terminal geschützte Aminosäurederivat **106** konnte anschließend an dessen freier Carboxylfunktion in einer durch Kupfer(I)-chlorid katalysierten Veresterung mit *tert*-Butanol unter dem aktivierenden Einfluss von *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[276] als *tert*-Butylester umgesetzt werden.^[141, 277-278] Der Glycosylakzeptor *Fmoc-Thr-OtBu* **104** wurde nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 67% erhalten. Der Verlauf der Veresterung bedarf dabei einer genauen Kontrolle, da es bei zu langer Reaktionszeit aufgrund des großen Überschusses an *tert*-Butanol auch zu einer unerwünschten Blockierung der Hydroxylfunktion des Threonin als *tert*-Butylether kommt. Letzteres kann jedoch bei dünnenschichtchromatographischer Kontrolle durch die Vermeidung zu langer Reaktionszeiten unterbunden werden. Für die Synthese des Galactosamin-Threonin-Bausteins wurde ein Galactosebaustein mit einer maskierten Aminofunktion in Form eines Azids benötigt, welcher in mehreren Stufen über ein Halogenid als Galactosyldonor mit dem geschützten Aminosäure-Baustein **104** umgesetzt werden konnte. Hierzu wurde zunächst D-Galactose (**12**) in einer Mischung aus Essigsäureanhydrid sowie einer katalytischen Menge an Perchlorsäure peracetyliert und *in situ* durch Behandlung mit einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig zum Galactosylbromid **107** umgesetzt (Schema 3.32).^[279]



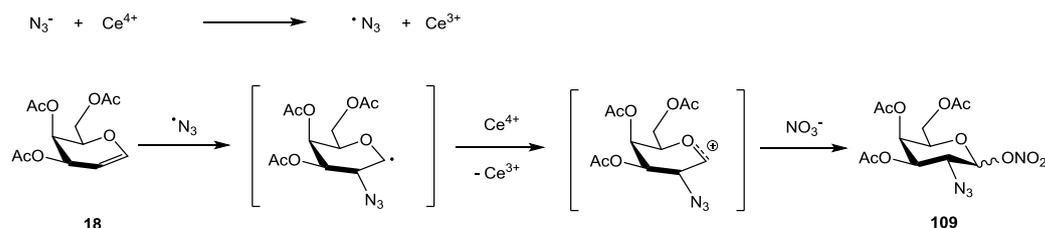
Schema 3. 32: Die Synthese des Galactals **18**.

In einer alternativen zweistufigen Synthese des Galactosylbromids **107** wurde D-Galactose (**12**) zunächst in siedendem Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Natriumacetat zu Verbindung **108** in einer Ausbeute von 80% umgesetzt,^[280] bevor durch Behandlung mit Bromwasserstoff in Eisessig (33%) ebenfalls das Bromid **107** erhalten wurde.^[281] Aufgrund des anomeren Effektes kommt es ausschließlich zur Bildung des α -Anomers, welches im Anschluss in einer reduktiven Zink-vermittelten Eliminierungsreaktion in Gegenwart von N -Methylimidazol in das Galactal **18**^[279] überführt wurde. Letzteres wurde nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 58% bezogen auf D-Galactose (**12**) erhalten. Für die selektive Einführung der bereits erwähnten Azidfunktion in der 2-Position des Zuckers wurde das Galactal **18** in einer Azidonitratisierung nach *Lemieux*^[282] mittels Cer(IV)-ammoniumnitrat und Natriumazid umgesetzt (Schema 3.33).



Schema 3. 33: Die Synthesen der Galactosylhalogenide **110** und **111**.

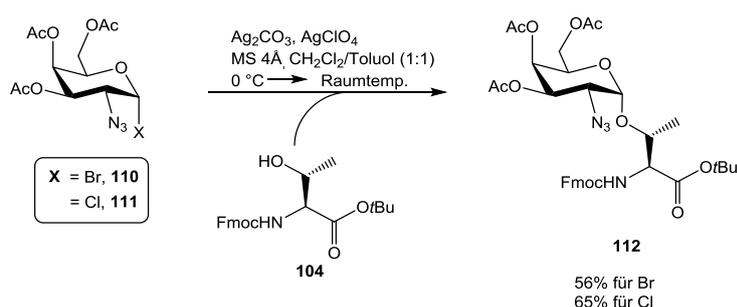
Im Zuge der Reaktion unter Einführung einer Nitratgruppe am anomeren Zentrum kommt es zur Bildung eines Anomerengemisches des Azidonitrats **109**. Im weiteren Verlauf der Synthese wurde die Nitratgruppe in Gegenwart von wasserfreiem Lithiumbromid in das anomere Bromid **110** überführt und nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 41% über zwei Stufen, bezogen auf das eingesetzte Galactal **18**, erhalten.^[282] Eine alternative Route unter simultaner Einführung der benötigten Azidfunktion in der 2-Position sowie der notwendigen Abgangsgruppe für die anschließende Glycosylierungsreaktion in Form eines Halogenids konnte durch eine modifizierte Variante, der sogenannten Azidochlorierung,^[283] unter Verwendung von Eisen(III)-chlorid-Trihydrat und Natriumazid in Gegenwart von Wasserstoffperoxid bewerkstelligt werden. Der Mechanismus für die Azidonitratisierung wurde von *Lemieux* in folgender Weise gedeutet (Schema 3.34):^[282]



Schema 3. 34: Der Mechanismus der Azidonitratisierung nach Lemieux.

Zunächst abstrahiert das Ce^{IV} als starkes Oxidationsmittel ein Elektron aus dem Azidanion, wobei das entsprechende Azidradikal sowie das reduzierte Ce^{III} entstehen. Das Azidradikal koordiniert an die Doppelbindung des Galactals **18** unter Bildung eines über den endocyclischen Sauerstoff stabilisierten Radikals, bevor unter der Einwirkung eines weiteren Ce^{IV} -Ions dieses zum Oxycarbeniumion oxidiert wird und im Anschluss nukleophil vom Nitrat anion am anomeren Zentrum angegriffen wird. Der Angriff an der C1-Position erfolgt hierbei nicht stereoselektiv und führt zur Bildung einer anomeren Mischung des Azidonitrats **109**. Nachfolgende Umsetzung des Azidonitrats **109** zum Glycosyldonor **110** führte in Gegenwart von Lithiumbromid in absol. Acetonitril zur Bildung des α -anomeren Bromids.

Die Reaktionskaskade für die Umsetzung des Galactals **18** unter den Bedingungen der Azidochlorierung (vgl. Schema 3.34) verläuft in analoger Weise: Auch hier kommt es zunächst durch Reduktion von Fe^{III} zu Fe^{II} in Folge der Oxidation des Azidanions zur Bildung des Azidradikals. Dieses koordiniert an die Doppelbindung des Galactals **18** und das stabilisierte Oxycarbeniumion kann im zweiten Schritt durch das Chloridanion nukleophil an der anomeren Position unter Bildung des α -anomeren Azidochlorids **111** substituiert werden. Das eingesetzte Wasserstoffperoxid führt in der Reaktion zur Regeneration der notwendigen Fe^{III} -Spezies. Die nachfolgende Glycosylierung konnte sowohl unter Verwendung des Azidobromids **110**, als auch durch das Azidochlorid **111** in einer von Paulsen und Hölck^[207] entwickelten Variante der Königs-Knorr-Glycosylierung bewerkstelligt werden (Schema 3.35).^[141, 207, 284]

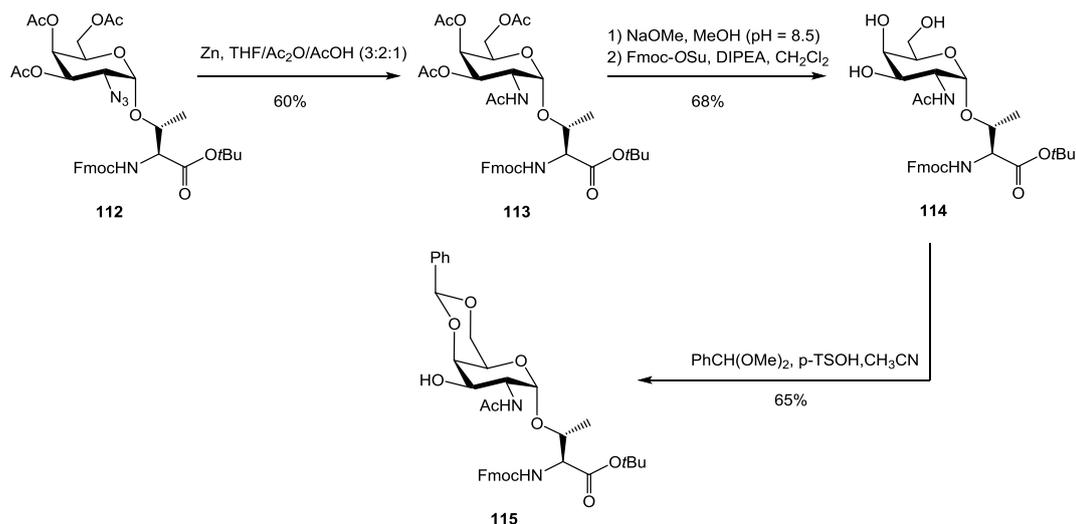


Schema 3. 35: Die Synthese des Galactosamin-Threonin-Konjugates **112**.

Durch Aktivierung mit einer äquimolaren Menge an Silbercarbonat in Gegenwart katalytischer Mengen an Silberperchlorat konnten die Galactosylhalogenide **110** und **111** mit dem orthogonal geschützten Threonin-Baustein **104** zur Reaktion gebracht werden. Hierbei kommt es durch das Silberperchlorat zu einer schnellen *in situ* Anomerisierung der α -Halogenide **110/111** in die entsprechenden β -Halogenide. Diese wiederum reagieren mit Silbercarbonat zu den Oxycarbeniumionen, welche nachfolgend vom Threonin-Baustein **104** nucleophil angegriffen werden. Infolge des fehlenden Nachbargruppeneffekts der Azidgruppe in der 2-Position der Galactosyldonoren kommt es zur Bildung des durch den anomeren Effekt begünstigten α -Ano-

mers des T_N-Azids **112** in Ausbeuten von 56% bzw. 65% bezogen auf die eingesetzten Galactosylhalogenide **110** und **111**.

Die weitere Umsetzung des T_N-Azids **112** zum entsprechenden Acetamid **113** erfolgte unter Reduktion der Azidfunktion und *in situ* Acetylierung mit aktiviertem Zink in einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure, gefolgt von der Entfernung der Acetylenschutzgruppen unter *Zemplén*-Bedingungen^[212] (Schema 3.36).^[285] Die Einstellung des pH-Wertes bedarf einer sorgfältigen Kontrolle um den Verlust der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe bzw. eine baseninduzierte β -Eliminierung der Aminosäure zu unterbinden.^[142]



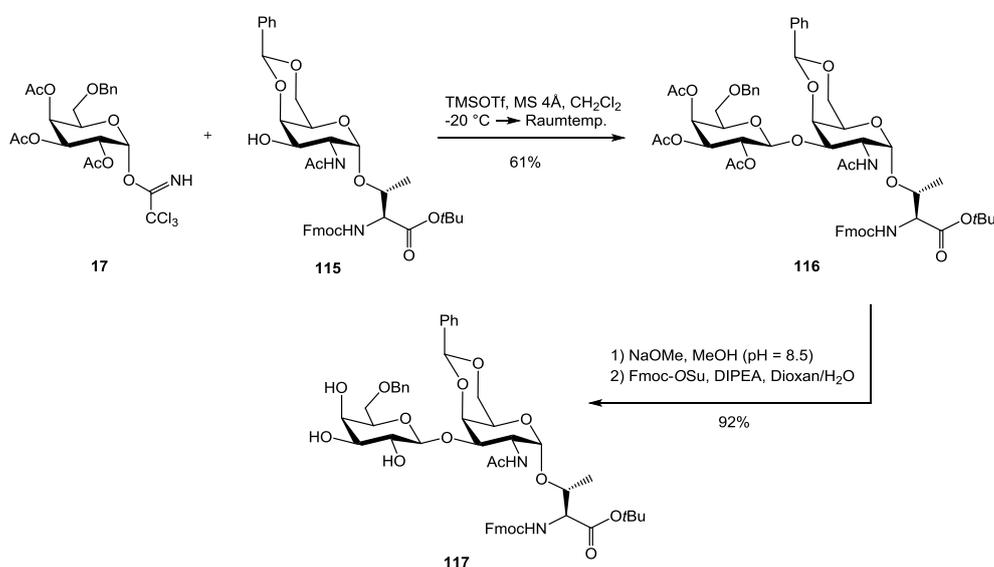
Schema 3. 36: Die Synthese des Galactosamin-Threonin-Konjugats **115**.

Da sich die Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe trotz sorgfältiger Kontrolle des pH-Wertes nicht vollständig unterdrücken lässt, wurde in einem zweiten Reaktionsschritt die Fmoc-Schutzgruppe erneut durch Umsetzung mit Fmoc-OSu eingeführt. Im Hinblick auf die geplanten Synthesen der komplexeren Oligosaccharid-Threonin-Derivate wurde das Produkt **114** einer durch *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (*p*-TSOH) katalysierten Umacetalisierung mit Benzaldehyddimethylacetal unterzogen,^[285-286] welche das 4,6-Benzylidineacetal-geschützte Galactose-Threonin-Konjugat **115** in einer Ausbeute von 65% nach Flashchromatographie lieferte (vgl. Kapitel 3.5.2).

3.5.2 Synthese der Disaccharid-Threonin-Konjugate

Für die Darstellung der Disaccharid-Threonin-Konjugate, welche als Glycosylakzeptoren für den Aufbau der sialylierten Trisaccharid-Bausteine (vgl. Kapitel 3.5.3) fungieren sollten, wurden die bereits in Kapitel 3.2.2 diskutierte Glycosylierungsmethoden zum einen über den Einsatz der Trichloracetimide nach *Schmidt*^[261-262, 287-288] sowie zum anderen über die von *Helferich*^[250, 289] entwickelte Variante der *Königs-Knorr*-Glycosylierung^[284] herangezogen. Die Synthesen konnten unter Einsatz des Galactose-Bausteins **17**, der unterschiedlich fluorierten Trichloracetimide **21**, **37** und dem Bromid **41** bewerkstelligt werden.

Für die anvisierte Darstellung der Disaccharid-Threonin-Konjugate wurde zunächst das Trichloracetimidat **17** nach *Schmidt*^[261-262, 287-288] unter Aktivierung durch die Lewis-Säure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) mit dem Galactose-Threonin-Konjugat **115** zum Disaccharid-Threonin-Konjugat **116** in einer Ausbeute von 61% umgesetzt (Schema 3.37).



Schema 3. 37: Die Synthese des natürlichen Disaccharid-Threonin-Konjugats **117**.

Infolge des Nachbargruppeneffekts der Acetylgruppe in der 2-Position des Glycosyldonors **17** konnte die gewünschte β -glycosidische Verknüpfung von Verbindung **116** erreicht werden. Interessanterweise konnte bei der Umsetzung zum Disaccharid-Threonin-Konjugat **116** die Bildung eines unpolaren Nebenprodukts in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur beobachtet werden. Es handelt sich hierbei um den entsprechenden Orthoester **118**, der als Konkurrenzprodukt bei der Galactosylierung resultiert (Abb. 3.3).

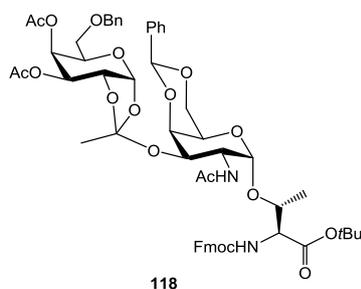
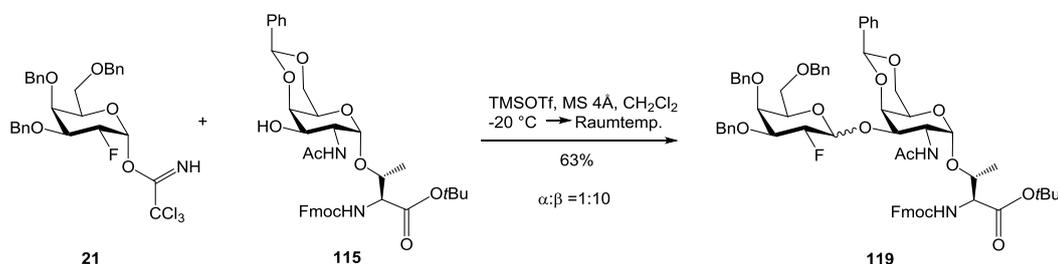


Abb. 3. 3: Der Orthoester **118** als „Nebenprodukt“ der Galactosylierung.

Die damit verbundenen Einbußen hinsichtlich der Ausbeute des gewünschten Disaccharid-Threonin-Konjugats **116** sind jedoch bei einer Ausbeute von 61% vertretbar. Von besonderer Bedeutung für ein Gelingen dieser Glycosylierung ist, dass durch die reversible Bildung des Orthoesters **118** der Reaktionsansatz zwingend vor dem Neutralisieren auf Raumtemperatur erwärmt werden muss, um dessen Umwandlung in das gewünschte Produkt **116** zu erreichen. Eine vergleichbare Umsetzung mit dem entsprechenden Galactosylbromid **22** unter den Bedingungen einer *Helferich*-Glycosylierung wurde dagegen aufgrund der geringen Stabilität von **22** nicht in Betracht gezogen. Der Nachweis des geforderten β -Glycosids konnte erneut durch die vorhandene große Kopplungskonstante (7.9 Hz) erbracht werden. Im Hinblick auf die geplante Synthese eines (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Akzeptors wurde Verbindung **116** unter den Bedingungen einer *Zemplén*-Umesterung^[212] in Gegenwart katalytischer Mengen an methanolischer Natriummethanolat-Lösung zum deblockierten Baustein **117** umgesetzt (Schema 3.37).^[144, 290] Die Einstellung des pH-Wertes bedarf auch hier einer sorgfältigen Kontrolle um den Verlust der ebenfalls basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe bzw. eine baseninduzierte β -Eliminierung der Glycosylaminosäure möglichst zu unterbinden.^[142] Zudem wurden auch hier in einem zweiten Reaktionsschritt potentiell deblockierte Glycosylaminosäureanteile durch erneute Umsetzung mit Fmoc-OSu blockiert. Das Disaccharid-Threonin-Konjugat **117** konnte nach Flashchromatographie an Kieselgel in einer Ausbeute von 92% erhalten werden.

In Anlehnung an eine literaturbekannte Syntheseroute^[173, 209] wurde der Zugang zu dem einfach-fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugat **119** über den Galactosyldonor **21** erreicht. Hierzu wurde das Benzyliden-acetal-geschützte Galactose-Threonin-Konjugat **115** mit dem Trichloracetimidat **21** unter Verwendung des Promotors TMSOTf wie zuvor zum Disaccharid-Threonin-Konjugat **119** in einer Ausbeute von 63% nach flashchromatographischer Reinigung umgesetzt (Schema 3.38).

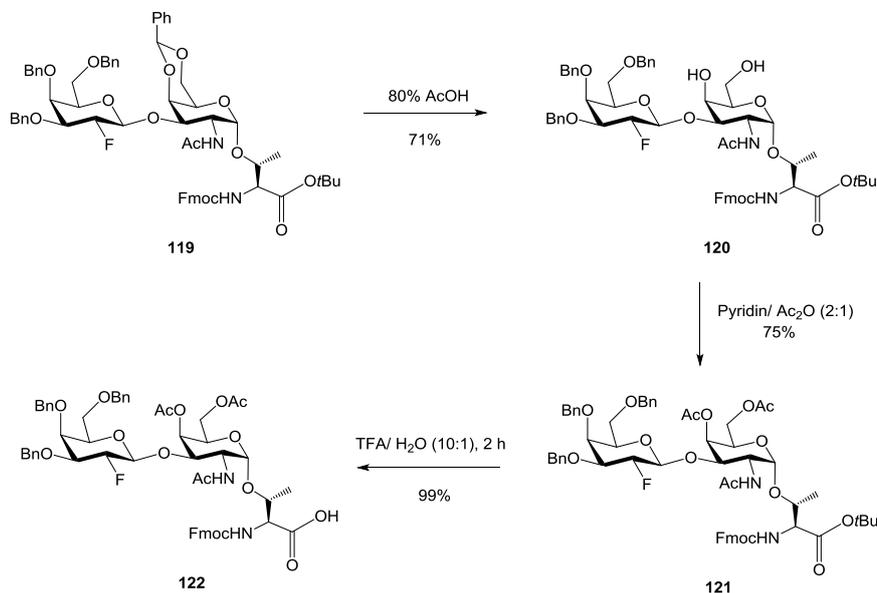


Schema 3. 38: Die Synthese des einfach-fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats **119**.

Die Selektivität der Glycosylierung zugunsten des gewünschten β -Anomers lag bei 10:1 (β : α), aufgrund der fehlenden nachbargruppenaktivierenden Acetylenschutzgruppe in der 2-Position des Glycosyldonors **21**. Selektivitätsverluste bei Glycosylierungsreaktionen von fluorierten Trichloracetimidaten wurden bereits in Arbeiten von *C. Mersch*^[209] beschrieben und können durch die Verwendung von Benzylether-geschützten Galactosyldonoren gemildert werden (vgl. Kapitel 3.1). Die Abtrennung des in der Reaktion gebildeten α -Glycosylierungsprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel sowie für analytische Zwecke durch semipräparative RP-HPLC. Die gewünschte β -glycosidische Verknüpfung konnte NMR-spektroskopisch anhand der großen Kopplungskonstante $^3J_{H1,H2}$ von 7.8 Hz im Vergleich zum α -Anomer ($^3J_{H1,H2}$ von 3.9 Hz) bestätigt werden.

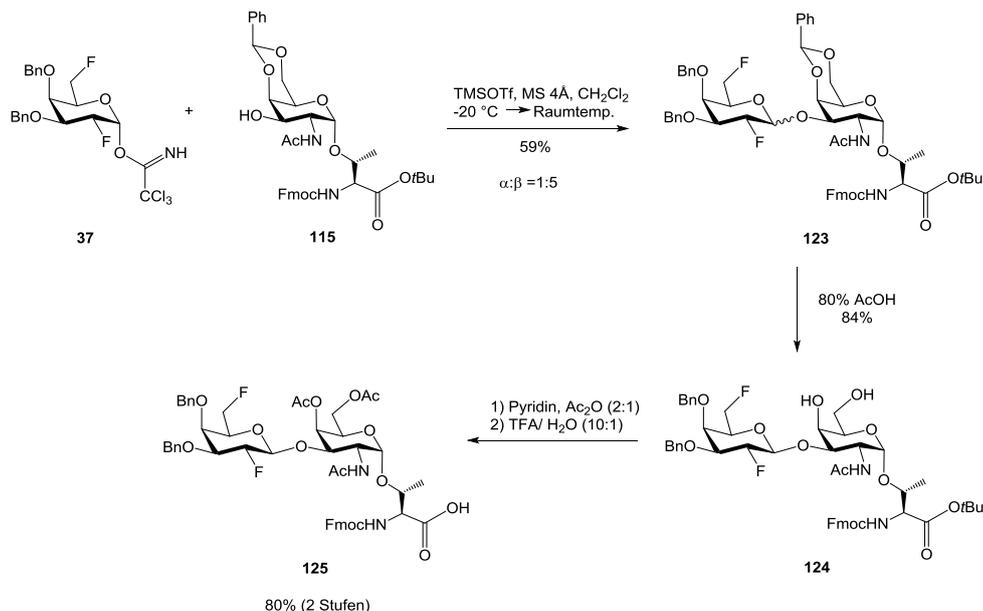
Das Galactose-Threonin-Konjugat **119** wurde anschließend zur Umwandlung eines für die Festphasenglycopeptidsynthese geeigneten Bausteins in Gegenwart von Essigsäure^[145, 290] unter Spaltung des Benzylidenacetals an der 4- und 6-Position deblockiert, wobei Baustein **120** in einer Ausbeute von 71% nach flash-

chromatographischer Reinigung resultierte (Schema 3.39). Nachfolgende Acetylierung von Verbindung **120** in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1), gefolgt von der Acidolyse des *tert*-Butylesters **121** in Trifluoressigsäure/Wasser (10:1) lieferte den gewünschten fluorierten Disaccharid-Threonin-Baustein **122** für die Festphasensynthese in einer Ausbeute von 99%.



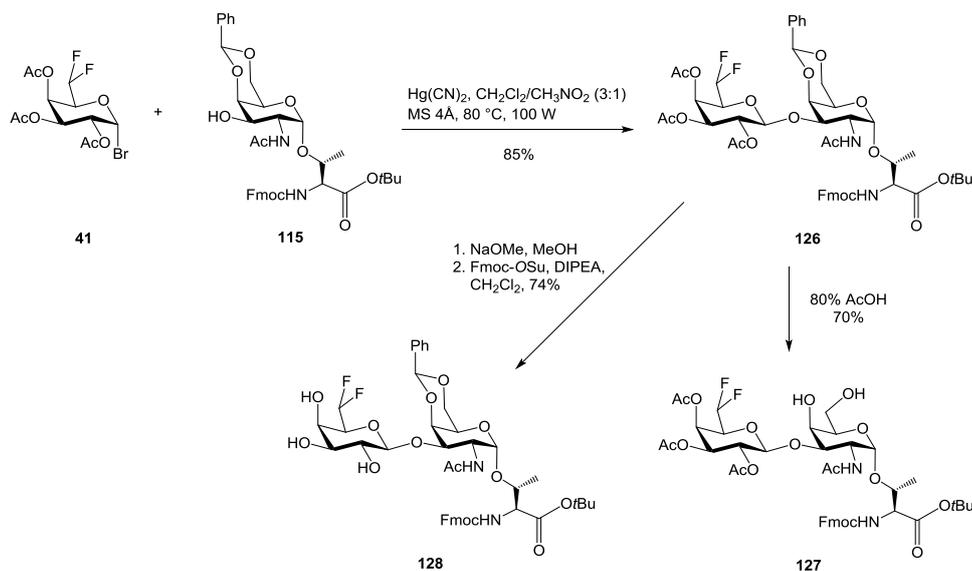
Schema 3.39: Schutzgruppenmanipulation zur Synthese des fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats **122** für die Festphasenglycopeptidsynthese.

Neben der Herstellung des einfach-fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats **122** sollte weiterhin die Synthese mehrfach fluorierter Disaccharid-Bausteine unter Einsatz der Galactosyldonoren **37** und **41** erfolgen. Hierfür wurde in Analogie zu Verbindung **119** das Disaccharid-Threonin-Konjugat **123** zunächst in einer *Schmidt*-Glycosylierung^[261-262, 287-288] mit dem fluorierten Galactosyldonor **37** in Gegenwart von TMSOTf in einer Ausbeute von 59% umgesetzt (Schema 3.40). Im Gegensatz zur Glycosylierung mit dem fluorierten Donor **21** konnte bei der Umsetzung mit dem 2,6-difluorierten Glycosyldonor **37** lediglich eine β -Selektivität von 5:1 (β : α) beobachtet werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen aus früheren Arbeiten.^[173] Trotz dieser beeinträchtigenden Faktoren konnte das Produkt **123** nach Reinigung in einer Ausbeute von 59% bezogen auf den eingesetzten Glycosylakzeptor **115** erhalten werden. Die anschließende Spaltung des Benzylidenacetals von Verbindung **123** in Gegenwart von Essigsäure lieferte wiederum zum einen den Akzeptor-Baustein **124** für den Aufbau eines sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats in einer Ausbeute von 84%.



Schema 3. 40: Die Synthese des 2,6-difluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats **125**.

Des Weiteren konnte durch Acetylierung des Disaccharid-Threonin-Konjugats **124** in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) die vollständig blockierte Verbindung **125a** erhalten werden, welche abschließend einer Acidolyse des *tert*-Butylesters in einer Mischung aus Trifluoressigsäure/Wasser (10:1) unterworfen wurde und den gewünschten fluorierten Disaccharid-Threonin-Baustein **125** für die Festphasensynthese in einer Ausbeute von 80% über zwei Stufen lieferte. Zur Darstellung des an der 6-Position difluorierten Threonin-Konjugats **126** wurde die bereits erwähnte *Helferich*-Glycosylierung^[250, 289] unter Verwendung des fluorierten Galactosylbromids **41** eingesetzt, da sich diese Methode bereits zur Synthese von Disaccharid-Threonin-Konjugaten in früheren Experimenten bewährt hatte. Die Synthese des difluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugat **126** erfolgte in einer Mischung aus absol. Dichlormethan und Nitromethan (3:1) unter Mikrowelleneinstrahlung über eine Reaktionsdauer von 6 h um eine ausreichende Umsetzung des eingesetzten Galactosylbromids **41** zu gewährleisten (Schema 3.41).



Schema 3. 41: Die Synthese der difluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugate **127** und **128**.

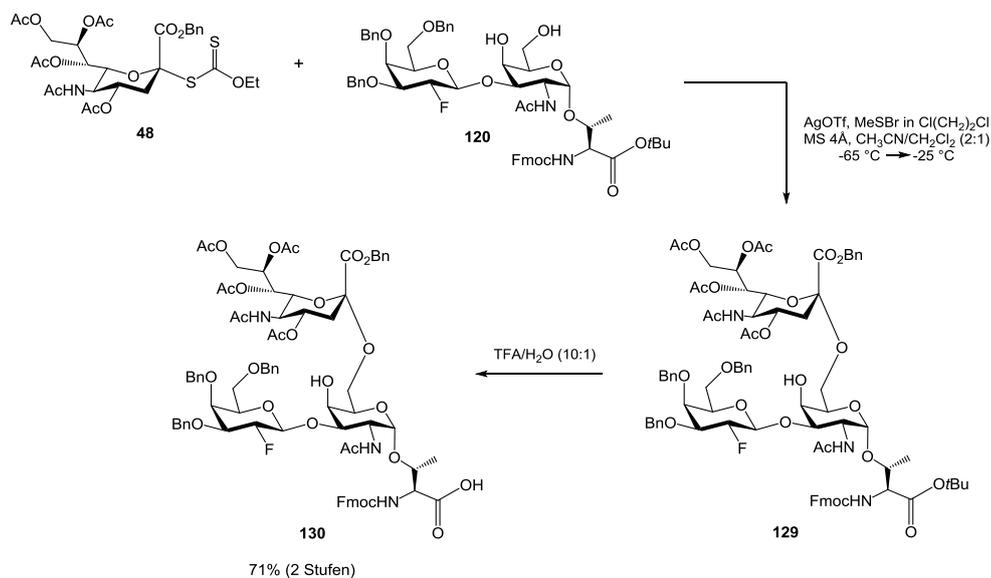
Bei dieser Methode kommt es durch Aktivierung der als Bromide eingesetzten Glycosyldonoren mit Quecksilbersalzen, insbesondere Quecksilber(II)-cyanid, zur Bildung des intermediären Oxycarbeniumions, welches nachfolgend durch den Alkohol nucleophil angegriffen wird. Aufgrund der in der 2-Position nachbargruppenaktivierenden Acetylschutzgruppe des Donors **41** kommt es ausschließlich zur Bildung des gewünschten β -anomeren Glycosylierungsprodukts **126** (Kopplungskonstante 7.2 Hz). Das Glycosylierungsprodukt konnte in einer Ausbeute von 85% nach flashchromatographischer Reinigung bezogen auf den eingesetzten Akzeptor-Baustein **115** erhalten werden.

Um das Disaccharid-Threonin-Konjugat **126** schließlich in einen geeigneten Glycosylakzeptor für die nachfolgenden Umsetzungen zu den sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugaten zu überführen, wurde einerseits das Benzylidenacetal in 80%-iger Essigsäure (Baustein **127**, 70%) und andererseits die Acetylschutzgruppen in der 2-, 3- und 4-Position durch *Zemplén*-Umesterung (Baustein **128**, 74%) entfernt. Somit standen für die angestrebten Sialylierungsreaktionen insgesamt fünf unterschiedliche Disaccharid-Threonin-Bausteine zur Verfügung.

3.5.3 Synthese der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate

Die im vorangegangenen Kapitel vorgestellten Synthesen der selektiv deblockierten Disaccharid-Threonin-Konjugate **117**, **120**, **124**, **127** und **128** ermöglichten nun den Zugang zu entsprechenden (2,6)-sialylierten Trisacchariden bzw. deren regioisomeren (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugaten.

Die stereoselektive Sialylierung der einzelnen Disaccharid-Threonin-Konjugate **120**, **124** und **127** erfolgte mit einem 2.5-fachen Überschuss an Neuraminsäureanthogenat **48** bei einer Temperatur von $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Ausnutzung des *Nitrileffekts* in einem Gemisch aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1). Hierfür wurden der Sialinsäuredonor **48** und die Disaccharid-Threonin-Konjugate **120**, **124** und **127** mit aktiviertem, gepulvertem Molsieb ($4\text{ }\text{\AA}$) zunächst unter einer Argonatmosphäre vorgerührt. Die Erzeugung des thiophilen Promotors erfolgte nach Zugabe von wasserfreiem Silbertrifluormethansulfonat (AgOTf) und tropfenweiser Zugabe einer gekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in 1,2-Dichlorethan). Die Synthese des einfach fluorierten Bausteins **129** unter Verwendung von Neuraminsäuredonor **48** und Disaccharid-Threonin-Konjugat **120** konnte in einer Ausbeute von 75% nach flashchromatographischer Reinigung erfolgen (Schema 3.42).



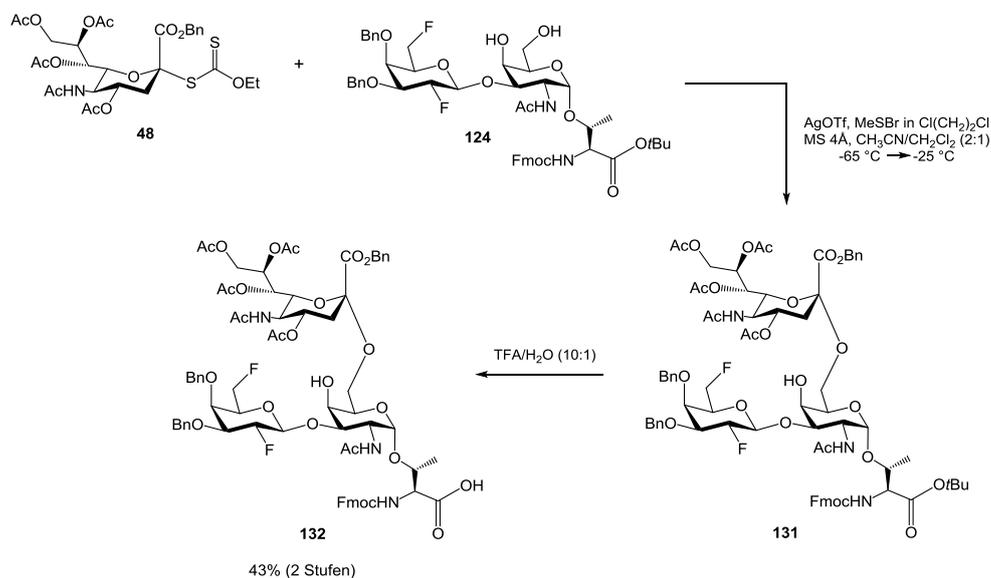
Schema 3. 42: Synthese des einfach-fluorierten sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats **128**.

Die bei dieser Glycosylierung beobachtete regioselektive Anknüpfung der Neuraminsäure an der 6-Position des Galactosaminrests kann auf die unterschiedlichen Reaktivitäten zwischen der sekundären Hydroxylgruppe in der 4-Stellung und dem primären Alkohol in der 6-Position zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 3.4.1) und lässt sich eindeutig im NMR-Experiment belegen.

Wie schon zuvor bei der Synthese der sialylierten Trisaccharid-Bausteine (vgl. Kapitel 3.4), konnte trotz zweimaliger flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel das bei der Reaktion gebildete Glycal **49** nicht vollständig abgetrennt werden. Dies gelang erst nach abschließender Acidolyse des *tert*-Butylesters **129** in einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (10:1), wobei der für die Festphasenglycopeptid-synthese geeignete Baustein **130** in einer Ausbeute von 71% (2 Stufen) nach flashchromatographischer Reinigung erhalten wurde. Die an der 4-Position vorhandene freie Hydroxylgruppe stellt für die Festphasen-

glycopeptidsynthese aufgrund ihrer abgeschirmten Position sowie der geringen Reaktivität kein Problem dar^[145], weshalb auf deren Blockierung verzichtet wurde.

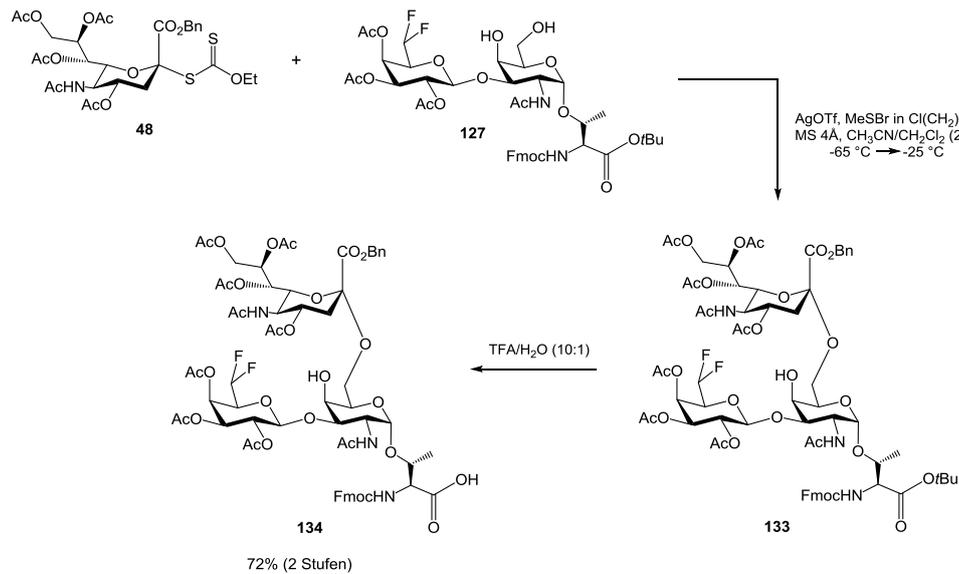
In analoger Weise ließen sich die beiden Disaccharid-Threonin-Konjugate **124** und **127** mit dem Neuraminsäurexanthogenat **48** zu den sialylierten Trisaccharid-Konjugaten umsetzen. Die Reaktion des zweifach-fluorierten Disaccharid-Akzeptors **124** lieferte dabei das gewünschte α -Glycosylierungsprodukt **131** in einer Ausbeute von 65% (Schema 3.43).



Schema 3. 43: Synthese des zweifach-fluorierten sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats **132**.

Das difluorierte (2,6)-Sialyl-Threonin-Konjugat **131** wurde im nächsten Schritt am Carboxylterminus deblockiert und lieferte den Festphasenbaustein **132** nach Flashchromatographie mit einer zufriedenstellenden Ausbeute von 43% (2 Stufen). An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass es im Zuge der flashchromatographischen Reinigung des Festphasenbausteins **132** zu einem signifikanten Substanzverlust gekommen ist, wodurch die insgesamt niedrigere Gesamtausbeute erklärt werden kann, wohingegen die Reaktivität der beiden fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugate **120** und **124** keine nennenswerten Unterschiede in den Sialylierungsreaktionen zeigt.

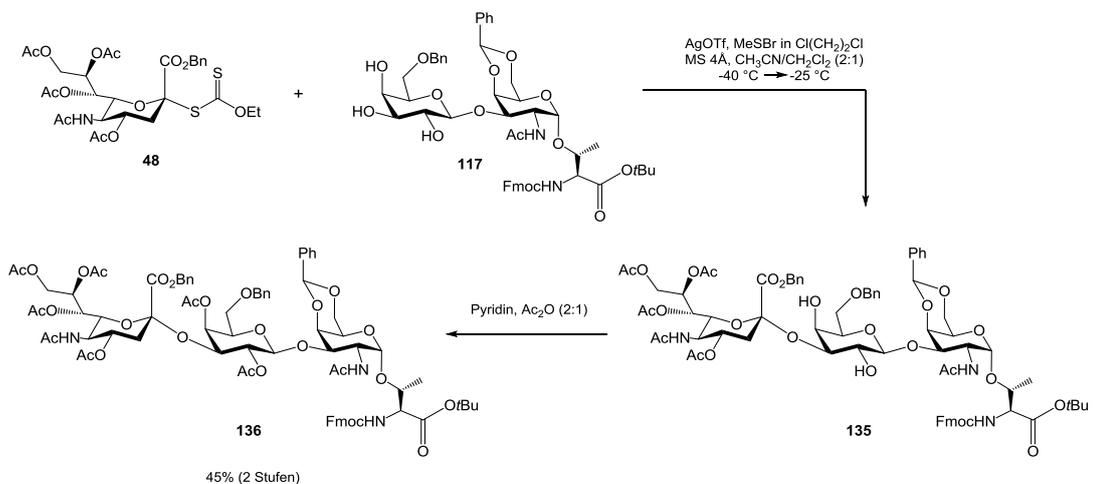
Für die Darstellung eines weiteren (2,6)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats konnte der an der 6-Position difluorierte Baustein **127** ebenfalls in der beschriebenen Sialylierungsreaktion eingesetzt werden (Schema 3.44). Nach flashchromatographischer Reinigung konnte der 6,6-difluorierte Sialyl-Baustein **133** in einer Ausbeute von 72% dargestellt werden. Die Acidolyse des *tert*-Butylesters lieferte wie schon in den vorangegangenen Umsetzungen das für die Festphasenglycopeptidsynthese geeignete Trisaccharid-Threonin-Konjugat **134** in einer Ausbeute von 72% über zwei Stufen.



Schema 3. 44: Synthese des zweifach-fluorierten sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats **134**.

Für die Synthese der regioisomeren (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate wurden der natürliche Disaccharid-Baustein **117** und der difluorierte Disaccharid-Baustein **128** analog zu den oben beschriebenen Durchführungen mit dem Neuraminsäuredonor **48** umgesetzt. Jedoch musste aufgrund der geringeren Reaktivität der sekundären Hydroxylfunktion in der 3-Position des Galactosylrests im Vergleich zur primären Hydroxylgruppe die Reaktionstemperatur von -65°C auf -45°C erhöht werden (Schema 3.45).

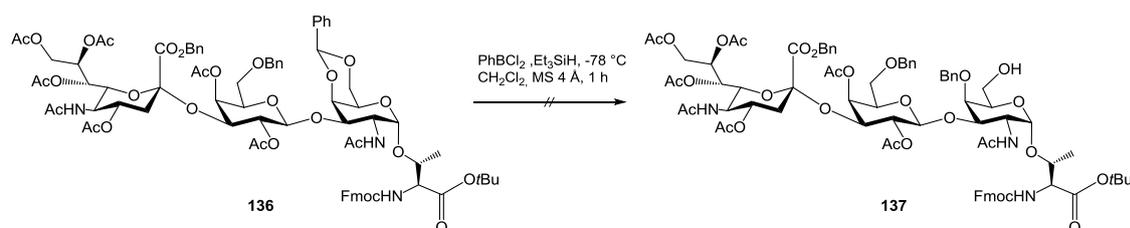
Leider konnte trotz dieser Maßnahme lediglich eine mäßige Umsetzung beobachtet werden. Das (2,3)-sialylierte Trisaccharid-Threonin-Konjugat **135** konnte dennoch in einer für diese Umsetzung üblichen Ausbeute von 25% erhalten werden, welche sich zum Teil aus der geringeren Reaktivität des eingesetzten Akzeptors **117** sowie der sterischen Hinderung bei der Sialylierungsreaktion erklären lassen (vgl. Kapitel 3.4). Um eine brauchbare Substanzmenge für die anvisierten Synthesen zur Darstellung der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate (vgl. Kapitel 3.6) vorweisen zu können, wurde nicht umgesetztes Disaccharid-Threonin-Konjugat **117** zurückgewonnen und erneut umgesetzt.



Schema 3. 45: Synthese des natürlichen (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats **136**.

Die Regioselektivität der Anknüpfung unter Bildung des gewünschten α -Glycosylierungsprodukts **135** konnte wie schon mehrfach erwähnt durch die Aufnahme eines HMBC-Spektrums ermittelt werden. Im Gegensatz zur Synthese der regioisomeren (2,6)-Sialyl-Bausteine wurde Verbindung **135** im nächsten Schritt einer Schutzgruppenmanipulation unter Blockierung der beiden freien Hydroxylgruppen in der 2- sowie der 4-Position des Galactosylrests in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) unterworfen. Die vollständig acetylierte Verbindung **136** konnte nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 45% über zwei Stufen erhalten werden.

In entsprechenden Vorarbeiten im Rahmen der Dissertation von *K. Baumann* konnte gezeigt werden, dass es im Zuge der langsam ablaufenden Glycosylierungsreaktionen von sterisch anspruchsvollen Trichloracetimidatdonoren mit einem T-Antigen-Glycosylakzeptor mit deblockierten Hydroxylgruppen in der 4- sowie der 6-Position zur Bildung eines über die 4-Position verknüpften Regioisomers kommen kann.^[136, 214] Um die Bildung dieses falschen Regioisomers zu umgehen, sollte daher versucht werden das Benzylidenacetal regioselektiv unter Freisetzung der primären Hydroxylfunktion zu öffnen. Einen vielversprechenden Ansatz hierfür stellte die von *Sakagami* und *Hamana* vorgestellte Methode unter Verwendung von Dichlorphenylboran (PhBCl_2)^[236] als Lewis-Säure in Gegenwart von Triethylsilan dar (Schema 3.46).

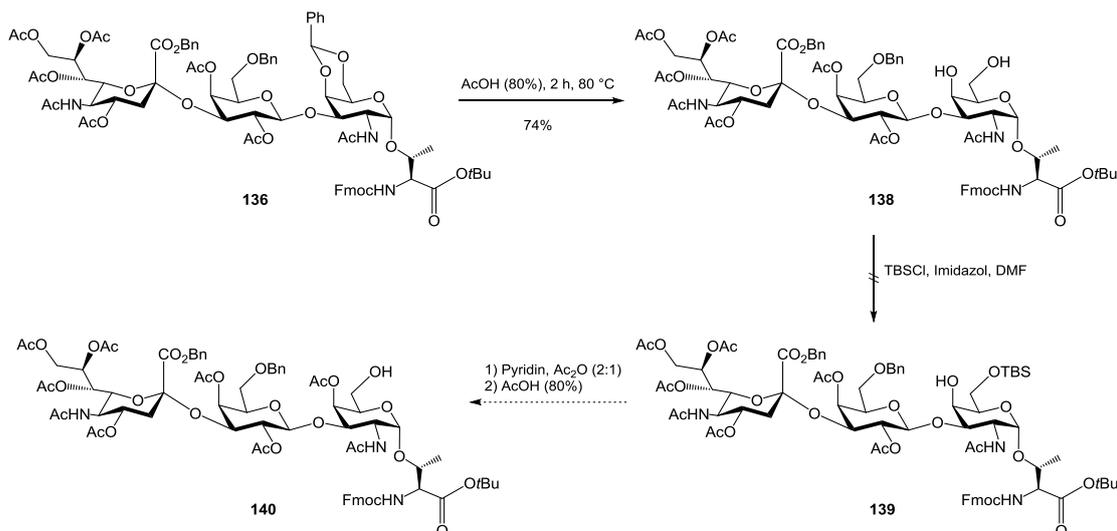


Schema 3. 46: Versuch der regioselektiven Acetalöffnung des (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats **137** mit Dichlorphenylboran und Triethylsilan.

Die Acetalöffnung des komplexen Trisaccharid-Threonin-Konjugats **136** zum gewünschten Produkt **137** konnte unter den angegebenen Bedingungen jedoch nicht beobachtet werden. Ebenso wenig führte eine Erhöhung der Reaktionstemperatur nach Zugabe der Lewis-Säure zum gewünschten Erfolg, allerdings konnte hierbei der Baustein **136** zurückgewonnen werden. Daher wurde auf weitergehende Versuche verzichtet und stattdessen sollte daher die Synthese des Glycosylakzeptors **136** unter temporärer Einführung einer TBS-Schutzgruppe in der 6-Position des Galactosamins fortgesetzt werden (Schema 3.47).

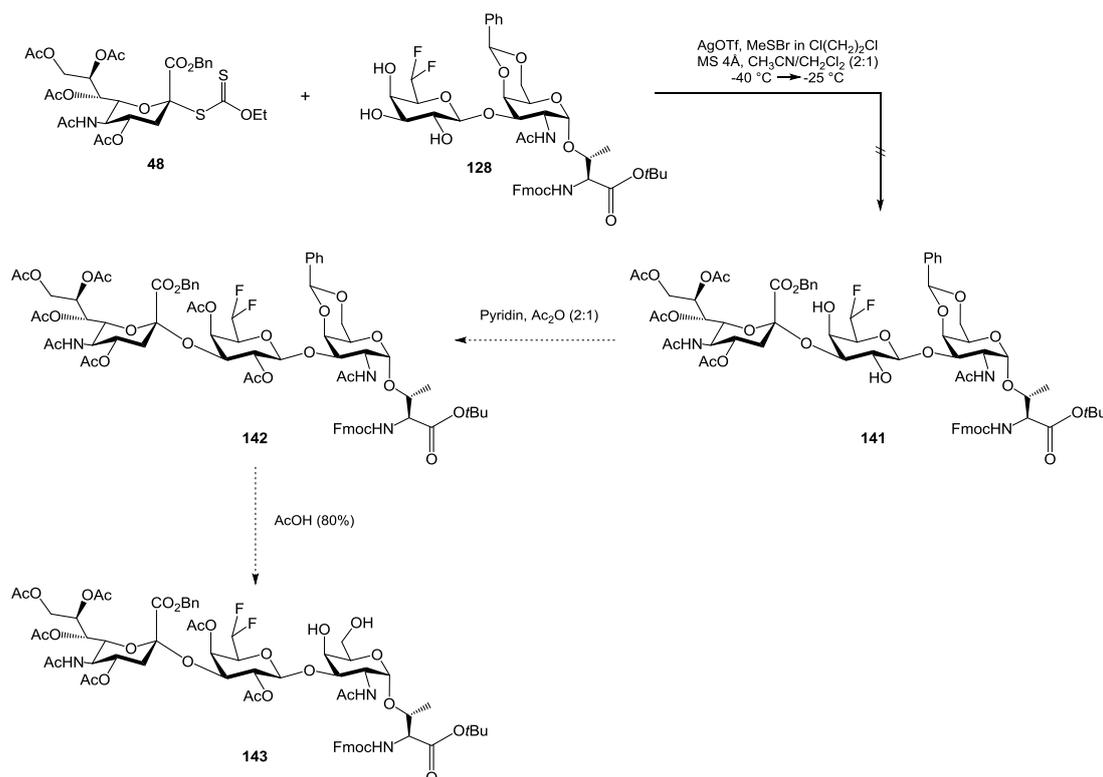
Hierfür wurde das Benzylidenacetal von Verbindung **136** zunächst mit Essigsäure (80%) gespalten, bevor das nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 74% erhaltene Produkt **138** im nächsten Schritt in Gegenwart von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBS-Chlorid) und Imidazol in den Silylether **139** überführt werden sollte. Die anschließende Umsetzung der freien Hydroxylgruppe in der 4-Position des Galactosamins, sowie die Spaltung des Silylethers sollte eigentlich zum Glycosylakzeptor **140** führen, jedoch konnte das Produkt **139** trotz zweimaliger Umsetzung nicht isoliert werden. So führten die gewählten Reaktionsbedingungen auch unter Verwendung von schwachen Basen zu einer Zersetzung des Edukts.

In Anbetracht dieser Umstände und mit Blick auf die Tatsache, dass unter den anvisierten Schutzgruppenmanipulationen gegebenenfalls mit der unerwünschten Migration der Acetylgruppe an C4 gerechnet werden muss^[291], wurde Verbindung **138** direkt als Glycosylakzeptor in den Glycosylierungsreaktionen zu den komplexen Hexasaccharid-Threonin-Konjugaten (vgl. Kapitel 3.6) eingesetzt.



Schema 3. 47: Alternative Route zur Darstellung des sialylierten Glycosylakzeptors **140**.

Der Aufbau eines weiteren (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugat **141** sollte in gleicher Weise unter Verwendung des difluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugats **128** sowie des Sialinsäurexanthogenats **48** bewerkstelligt werden (Schema 3.48).



Schema 3. 48: Die Synthese des difluorierten (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugats **143**.

Die Sialylierung des deaktivierten Akzeptor-Bausteins **128** konnte jedoch das gewünschte Produkt **141** selbst nach einer Reaktionsdauer von 3 Tagen nicht liefern. Vergleichbare Beobachtungen bzw. Probleme wurden bereits im Zuge des Aufbaus des entsprechenden difluorierten Trisaccharid-Bausteins **97** gemacht (vgl. hierzu Abschnitt 3.4.2), weshalb auf weitere Versuche in diese Richtung verzichtet wurde.

Weiterführende Arbeiten sollten daher einen alternativen Ansatz unter Verwendung eines reaktiveren Sialinsäurebausteins mit elektronenschiebenden Substituenten verfolgen um der eingeschränkten Reaktivität des deaktivierten Akzeptors **128** möglicherweise entgegenwirken zu können. Weiterhin sollte in diesem Kontext der Aufbau des difluorierten Bausteins **143** in Anlehnung an die Verwendung eines chemoenzymatischen Ansatzes^[292] für die Synthese (2,3)-sialylierter Trisaccharid-Threonin-Konjugate in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Zudem konnte durch *Frederik Broszeit* im Rahmen seiner Masterarbeit der Aufbau eines weiteren fluorierten (2,3)-sialylierten Trisaccharid-Threonin-Akzeptorbausteins **144** erfolgen, welcher zum Aufbau der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate eingesetzt werden konnte (Abb. 3.4).^[260] Dieser wurde in analoger Weise zu der hier bereits beschriebenen Synthese des 6,6-difluorierten (2,3)-ST-Trisaccharid-Akzeptors **143** unter Verwendung des einfach-fluorierten 6-Fluorgalactosylbromids **31** aufgebaut.

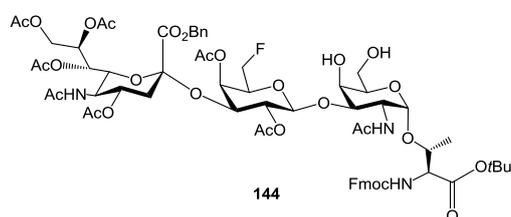
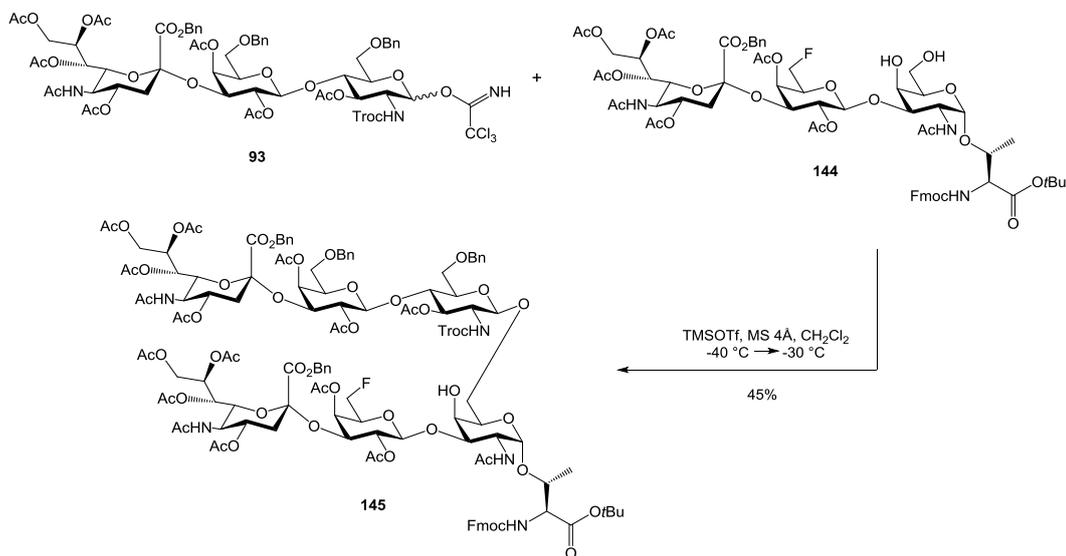


Abb. 3. 4: Der fluorierte (2,3)-Sialyl-Trisaccharid-Akzeptor **144**.

Somit standen für die Synthesen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate (vgl. Kapitel 3.6) insgesamt zwei sialylierte (2,3)-Trisaccharid-Threonin-Konjugate zur Verfügung, welche mit den beiden Trichloracetimidatdonoren **93** und **103** umgesetzt wurden.

3.6 Die Synthesen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate

Für die Synthese des Hexasaccharid-Threonin-Konjugats **145** wurde der sialylierte Trisaccharid-Threonin-Baustein **144** mit dem Trichloracetimidat **93** in Gegenwart von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) zum β -konfigurierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugat in einer Ausbeute von 45% verknüpft (Schema 3.49).



Schema 3. 49: Die Synthese des fluorierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugats **145**.

Hierzu wurde entgegen dem gängigen Glycosylierungsprotokoll der Akzeptorbaustein mit nur einem geringen Überschuss (1.2 Äquiv.) eingesetzt. Zudem konnte nicht umgesetzter Glycosylakzeptor **144** nach flashchromatographischer Reinigung zurückgewonnen werden. Eine Lösung des Trichloracetimidatdonors **93** sowie des Akzeptors **144** wurden hierzu in absol. Dichlormethan mit aktiviertem Molsieb auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit einer Lösung der Lewis-Säure TMSOTf in absol. Dichlormethan versetzt. Bei einer Reaktionstemperatur von $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnte jedoch keine Umsetzung zum gewünschten Hexasaccharid beobachtet werden, sodass der Reaktionsansatz langsam erwärmt werden musste. Interessanterweise konnte bei dem Erwärmen des Ansatzes auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ über eine Dauer von zwei Stunden eine Umsetzung beobachtet werden, die zur Bildung von zwei unterschiedlichen Produkten führte (DC-Reaktionskontrolle). Bei letzteren sollte es sich allerdings nicht um Anomere handeln, da der partizipierende Einfluss der in der 2-Position der Glucosamin-Einheit vorhandenen Troc-Schutzgruppe eine stereoselektive β -Verknüpfung garantieren sollte. Die gewünschte β -Selektivität konnte auch tatsächlich NMR-spektroskopisch anhand der großen Kopplungskonstanten zwischen dem anomeren H1-GlcN und dem H2-GlcN nachgewiesen werden. Eine direkte Aussage über die regioselektive Anbindung an die 6-Position des Galactosamins konnte leider aber über die Aufnahme eines HMBC-Spektrums in diesem Fall nicht getroffen werden, da weder ein Kreuzpeak zwischen dem anomeren Zentrum des Glucosamins (C1-GlcN) mit den Protonen H4-GalN bzw. H6a/b-GalN noch eine Kopplung zwischen dem anomeren H1 des Glucosamins mit dem Kohlenstoffatom an der 6-Position des Galactosamins (bzw. der 4-Position) detektiert wurde.

Das angestrebte Hexasaccharid-Threonin-Konjugat **145** konnte im Zuge der beschriebenen Glycosylierung gewonnen werden, jedoch wurde bei der flashchromatographischen Reinigung weiterhin eine unpolare

Verbindung isoliert, die das gleiche Molekulargewicht aufwies und die bereits zuvor vermutete Bildung eines über die 4-Position des Galactosamin verknüpften Regioisomers **146** bestätigte (Abb. 3.5). Dieses zweite Produkt konnte nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 55% bezogen auf den eingesetzten Trichloracetimidatdonor **93** erhalten werden.

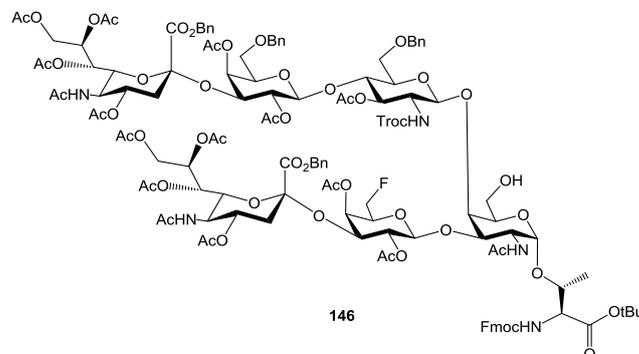


Abb. 3. 5: Das Hexasaccharid-Threonin-Konjugat **146** als Konkurrenzprodukt der Glycosylierung.

Die Interpretation der zugehörigen zweidimensionalen NMR-Spektren zeigte im Vergleich zu den ¹H-¹³C-korrelierten HSQC-Spektren der Verbindungen **145** bzw. **146** einen signifikanten Unterschied in den Verschiebungen der CH₂-Gruppe an der 6-Position der Galactosamin-Einheit. Während in dem gewünschten Regioisomer **145** eine chemische Verschiebung von 70.5 ppm für das Kohlenstoffatom C6-GalN bestimmt werden kann (Abb. 3.6), erfährt die Methylengruppe von Verbindung **146** eine Hochfeldverschiebung zu 59.2 ppm für das betreffende Kohlenstoffatom-6 als auch für die Signale der beiden Protonen H6a/b-GalN (Abb. 3.7). Aufgrund einer Vielzahl von Signalüberlappungen in den entscheidenden Bereichen kann die vorliegende Struktur von Verbindung **146** nicht zweifelsfrei belegt werden, jedoch sprechen die hier beschriebenen relativen Hochfeldverschiebungen der CH₂-Gruppe dafür, dass diese nicht substituiert ist.

Wie bereits oben erwähnt kann durch die Aufnahme eines HMBC-Spektrums auf dieser Stufe weder eine Kopplung für das betreffende Proton H1-GlcN mit dem C6-GalN gezeigt, noch ein entsprechender Kreuzpeak beobachtet werden. Eine Möglichkeit die postulierte Bildung des über die 4-Position verknüpften Regioisomers zu bestätigen, kann durch eine nachfolgende Acetylierung von Verbindung **146** erreicht werden, da in diesem Fall die zugehörigen Kontakte der Methylengruppe mit der Acetylschutzgruppe im HMBC-Spektrum zu sehen wären.

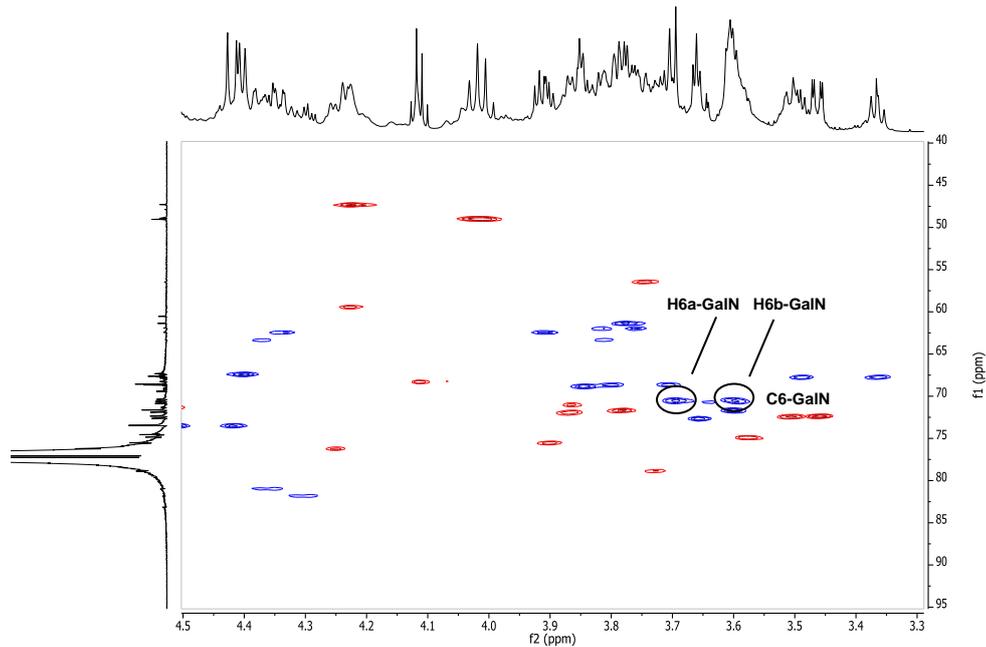


Abb. 3. 6: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum vom Hexasaccharid **145**.

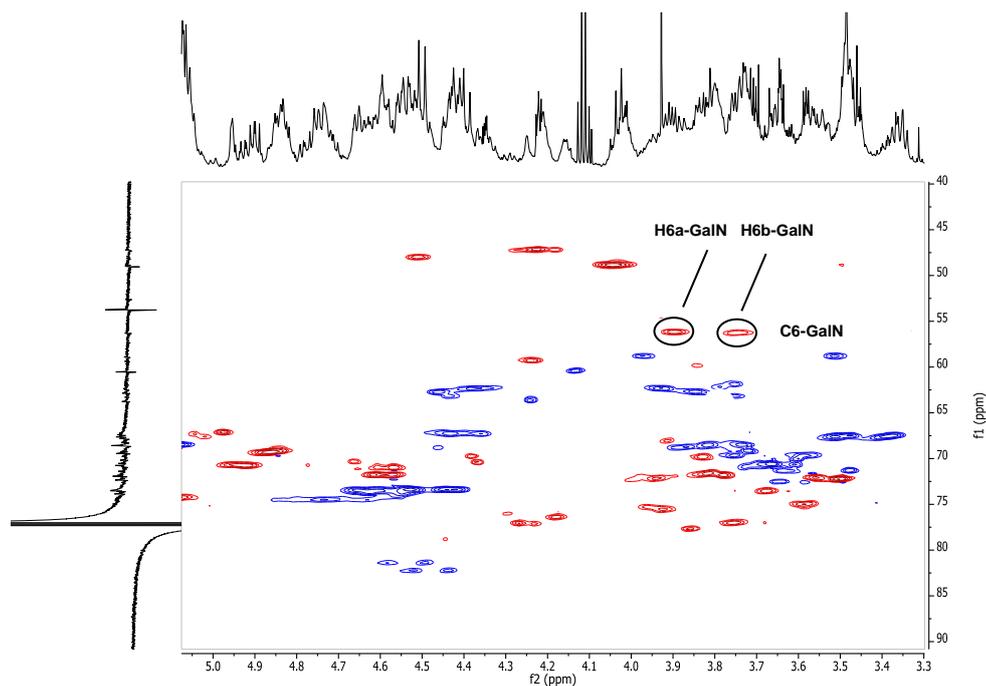
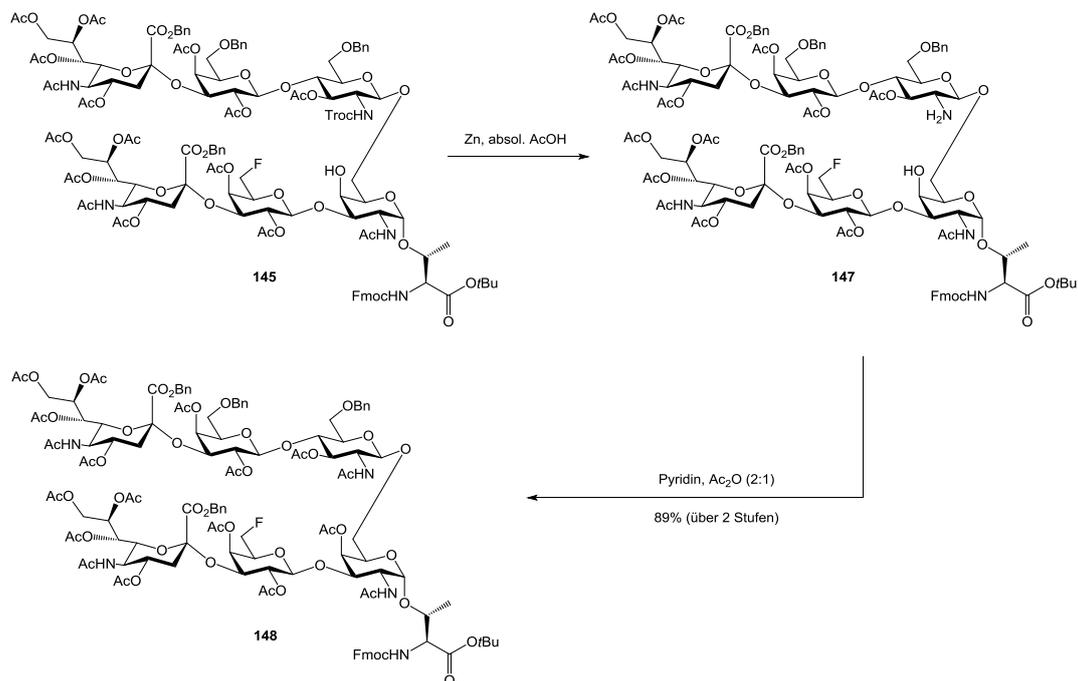


Abb. 3. 7: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum vom Hexasaccharid **146**.

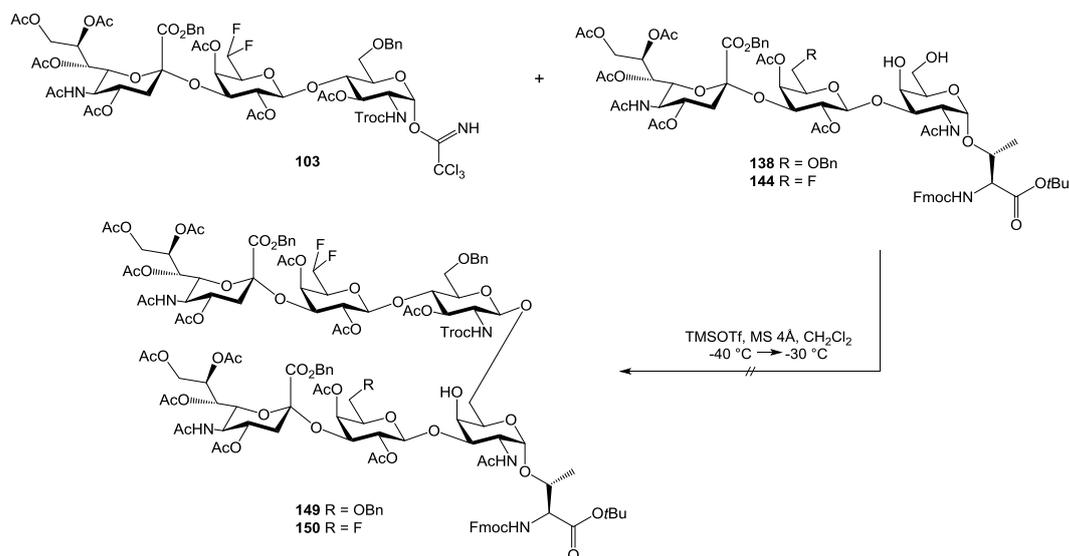
Zudem wurde zur Einführung der Acetamidfunktion an C2 des Glucosaminbausteins in **145** dessen Carbamatschutzgruppe in Gegenwart von aktiviertem Zink in Essigsäure^[277] entfernt. Das freie Amin **147** wurde anschließend ohne weitere Reinigung einer Acetylierung in einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid unterzogen (Schema 3.50), was zum vollständig blockierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugat **148** führte, das nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 89% über zwei Stufen erhalten werden konnte. Zur Herstellung eines für die Festphasensynthese geeigneten Glycosylaminosäure-Bausteins kann in einem weiteren Schritt die Spaltung des *tert*-Butylesters **148** unter Freisetzung

der Carbonsäure mit Trifluoressigsäure und Wasser erfolgen, jedoch wurde hierauf in Anbetracht der geringen Substanzmenge verzichtet.



Schema 3. 50: Die Synthese des vollständig blockierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugats **148**.

In Analogie zur Synthese des Hexasaccharid-Threonin-Konjugats **148** sollten die beiden Trisaccharidtrichloracetimidate **93** und **103** nach dem vorliegenden Glycosylierungsprotokoll mit den Trisaccharid-Threonin-Konjugaten **138** und **144** in Gegenwart der Lewis-Säure TMSOTf umgesetzt werden (Schema 3.51).

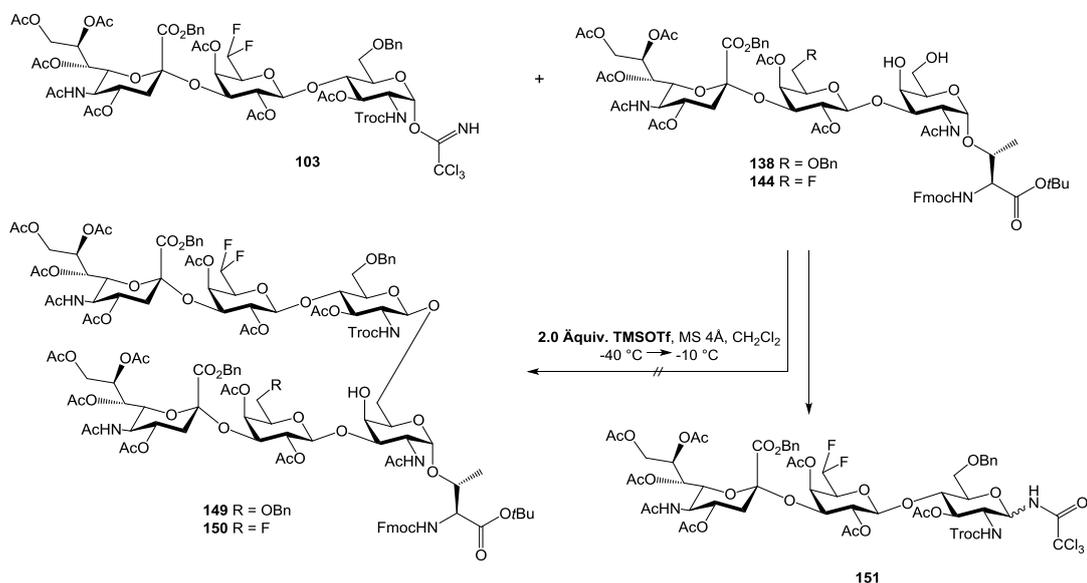


Schema 3. 51: Die Synthese der fluorinierten Hexasaccharid-Threonin-Konjugate **149** und **150**.

Überraschenderweise konnte die Darstellung der beiden Hexasaccharid-Threonin-Konjugate **149** und **150** bedingt durch eine fehlende Reaktivität des eingesetzten Trichloracetimidatdonors **103** in Gegenwart von 0.5 Äquivalenten der Lewis-Säure TMSOTf nicht bewerkstelligt werden. Nach flashchromatographischer Reini-

gung konnten sowohl die im Überschuss eingesetzten Trisaccharid-Threonin-Akzeptoren **138** und **144**, als auch der Glycosyldonor **103**, zurückgewonnen werden.

Daher sollte alternativ versucht werden, den difluorierten Donorbaustein **103** in Gegenwart von 2.0 Äquivalenten der Lewis-Säure mit den Akzeptorbausteinen **138** bzw. **144** zur Reaktion zu bringen (Schema 3.52).



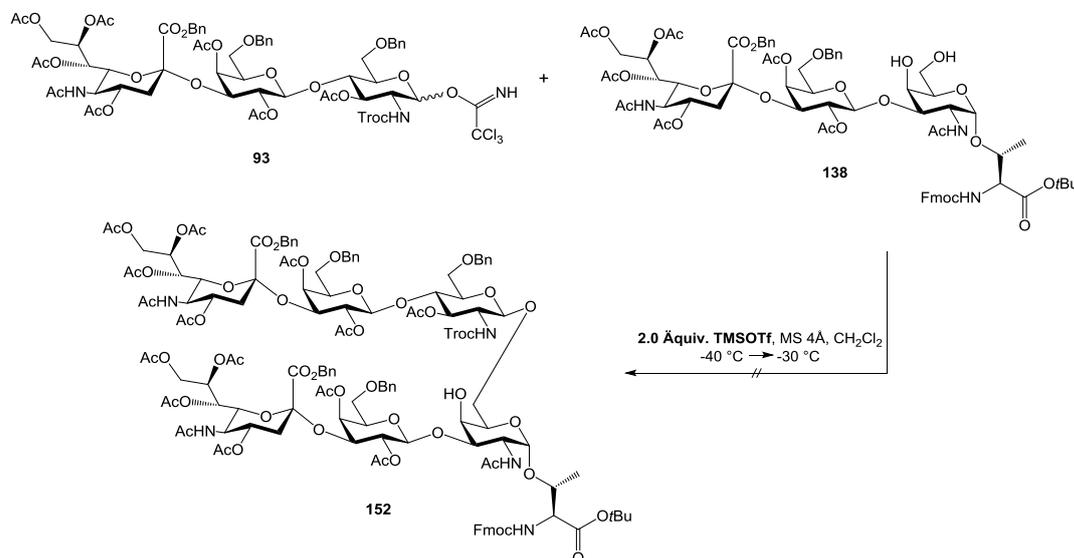
Schema 3. 52: Alternative Darstellung der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate **149** und **150** unter Bildung von **151**.

Hierzu wurden das Trichloracetimidat **103** und die Trisaccharid-Threonin-Bausteine **138** bzw. **144** in einer Lösung aus absol. Dichlormethan mit aktiviertem Molsieb wiederum bei Raumtemperatur gerührt und nach dem Abkühlen der Ansätze auf -40 °C mit 2.0 Äquivalenten einer Lösung von TMSOTf in absol. Dichlormethan versetzt. Die Reaktionsansätze zeigten jedoch über eine Dauer von zwei Stunden keinerlei Umsatz zu den gewünschten Hexasaccharid-Threonin-Konjugaten **149** und **150**, weshalb die Reaktionsmischungen langsam erwärmt wurden. Nach einer Reaktionsdauer von sechs Stunden wurden die Umsetzungen aufgrund ausbleibender Reaktion (DC-Kontrolle) abgebrochen.

Die anschließenden flashchromatographischen Reinigungen lieferten zum einen die beiden Trisaccharid-Akzeptorbausteine **138** bzw. **144** sowie ein säure-katalysiertes Umlagerungsprodukt **151** des eingesetzten Glycosyldonors **103**. Die Interpretation der zugehörigen NMR-Spektren konnte aufgrund einer Vielzahl von Signalüberlappungen nicht zweifelsfrei die Bildung des entsprechenden Amids **151** bestätigen, jedoch sprechen im Vergleich zum Trichloracetimidat **103** die Verschiebungen der relevanten Signale in den ¹H-¹³C-korrelierten HSQC-Spektren für das anomere Proton H1-GlcN der Glucosamin-Einheit und das zugehörige C1-GlcN für diese Annahme in Form einer relativen Hochfeldverschiebung der betreffenden Kerne. Weiterhin weisen die eindimensionalen NMR-Spektren von Verbindung **151** nicht mehr die charakteristischen Signale eines Trichloracetimidats in Form einer singulären NH-Bande bei 8.70 ppm wie auch des carbonylanalogen Kohlenstoffatoms bei 161.0 ppm auf.

Weiterhin sollte unter Verwendung des Trisaccharid-Threonin-Konjugats **138** sowie des natürlichen Trichloracetimidats **93** die Darstellung eines natürlichen Hexasaccharid-Threonin-Konjugats **152** bewerkstelligt werden (Schema 3.53). Wie zuvor bei der versuchten Darstellung der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate **149** bzw. **150** zeigte auch der natürliche Trichloracetimidatdonor **93** leider keinerlei Reaktivität bei Akti-

vierung mit TMSOTf (0.5 Äquiv. bzw. 2.0 Äquiv.) gegenüber dem Akzeptorbaustein **138**. Dieses völlig unerwartete Resultat stellt insofern einen überraschenden Befund dar, als sich der Glycosyldonor **93** in Gegenwart des entsprechenden fluorierten Akzeptorbausteins **144** problemlos in das gewünschte Hexasaccharid-Threonin-Konjugat **145** überführen ließ.



Schema 3. 53: Die Synthese des natürlichen Hexasaccharid-Threonin-Konjugats **152**.

Demzufolge kann eine eingeschränkte bzw. fehlende Reaktivität des vorliegenden Trichloracetimidats **93** nicht die einzige Ursache für die ausbleibende Umsetzung sein. Vielmehr können auch sterische Effekte die Glycosylierung dem an der 6-Position verknüpften Regioisomers erschweren, wodurch nach der säurekatalysierten Aktivierung des Glycosyldonors dessen Umlagerung begünstigt wird.

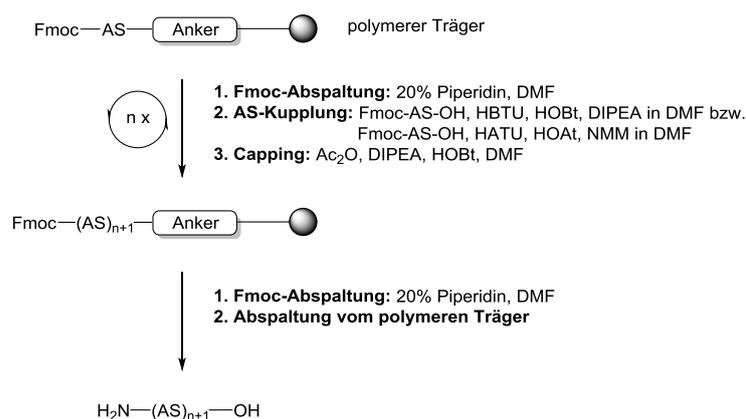
Von besonderer Bedeutung im Aufbau solch komplexer Oligosaccharid-Threonin-Konjugate scheinen daher tatsächlich kleinere strukturelle Unterschiede in den vorliegenden Akzeptorbausteinen **138** und **144** zu sein. Diese äußern sich möglicherweise in unterschiedlichen Vorzugskonformationen der hier betrachteten Bausteine und ermöglichen bzw. erschweren die Darstellung höher funktionalisierter Oligosaccharid-Threonin-Konjugate und zeigen auf eindrucksvolle Weise, dass entsprechende Vorhersagen über das Reaktionsverhalten einer vorliegenden Verbindung nicht ohne weiteres erbracht werden können.

3.7 Synthese der Glycopeptidantigene mit fluorierten Kohlenhydrat-Epitopen

Die synthetisierten Glycosylaminosäure-Bausteine **130**, **132**, und **134**, deren Herstellung im vorangehenden Kapitel (vgl. Kapitel 3.5.3) beschrieben wurde, standen nun für die geplanten Festphasenglycopeptidsynthesen zur Verfügung. Hierbei wurden die entsprechenden Glycopeptide aus der *tandem repeat*-Einheit des epithelialen MUC1 aufgebaut.

3.7.1 Grundlagen der Peptidsynthese und das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasensynthese

Die grundlegenden Prinzipien der Festphasensynthese bilden die bereits im Jahre 1963 veröffentlichten Arbeiten von *Merrifield* unter Einsatz von Trägermaterialien aus Basis von quervernetzten Polystyrolen.^[293-294] Allgemein geht man für die Synthese von (Glyco-)Peptiden an der festen Phase von einer *N*-terminal geeignet blockierten Aminosäure aus, welche über die Carboxylfunktion an eine Ankergruppe gebunden ist, die wiederum mit einem polymeren Träger verknüpft ist. Im Gegensatz zur Biosynthese erfolgt der Aufbau synthetischer Peptide an der festen Phase daher ausgehend vom *C*-Terminus. Für die temporäre Blockierung der Aminofunktion der am Harz gebundenen und aller folgenden Aminosäuren kommt in der Regel die unter milden Bedingungen spaltbare, basenlabile 9*H*-Fluorenmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe zum Einsatz.^[295] Zu Beginn der Synthese erfolgt die selektive Deblockierung der an das funktionalisierte Harz gebundenen Startaminosäure (Schema 3.54), sofern diese in geschützter Form vorliegt. Bei der Verwendung der *Fmoc-Strategie* geschieht dies unter der Einwirkung von sekundären Basen wie Piperidin oder Morpholin. Nach der Spaltung des Fmoc-Carbamats steht die resultierende freie Aminofunktion für die Anknüpfung der zweiten *N*-terminal geschützten Aminosäure zur Verfügung, welche den Einsatz geeigneter Kupplungsreagenzien erfordert.



Schema 3. 54: Das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasensynthese nach der *Fmoc-Strategie*.

Um die Bildung von Fehlsequenzen im Zuge eines unvollständigen Umsatzes der anzuknüpfenden Aminosäure zu unterbinden, besteht die Möglichkeit einen sogenannten *Capping*-Schritt in die Synthese einzubauen, bei welchem nicht umgesetzte Aminogruppen durch Reaktion mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von *N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) unter Acetylierung der weiteren Peptidsynthese entzogen werden. Im weiteren Verlauf kann nun die dreistufige Reaktionssequenz wiederholt werden und liefert das polymer-

gebundene (Glyco-)Peptid in vollständig geschützter Form. Hierbei sind alle funktionellen Seitenketten der Fmoc-geschützten Aminosäuren mit säurelabilen Schutzgruppen (*tert*-Butylether bei L-Serin, L-Threonin und L-Tyrosin bzw. entsprechende *tert*-Butylester bei L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure) sowie mit der 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl(Pmc)-Schutzgruppe^[296] für L-Arginin versehen. Um alle Aminosäureseitenketten-Schutzgruppen gemeinsam abspalten zu können, wird daher auch das sekundäre Amin des Histidins mit der säurelabilen Trityl-Schutzgruppe^[297] blockiert (Abb. 3.8).

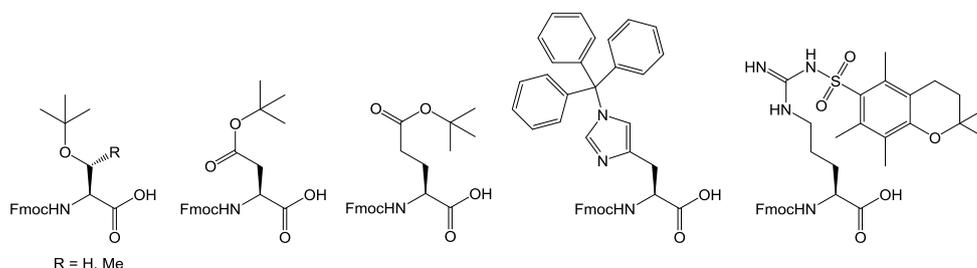


Abb. 3. 8: Sekundäre Schutzgruppen der Fmoc-geschützten Aminosäuren in der Festphasensynthese.

Nach erfolgter Synthese wird das fertige Peptid z.B. durch Behandlung mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan vom Harz gespalten und nach Überführung in einen Merrifield-Reaktor durch Filtration vom polymeren Träger abgetrennt. Je nach Wahl der Reaktionsbedingungen und des jeweiligen Ankersystems kommt es gleichzeitig zu einer Spaltung der Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren. Die verbliebenen Schutzgruppen der Glycosylaminosäure lassen sich schließlich durch Umsetzung in Lösung entfernen. Der Aufbau von Aminosäuresequenzen an der festen Phase bietet zudem den Vorteil, dass die polymer-gebundenen Peptidketten durch einfache Filtration von den eingesetzten Reagenzien und durch gründliche Waschstufen abgetrennt werden können. Diese Form der Aufreinigung ermöglicht zum einen die Automatisierung der Synthese und gewährleistet im Allgemeinen hohe Umsatzraten bei kurzen Reaktionszeiten.

Für die Festphasensynthese kann neben der bereits beschriebenen konventionellen Methode unter Anwendung eines dreistufigen Synthesesyklus auch ein modifiziertes Verfahren unter Mikrowelleneinstrahlung Anwendung finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Synthesen der (Glyco-)Peptide in einem zweistufigen Synthesesyklus an einem Liberty1-Mikrowellen-Peptidsynthesizer der Firma CEM durchgeführt. Im Gegensatz zur konventionellen Festphasensynthese umfasst dieses Syntheseprotokoll lediglich zwei einzelne Reaktionsschritte. Wiederum startet der Aufbau des Peptids mit der Deblockierung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe der am Harz gebundenen Startaminosäure unter der Einwirkung von Mikrowellenstrahlung, gefolgt von der Anknüpfung der folgenden Aminosäure unter geeigneten Kupplungsbedingungen im zweiten Schritt der Synthese. Durch die Unterstützung mit Mikrowellenstrahlung kann auf den nachfolgenden Capping-Schritt in der Regel verzichtet werden.

Im Folgenden soll nun auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Synthesen der (Glyco-)Peptide und die zugrundeliegenden einzelnen Reaktionsschritte der Festphasensynthese genauer eingegangen werden.

Wie zuvor schon erwähnt wurden die Synthesen an einem Liberty1-Peptidsynthesizer der Firma CEM unter Mikrowelleneinstrahlung durchgeführt. Als polymere Träger wurden wegen der guten Quelleigenschaften kommerziell erhältliche Wang-TentaGel-Harze der Firma Novabiochem, Merck Millipore verwendet, welche mit der *C*-terminalen Startaminosäure L-Alanin beladen sind (Beladung: 0.33 - 0.35 mmol/g). Das gewählte säurelabile Ankersystem bot sich dahingehend an, dass die (Glyco-)Peptide mit einer Mischung aus Trifluor-

essigsäure, Wasser und Triisopropylsilan unter Entfernung der ebenfalls säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren in einem einzigen Schritt ohne nennenswerte Racemisierung vom eingesetzten polymeren Trägerharz abgespalten werden konnten.

Zu Beginn der automatisierten (Glyco-)Peptidfestphasensynthese erfolgt zunächst die *N*-terminale Fmoc-Abspaltung der am Harz gebundenen Startaminosäure mit einer 20%-igen Piperidin-Lösung in *N,N*-Dimethylformamid. Dieser Reaktionsschritt wird in der Regel mindestens zweimal wiederholt und infolge der Deprotonierung des CH-aciden Protons in der 9-Position der Schutzgruppe kommt es zur Freisetzung der deblockierten Aminosäure (E_1cB -Mechanismus). Über die starke UV-Absorption des entstandenen Abspaltungsprodukt der Fmoc-Gruppe, dem Dibenzofulven-Piperidin-Addukt, kann eine Reaktionskontrolle der Fmoc-Abspaltung erfolgen und indirekt zur Überprüfung der Effizienz der vorangegangenen Aminosäurekupplung genutzt werden.

Für die Kupplungen der folgenden Aminosäuren steht eine Reihe von verschiedenen Möglichkeiten zur Verfügung. Allgemein erfolgt die Aktivierung der Carboxylfunktion der anzubindenden Aminosäure durch *in situ* Aktivierung über spezielle Kupplungsreagenzien. Die Wahl der Reagenzien richtet sich hierbei neben der Reaktivität auch nach der Racemisierungsneigung der aktivierten Aminosäure. Letztere zeigen dabei nicht nur wesentlich höhere Reaktivitäten bei Bildung der Aktivester, sondern bieten im Zusammenhang mit den Triazoladditiven 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[298] oder 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)^[299] eine deutliche Reduzierung der Racemisierung des gebildeten Aktivesters.

Neben dem Einsatz von Carbodiimiden wie z.B. *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)^[300] *N*-Ethyl-*N*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC)^[301] und *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC), kommen heutzutage vorwiegend Kupplungsreagenzien auf der Basis von Uroniumsalzen wie z.B. *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)^[302-303] sowie das reaktivere *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU)^[304-305] zum Einsatz (Abb. 3.9).

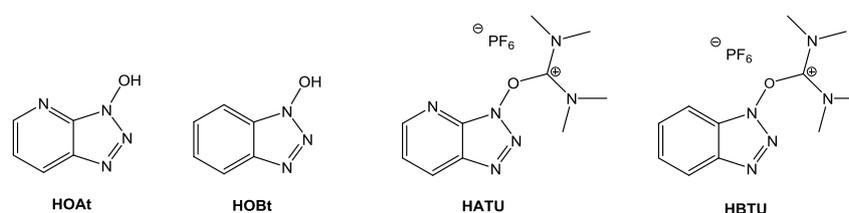
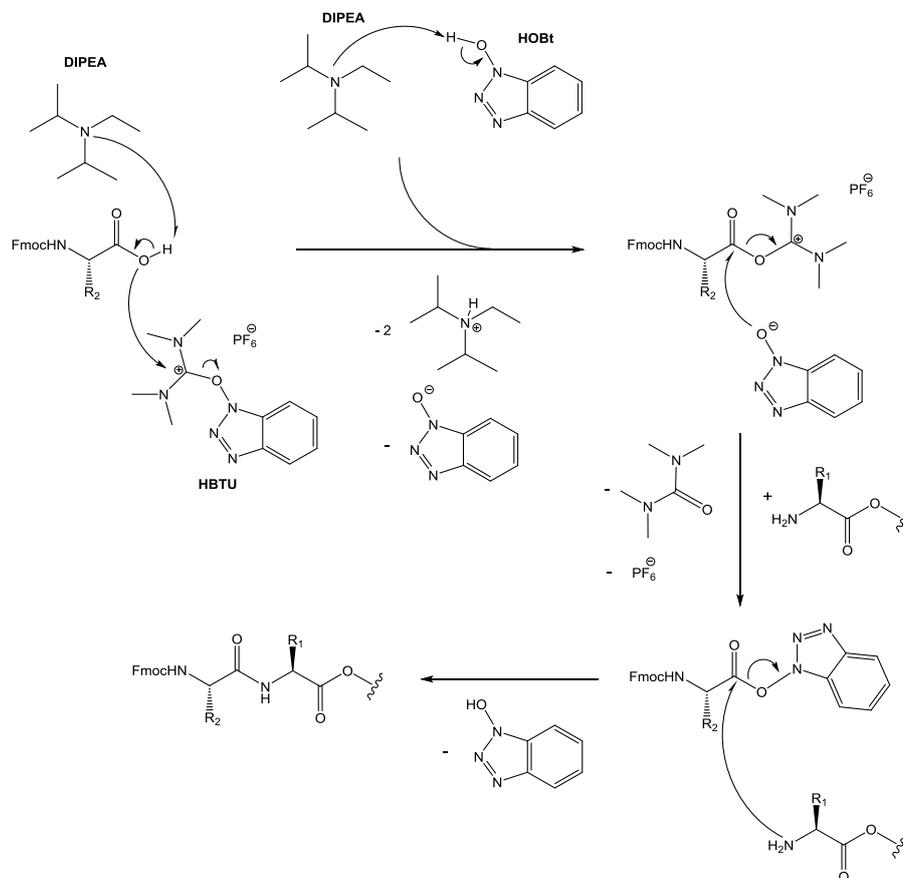


Abb. 3. 9: Übersicht über verwendete Kupplungsreagenzien sowie die zugehörigen Additive.

Der Mechanismus der Aktivierung für die Aminosäure in Gegenwart von HBTU und HOBt kann wie folgt beschrieben werden: Zunächst kommt es durch eine äquimolare Menge an *N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) zur Deprotonierung der Carbonsäure sowie des sauren, nucleophilen Additivs HOBt (Schema 3.55). Daraufhin kommt es zu einer Umsetzung des Carboxylats mit dem Uroniumsalz, wobei sich das entsprechende *O*-Acyl-Uroniumsalz als Intermediat bildet. Im zweiten Reaktionsschritt kann nun dieses vom deprotonierten HOBt unter Bildung eines Aktivesters substituiert werden, wodurch schließlich unter Angriff der freien Aminofunktion die gewünschte Peptidbindung erhalten wird. Die teilweise beobachtete Racemisierung und weitere unerwünschte Nebenreaktionen lassen sich durch die Verwendung des Additivs HOBt bzw. HOAt für die Kupplung der komplexen Glycosylaminosäurebausteine herabsetzen. Dies kann in besonderem Maße auf die hohe Reaktivität des mit dem deprotonierten HOBt gebildeten Aktivesters zurückgeführt werden,

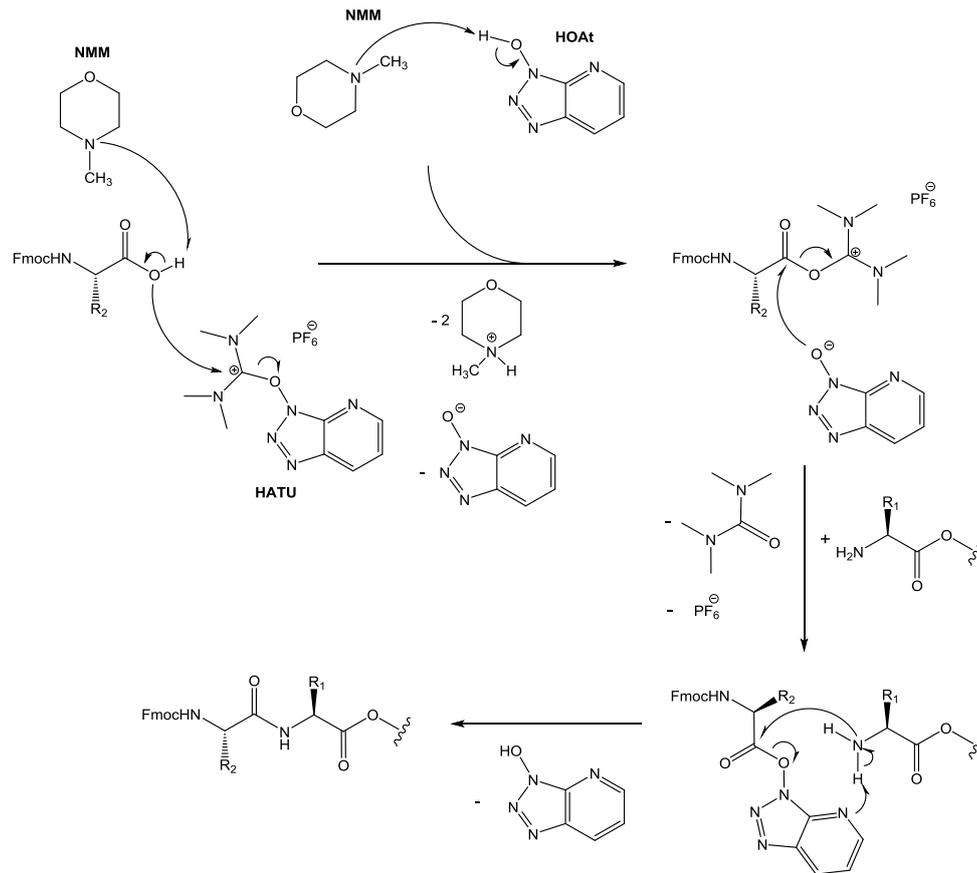
welcher sich sehr schnell mit der Aminkomponente umsetzen lässt. Aus diesem Grund wird die gewünschte Amidbindung erhalten, bevor es zu einer Racemisierung der aktiven Intermediats kommen kann.



Schema 3. 55: Der Mechanismus der Peptidkupplung unter der Verwendung von HBTU und HOBT.

Expliziert führt die Verwendung der beiden 7-Azaanaloga von HOBT und HBTU, dem HOAt und HATU, in der Kombination mit der Base *N*-Methylmorpholin (NMM) zu einer noch gesteigerten Reaktivität infolge der Substitution des Benzotriazolrings in der 7-Position mit einem elektronenziehenden Stickstoffatom (Schema 3.56).

Die erhöhte Reaktivität zeigt sich nicht nur beim eingesetzten Reagenz, sondern auch bei dem gebildeten Aktivester, der damit eine bessere Abgangsgruppe darstellt. Weiterhin führt der Einsatz von HOAt zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke im Zuge der Peptidkupplung, wodurch eine deutliche Minimierung der Racemisierung erreicht werden kann. Hierdurch kommt es zu einer Vorkoordination, welche den anschließenden nucleophilen Angriff des polymergebundenen Oligopeptids an die sterisch anspruchsvolle Glycosylaminosäure erleichtert. Dem Kupplungsschritt schließt sich – wie zuvor erwähnt – der nächste Synthesezyklus durch die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit einer 20%-igen Piperidin-Lösung in *N,N*-Dimethylformamid an. Nach dem erfolgten Aufbau des (Glyco-)Peptids durch die zweistufigen Synthesezyklen kann das Peptid nach finaler Fmoc-Abspaltung vom Harz abgespalten werden. Weitere Umsetzungen unter Entfernung sämtlicher Schutzgruppen können durch entsprechende Reaktionen in Lösung bewerkstelligt werden.

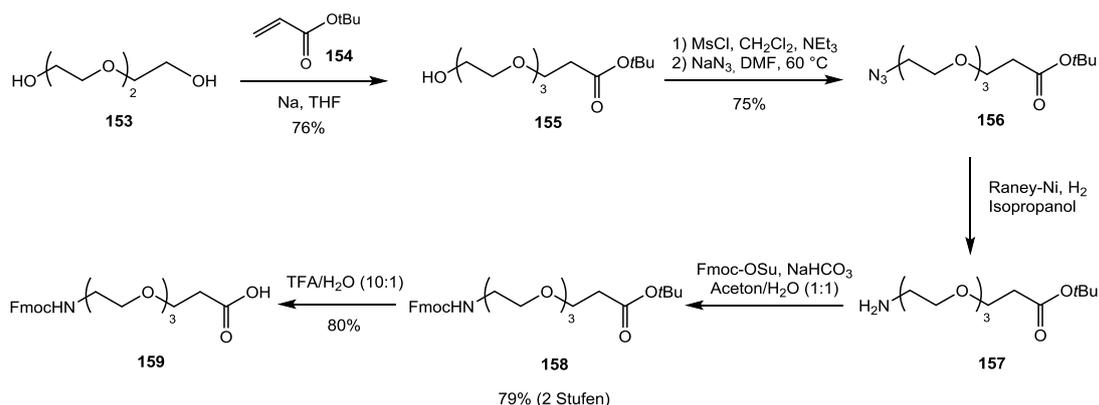


Schema 3. 56: Der Mechanismus der Peptidkupplung unter der Verwendung von HATU und HOAt.

3.7.2 Synthese der Triethylenglycol-Spacer

Der Aufbau vollsynthetischer Vakzine auf der Basis von tumorassoziierten MUC1-Glycopetiden und deren spätere Konjugation an geeignete Carrierproteine wie z.B. dem *Tetanus-Toxoid* (TTox) oder dem *Rinderserumalbumin* (BSA) machte die Synthese eines nicht-immunogenen Abstandhalters erforderlich, um gegenseitige Wechselwirkungen der beiden Teilstrukturen des Glycopeptids sowie des Carrierproteins zu minimieren.^[210]

Für den Aufbau von Vakzinen haben sich funktionalisierte Ethylenglycolspacer bewährt, da sie weder immunogen wirken noch negative Eigenschaften auf die Konformation der Vakzine ausüben. Die Synthese des Triethylenglycolspacers erfolgte nach einem literaturbekannten Verfahren^[210, 306] ausgehend von Triethylenglycol **153** (Schema 3.57). Dieser wurde in einer Hetero-Michael-Addition mit Acrylsäure-*tert*-butylester **154** in Gegenwart katalytischer Mengen an Natrium in Tetrahydrofuran zu Verbindung **155** umgesetzt. Für die Einführung einer Azidofunktion an der 12-Position des Spacers wurde die Hydroxyfunktion zunächst durch Reaktion mit Methansulfonylchlorid (Mesylchlorid, MsCl) und Triethylamin in das entsprechende Mesylat überführt, bevor dieses in einer Substitutionsreaktion mit Natriumazid zur Verbindung **156** umgesetzt wurde, die nach flashchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 75% erhalten werden konnte.

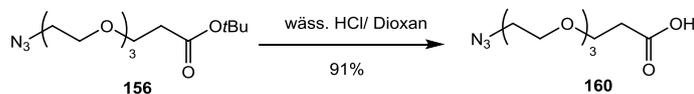


Schema 3. 57: Die Synthese des Triethylenglycol-Spacers **159**.

Die anschließende Umsetzung des Azids **156** konnte durch Reduktion mit Wasserstoff in Gegenwart von *Raney-Nickel* als Katalysator in Isopropanol zum freien Amin **157** erreicht werden, welches im Anschluss nach Reaktion mit Fmoc-OSu als orthogonal-blockierte Verbindung **158** in einer Ausbeute von 79% (über zwei Stufen) erhalten werden konnte. Im letzten Schritt der Reaktionssequenz wurde die Spaceraminosäure **158** durch Spaltung des *tert*-Butylesters mit Trifluoressigsäure und Wasser (10:1) am Carboxylterminus deblockiert (**159**).

Ausgehend von Verbindung **156** konnte weiterhin nach einer literaturbekannten Vorschrift^[307] die Synthese eines modifizierten Spacers **160** erfolgen, welcher den Zugang zu Konjugaten über Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (Click-Reaktion)^[308-309] ermöglichen sollte. Hierzu wurde der *tert*-Butylester von Verbindung **156** in einer Mischung aus Salzsäure (4 M) und 1,4-Dioxan mit einer Ausbeute von 91% unter Freisetzung der Carbonsäure umgesetzt (Schema 3.58).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch aufgrund zu geringer Substanzmengen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate (vgl. Kapitel 3.6) die Synthese der entsprechenden Glycopeptide nicht mehr durchgeführt werden, sodass eine spätere Konjugation dieses funktionalisierten Triethylenglycolspacers **160** in weiterführenden Arbeiten untersucht werden muss.



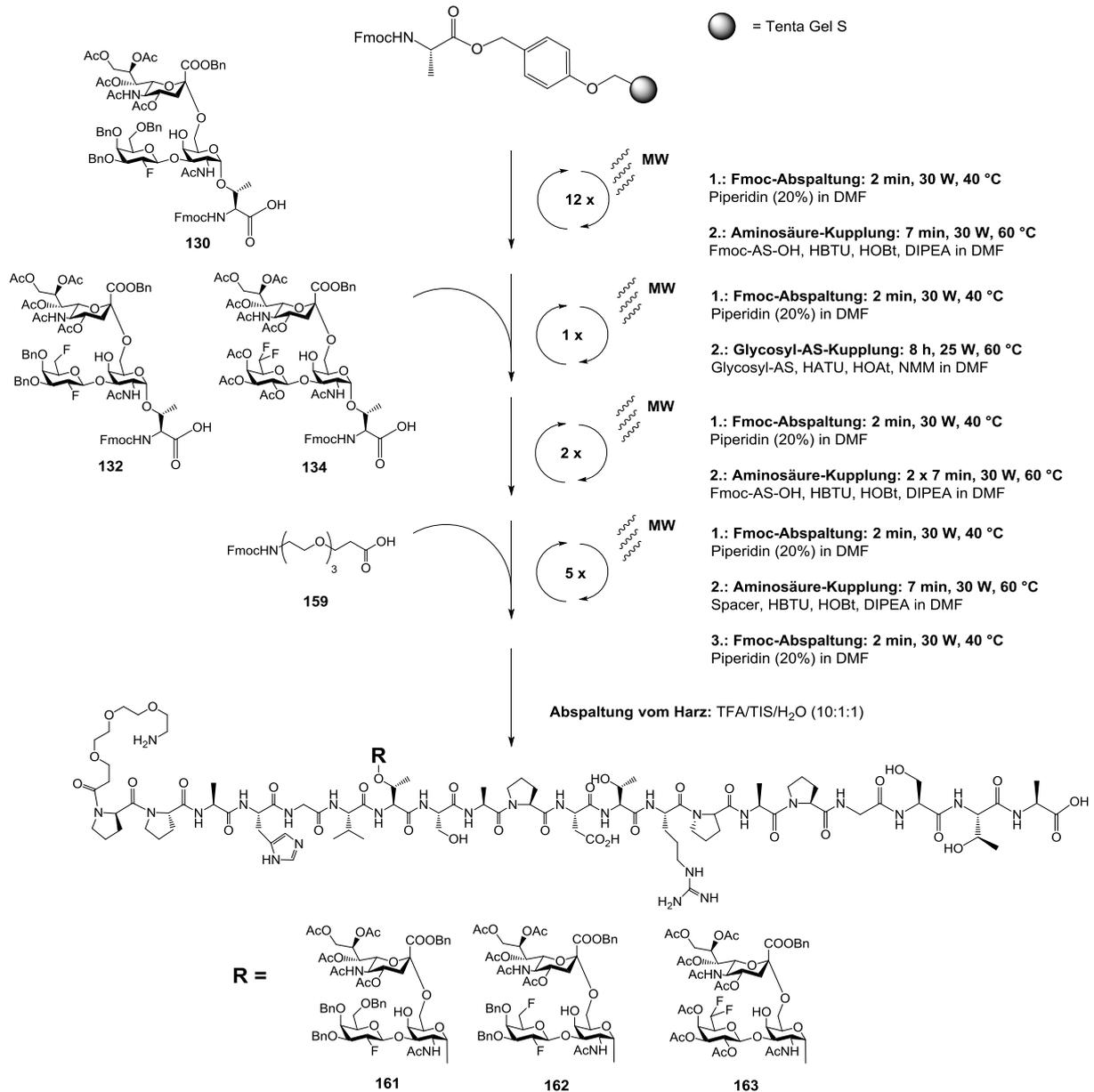
Schema 3. 58: Synthese des modifizierten Triethylenglycol-Spacer 160.

3.7.3 Festphasensynthese der Glycopeptide des epithelialen Mucins MUC1

Zum Aufbau der fluorierten Glycopeptide wurden zunächst die Glycosylaminosäure-Bausteine **130**, **132** und **134** in die *tandem repeat*-Sequenz des epithelialen Mucins MUC1 eingebaut. Für die Synthesen der Glycopeptide wurde ein mit *Fmoc*-Alanin beladenes *Wang*-TentaGel-Harz (Beladung: 0.33 - 0.35 mmol/g) entsprechend dem zuvor beschriebenen zweistufigen Synthesesyklus eingesetzt (Schema 3.54). Nach erfolgter Synthese an der festen Phase wurde das Harz in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und für die Dauer von 3 h in einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan (10:1:1) stark geschüttelt. Die Rohpeptide konnten nach Entfernung der Lösungsmittel anschließend aus kaltem Diethylether gefällt werden und wurden nach Lyophilisation als farblose Feststoffe erhalten (Schema 3.59).

Die Rohpeptide **161**, **162** und **163** wurden durch semipräparative RP-HPLC gereinigt und nach Lyophilisation in Ausbeuten von 49% - 60% bezogen auf das eingesetzte Harz erhalten, wobei auf dieser Stufe deren erfolgreiche Darstellung über entsprechende Massenspektrometrie und NMR-Experimente bestätigt werden konnte. Anschließend wurden die Kohlenhydratschutzgruppen der Glycosylaminosäure-Bausteine durch kontrollierte Methanolyse bzw. Behandlung mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung bei einem pH-Wert von 11 entfernt (Schema 3.60). Dabei bedarf die Einstellung des pH-Wertes genauer Kontrolle und muss gegebenenfalls nachjustiert werden, um den Verlust der Kohlenhydratseitenkette infolge einer β -Eliminierung wirkungsvoll zu unterdrücken.

Bei der Deblockierung der Glycopeptide **161** und **162** unter Spaltung der Benzylether führte die gewählte Methode in Gegenwart von Palladium(II)-acetat unerwartet nicht zum Erfolg, so dass nach semipräparativer RP-HPLC massenspektroskopisch lediglich unvollständig debenzylierte Peptide bzw. solche unter Verlust der Kohlenhydrat epitope isoliert werden konnten. Aus Zeitgründen sowie zu geringen Substanzmengen der Festphasenbausteine **130** und **132** konnte die erneute Synthese der Glycopeptide **161** und **162** nicht mehr durchgeführt werden, wobei in weiterführenden Arbeiten alternative Reaktionsbedingungen für die Spaltung der Benzylether zur vollständigen Deblockierung dieser herangezogen werden sollten. Dennoch konnten im Rahmen dieser Arbeit mit den Verbindungen **161**, **162** und **163** drei neuartige fluorierte Glycopeptide mit 2,6-(ST)-Antigenbausteinen in vollgeschützter Form erfolgreich hergestellt werden.

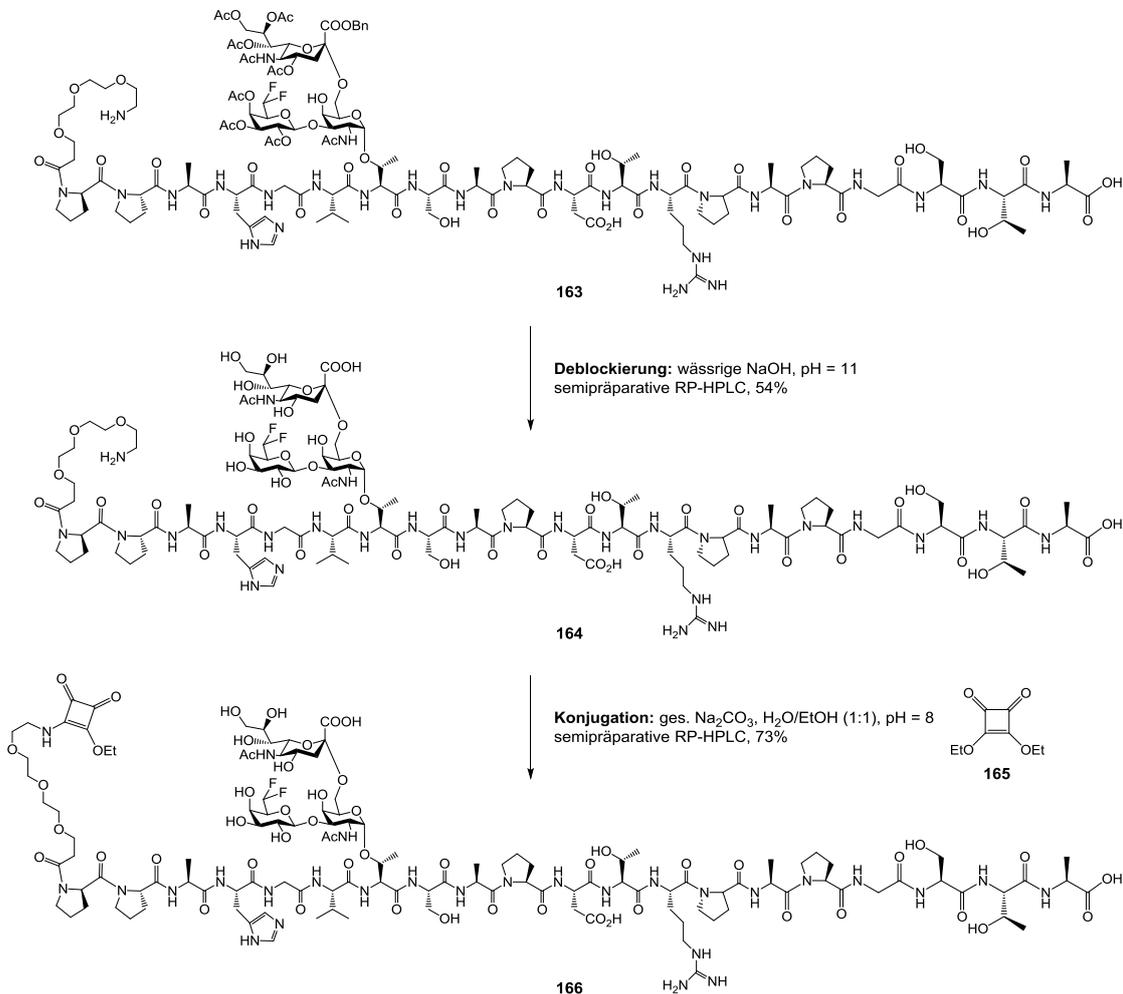


Schema 3. 59: Festphasenglycopeptidsynthese der fluorierten MUC1-Glycopeptide **161**, **162** und **163**.

Die erfolgreiche Deacetylierung des Peptids **163** wurde wie zuvor beschrieben mit einer wässrigen Natronlauge bei pH = 11 bewerkstelligt, gefolgt von einer Neutralisation mit Essigsäure (1 M) und anschließender Lyophilisation. Semipräparative RP-HPLC lieferte das gereinigte Glycopeptid **164** in einer Ausbeute von 54% bezogen auf **163** (Schema 3.60).

Zur Gewährleistung einer effektiven Immunantwort im Zuge der Immunisierung mit MUC1-Glycopeptiden ist eine Konjugation an geeignete Carrierproteine notwendig, da solche Kohlenhydrathaptene lediglich über eine unzureichende Immunogenität verfügen (vgl. Kapitel 1.6). Für die Überwindung der Toleranzmechanismen des Immunsystems machte dies die Verknüpfung mit Carrierproteinen notwendig, welche ihrerseits T_H2-Zell-Epitope aufweisen und damit eine über MHC-II-Komplexe prozessierte Immunantwort auslösen können. Die hierdurch sichergestellte Erkennung durch CD4⁺-T-Helferzellen gewährleistet einerseits eine effektive Aktivierung von B-Zellen und bietet andererseits die Grundlage für eine starke Aktivierung des Immunsystems. Einen Ansatz hierfür bietet das in zahlreichen Arbeiten^[143, 164, 190, 310] bereits genutzte Ver-

fahren zur Konjugation von MUC1-Glycopeptiden, welches nach *Tietze*^[311-312] auf dem Einsatz von Quadratsäurediethylester (3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion) unter chemoselektiver Verknüpfung mit dem primären Amin des Triethylglycolspacers beruht (Schema 3.60).



Schema 3. 60: Synthese des Quadratsäure-funktionalisierten Glycopeptids **166**.

Hierzu wurde das vollständig deblockierte Glycopeptid **164** am freien Amin des Triethylglycolspacers mit dem Quadratsäurediethylester **165** in einer Mischung aus Wasser und Ethanol (1:1) sowie einer ges. Natriumcarbonat-Lösung bei einem pH-Wert von 8 zum gewünschten Monosquarat **166** in einer Ausbeute von 73% nach semipräparativer RP-HPLC umgesetzt. Somit konnte für das neuartige 6,6-difluorierte Glycopeptid-Monosquarat **166** erstmals der synthetische Zugang zu einem vielversprechenden Vakzinkandidaten für eine spätere Konjugation an unterschiedliche Carrierproteine wie dem *Rinderserumalbumin* (BSA), dem *Tetanus-Toxoid* (TTox) sowie weiterer Immunstimulationen gelegt werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung von Antitumorvakzinen auf der Basis mucinartiger Glycopeptide stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von Krebs sowie einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen dar. Weiterhin ist ein solcher Therapieansatz für eine mögliche Unterdrückung chronisch entzündlicher Krankheiten wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) von großem Interesse. Die Grundvoraussetzung für die gezielte Stimulation des körpereigenen Immunsystems liegt in der genauen Identifikation spezifischer Zelloberflächenstrukturen und deren Funktion in den zugrundeliegenden zellulären Prozessen. In diesem Zusammenhang stellen Modifikationen der Oberflächenproteinstrukturen bei Mucinen, die auf einer veränderten Expression und Aktivität verschiedener Glycosyltransferasen in entarteten Zellen beruhen, wichtige Erkennungsmerkmale und somit Zielstrukturen für die Entwicklung von selektiven kohlenhydratbasierten Vakzinen dar.

Die unzureichende Immunogenität der Glycopeptidkonjugate erfordert jedoch die Konjugation an hoch immunogene *Carrier*-Proteine zur Sicherstellung einer ausreichenden Immunantwort. Dabei unterliegen solche Konjugate aufgrund ihrer eingeschränkten metabolischen Stabilität einer enzymatischen Degradation im Organismus, was zum vorzeitigen Verlust von wichtigen antigenen Erkennungsstrukturen im Vakzin führen kann. Um dies zu verhindern, werden zunehmend entsprechende Kohlenhydratmimetika, die die Bioverfügbarkeit der Konjugate erhöhen, eingesetzt. Wie von *Hoffmann-Röder et al.* kürzlich gezeigt wurde, eignen sich hierfür insbesondere fluorierte Kohlenhydratanaloga beziehungsweise daraus aufgebaute Glycopeptidanaloga.

Ziel dieser Arbeit war daher, einen synthetischen Zugang zu neuen mucinartigen Glycopeptiden zu schaffen, die sich durch eine gezielte Substitution von Hydroxylgruppen durch Fluoratome auszeichnen. Von besonderem Interesse sind dabei Analoga der sialylierten Kohlenhydratantigene des (2,6)-ST-Antigens und des Sialophorins, da diese an der Ausbildung einer Vielzahl von Krankheitsgeschehen maßgeblich beteiligt sind. Der Aufbau der entsprechenden Glycopeptide sollte hierbei an der festen Phase erfolgen und die resultierenden Glycopeptide nachfolgend zur Untersuchung ihrer immunologischen Eigenschaften an geeignete Carrier-Proteine konjugiert werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Konzept sah den Aufbau über eine konvergente Strategie eines zentralen Galactosamin-Threonin-Konjugats (T_N -Antigen) vor, welches einer biomimetischen Synthese folgend in linearen Routen zu höheren Oligosaccharid-Threonin-Bausteinen umgesetzt werden sollte. Dieses setzte die Darstellung der funktionalisierten Monosaccharid-Bausteine voraus, welche in entsprechenden Glycosylierungsreaktionen die Di- und Trisaccharid-Derivate lieferte. Diesem Konzept folgend sollte eine finale β -1,6-Verknüpfung aufgebaut werden, da diese bedingt durch eine im Allgemeinen höhere Reaktivität am leichtesten zu bewerkstelligen ist (vgl. Kapitel 3.1).

Für die Darstellung der komplexen Oligosaccharid-Threonin-Konjugate **130**, **132**, **134**, und **148** musste zunächst ein synthetischer Zugang zu den unterschiedlich fluorierten Kohlenhydrat-Bausteinen geschaffen werden (Abb. 4.1). Besondere Bedeutung bei der Planung der einzelnen Synthesen kam der Wahl eines orthogonalen Schutzgruppenmusters sowie die Verwendung gemeinsamer Vorläufermoleküle für den modularen Aufbau der Verbindungen zu.

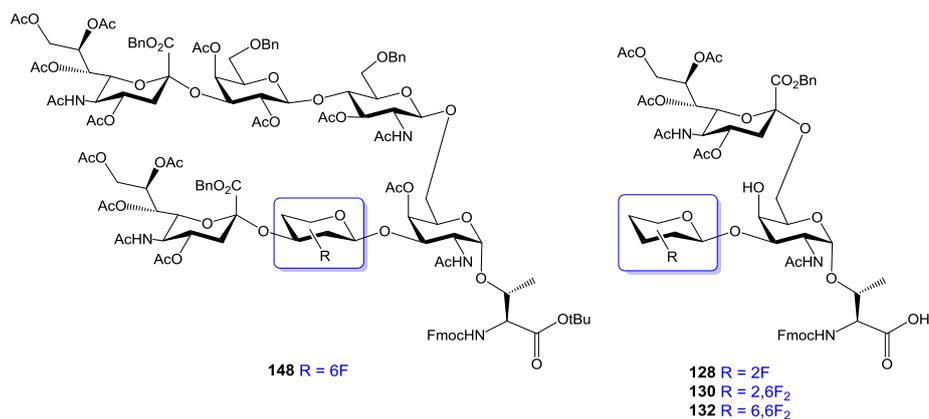
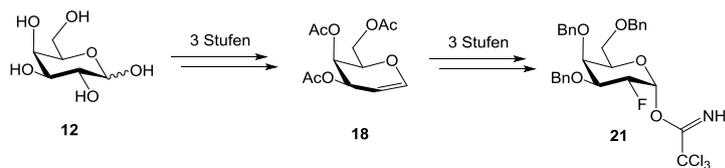


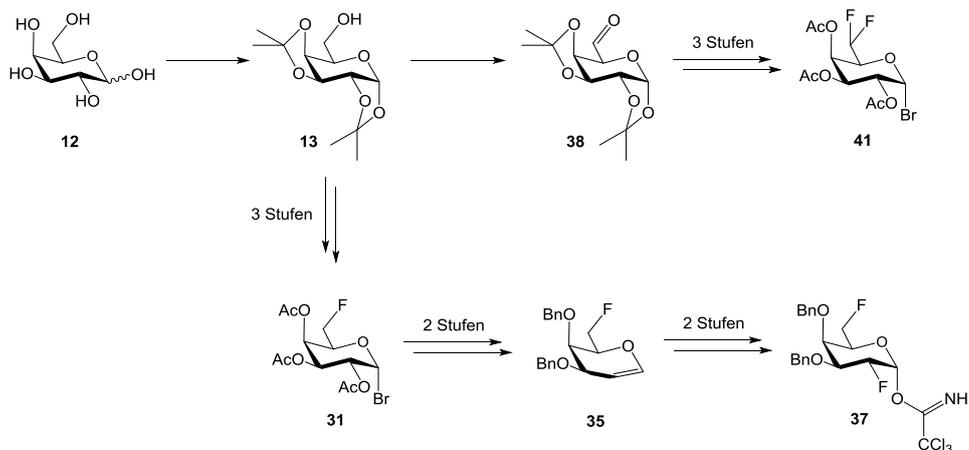
Abb. 4. 1: Die synthetisierten fluorierten Oligosaccharidbausteine **130**, **132**, **134** und **148**.

Einer konvergenten Strategie folgend wurden die Disaccharid-Threonin-Konjugate durch Glycosylierungsreaktionen unter Einsatz der fluorierten Galactosyldonoren **21**, **37** und **41** sowie des T_N-Antigen-Akzeptors **115** nach literaturbekannten Syntheserouten aufgebaut. Die Synthese des einfach-fluorierten Galactosyltrichloracetimidats **21** erfolgte ausgehend von D-Galactose (**12**) in sechs Stufen und unter Verwendung einer elektrophilen Fluorierung mit Selectfluor[®] (Schema 4.1).



Schema 4. 1: Die Synthese des einfach-fluorierten Galactosyldonors **21**.

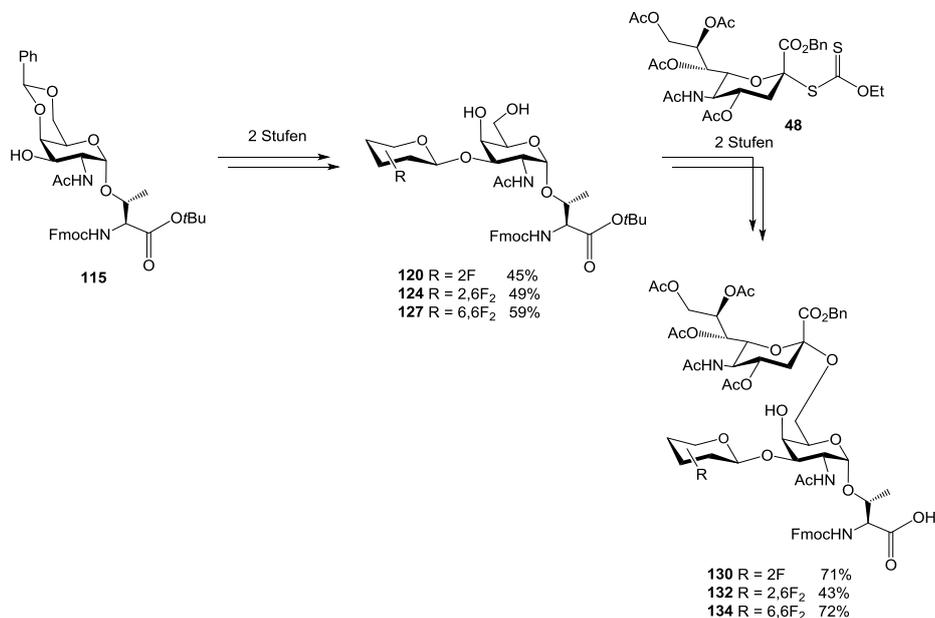
Demgegenüber wurden die beiden zweifach-fluorierten Bausteine **37** und **41** ausgehend von D-Galactose (**12**) mithilfe nucleophiler Fluorierungsreaktionen unter Verwendung von DAST[®] aufgebaut, wobei **41** nach insgesamt fünf Stufen und Trichloracetimidat **37** nach insgesamt acht Stufen erhalten wurde (Schema 4.2).



Schema 4. 2: Die Synthesen der zweifach-fluorierten Galactosyldonoren **37** und **41**.

Die nachfolgenden Glycosylierungsreaktionen der Galactosyldonoren **21**, **37** und **41** mit dem T_N-Antigen-Akzeptor **115** konnten in Ausbeuten von 59% - 85% bewerkstelligt werden, so dass nach Deblockierung der

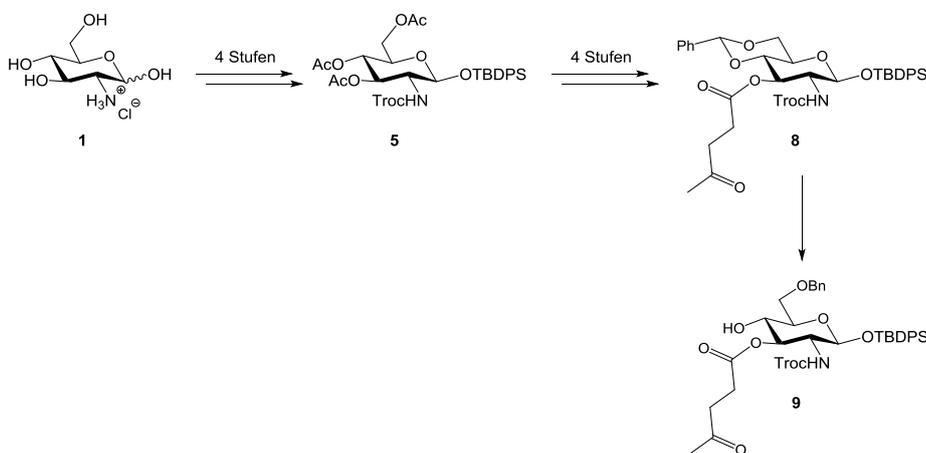
Benzyldenacetale die entsprechenden Disaccharid-Konjugate **120**, **124** und **127** für den späteren Aufbau der sialylierten (2,6)-ST-Antigen-Bausteine in Gesamtausbeuten von 49% - 59% erhalten wurden (Schema 4.3).



Schema 4. 3: Die Synthesen der sialylierten Festphasenbausteine **130**, **132** und **134**.

Aus den fluorierten Disaccharid-Threonin-Konjugaten ließen sich im Anschluss die regioisomeren (2,6)-sialylierten ST-Antigenbausteine **129**, **131** und **133** unter Einsatz des Xanthogenats **48** der Neuraminsäure herstellen. Die nachfolgende Spaltung der *tert*-Butylester der Glycosylaminosäure lieferte schließlich die Bausteine **130**, **132** und **134** in Ausbeuten von 43% - 72% über zwei Stufen, die direkt in der Glycopeptidfestphasensynthese eingesetzt werden konnten. Die signifikant geringere Ausbeute bei der Herstellung des zweifach-fluorierten (2,6)-ST-Bausteins **132** resultierte aus erheblichen Substanzverlusten im Zuge der flash-chromatographischen Reinigung. Aus Zeitgründen wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine Wiederholung dieser Synthese aber verzichtet.

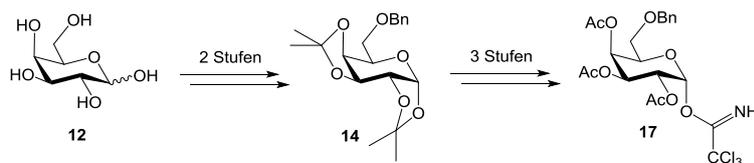
Bei der Darstellung der angestrebten komplexen Hexasaccharid-Threonin-Konjugate des Sialophorins kam dem Schutzgruppenmuster des zentralen Glucosamin-Bausteins **9** besondere Bedeutung in der Synthese zu. So wurde ein *tert*-Butyldiphenylsilyl(TBDPS)-Glycosid als anomere Schutzgruppe gewählt, während die Aminofunktion durch die Troc-Schutzgruppe in Form eines Carbamats blockiert wurde (Schema 4.4).



Schema 4. 4: Die Synthese des zentralen Glucosamin-Bausteins **9**.

Ausgehend von D-Glucosamin-Hydrochlorid (**1**) konnte nach Einführung der TBDPS-Schutzgruppe Baustein **5** erhalten werden, welcher nach vier weiteren Stufen in das vollständig blockierte Derivat **8** überführt wurde. Abschließende selektive Öffnung des Benzylidenacetals stellte den Glucosamin-Akzeptor **9** zum Aufbau der modifizierten Lactosamin-Bausteine zur Verfügung.

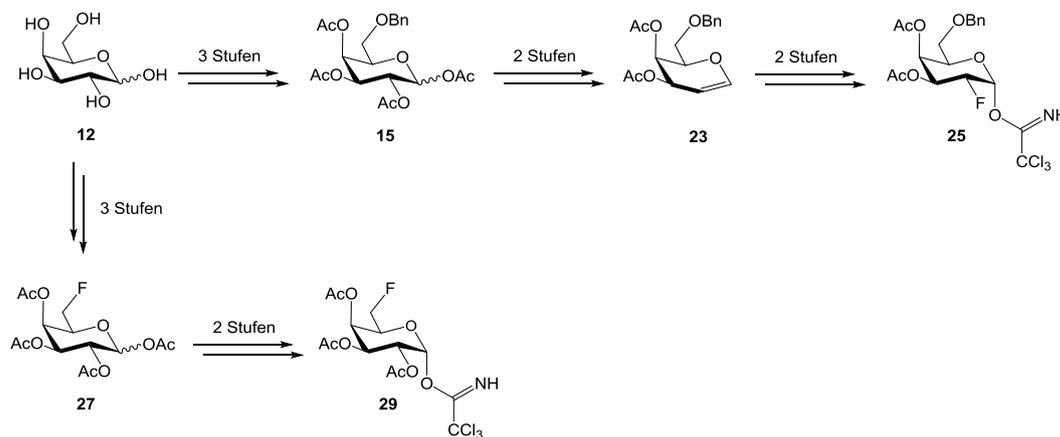
Zur Synthese von fluorierten Mimetika des Hexasaccharids Sialophorin war neben dem Aufbau eines natürlichen Galactosyldonors **17** weiterhin der Aufbau entsprechender fluorierter Galactosyltrichloracetimide in Anlehnung an literaturbekannte Syntheserouten erforderlich. Der natürliche Trichloracetimidatdonor **17** konnte nach einer Syntheseroute ausgehend von D-Galactose (**12**) in fünf linearen Stufen aufgebaut werden (Schema 4.5).



Schema 4. 5: Die Synthese des natürlichen Galactosyldonors **17**.

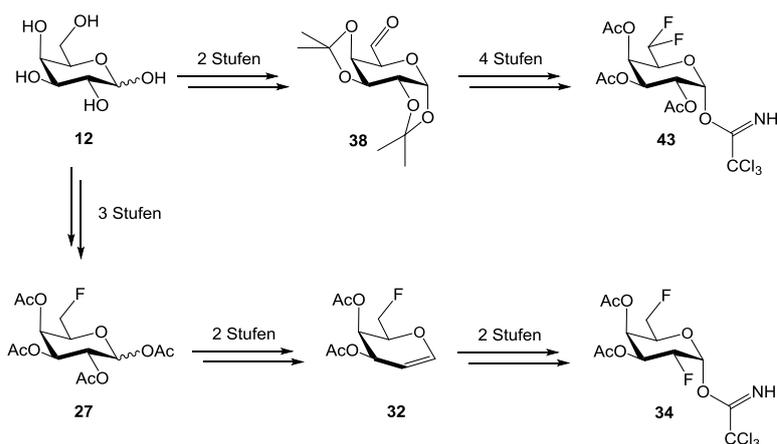
Da jedoch die zuvor hergestellten Galactosyldonoren aufgrund fehlender Kompatibilität zum Schutzgruppenmuster der Lactosamin-Disaccharide nicht eingesetzt werden konnten, mussten hierfür neue fluorierte Galactosylbausteine synthetisiert werden.

Wie bereits bei der Darstellung der Disaccharid-Threonin-Konjugate vorgestellt, gelang die Synthese der Galactosyldonoren **25**, **29**, **34** und **43** mithilfe elektrophiler und nucleophiler Fluorierungsmethoden, so dass die einfach-fluorierten Trichloracetimide **25** und **29** ausgehend von D-Galactose (**12**) in fünf bzw. sieben linearen Stufen erhalten werden konnten (Schema 4.6).



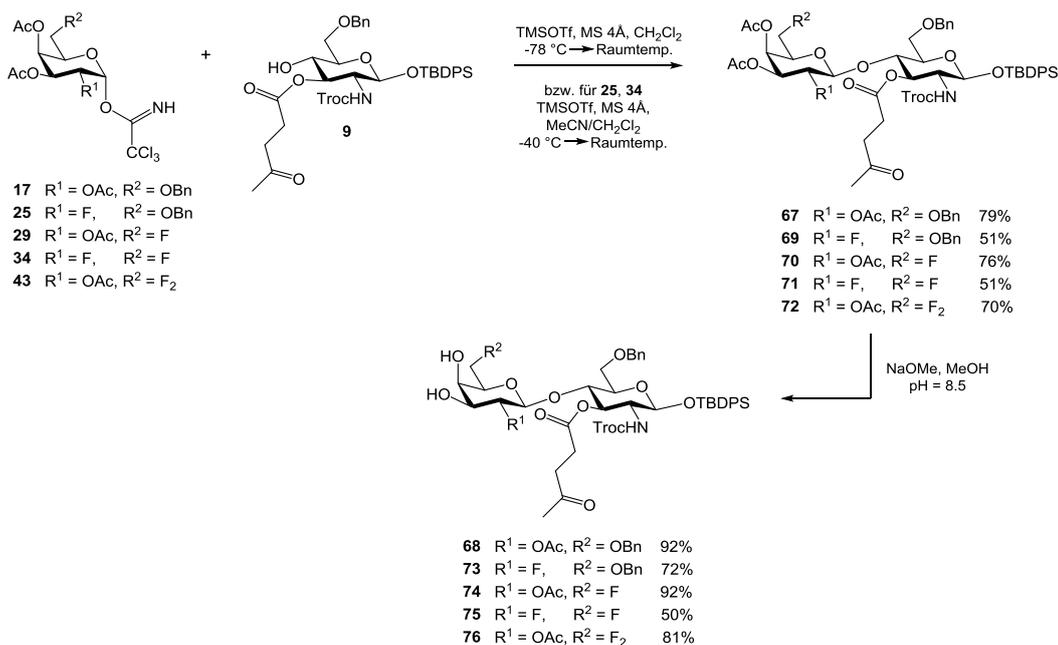
Schema 4. 6: Die Synthesen der einfach-fluorierten Trichloracetimide **25** und **29**.

Analog hierzu wurden die beiden zweifach-fluorierten Bausteine **34** und **43** ausgehend von Verbindung **12** über insgesamt fünf Stufen hergestellt werden (Schema 4.7). Zum anderen konnte über fünf Stufen der fluorierte Baustein **32** erhalten werden, welcher über zwei weitere Stufen das Trichloracetimidat **34** für die Synthese der Lactosamin-Disaccharide lieferte.



Schema 4. 7: Die Synthesen der zweifach-fluorierten Galactosyldonoren **34** und **43**.

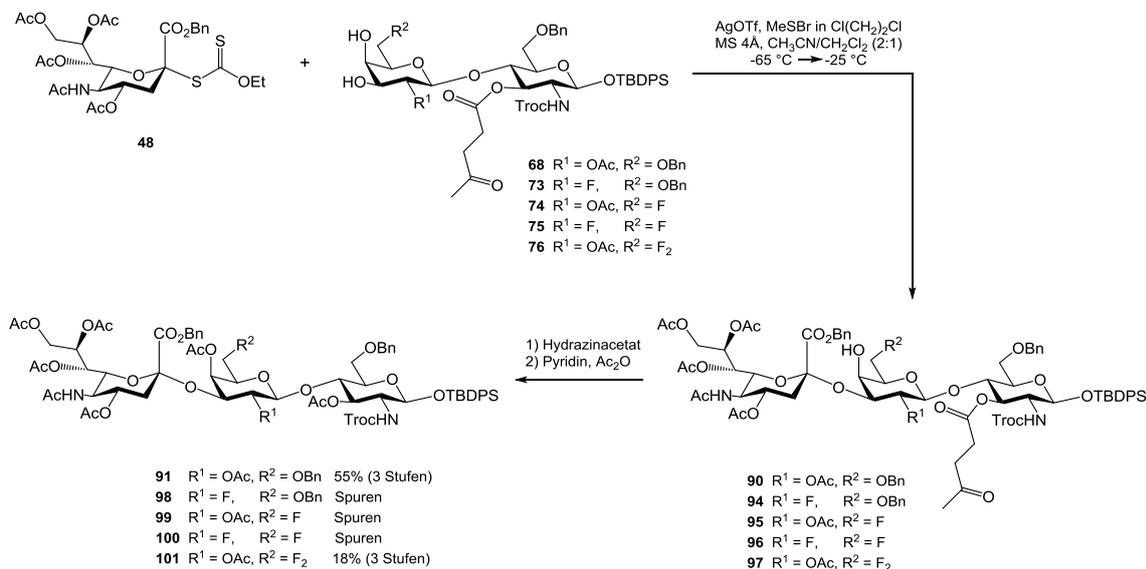
Bei dem entwickelten konvergenten Synthesekonzept sollte zunächst das Glucosaminderivat **9** galactosyliert werden (Schema 4.8). Wie aufgrund der geringeren Reaktivitäten zu erwarten war, wurden dabei für die Lactosamin-Bausteine **69** und **71** deutlich niedrigere Ausbeuten als für den entsprechenden natürlichen Baustein **67** und die beiden anderen fluorierten Bausteine **68** und **70** erzielt.



Schema 4. 8: Die Synthesen der Disaccharide **68**, **73** – **76**.

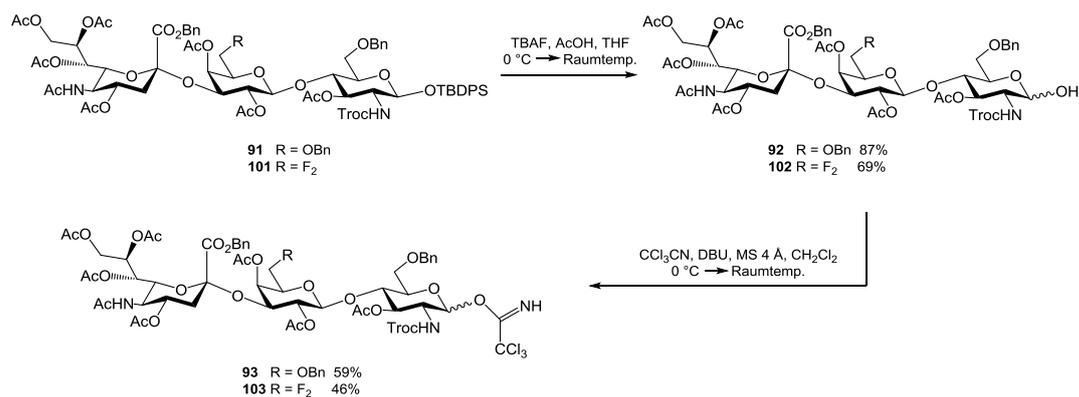
Nach selektiver Deblockierung mithilfe einer *Zemplén*-Umesterung ließen sich die Disaccharide **68**, **73** – **76** für die nachfolgende Sialylierung unter Einsatz des Sialinsäurexanthogenats **48** stereoselektiv in die regioisomeren (2,3)-verknüpften Trisaccharide überführen (Schema 4.9). Wie zuvor schon beim Aufbau der fluorierten Lactosamin-Analoga **69** und **71** zeigten die beiden Bausteine **73** und **75** eine signifikant schlechtere bzw. keinerlei Reaktivität in den Sialylierungen gegenüber dem Xanthogenat **48**, sodass die entsprechenden Trisaccharid-Bausteine **98** und **100** lediglich massenspektroskopisch nachgewiesen werden konnten. Erstaunlicherweise konnte zudem für die in der 6-Position einfach-fluorierte Verbindung **99** kein reines Pro-

dukt isoliert werden, da sich das in der Reaktion gebildete Eliminierungsprodukt **49**, aufgrund vergleichbarer polarer Eigenschaften nicht über säulenchromatographische bzw. semipräparative RP-HPLC abtrennen ließ. Aus diesem Grund musste auf eine weitere Umsetzung dieses Bausteins verzichtet werden. Es wurden daher im Rahmen dieser Arbeit nur noch die in ausreichenden Ausbeuten erhaltenen Trisaccharide **91** und **101** zu den entsprechenden Trichloracetimidatdonoren umgesetzt, während auf die weitere Umsetzung der anderen Bausteine verzichtet wurde.



Schema 4. 9: Die Synthesen der sialylierten Trisaccharide **91**, **98** – **101**.

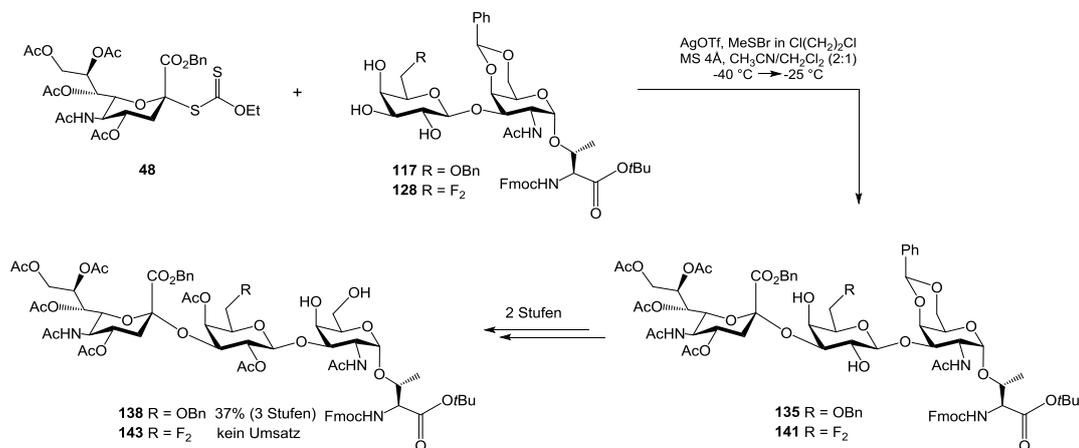
Zunächst wurden die Trisaccharide-Bausteine **91** und **101** zu den als Donoren fungierenden reaktiven Trichloracetimidaten **93** und **103** umgesetzt (Schema 4.10), welche später mit den Trisaccharid-Threonin-Konjugaten zur Reaktion gebracht werden sollten.



Schema 4. 10: Die Darstellung der Trichloracetimide **93** und **103**.

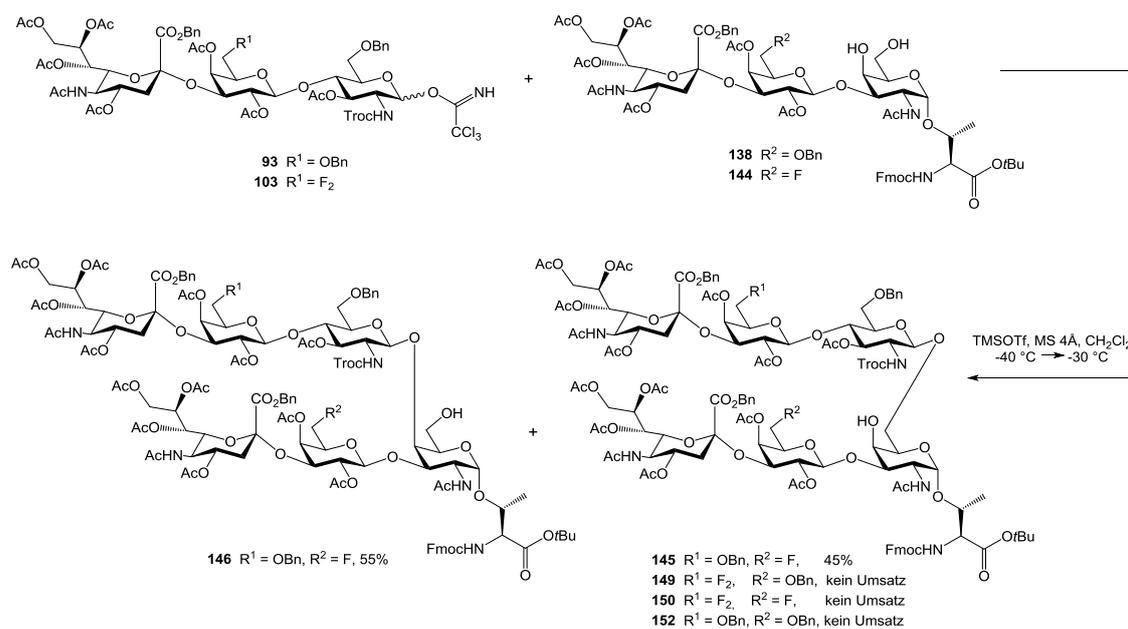
Nach anomerer Entschützung der Silylglucoside in Gegenwart von TBAF und Essigsäure konnten die reduzierenden Trisaccharide **92** und **102** in Ausbeuten von 87% bzw. 69% erhalten werden und der nachfolgenden basenkatalysierten Umsetzung mit Trichloracetonitril in Gegenwart von DBU zu den Donorbausteinen **93** und **103** unterworfen werden. Die für den Aufbau der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate notwendigen trisaccharidischen Threoninakzeptoren konnten zum einen durch eine Galactosylierung des T_N-Antigens **115**

mit dem Trichloracetimidat **17** erhalten werden, wobei nach Schutzgruppenmanipulation und regioselektiver (2,3)-Sialylierung mit dem Xanthogenat **48** der gewünschte Akzeptorbaustein **138** in einer Gesamtausbeute von 37% über drei Stufen resultierte (Schema 4.11).



Schema 4. 11: Die Synthesen der Trisaccharid-Threonin-Akzeptoren **138** und **143**.

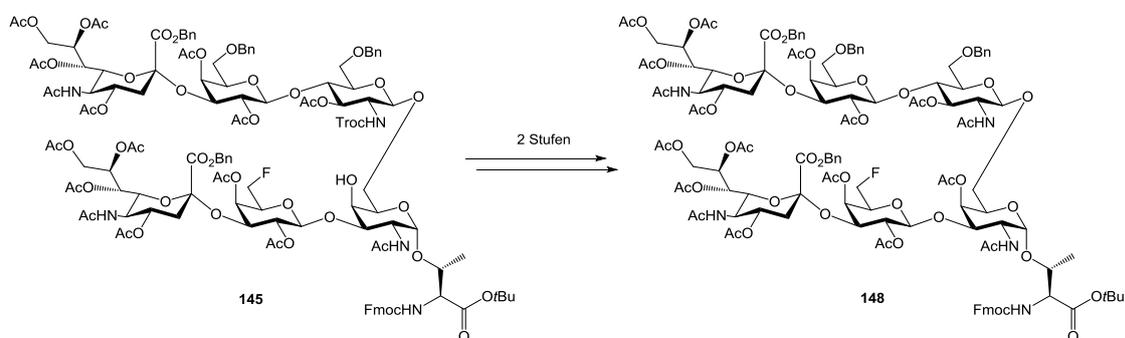
Daneben wurde auch eine *Helferich*-Glycosylierung des Bromids **41** mit dem T_N-Antigen-Baustein **115** und nachfolgender *Zemplén*-Umesterung durchgeführt. Das dabei resultierende Disaccharid-Threonin-Konjugat **128** sollte nach regioselektiver (2,3)-Sialylierung und anschließender Schutzgruppenmanipulation in den Baustein **143** überführt werden, was jedoch aufgrund des fehlenden Reaktionsumsatzes bei der Sialylierung nicht gelang. Dieses Problem der eingeschränkten/fehlenden Reaktivität konnte bereits bei der Darstellung von Baustein **97** beobachtet werden, allerdings konnten weiterführende Arbeiten aus Zeitgründen hierzu nicht mehr durchgeführt werden. Die sialylierten Trisaccharid-Akzeptorbausteine **138** und **144** wurden im Anschluss mit den Trichloracetimidaten **93** und **103** zur Reaktion gebracht (Schema 4.12), wobei hierbei neben dem gewünschten Hexasaccharid-Baustein **145** auch die Bildung eines entsprechenden Regioisomers **146** beobachtet werden konnte.



Schema 4. 12: Die Synthesen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate **145**, **149**, **150** und **152**.

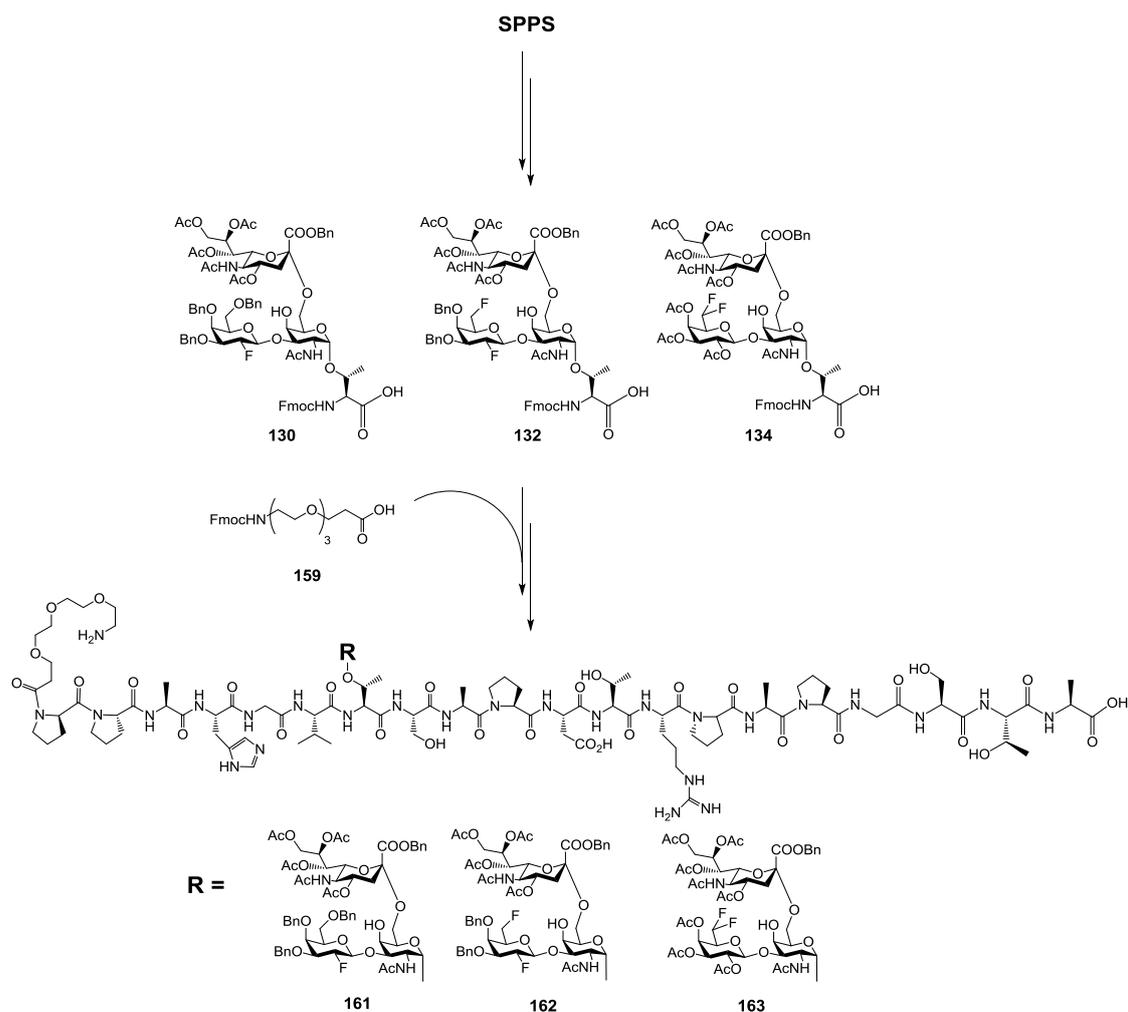
Bemerkenswerterweise wurde letzteres, bei dem die Verknüpfung über die allgemein als unreaktiver ange-sehene 4-Position der Galactosamin-Einheit erfolgt, in großem Maße erhalten. Die Darstellung der korres-pondierenden Hexasaccharid-Threonin-Konjugate **149**, **150** und **152** konnte infolge fehlender Reaktivität des eingesetzten difluorierten Glycosyldonors **103** und trotz hoher Reagenzüberschüsse von bis zu 2.0 Äquiva-lenten des Promotors nicht bewerkstelligt werden. So führten die hier gewählten Glycosylierungsbedin-gungen ausschließlich zur Bildung des säure-katalysierten Acetamid-Umlagerungsprodukts **151**. Zudem konnten die beiden Trisaccharid-Threonin-Konjugate **138** und **144** nach der Hydrolyse zurückgewonnen werden. Völlig unerwartet führte das natürliche Trichloracetimidat **93** in der Reaktion mit dem Akzeptor-baustein **138** ebenfalls zu keiner Umsetzung.

Die nachfolgende Schutzgruppenmanipulation des erhaltenen Hexasaccharid-Threonin-Konjugats **145** unter Spaltung des Carbamats **145** und die anschließende Überführung in das entsprechende Acetamid lieferte den vollständig blockierten Glycosylaminosäure-Baustein **148**, welcher nach Deblockierung des *tert*-Butylesters in der Festphasensynthese eingesetzt werden kann (Schema 4.13).



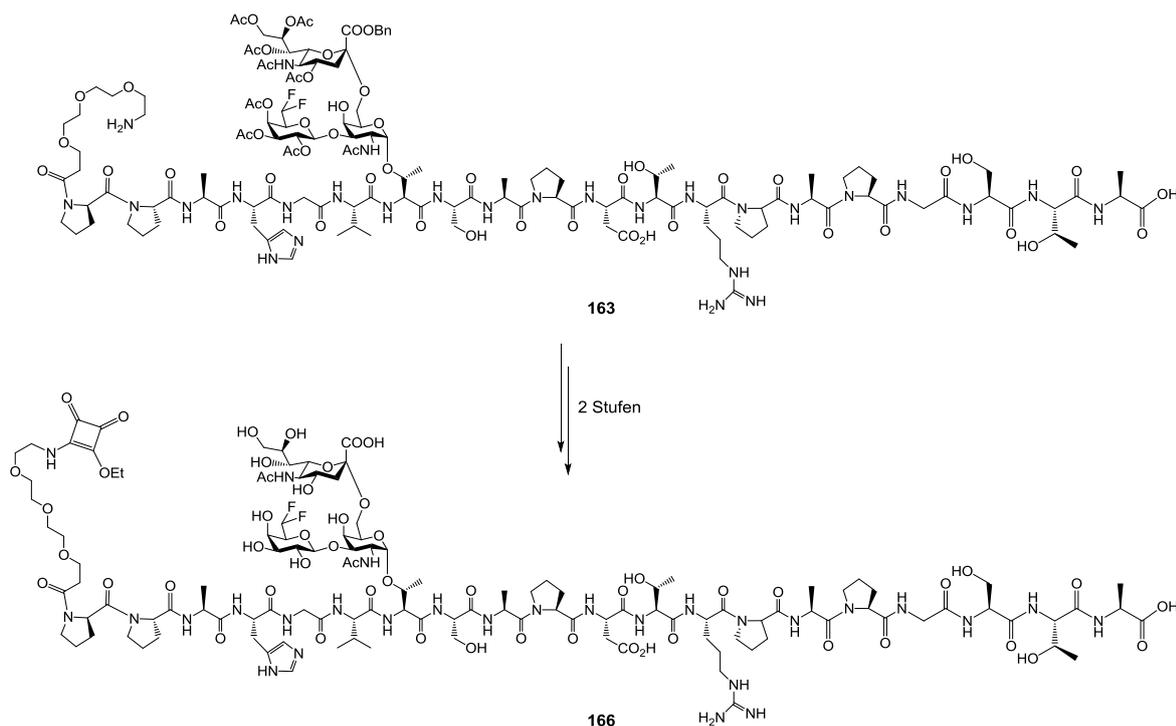
Schema 4. 13: Die Synthese des Glycosylaminosäure-Bausteins **148**.

Der Aufbau von fluorierten MUC1-Glycopeptiden konnte unter Verwendung der sialylierten Glycosylamino-säure-Bausteine **130**, **132** und **134** an der festen Phase erfolgen, wobei die hier hergestellten Bausteine zusammen mit einem *N*-terminalen Triethylglycolspacer **159** in die 20 Aminosäuren umfassende *tandem repeat*-Sequenz des Mucins MUC1 eingebaut wurden (Schema 4.14).



Schema 4. 14: Die Synthesen der Glycopeptide **161**, **162** und **163**.

Exemplarisch konnte zudem das fluorierte Glycopeptid **163** mit einer Quadratsäure funktionalisiert werden, um für eine spätere Konjugation an die Trägerproteine BSA bzw. TTox zur Entwicklung potentieller Vakzin-kandidaten für Immunisierungsstudien bereit zu stehen (Schema 4.15).



Schema 4. 15: Sialyliertes 6,6-F₂-MUC1-Glycokonjugat **166** für den Aufbau von Vakzinen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit der Entwicklung biomimetischer Synthesen für die Darstellung fluoriertes Sialyl-Trisaccharidepitope vom Typ der (2,6)-ST-Antigenbausteine des epithelialen Mucins MUC1 und deren Einbau in die zugehörige *tandem repeat*-Sequenz. Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte zudem in einem weiteren Projekt ein Synthesekonzept zum Aufbau fluoriertes Sialophorin-Derivate mit unterschiedlich fluorierten D-Galactose-Bausteinen für den Einbau in die N-terminale Partialsequenz des Glycoproteins Sialophorin (CD 43) erarbeitet werden.

Dabei gelangen erstmals der Aufbau von fluorierten sialinsäurehaltigen MUC1-Glycokonjugaten und die Synthese komplexer Sialophorin-Bausteine für die Entwicklung von kohlenhydrat-basierten potentiellen Vakzinen für Immunisierungsstudien. Im Fall des Sialophorins wurde ein neuer synthetischer Zugang zu diesem komplexen Hexasaccharid-Epitop erarbeitet, wobei dieser im Vergleich zur Synthese nach *Singh et al.* (vgl. Kapitel 1.6) nach einem biomimetischen Konzept erfolgte. Den Defiziten in der bisher bekannten Synthese sollte dabei durch eine konvergente Strategie begegnet werden, bei der die Neuraminsäure erst zu einem relativ späten Zeitpunkt eingeführt wird. Interessanterweise wurde bei der Glycosylierung der beiden Trisaccharid-Bausteine die Bildung eines regioisomeren Derivats, bei dem die Anbindung über die 4-Position des zentralen Galactosamins erfolgte beobachtet, weshalb zur Optimierung dieser Synthese ein etwas anderer Weg eingeschlagen werden muss (siehe Anhang).

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Messgeräte und allgemeine Arbeitsweisen

5.1.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur und unter Rühren durchgeführt. Luft- und feuchtigkeitsempfindliche Versuche wurden unter Argonatmosphäre und der Verwendung der Septentechnik durchgeführt. Im Anschluss an flashchromatographische Reinigungen wurden die erhaltenen Reinsubstanzen stets einmal mit Dichlormethan kodestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Die Durchführung von Versuchen unter Mikrowelleneinstrahlung erfolgte mithilfe eines *Discover*-Gerätes der Firma *CEM*, Matthews, NC (USA). Die spezifischen Bedingungen der Reaktionsführung sind den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen. Der angegebene Leistungswert bezieht sich hierbei auf die maximale Leistung mit welcher die Reaktion auf die gewünschte Temperatur aufgeheizt wurde.

5.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden für jede Reaktion Lösungsmittel des Reinheitsgrads *pro analysi* (p.a.) eingesetzt.

Absolutes *N,N*-Dimethylformamid wurde in durch Septen verschlossenen Flaschen über Molekularsieb MS 4 Å aufbewahrt.

Absolute Lösungsmittel wie Acetonitril, Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan, Nitromethan und Triethylamin wurden – soweit erforderlich – über Calciumhydrid getrocknet und direkt vor dem Gebrauch frisch destilliert. Absolutes Ethanol wurde durch Destillation über Natrium/Phthalsäurediethylester gewonnen, absoluter Diethylether, absolutes 1,4-Dioxan, absolutes Toluol und absolutes Tetrahydrofuran wurden durch Trocknung über Natrium/Benzophenon erhalten und ebenfalls vor Verwendung frisch destilliert.^[313]

5.1.3 Molekularsieb

Bei allen Reaktionen, welche in Gegenwart von Molekularsieb durchgeführt wurden, wurde – soweit nicht anders angegeben – pulverförmiges Molekularsieb mit einer Korngröße von 1-2 mm und einer Porengröße von 4 Å der Firma *VWR*, Darmstadt (Deutschland) verwendet. Dieses wurde direkt vor dem Einsatz im Reaktionskolben einige Stunden im Hochvakuum mit Hilfe eines Quarzstrahlers ausgeheizt.

5.1.4 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie: Für die Reaktionskontrolle über Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigplatten der Firma *Merck KG*, Darmstadt (Deutschland), beschichtet mit Kieselgel 60_{F254}, ver-

wendet. Die Visualisierung erfolgte durch Detektion mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm und mittels folgender Färbereagenzien:

- „**Seebach-Reagenz**“ (2.5 g Molybdato-phosphorsäure, 1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat in einer Mischung aus 6 mL konzentrierter Schwefelsäure und 94 mL entionisiertem Wasser).
- „**Zucker-Reagenz**“ (1:1-Mischung 0.2%-iger ethanolischer 4-Methoxyphenol-Lösung und 1 M ethanolischer Schwefelsäure).
- „**Ninhydrin-Reagenz**“ (1.5 g Ninhydrin, 15 mL Eisessig und 500 mL Methanol).

Die Dünnschichtchromatogramme wurden in die jeweiligen Lösungen getaucht und unter Wärmeeinwirkung mittels eines Heißluftföns entwickelt.

Säulenchromatographie: Zur Flashchromatographie wurde Kieselgel der Firma *Acros Organics*, Nidderau (Deutschland), mit der Korngröße 35-70 μm und einer Porengröße von 60 \AA eingesetzt. Die Durchführung der Flashchromatographie erfolgte in der Regel bei leicht erhöhtem Druck (0.2 – 0.3 bar).

5.1.5 Spezifische Drehwerte

Die spezifischen Drehwerte der einzelnen Verbindungen wurden mit einem Polarimeter *Krüß P800-P8100-T* der Firma *Krüß*, Hamburg (Deutschland) aufgenommen und auf die Natrium-D-Linie bei 589 nm extrapoliert. Hierzu wurde eine Extrapolation nach *Lippke* und *Thaler* herangezogen.^[314] Die Konzentration der vermessenen Lösung in mg/1 mL sowie die Messtemperatur sind den einzelnen Versuchsvorschriften zu entnehmen.

5.1.6 Massenspektrometrie (MS)

Für die Messung von Elektronenspray-Massenspektren (ESI) wurde ein *Thermo Finnigan LTQ FT* Gerät der Firma *Conquer Scientific*, San Diego, CA (USA) verwendet. Die in den Summenformeln in runden Klammern angegebenen Molmassen berücksichtigen die natürliche Isotopenverteilung, die bei den Massenspektren angegebenen Molekülmassen beziehen sich hingegen auf die reinen Isotope ^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{19}F , ^{23}Na , ^{28}Si , ^{31}P , ^{32}S , ^{35}Cl , ^{39}K und ^{79}Br . Zur Vereinfachung wird bei sämtlichen aufgeführten Verbindungen lediglich ein – in der Regel jeweils der erste – Isotopenpeak bei der Interpretation der Massenspektren aufgeführt. Es ist jedoch anzumerken, dass das zu erwartende Isotopenmuster zu beobachten ist.

5.1.7 Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte an einer Schmelzpunktapparatur nach *Dr. Tottoli* der Firma *Büchi*, Flawil (Schweiz) und sind unkorrigiert aufgenommen.

5.1.8 Analytische RP-HPLC

Die analytische RP-HPLC wurde mit einer *Jasco*-HPLC-Pumpe (PU-2080 Plus), einem *Jasco*-3-Wege-Entgaser (DG-2080-53), einer ternären *Jasco*-Gradienteneinheit (LG-2080-02) sowie einem *Jasco*-Diodenarray-detektor (MD-2010 Plus) durchgeführt. Als Säulen wurden eine *Jupiter*-Säule (C18, 5 μm , 300A, 250 \times

4.6 mm) und eine *Luna*-Säule (C18, 5 μm , 300A, 250 \times 4.6 mm) der Firma *Phenomenex*, Torrance, CA (USA) verwendet. Hierbei wurde mit Flussraten von 1 mL/min gearbeitet. Die verwendeten Gradienten sind bei den jeweiligen Versuchsvorschriften vermerkt.

5.1.9 Semipräparative RP-HPLC

Für die semipräparative RP-HPLC wurden zwei *Jasco*-Gradientenpumpen (PU-2087 Plus) sowie ein *Jasco*-UV-Detektor mit variabler Wellenlängenauswahl genutzt. Als Säulen wurde eine *Jupiter*-Säule (C18, 10 μm , 300A, 250 \times 30.0 mm) beziehungsweise eine *Luna*-Säule (C18, 5 μm , 300A, 250 \times 20.0 mm) bei einer Flussrate von 20.0 mL/min verwendet. Als Eluenten für die analytische und die semipräparative RP-HPLC dienen Gemische aus Acetonitril und Wasser bzw. Methanol und Wasser (ggf. unter dem Zusatz von Trifluoressigsäure). Die entsprechenden Gradienten sowie die Detektion bei jeweiliger Wellenlänge sind den Angaben der Verbindungen zu entnehmen. Acetonitril und Methanol wurden in der Qualität HPLC-grade erworben, das HPLC-Wasser wurde mit Hilfe einer *Arium*[®] *ProUV* Reinstwasser-Anlage der Firma *Sartorius Stedim Biotech S.A.*, Göttingen (Deutschland) entnommen.

5.1.10 (Glyco-)Peptidfestphasensynthese

Die Synthesen der (Glyco-)Peptide an der festen Phase wurden mit einem *Liberty 1* Mikrowellen-Peptidsynthesizer der Firma *CEM*, Matthews, NC (USA) durchgeführt. Zur Verfolgung der Fmoc-Abspaltung kam ein UV/VIS-Detektor der Firma *CEM*, Matthews, NC (USA) zum Einsatz. Es wurden polymere Wang-Trägerharze für die Peptidsynthesen von der Firma *Merck Novabiochem KGaA*, Darmstadt (Deutschland) eingesetzt. Sämtliche verwendeten Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden von der Firma *Orpegen Pharma*, Heidelberg (Deutschland), bezogen.

5.1.11 Kernresonanzspektroskopie (¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-NMR)

Die Kernresonanzspektren wurden an den Spektrometern ARX 200, AC 300, WH 400 und AMX 600 mit Cryo-Kopf der Firma *Varian*, Darmstadt (Deutschland) bzw. an den Spektrometern Avance III HD 400 und Avance III HD mit Cryo-Kopf 800 der Firma *Bruker*, Billerica, MA (USA) bei Raumtemperatur gemessen. Die angegebenen Werte für die chemischen Verschiebungen δ (in ppm) beziehen sich bei den ¹H- und ¹³C-Spektren auf das Signal des deuterierten Lösungsmittels in Bezug auf Tetramethylsilan (TMS) = 0 als internen Standard. Die Kopplungskonstanten *J* der entsprechenden Signale werden in Hertz (Hz) angegeben. Einzelne Kopplungspartner werden durch die Schreibweise *J_{a,b}* gekennzeichnet.

Die jeweils durchgeführten NMR-Experimente sowie die verwendeten Lösungsmittel sind bei den entsprechenden Verbindungen genannt.

Die Multiplizitäten der Signale wurden mit folgenden Abkürzungen angegeben:

s – Singulett; bs – breites Singulett; ps – Pseudosingulett; d – Dublett; dd – Dublett vom Dublett; ddd – Dublett vom Dublett vom Dublett; dq – Dublett vom Quartett; dt – Dublett vom Triplett; t – Triplett; td – Triplett vom Dublett; pt – Pseudotriplett; q – Quartett; m – Multipllett; m_c – zentriertes Multipllett.

Bei „Pseudotriplets“ sowie „Pseudoquartetts“, welche durch Kopplungen vergleichbarer Größe eines Protons zu zwei bzw. drei magnetisch sowie chemisch nicht äquivalenten Kernen zustande kommen, kann die Kopplungskonstante nur als ungefähre Wert angesehen werden und wird durch das Symbol (\approx) angegeben.

Der Vergleich der Kopplungskonstante mit der des zugehörigen Kerns kann hierbei zu Abweichungen führen. Diese Differenzen lassen sich auf die nicht immer symmetrische Form eines Peaks zurückführen. Insbesondere bei überlagerten oder zusammenfallenden Signalen können solche Abweichungen der Kopplungskonstanten in Erscheinung treten. Lässt sich die Lage eines Signals für ein bestimmtes Proton innerhalb eines Multipletts anhand der vorliegenden 2D-NMR-Spektren oder bereits aufgrund des Aufspaltungsmusters genauer ermitteln, so ist die jeweilige chemische Verschiebung für den zugehörigen Kern in geschweiften Klammern { } hinter der Zuordnung angegeben. Dort werden weiterhin – sofern möglich – die Multiplizität des Signals sowie die Kopplungskonstante(n) aufgeführt.

Bei der Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale in den NMR-Spektren werden folgende Abkürzungen zur Kennzeichnung der verschiedenen Bausteine genutzt:

- GlcN D-Glucosamin
- Gal D-Galactose (an D-Glucosamin geknüpft)
- Sia Sialinsäure; *N*-Acetyl-D-neuraminsäure
- GalN D-Galactosamin
- Gal' D-Galactose (an D-Galactosamin geknüpft)
- Sia' Sialinsäure (an D-Galactose Gal' geknüpft)
- Thr L-Threonin

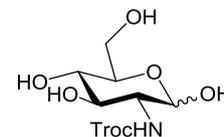
Die Benennung der übrigen Aminosäure-Bausteine erfolgt nach der IUPAC-Empfehlung von 1983.^[315] Tritt die gleiche Aminosäure innerhalb der Peptidsequenz mehrfach auf, so erfolgt eine willkürliche Nummerierung. Diese dient nur der Kennzeichnung der Zugehörigkeit der einzelnen Signale zu einem Aminosäurerest, hieraus kann aber kein Rückschluss auf dessen genaue Position im Glycopeptid gezogen werden. Diese lässt sich anhand der aufgenommenen Spektren nur bedingt ermitteln.

5.2 Die Synthesen der Monosaccharid-Bausteine

5.2.1 Synthese der Glucosamin-Bausteine

2-Desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β -D-glucopyranose (**2**)^[230]

(α/β -GlcNTroc-OH)



Unter kräftigem Rühren wurden 30.0 g (139 mmol) α -D-Glucosamin-Hydrochlorid (**1**) in 400 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und innerhalb von 30 Minuten tropfenweise mit 35.4 g (23.0 mL, 167 mmol, 1.2 Äquiv.) Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester (TrocCl) versetzt. Es wurden weitere 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde anschließend 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde abfiltriert und mit 100 mL Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure (1 M) neutralisiert und i. Vak eingengt, der ausgefallene Feststoff wurde erneut abfiltriert. Das Produkt wurde anschließend lyophilisiert und ohne weitere Reinigung der nachfolgenden Reaktion unterworfen.

Ausbeute: 39.4 g (0.11 mol, 80%); farbloser Feststoff.

$R_f = 0.37/0.49$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

$C_9H_{14}Cl_3NO_7$ (M = 354.57 g/mol) [352.98].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 375.97 ($[M+Na]^+$, ber.: 375.97).

ESI-MS (*negativ*) m/z : 351.97 ($[M-H]^-$, ber.: 351.97).

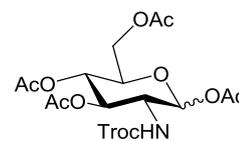
HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 375.9734 ($[M+Na]^+$, ber.: 375.9734).

HR-ESI-MS (*negativ*) m/z : 351.9757 ($[M-H]^-$, ber.: 351.9763).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[230]

1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β -D-glucopyranose (**3**)^[230]

(α/β -Ac₃GlcNTroc-OAc)



Es wurden 30.0 g (84.6 mmol) α/β -GlcNTroc-OH **2** in 150 mL Pyridin gelöst und unter Eiskühlung langsam mit 75 mL Essigsäureanhydrid bei 0 °C versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 20 h gerührt, bevor Pyridin und überschüssiges Essigsäureanhydrid im Hochvakuum entfernt wurden. Der erhaltene Rückstand wurde dreimal mit je 80 mL Toluol und zweimal mit je 60 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 40.2 g (76.8 mmol, 91%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.62 (°Hex/EtOAc, 1:1).

C₁₇H₂₂Cl₃NO₁₁ (M = 522.72 g/mol) [521.03].

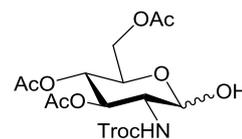
ESI-MS (*positiv*) m/z : 544.01 ([M+Na]⁺, ber.: 544.02).

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 539.0599 ([M+NH₄]⁺, ber.: 539.0597).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[230]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β -D-glucopyranose (**4**)

(α/β -Ac₃GlcNTroc-OH)



Entsprechend Referenz^[231] wurden 31.0 g (59.0 mmol) α/β -Ac₃GlcNTroc-OAc **3** in 150 mL Tetrahydrofuran gelöst und unter Eiskühlung mit 4.73 mL (70.8 mmol, 1.2 Äquiv.) Ethylendiamin sowie 4.73 mL (82.6 mmol, 1.4 Äquiv.) Essigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, bevor 150 mL Wasser zugegeben wurden. Es wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit verdünnter Salzsäure (1 M), einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (2 × 80 mL) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 30 mL Toluol und Dichlormethan kodestilliert, flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt und das Produkt wurde als Anomerengemisch erhalten.

Ausbeute: 25.8 g (53.7 mmol, 91%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.50/0.62 (°Hex/EtOAc, 1:1).

C₁₅H₂₀Cl₃NO₁₀ (M = 480.67 g/mol) [479.01].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 497.05 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 497.04), 502.00 ($[M+Na]^+$, ber.: 502.00).

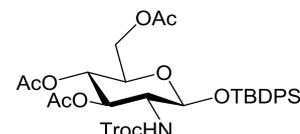
Charakteristische NMR-Signale:

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 6.22 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H1-GlcN ^{α}), 5.71 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.8$ Hz, H1-GlcN ^{β}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[214, 230]

***tert*-Butyldiphenylsilyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (5)^[136, 214, 316]**

(β -Ac₃GlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung von 25.8 g (53.7 mmol) α/β -Ac₃GlcNTroc-OH **4** in 200 mL *N,N*-Dimethylformamid wurde mit 5.48 g (80.6 mmol, 1.5 Äquiv.) Imidazol, 656 mg (5.37 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 18.2 mL (19.2 g, 80.6 mmol, 1.3 Äquiv.) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur zwei Tage gerührt, erneut mit einer Spatelspitze 4-DMAP versetzt und einen weiteren Tag gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde zweimal mit je 50 mL Toluol und 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^{$^{\circ}$} Hex/EtOAc, 2:1). Im Anschluss wurde erneut zweimal mit je 20 mL Toluol und 20 mL Dichlormethan kodestilliert und das Produkt wurde als amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 29.7 g (41.3 mmol, 77%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.44$ (^{$^{\circ}$} Hex/EtOAc, 2:1).

$C_{31}H_{38}Cl_3NO_{10}Si$ ($M = 719.08$ g/mol) [717.13].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 740.12 ($[M+Na]^+$, ber.: 740.12).

ESI-MS (*negativ*) m/z : 716.12 ($[M-H]^-$, ber.: 716.12).

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 735.1673 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 735.1669).

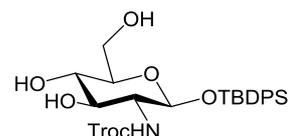
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.74 - 7.60 (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.48 - 7.33 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 5.08 - 4.94 (m, 2H, H4-GlcN {5.03, t, $J_{H4,H3} = J_{H4,H5} = 9.1$ Hz}, H3-GlcN {4.95, t, $J_{H3,H2} = J_{H3,H4} = 9.1$ Hz}), 4.90 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH-GlcN), 4.74 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.59 - 4.48 (m, 2H, CH_{2b}-Troc, H1-GlcN {4.52, d, $J_{H1,H2} = 8.2$ Hz}), 4.08 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 12.0$ Hz, $J_{H6a,H5} = 5.5$ Hz, H6a-GlcN), 3.95 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 12.1$ Hz, $J_{H6b,H5} = 2.4$ Hz, H6b-GlcN), 3.92 - 3.87 (m, 1H, H2-GlcN), 3.40 - 3.34 (m, 1H, H5-GlcN), 1.99, 1.99, 1.96 (3 \times s, 9H, CH₃-OAc), 1.05 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.9, 170.7, 169.6 (C=O-Ac), 154.2 (C=O-Troc), 136.1, 135.9, 135.3, 134.9 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 132.7, 132.6 ($\text{C}_{\text{q}}\text{-Ph}$), 130.2, 130.1, 129.7, 128.0, 127.8, 127.6 ($10 \times \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 96.1 (C1-GlcN), 95.4 (CCl_3), 74.7 ($\text{CH}_2\text{-Troc}$), 72.5 (C3-GlcN), 71.7 (C5-GlcN), 68.9 (C4-GlcN), 62.3 (C6-GlcN), 58.0 (C2-GlcN), 26.8 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$), 20.8, 20.7, 20.7 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$), 19.3 ($\text{C}_{\text{q}}\text{-}t\text{Bu-Si}$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[136, 214, 316]

***tert*-Butyldiphenylsilyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (6)**^[136, 214, 316]

(β -GlcNTroc-OTBDPS)



Zu einer Lösung von 29.7 g (41.3 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**5**) in 90 mL Methanol (HPLC-grade) wurde tropfenweise eine frisch hergestellte Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol gegeben bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Unter ständiger pH-Kontrolle wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 6 h gerührt und anschließend durch Zugabe von Amberlyst® 15 neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit 100 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 40 mL Dichlormethan kodestilliert und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 24.3 g (41.0 mmol, quant.); farbloser amorpher Feststoff.

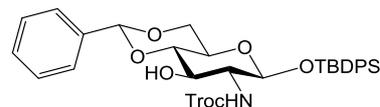
$\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{Cl}_3\text{NO}_7\text{Si}$ (M = 592.97 g/mol) [591.10].

ESI-MS (positiv) m/z : 614.09 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 614.09).

ESI-MS (negativ) m/z : 590.09 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 590.09).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.75 - 7.61 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 7.47 - 7.30 (m, 6H, $\text{H}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 5.76 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.1$ Hz, NH-GlcN), 4.77 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}\text{-Troc}$), 4.58 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}\text{-Troc}$), 4.52 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 7.9$ Hz, H1-GlcN), 3.65 - 3.08 (m, 6H, H2-GlcN, H3-GlcN, H4-GlcN, H5-GlcN, H6a/b-GlcN), 1.05 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 155.6 (C=O-Troc), 136.0, 135.9, 135.6, 134.9 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 133.6, 133.4 ($\text{C}_{\text{q}}\text{-Ph}$), 132.9, 130.2, 130.1, 128.7, 127.9, 127.8 ($10 \times \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Ph}$), 96.2 (C1-GlcN), 95.4 (CCl_3), 74.5 ($\text{CH}_2\text{-Troc}$), 75.3 (C3-GlcN), 75.0 (C5-GlcN), 70.4 (C4-GlcN), 61.7 (C6-GlcN), 59.8 (C2-GlcN), 26.9 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$), 19.2 ($\text{C}_{\text{q}}\text{-}t\text{Bu-Si}$).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (7)**^[136, 214, 316]**(β -4,6Bzn-GlcNTroc-OTBDPS)**

Es wurden 24.3 g (41.0 mmol) β -GlcNTroc-OTBDPS **6** in 150 mL absol. Acetonitril gelöst und mit 12.2 mL (82.0 mmol, 2.0 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal versetzt. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat auf pH = 4.0 eingestellt und das Gemisch wurde 3 h bei 40 °C und 200 mbar am Rotationsverdampfer gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde durch Zugabe von *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 25.1 g (36.8 mmol, 89%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.57 (^cHex/EtOAc, 2:1).

C₃₂H₃₆Cl₃NO₇Si (M = 681.08 g/mol) [679.13].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 697.17 ([M+NH₄]⁺, ber.: 697.17), 702.12 ([M+Na]⁺, ber.: 702.12).

ESI-MS (negativ) *m/z*: 678.12 ([M-H]⁻, ber.: 678.12).

HR-ESI-MS (negativ) *m/z*: 678.1253 ([M-H]⁻, ber.: 678.1254).

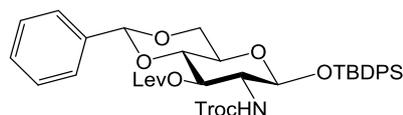
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.78 - 7.58 (m, 5H, H_{Ar}-Ph, -Bzn), 7.49 - 7.19 (m, 10H, H_{Ar}-Ph, -Bzn), 5.48 (s, 1H, CH-Bzn), 4.91 (d, 1H, *J*_{NH,H2} = 7.9 Hz, NH-GlcN), 4.71 (d, 1H, *J*_{CH,CH} = 12.0 Hz, CH_{2a}-Troc), 4.64 (d, 1H, *J*_{CH,CH} = 11.9 Hz, CH_{2b}-Troc), 4.56 (d, 1H, *J*_{H1,H2} = 6.9 Hz, H1-GlcN), 4.05 (dd, 1H, *J*_{H6a,H6b} = 10.5 Hz, *J*_{H6a,H5} = 5.0 Hz, H6a-GlcN), 3.73 - 3.47 (m, 4H, H6b-GlcN {3.68}, H3-GlcN {3.67}, H2-GlcN {3.66}, H4-GlcN {3.53}), 3.14 - 3.08 (m, 1H, H5-GlcN), 3.00 (bs, 1H, 3-OH-GlcN), 1.06 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 154.6 (C=O-Troc), 137.1 (C_q-Bzn), 136.1, 136.0, 135.9, 135.6, 134.9, 134.6 (C_{Ar}-Ph, C_{Ar}-Bzn), 132.9, 132.7 (C_q-Ph), 130.2, 129.9, 129.7, 128.5, 127.6, 126.8, 126.5 (9 \times C_{Ar}-Ph, C_{Ar}-Bzn), 103.3 (CCl₃), 102.0 (CH-Bzn), 96.4 (C1-GlcN), 81.4 (C4-GlcN), 74.9 (CH₂-Troc), 71.6 (C3-GlcN), 68.4 (C6-GlcN), 66.0 (C5-GlcN), 60.3 (C2-GlcN), 26.9 (CH₃-*t*Bu-Si), 19.3 (C_q-*t*Bu-Si).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[136, 214, 316]

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonyl-amino)- β -D-glucopyranosid (8)**

(β -3Lev-4,6Bzn-GlcNTroc-OTBDPS)



Entsprechend Referenz^[317] wurden zu einer Lösung von 25.1 g (36.8 mmol) β -4,6Bzn-GlcNTroc-OTBDPS **7** in 250 mL absol. Dichlormethan bei Raumtemperatur 11.4 g (55.2 mmol, 1.5 Äquiv.) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 450 mg (3.68 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 7.28 g (62.7 mmol, 1.7 Äquiv.) Lävulinsäure gegeben. Die Reaktionsmischung wurde unter Argonatmosphäre 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und durch *Hyflo*[®] filtriert. Der Rückstand wurde zweimal mit je 100 mL Dichlormethan nachgewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 20.6 g (26.4 mmol, 78%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.74 (^cHex/EtOAc, 2:1), 0.48 (^cHex/EtOAc, 3:1).

C₃₇H₄₂Cl₃NO₉Si (M = 779.18 g/mol) [777.17].

ESI-MS (positiv) m/z: 795.20 ([M+NH₄]⁺, ber.: 795.20).

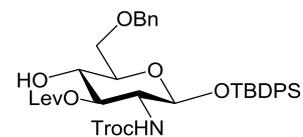
ESI-MS (negativ) m/z: 776.16 ([M-H]⁻, ber.: 776.16).

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 795.2033 ([M+NH₄]⁺, ber.: 795.2033).

HR-ESI-MS (negativ) m/z: 776.1620 ([M-H]⁻, ber.: 776.1622).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.91 - 7.89 (m, 1H, H_{Ar}-Ph), 7.73 - 7.61 (m, 4H, H_{Ar}-Ph, -Bzn), 7.48 - 7.29 (m, 10H, H_{Ar}-Ph, -Bzn), 5.46 (s, 1H, CH-Bzn), 5.07 (t, 1H, $J_{H3,H2} = J_{H3,H4} = 9.6$ Hz, H3-GlcN), 5.01 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.8$ Hz, NH-GlcN), 4.75 - 4.69 (m, 2H, CH_{2a}-Troc {4.73, d, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz}, CH_{2b}-Troc {4.70, d, $J_{CH,CH} = 11.4$ Hz}), 4.61 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 7.8$ Hz, H1-GlcN), 4.09 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 10.5$ Hz, $J_{H6a,H5} = 4.9$ Hz, H6a-GlcN), 3.91 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.0$ Hz, $J_{H2,H1} = 8.0$ Hz, H2-GlcN), 3.72 - 3.65 (m, 2H, H6b-GlcN {3.68}, H4-GlcN {3.65}), 3.13 (m_c, 1H, H5-GlcN), 2.74 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 6.7$ Hz, CH₂-Lev), 2.57 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 6.6$ Hz, CH₂-Lev), 2.19 (s, 3H, CH₃-Lev), 1.08 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 206.8 (C=O-Lev), 172.9 (C=O-Lev), 154.4 (C=O-Troc), 137.0 (C_q-Bzn), 136.1, 136.0, 134.9, 134.6 (C_{Ar}-Ph, C_{Ar}-Bzn), 132.9, 132.5 (C_q-Ph), 130.2, 130.1, 129.9, 128.3, 127.8, 127.6, 126.8, 126.3 (11 \times C_{Ar}-Ph, C_{Ar}-Bzn), 101.5 (CH-Bzn), 96.9 (C1-GlcN), 95.5 (CCl₃), 78.7 (C4-GlcN), 74.9 (CH₂-Troc), 71.8 (C3-GlcN), 68.5 (C6-GlcN), 66.4 (C5-GlcN), 58.8 (C2-GlcN), 38.0 (CH₂-Lev), 29.8 (CH₃-Lev), 28.1 (CH₂-Lev), 27.0 (CH₃-*t*Bu-Si), 19.2 (C_q-*t*Bu-Si).

tert*-Butyldiphenylsilyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (9)*(β -3Lev-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS)**

Entsprechend Referenz^[236] wurde eine Mischung aus 14.0 g (18.0 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**8**) und 15.0 g Molsieb (4 Å) in 250 mL absol. Dichlormethan unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen des Ansatzes auf -78 °C wurden zunächst 4.31 mL (27.0 mmol, 1.5 Äquiv.) Triethylsilylan zugesetzt, bevor tropfenweise eine gekühlte Lösung aus 2.37 mL (27.0 mmol, 1.5 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäure (TfOH) in 10 mL absol. Dichlormethan innerhalb von 15 Minuten zugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde bei -78 °C unter Argonatmosphäre 4 h gerührt, wobei nach 2 h noch einmal zur Vervollständigung des Umsatzes 1.5 Äquiv. TfOH in 10 mL absol. Dichlormethan zugetropft wurden. Für den Abbruch der Reaktion wurden 15 mL Methanol zugefügt und der Ansatz wurde bei -78 °C durch Zugabe von DIPEA in Dichlormethan unter ständiger Kontrolle des pH-Werts neutralisiert. Das Molsieb wurde abfiltriert und dreimal mit je 100 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat- sowie einer Natriumchlorid-Lösung gewaschen und die wässrige Phase wurde zweimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 8.29 g (10.6 mmol, 59%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.30$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: $R_t = 7.05$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{21} = -5.9$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₃₇H₄₄Cl₃NO₉Si ($M = 781.19$ g/mol) [779.18].

ESI-MS (positiv) m/z : 797.21 ([M+NH₄]⁺, ber.: 797.21).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 797.2188 ([M+NH₄]⁺, ber.: 797.2189), 818.1493 ([M+K]⁺, ber.: 818.1482).

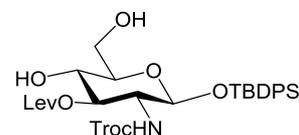
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.71 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 7.3$ Hz, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.64 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 7.4$ Hz, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.44 - 7.36 (m, 1H, H_{Ar}-Ph), 7.35 - 7.22 (m, 10H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 4.86 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.9$ Hz, NH-GlcN), 4.79 (t, 1H, $J_{\text{H4,H3}} \approx J_{\text{H4,H5}} = 9.5$ Hz, H4-GlcN), 4.75 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.1$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.62 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.9$ Hz, CH_{2b}-Troc), 4.52 - 4.43 (m, 3H, CH₂-Bn {4.48, 4.44, 2 \times d, $J_{\text{CH,CH}} = 12.1$ Hz, $J_{\text{CH,CH}} = 11.8$ Hz}), H1-GlcN {4.46, d, $J_{\text{H1,H2}} = 8.1$ Hz}), 3.85 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 9.8$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 9.5$ Hz, H2-GlcN), 3.75 (t, 1H, $J_{\text{H3,H2}} \approx J_{\text{H3,H4}} = 9.5$ Hz, H3-GlcN), 3.64 - 3.57 (m, 2H, H6a-GlcN {dd,

$J_{H6a,H6b} = 10.6$ Hz, $J_{H6a,H5} = 5.0$ Hz}, H6b-GlcN {dd, $J_{H6b,H6a} = 10.5$ Hz, $J_{H6b,H5} = 4.1$ Hz}, 3.18 (m, 1H, H5-GlcN), 2.75 (t, 2H, $J_{CH,CH} = 6.4$ Hz, CH₂-Lev), 2.53 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 6.3$ Hz, CH₂-Lev), 2.15 (s, 3H, CH₃-Lev), 1.07 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 207.4 (C=O-Lev), 173.4 (C=O-Lev), 154.4 (C=O-Troc), 138.0 (C_q-Bn), 136.1, 136.0 (C_{Ar}-Ph, C_{Ar}-Bn), 133.1, 132.7 (C_q-Ph), 130.2, 130.0, 128.5, 127.8, 127.6 (13 × C_{Ar}-Ph, C_{Ar}-Bn), 96.5 (C1-GlcN), 95.6 (CCl₃), 75.9 (C4-GlcN), 74.8 (CH₂-Troc), 74.4 (C5-GlcN), 73.8 (CH₂-Bn), 70.4 (C3-GlcN), 69.8 (C6-GlcN), 57.7 (C2-GlcN), 38.4 (CH₂-Lev), 29.9 (CH₃-Lev), 28.3 (CH₂-Lev), 26.9 (CH₃-*t*Bu-Si), 19.3 (C_q-*t*Bu-Si).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosid (10)**

(β-3Lev-GlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 5.00 g (6.42 mmol) β-3Lev-4,6Bzn-GlcNTroc-OTBDPS **8** in 50 mL Essigsäure (80%) gelöst und 16 h bei 80 °C erhitzt. Es wurde mit 50 mL Toluol verdünnt, die Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 30 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 4.40 g (6.37 mmol, 99%); farbloser amorpher Feststoff.

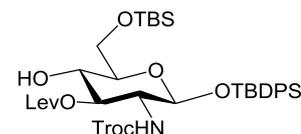
$R_f = 0.05$ (°Hex/EtOAc, 2:1).

C₃₀H₃₈Cl₃NO₉Si (M = 691.07 g/mol) [689.14].

HR-ESI-MS (negativ) m/z : 688.1311 ([M-H]⁻, ber.: 688.1309).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.76 - 7.59 (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 7.50 - 7.31 (m, 6H, H_{Ar}-Ph), 5.05 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH-GlcN), 4.83 (dd, 1H, $J_{H4,H3} = 11.0$ Hz, $J_{H4,H5} = 9.0$ Hz, H4-GlcN), 4.74 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.63 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz, CH_{2b}-Troc), 4.62 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.6$ Hz, H1-GlcN), 3.82 (t, 1H, $J_{H2,H1} = J_{H2,H3} = 8.7$ Hz, H2-GlcN), 3.69 - 3.53 (m, 3H, H6a-GlcN {3.64}, H3-GlcN {3.61}, H6b-GlcN {3.58}), 3.08 (m, 1H, H5-GlcN), 2.83 - 2.69 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.63 - 2.44 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.16 (s, 3H, CH₃-Lev), 1.06 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 208.1 (C=O-Lev), 173.5 (C=O-Lev), 154.5 (C=O-Troc), 136.0, 135.9 (C_{Ar}-Ph), 133.5, 132.7 (C_q-Ph), 130.3, 130.2, 128.4, 127.9, 127.8, 127.7 (8 × C_{Ar}-Ph), 96.4 (C1-GlcN), 95.5 (CCl₃), 75.9 (C4-GlcN), 75.3 (C5-GlcN), 74.7 (CH₂-Troc), 69.5 (C3-GlcN), 62.2 (C6-GlcN), 57.7 (C2-GlcN), 38.0 (CH₂-Lev), 29.8 (CH₃-Lev), 28.2 (CH₂-Lev), 26.7 (CH₃-*t*Bu-Si), 19.2 (C_q-*t*Bu-Si).

tert*-Butyldiphenylsilyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxy-carbonylamino)- β -D-glucopyranosid (11)*(β -3Lev-6TBS-GlcNTroc-OTBDPS)**

Zu einer Lösung von 4.40 g (6.37 mmol) β -3Lev-GlcNTroc-OTBDPS **10** in 50 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid wurden 960 mg (6.37 mmol, 1.0 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBS-Chlorid) und 867 mg (12.7 mmol, 2.0 Äquiv.) Imidazol unter Argonatmosphäre und Eiskühlung gegeben. Die Reaktionslösung wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 24 h gerührt, erneut mit 216 mg (3.18 mmol, 0.5 Äquiv.) Imidazol und 191 mg (1.27 mmol, 0.2 Äquiv.) TBS-Chlorid zur Vervollständigung versetzt und einen weiteren Tag gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde zweimal mit je 50 mL Toluol und 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}$ Hex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 2.92 g (3.63 mmol, 57%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.32$ ($^{\circ}$ Hex/EtOAc, 2:1).

$[\alpha]_D^{21} = -7.2$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{Cl}_3\text{NO}_9\text{Si}_2$ ($M = 805.33$ g/mol) [803.22].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 1624.48 ($[2\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 1624.48).

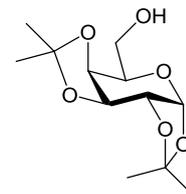
HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 821.2587 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 821.2584).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HSQC), δ (ppm): 7.69 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 7.9$ Hz, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 7.63 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 7.3$ Hz, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 7.47 - 7.38 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 7.35 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$), 4.85 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.8$ Hz, NH-GlcN), 4.80 (dd, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 10.9$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 9.0$ Hz, H4-GlcN), 4.73 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a-Troc}}$), 4.64 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b-Troc}}$), 4.48 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 8.0$ Hz, H1-GlcN), 3.81 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H1}} = 8.0$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 10.2$ Hz, H2-GlcN), 3.76 - 3.63 (m, 3H, H3-GlcN {3.73}, H6a/b-GlcN {3.69}), 3.32 (d, 1H, $J_{\text{OH,H4}} = 2.3$ Hz, 4-OH-GlcN), 3.05 (dt, 1H, $J_{\text{H5,H4}} = 9.2$ Hz, $J_{\text{H5,H6a}} = J_{\text{H5,H6b}} = 5.0$ Hz, H5-GlcN), 2.77 - 2.71 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Lev}$), 2.60 - 2.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Lev}$), 2.15 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Lev}$), 1.06 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$, TBDPS), 0.86 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$, TBS), 0.04, 0.01 ($2 \times$ s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Me-Si}$, TBS).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 207.0 (C=O-Lev), 173.3 (C=O-Lev), 154.4 (C=O-Troc), 136.1, 135.9 ($\text{C}_{\text{Ar-Ph}}$), 133.1, 132.8 ($\text{C}_{\text{q-Ph}}$), 130.1, 130.0, 127.8, 127.6 ($8 \times \text{C}_{\text{Ar-Ph}}$), 96.4 (C1-GlcN), 95.6 (CCl_3), 75.7 (C4-GlcN), 74.8 ($\text{CH}_2\text{-Troc}$), 74.4 (C5-GlcN), 71.3 (C3-GlcN), 64.1 (C6-GlcN), 57.7 (C2-GlcN), 38.3 ($\text{CH}_2\text{-Lev}$), 29.9 ($\text{CH}_3\text{-Lev}$), 28.2 ($\text{CH}_2\text{-Lev}$), 26.9 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$, TBDPS), 26.0 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$, TBS), 19.3 ($\text{C}_{\text{q-}t\text{Bu-Si}}$, TBDPS), 18.4 ($\text{C}_{\text{q-}t\text{Bu-Si}}$, TBS), -5.41, -5.46 ($\text{CH}_3\text{-Me-Si}$, TBS).

5.2.2 Synthese des Galactose-Bausteins und der fluorierten Analoga

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**13**)^[290, 318]



Es wurden 15.0 g (83.0 mmol) D-Galactose (**12**) in 300 mL Aceton aufgeschlämmt und mit 33.5 g (0.21 mol, 2.5 Äquiv.) wasserfreiem Kupfersulfat versetzt. Zu dieser Suspension wurden unter Rühren 2.0 mL konzentrierte Schwefelsäure gegeben, bevor weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach beendeter Reaktion wurde das Kupfersulfat durch *Hyflo*[®] filtriert, es wurde mit Triethylamin neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 17.3 g (66.4 mmol, 80%); gelbes Öl.

R_f = 0.45 (^cHex/EtOAc, 1:1).

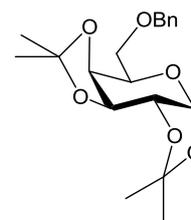
C₁₂H₂₀O₆ (M = 260.28 g/mol) [260.13].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 283.12 ([M+Na]⁺, ber.: 283.12).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.57 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 5.0 Hz, H1-Gal), 4.61 (dd, 1H, $J_{H3,H4}$ = 7.9 Hz, $J_{H3,H2}$ = 2.4 Hz, H3-Gal), 4.33 (dd, 1H, $J_{H2,H3}$ = 5.0 Hz, $J_{H2,H3}$ = 2.4 Hz, H2-Gal), 4.27 (dd, 1H, $J_{H4,H3}$ = 7.9 Hz, $J_{H4,H5}$ = 1.6 Hz, H4-Gal), 3.90 - 3.82 (m, 2H, H6a/b-Gal), 3.75 (pt, 1H, $J_{H5,H6a/b}$ = 7.3 Hz, H5-Gal), 2.21 (bs, 1H, 6-OH-Gal), 1.53, 1.45, 1.33, 1.33 (4 \times s, 12H, CH₃-Acetal).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 109.8, 109.0 (2 \times C_q-Acetal), 96.6 (C1-Gal), 71.9 (C4-Gal), 71.1 (C3-Gal), 70.9 (C2-Gal), 68.4 (C5-Gal), 62.7 (C6-Gal), 26.3, 26.2, 25.2, 24.6 (CH₃-Acetal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[319]

6-O-Benzyl-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose (14)^[214]

Es wurden 10.0 g (38.4 mmol) 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**13**) in 100 mL *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen. Unter Eiskühlung und Argonatmosphäre wurden zunächst portionsweise 3.07 g (128 mmol, 2.0 Äquiv.) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei 0 °C wurden 6.84 mL (57.6 mmol, 1.5 Äquiv.) Benzylbromid langsam zugetropft und die Reaktionslösung wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 16 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden langsam 5 mL Methanol zugesetzt, bevor die Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurden. Der Rückstand wurde in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt, bevor mit Magnesiumsulfat getrocknet wurde. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, der Rückstand wurde anschließend viermal mit je 20 mL Toluol kodestilliert und flash-chromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 8:1) gereinigt.

Ausbeute: 12.5 g (35.7 mmol, 83%); blassgelbes Öl.

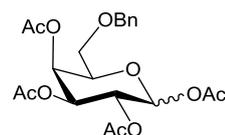
R_f = 0.40 (^cHex/EtOAc, 5:1).

C₁₉H₂₆O₆ (M = 350.41 g/mol) [350.17].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 368.21 ([M+NH₄]⁺, ber.: 368.21), 373.16 ([M+Na]⁺, ber.: 373.16).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.36 - 7.25 (m, 5H, H_{Ar}-Bn), 5.55 (d, 1H, *J*_{H1,H2} = 5.0 Hz, H1-Gal), 4.65 - 4.52 (m, 3H, H3-Gal, CH₂-Bn {4.59, d, *J*_{CH,CH} = 11.0 Hz}), 4.31 (dd, 1H, *J*_{H2,H1} = 5.0 Hz, *J*_{H2,H3} = 2.4 Hz, H2-Gal), 4.27 (dd, 1H, *J*_{H4,H3} = 8.0 Hz, *J*_{H4,H5} = 1.7 Hz, H4-Gal), 4.02 (pt, 1H, *J*_{H5,H6a/b} = 6.7 Hz, H5-Gal), 3.73 - 3.60 (m, 2H, H6a/b-Gal), 1.54, 1.43, 1.33 (4 × s, 12H, CH₃-Acetal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[209, 214]

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α/β -D-galactopyranose (15)^[290]**(α/β -6BnAc₃Gal-OAc)**

Es wurden 11.2 g (31.9 mmol) 6-*O*-Benzyl-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**14**) in 100 mL Essigsäure (80%) aufgenommen und 20 h bei 80 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 60 mL Toluol sowie zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Die deblockierte 6-*O*-Benzyl- α/β -D-galactose wurde in 75 mL einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) aufgenommen und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden die Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1).

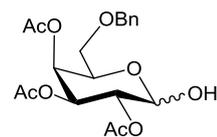
Ausbeute: 9.20 g (20.9 mmol, 55%); blassgelbes Öl, Anomerengemisch.

R_f = 0.68 (^cHex/EtOAc, 1:1).

C₂₁H₂₆O₁₀ (M = 438.43 g/mol) [438.15].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 461.14 ([M+Na]⁺, ber.: 461.14).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[290]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α/β -D-galactopyranose (16)^[320]**(α/β -6BnAc₃Gal-OH)**

Eine Lösung von 18.0 g (41.1 mmol) α/β -6BnAc₃Gal-OAc **15** in 150 mL Tetrahydrofuran wurde langsam mit 3.30 mL (57.5 mmol, 1.4 Äquiv.) Essigsäure und 3.30 mL (49.3 mmol, 1.2 Äquiv.) Ethylendiamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, bevor 100 mL Wasser zugegeben wurden. Im Anschluss wurde zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit verdünnter Salzsäure (1 M), einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 2 × 50 mL) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 30 mL Toluol und 20 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 11.8 g (29.8 mmol, 73%); farbloser amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

R_f = 0.24 (^cHex/EtOAc, 2:1).

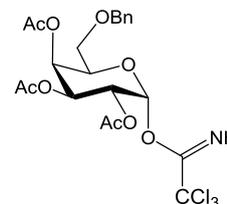
C₁₉H₂₄O₉ (M = 396.39 g/mol) [396.14].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 414.17 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 414.17), 419.13 ($[M+Na]^+$, ber.: 419.13).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[214, 320]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**17**)^[117, 241]

(α -6BnAc₃Gal-OC(NH)CCl₃)



Zu einer Lösung von 11.8 g (29.8 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α / β -D-galactopyranose (**16**) in 120 mL absol. Dichlormethan wurden unter Eiskühlung und Argonatmosphäre langsam 5.98 mL (59.6 mmol, 2.0 Äquiv.) Trichloroacetonitril und wenige Tropfen DBU gegeben. Die Reaktionslösung wurde 20 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor die Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurden. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt und als Anomerengemisch erhalten (α : β , 1:1.5, über NMR-Spektroskopie bestimmt).

Ausbeute: 13.6 g (25.1 mmol, 84%); farbloser amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

R_f = 0.39/0.30 (^cHex/EtOAc, 2:1).

$[\alpha]_D^{21} = +22.6$ ($c = 1.00$, CHCl₃, α -Anomer).

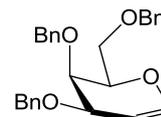
C₂₁H₂₄Cl₃NO₉ ($M = 540.77$ g/mol) [539.05].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 562.0411 ($[M+Na]^+$, ber.: 562.0414).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): charakteristische Signale: 8.71 (s, 1H, NH ^{β}), 8.63 (s, 1H, NH ^{α}), 7.32 - 7.21 (m, 5H, H_{Ar}-Ph), 6.57 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.6$ Hz, H1-Gal ^{α}), 5.82 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.3$ Hz, H1-Gal ^{β}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): α -Anomer: 170.2, 170.2, 170.0 (C=O-Ac), 161.1 (C=NH(CCl₃)), 137.5 (C_q-Bn), 128.0, 128.0, 127.9 ($5 \times$ C_{Ar}-Bn), 93.8 (C1-Gal), 90.7 (CCl₃), 73.2 (CH₂-Bn), 70.2 (C5-Gal), 67.9, 67.8 (C3-Gal, C4-Gal), 67.2, 67.2 (C2-Gal, C6-Gal), 20.8, 20.7, 20.7 (CH₃-OAc); β -Anomer: 170.2, 170.2, 169.2 (C=O-Ac), 161.2 (C=NH(CCl₃)), 137.5 (C_q-Bn), 128.5, 128.5, 128.1, 128.0 ($5 \times$ C_{Ar}-Bn), 96.3 (C1-Gal), 90.6 (CCl₃), 73.5 (CH₂-Bn), 71.0 (C5-Gal), 68.0, 67.9 (C3-Gal, C4-Gal), 67.3, 66.8 (C2-Gal, C6-Gal), 20.8, 20.8, 20.7 (CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[117, 241]

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-D-galactal (19)^[321]**(Bn₃Gal)**

Es wurden 5.00 g (18.4 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**18**, siehe S. 183) in 80 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und durch Zugabe einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol wurde ein pH-Wert von 9.5 - 10 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 50 mL Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert, in 60 mL *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen und unter Eiskühlung und Argonatmosphäre mit 3.70 g (91.9 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) versetzt. Nach 30 Minuten Rühren wurden langsam 7.96 mL (67.0 mmol, 3.6 Äquiv.) Benzylbromid zugetropft und die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur 20 h gerührt. Im Anschluss wurde zur Hydrolyse auf 200 mL einer Mischung aus Toluol und Eiswasser (1:2) gegossen, die wässrige Phase wurde dreimal mit je 60 mL Toluol extrahiert und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.51 g (15.6 mmol, 85%); farbloser kristalliner Feststoff.

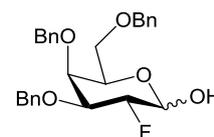
R_f = 0.56 (^cHex/EtOAc, 4:1).

C₂₇H₂₈O₄ (M = 416.51 g/mol) [416.20].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.48 - 7.28 (m, 15H, H_{Ar}-Bn), 6.45 (dd, 1H, *J*_{H1,H2} = 6.2 Hz, *J*_{H1,H3} = 1.5 Hz, H1-Gal), 4.96 (d, 1H, *J*_{CH,CH} = 11.9 Hz, CH₂-Bn), 4.94 - 4.91 (m, 1H, H2-Gal), 4.76 - 4.47 (m, 5H, CH₂-Bn), 4.30 - 4.23 (m, 2H, H3-Gal, H5-Gal), 4.04 - 4.00 (m, 1H, H4-Gal), 3.87 (dd, 1H, *J*_{H6a,H6b} = 10.1 Hz, *J*_{H6a,H5} = 7.1 Hz, H6a-Gal), 3.73 (dd, 1H, *J*_{H6a,H6b} = 10.1 Hz, *J*_{H6b,H5} = 5.2 Hz, H6b-Gal).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 144.4 (C1-Gal), 138.8, 138.6, 137.9 (C_q-Bn), 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7 (15 × C_{Ar}-Bn), 100.2 (C2-Gal), 75.9 (C3-Gal), 73.6, 73.5, 71.5, 71.1, 70.9 (3 × CH₂-Bn, C4-Gal, C5-Gal), 68.7 (C6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[209]

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (20)^[68]**(α/β -Bn₃2FGal-OH)**

Es wurden 1.45 g (3.48 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-D-galactal (**19**) in 100 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) gelöst und 2.47 g (6.96 mmol, 2.0 Äquiv.) Selectfluor[®] zugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 22 h gerührt und im Anschluss 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt, bevor 100 mL Wasser zugegeben wurden und dreimal mit je 100 mL Essigsäureethylester extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 80 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

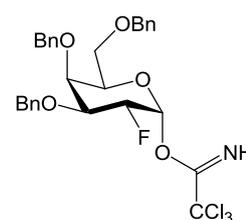
Ausbeute: 1.26 g (2.78 mmol, 80%); farbloses Öl.

R_f = 0.23 (°Hex/EtOAc, 4:1).

C₂₇H₂₉FO₅ (M = 452.51 g/mol) [452.20].

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): **α -Anomer:** -207.2 (ddd, J_{F_2,H_2} = 50.3 Hz, J_{F_2,H_1} = 10.6 Hz, J_{F_2,H_3} = 4.1 Hz, F2-Gal), **β -Anomer:** -205.1 (dd, J_{F,H_2} = 54.7 Hz, J_{F,H_1} = 14.2 Hz, F2-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[68, 209]

3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (21)^[173, 209]**(α -Bn₃2FGal-OC(NH)CCl₃)**

Zu einer Lösung von 1.26 g (2.78 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (**20**) in 80 mL absol. Dichlormethan wurden unter Eiskühlung und Argonatmosphäre 560 μ L (5.56 mmol, 2.0 Äquiv.) Trichloracetimidat und wenige Tropfen DBU gegeben. Die Reaktionslösung wurde 20 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor nach beendeter Reaktion das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde und das Produkt durch Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 3:1) gereinigt werden konnte.

Ausbeute: 1.50 g (2.51 mmol, 90%); farbloses Öl.

R_f = 0.62 (°Hex/EtOAc, 4:1).

$[\alpha]_D^{23}$ = + 40.5 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23}$ = + 33.0 (c = 1.00, CHCl₃).

$C_{29}H_{29}Cl_3FNO_5$ ($M = 596.90$ g/mol) [595.11].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 618.10 ($[M+Na]^+$, ber.: 618.10), 636.08 ($[M+K]^+$, ber.: 636.07).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.63 (s, 1H, NH), 7.38 - 7.28 (m, 15H, H_{Ar} -Bn), 6.56 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.5$ Hz, H1-Gal), 5.16 (ddd, 1H, $J_{H2,F} = 49.4$ Hz, $J_{H2,H3} = 9.5$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.8$ Hz, H2-Gal), 4.96 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.2$ Hz, CH_2 -Bn), 4.81 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH_2 -Bn), 4.72 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH_2 -Bn), 4.59 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.2$ Hz, CH_2 -Bn), 4.47 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.7$ Hz, CH_2 -Bn), 4.41 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.7$ Hz, CH_2 -Bn), 4.18 - 4.05 (m, 3H, H3-Gal, H4-Gal, H5-Gal), 3.67 - 3.55 (m, 2H, H6a/b-Gal).

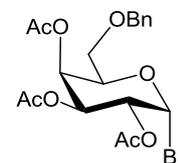
^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 160.6 ($C=NH(CCl_3)$), 138.3, 138.0, 137.9 (C_q -Bn), 128.6, 128.5, 128.3, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9 ($15 \times C_{Ar}$ -Bn), 94.3 (d, $J_{C1,F} = 23.1$ Hz, C1-Gal), 91.1 (CCl_3), 88.5 (d, $J_{C2,F} = 189.4$ Hz, C2-Gal), 76.3 (d, $J_{C3,F} = 16.0$ Hz, C3-Gal), 75.3 (CH_2 -Bn), 75.0 (d, $J_{C4,F} = 8.5$ Hz, C4-Gal), 73.7 (CH_2 -Bn), 72.4 (C5-Gal), 68.0 (C6-Gal).

^{19}F -NMR (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): -209.1 (ddd, $J_{F,H2} = 49.3$ Hz, $J_{F,H1} = 9.4$ Hz, $J_{F,H3} = 4.7$ Hz).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[173, 209]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosylbromid (**22**)^[322]

(α -6BnAc₃GalBr)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 17.0 g (38.7 mmol) α/β -6BnAc₃Gal-OAc **15** in 200 mL absol. Dichlormethan wurden langsam 100 mL Bromwasserstoff in Eisessig (33%-ig) zugetropft. Die Lösung wurde bei 0 °C 30 Minuten gerührt, anschließend auf 500 mL Eiswasser gegossen und mit 100 mL Dichlormethan verdünnt. Es wurde zweimal mit je 100 mL dest. Wasser sowie einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit 100 mL einer 10%-igen Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 3:1 + 1% NEt_3) gereinigt.

Ausbeute: 7.20 g (15.7 mmol, 41%); gelbliches Öl.

$R_f = 0.35$ (c Hex/EtOAc, 3:1 + 1% NEt_3).

$C_{19}H_{23}BrO_8$ ($M = 459.29$ g/mol) [458.06].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 476.09 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 476.09).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 7.39 - 7.25 (m, 5H, H_{Ar} -Bn), 6.70 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, H1-Gal), 5.57 (dd, 1H, $J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, $J_{H4,H5} = 1.4$ Hz, H4-Gal), 5.40 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.3$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz,

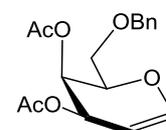
H3-Gal), 5.03 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.6$ Hz, $J_{H2,H1} = 4.0$ Hz, H2-Gal), 4.58 - 4.38 (m, 3H, CH₂-Bn {4.54, d, $J_{CH,CH} = 11.8$ Hz}, H5-Gal {4.45, d, $J_{H4,H5} = 1.4$ Hz}, CH₂-Bn {4.40, d, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz}), 3.60 - 3.42 (m, 2H, H6a/b-Gal), 2.15, 2.12, 2.01 (3 × s, 9H, CH₃-OAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 170.2, 169.9, 169.8 (3 × s, C=O-Ac), 137.4 (C_q-Bn), 128.6, 128.0, 127.9 (5 × C_{Ar}-Bn), 88.8 (C1-Gal), 73.4 (CH₂-Bn), 72.2 (C5-Gal), 68.1 (C3-Gal), 67.9 (C2-Gal), 67.4 (C4-Gal), 66.7 (C6-Gal), 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[120]

3,4-Di-O-acetyl-6-O-benzyl-D-galactal (23)

(6BnAc₂Gal)



Es wurden 9.80 g (0.15 mol, 10.0 Äquiv.) Zinkpulver mit 50 mL verdünnter Salzsäure (1 M) aktiviert, dreimal mit je 80 mL dest. Wasser gewaschen und mit je 50 mL Methanol sowie Diethylether getrocknet. Das aktivierte Zinkpulver wurde in 150 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt und mit 1.21 mL (15.2 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Methylimidazol versetzt. Die Mischung wurde unter Rückfluss auf 80 °C erhitzt, bevor 7.00 g (15.2 mmol) α-6BnAc₃GalBr **22**, gelöst in 80 mL Essigsäureethylester, innerhalb von 1 h zugetropft wurden. Es wurde 1 h bei dieser Temperatur gerührt, bevor die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und durch Hyflo[®] filtriert wurde. Die organische Phase wurde zweimal mit je 80 mL verdünnter Salzsäure (1 M) gewaschen und zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde flash-chromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.20 g (10.0 mmol, 66%); gelbliches Öl.

$R_f = 0.41$ (°Hex/EtOAc, 2:1).

C₁₇H₂₀O₆ (M = 320.34 g/mol) [320.13].

ESI-MS (positiv) m/z: 338.16 ([M+NH₄]⁺, ber.: 338.16), 343.11 ([M+Na]⁺, ber.: 343.11).

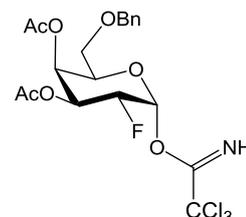
ESI-MS (negativ) m/z: 319.12 ([M-H]⁻, ber.: 319.12).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.35 - 7.15 (m, 5H, H_{Ar}-Bn), 6.43 (dd, 1H, $J_{H1,H2} = 6.3$ Hz, $J_{H1,H3} = 1.9$ Hz, H1-Gal), 4.63 - 4.58 (m, 1H, H2-Gal), 4.53 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH₂-Bn), 4.42 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH₂-Bn), 5.52 - 5.49 (m, 1H, H3-Gal), 5.44 - 5.41 (m, 1H, H4-Gal), 4.26 - 4.17 (m, 1H, H5-Gal), 3.59 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 10.0$ Hz, $J_{H6a,H5} = 6.8$ Hz, H6a-Gal), 3.48 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 10.0$ Hz, $J_{H6b,H5} = 5.8$ Hz, H6b-Gal), 2.00, 1.95 (2 × s, 6H, CH₃-OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , HSQC), δ (ppm): 170.2 ($2 \times \text{C}=\text{O}-\text{Ac}$), 145.5 (C1-Gal), 137.6 (C_q-Bn), 128.5, 127.9, 127.7 ($5 \times \text{C}_{\text{Ar}}-\text{Bn}$), 98.9 (C2-Gal), 74.3 (C5-Gal), 73.6 (CH_2-Bn), 68.0 (C6-Gal), 64.5 (C3-Gal), 63.7 (C4-Gal), 20.8, 20.7 (CH_3-OAc).

3,4-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**25**)

(α -6BnAc₂2FGal-OC(NH)CCl₃)



Eine Lösung von 3.00 g (9.36 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-D-galactal (**23**) in 100 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) wurde mit 6.62 g (18.7 mmol, 2.0 Äquiv.) Selectfluor[®] versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 22 h gerührt und im Anschluss 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständiger Reaktion wurden 100 mL Wasser zugegeben und es wurde dreimal mit je 80 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt. Das Produkt **24** konnte als Anomerengemisch erhalten werden (α : β , 1.3:1, über NMR-Spektroskopie bestimmt).

Ausbeute: 3.27 g (9.18 mmol, 98%); gelbliches Öl, Anomerengemisch.

R_f = 0.80 (^cHex/EtOAc, 1:1), 0.41 (^cHex/EtOAc, 2:1).

$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{FO}_7$ (M = 356.35 g/mol) [356.13].

ESI-MS (positiv) m/z : 374.16 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 374.16), 379.12 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 379.12).

ESI-MS (negativ) m/z : 355.12 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 355.12).

Charakteristische NMR-Signale zur Bestimmung des Anomerenverhältnisses:

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): α -Anomer: -207.1 (ddd, $J_{\text{F}_2,\text{H}_2} = 50.9$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_1} = 10.2$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_3} = 3.4$ Hz, F2-Gal), β -Anomer: -206.5 (ddd, $J_{\text{F}_2,\text{H}_2} = 51.4$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_1} = 13.0$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_3} = 3.0$ Hz, F2-Gal).

Eine Lösung von 3.24 g (9.10 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranose (**24**) in 100 mL absol. Dichlormethan wurde mit 1.83 mL (18.3 mmol, 2.0 Äquiv.) Trichloroacetonitril und wenigen Tropfen DBU unter Eiskühlung und Argonatmosphäre versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Das Rohprodukt konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt werden.

Ausbeute: 3.30 g (6.60 mmol, 73%); gelbes Öl.

R_f = 0.71 (^cHex/EtOAc, 2:1).

$[\alpha]_D^{21} = +78.7$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{Cl}_3\text{FNO}_7$ ($M = 500.73$ g/mol) [499.04].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 522.0258 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 522.0265).

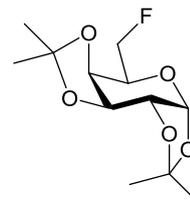
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): 8.76 (s, 1H, $\text{NH}(\text{CCl}_3)$), 7.39 - 7.22 (m, 5H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$), 6.65 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.8$ Hz, H1-Gal), 5.67 (pd, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, H4-Gal), 5.49 (td, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 10.6$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, H3-Gal), 4.96 (ddd, 1H, $J_{\text{H2,F}} = 48.9$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 10.2$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.8$ Hz, H2-Gal), 4.53 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.42 (d, 1H, $J_{\text{H5,H6a/b}} = 6.1$ Hz, H5-Gal), 4.39 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.54 (dd, 1H, $J_{\text{H6a,H6b}} = 9.7$ Hz, $J_{\text{H6a,H5}} = 5.8$ Hz, H6a-Gal), 3.46 (dd, 1H, $J_{\text{H6b,H6a}} = 9.7$ Hz, $J_{\text{H6b,H5}} = 6.8$ Hz, H6b-Gal), 2.06, 2.05 ($2 \times$ s, 6H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , HSQC), δ (ppm): 169.9, 169.9 ($\text{C}=\text{O-Ac}$), 160.9 ($\text{C}=\text{NH}(\text{CCl}_3)$), 137.5 ($\text{C}_q\text{-Bn}$), 128.5, 128.1, 128.0 ($5 \times \text{C}_{\text{Ar-Bn}}$), 93.4 (d, $J_{\text{C1,F2}} = 22.5$ Hz, C1-Gal), 90.8 (CCl_3), 84.7 (d, $J_{\text{C2,F2}} = 192.3$ Hz, C2-Gal), 73.4 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 70.2 (C5-Gal), 68.5 (d, $J_{\text{C3,F2}} = 17.4$ Hz, C3-Gal), 68.4 (C4-Gal), 67.0 (C6-Gal), 20.8, 20.6 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): **α -Anomer**: -209.1 (ddd, $J_{\text{F2,H2}} = 48.8$ Hz, $J_{\text{F2,H1}} = 11.0$ Hz, $J_{\text{F2,H3}} = 3.6$ Hz, F2-Gal), **β -Anomer**: -207.6 (ddd, $J_{\text{F2,H2}} = 51.6$ Hz, $J_{\text{F2,H1}} = 13.2$ Hz, $J_{\text{F2,H3}} = 4.0$ Hz, F2-Gal).

6-Desoxy-6-fluor-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (26)Variante A.^[323]

Eine Lösung von 10.0 g (38.4 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**13**) in 150 mL absol. Dichlormethan wurde mit 6.10 mL (46.1 mmol, 1.2 Äquiv.) 2,4,6-Collidin versetzt und unter Eiskühlung und Argonatmosphäre wurden 6.0 mL (46.1 mmol, 1.2 Äquiv.) DAST[®] zugegeben. Es wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktionsmischung 1 h auf 80 °C erhitzt wurde und nach dem Abkühlen mit 150 mL Essigsäureethylester verdünnt wurde. Es wurde im Anschluss zweimal mit je 100 mL einer 10%-igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie mit 50 mL verdünnter Salzsäure (1 M) ausgeschüttelt und zweimal mit je 50 mL dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt konnte flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt werden.



Ausbeute: 7.55 g (28.8 mmol, 75%); gelbes Öl.

Variante B:

Zu einer Lösung von 17.4 g (66.9 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**13**) in 150 mL absol. Dichlormethan und 21.0 mL (80.2 mmol, 1.2 Äquiv.) 2,4,6-Collidin wurden unter Argonatmosphäre 18.4 g (80.2 mmol, 1.2 Äquiv.) Xtal-Fluor-E[®] zugegeben und es wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 1 h auf 80 °C erhitzt, nach dem Abkühlen wurde zweimal mit je 100 mL einer 10%-igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie mit 50 mL verdünnter Salzsäure (1 M) extrahiert und zweimal mit 50 mL dest. Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 13.8 g (52.8 mmol, 79%); gelbes Öl.

$R_f = 0.70$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

$[\alpha]_D^{23} = -48.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[324] $[\alpha]_D^{23} = -51.4$ ($c = 3.18$, CHCl₃).

C₁₂H₁₉FO₅ (M = 262.27 g/mol) [262.12].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 787.35 ([3M+H]⁺, ber.: 787.37).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.55 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 5.0$ Hz, H1-Gal), 4.68 - 4.58 (m, 2H, H3-Gal, H6a-Gal), 4.53 - 4.41 (m, 1H, H6b-Gal), 4.34 (dd, 1H, $J_{H_2,H_1} = 5.0$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 2.5$ Hz, H2-Gal), 4.26 (dd, 1H, $J_{H_4,H_3} = 7.9$ Hz, $J_{H_4,H_5} = 2.0$ Hz, H4-Gal), 4.12 - 4.03 (m, 1H, H5-Gal), 1.54, 1.45, 1.34 (4 \times s, 12H, CH₃-Acetal).

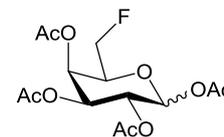
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 109.9, 109.0 (2 \times C_q-Acetal), 96.4 (C1-Gal), 82.3 (d, $J_{F,C_6} = 168.0$ Hz, C6-Gal), 70.8, 70.7, 70.6 (C2-Gal, C3-Gal, C4-Gal), 66.8 (d, $J_{F,C_5} = 22.6$ Hz, C5-Gal), 26.3, 26.1, 25.1, 24.6 (CH₃-Acetal).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -231.5 (dt, $J_{\text{F,H6a/b}} = 47.0$ Hz, $J_{\text{F,H5}} = 13.2$ Hz, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[209, 323-324]

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranose (**27**)^[177]

(α/β -Ac₃6FGal-OAc)



Es wurden 6.90 g (26.3 mmol) 6-Desoxy-6-fluor-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**26**) mit 100 mL 80%-iger Essigsäure versetzt und 18 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand dreimal mit je 50 mL Toluol sowie zweimal mit je 30 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in einer Lösung aus 120 mL Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurden die Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand viermal mit je 60 mL Toluol kodestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\text{c}}$ Hex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 9.03 g (25.8 mmol, 98%); farbloses Öl, Anomerengemisch.

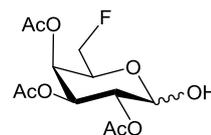
$R_f = 0.65$ ($^{\text{c}}$ Hex/EtOAc, 1:1).

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{FO}_9$ ($M = 350.29$ g/mol) [350.10].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 373.09 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 373.09).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -231.9 – -232.3 (m, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[177, 209]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranose (28)^[325]**(α/β -Ac₃6FGal-OH)**

Eine Lösung von 4.90 g (14.0 mmol) α/β -Ac₃6FGal-OAc **27** in 100 mL Tetrahydrofuran wurde mit 1.12 mL (19.6 mmol, 1.4 Äquiv.) Essigsäure und 1.12 mL (16.8 mmol, 1.2 Äquiv.) Ethylendiamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor 100 mL Wasser zugegeben wurden. Es wurde dreimal mit je 60 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit verdünnter Salzsäure (1 M), einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 2 × 50 mL) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 3.18 g (10.3 mmol, 74%); farbloser amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

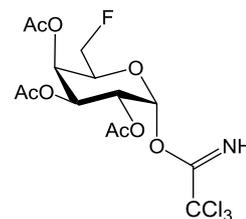
R_f = 0.50 (^cHex/EtOAc, 1:1).

C₁₂H₁₇FO₈ (M = 308.26 g/mol) [308.09].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 291.08 ([M-OH]⁺, ber.: 291.08), 331.10 ([M+Na]⁺, ber.: 331.09).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -231.7 – -232.2 (m, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[325]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (29)^[119]**(α -Ac₃6FGal-OC(NH)CCl₃)**

Zu einer Lösung von 3.10 g (10.0 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranose (**28**) in 100 mL absol. Dichlormethan wurden unter Eiskühlung und Argonatmosphäre 2.00 mL (20.0 mmol, 2.0 Äquiv.) Trichloracetonitril und wenige Tropfen DBU gegeben. Die Lösung wurde 18 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor nach beendeter Reaktion das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Das Rohprodukt konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt werden.

Ausbeute: 3.73 g (8.24 mmol, 82%); gelblicher amorpher Feststoff.

R_f = 0.74 (^cHex/EtOAc, 1:1), 0.52 (^cHex/EtOAc, 2:1).

$[\alpha]_D^{21} = +94.9$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[325] $[\alpha]_D^{23} = +97.4$ (c = 1.00, CHCl₃).

$C_{14}H_{17}Cl_3FNO_8$ ($M = 452.64$ g/mol) [451.00].

ESI-MS (positiv) m/z : 473.99 ($[M+Na]^+$, ber.: 473.99).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 473.9897 ($[M+Na]^+$, ber.: 473.9901).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 8.67 (s, 1H, $NH(CCl_3)$), 6.60 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, H1-Gal), 5.61 (d, 1H, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3-Gal), 5.46 - 5.34 (m, 2H, H2-Gal {5.35}, H4-Gal {5.27}), 4.56 - 4.29 (m, 3H, H6a-Gal {4.43}, H5-Gal {4.42}, H6b-Gal {4.28}), 2.16, 2.02, 2.01 (CH_3 -OAc).

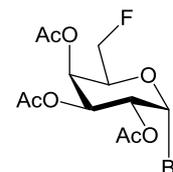
^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, HSQC), δ (ppm): 170.4, 170.1 ($3 \times C=O$ -Ac), 161.0 ($C=NH(CCl_3)$), 93.6 (C1-Gal), 90.9 (CCl_3), 80.8 (d, $J_{C6,F6} = 172.4$ Hz, C6-Gal), 69.8 (d, $J_{C5,F6} = 23.7$ Hz, C5-Gal), 67.6 (C3-Gal), 67.5 (C2-Gal), 67.0 (C4-Gal), 20.8, 20.7, 20.7 (CH_3 -OAc).

^{19}F -NMR (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): -231.8 (m, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[325]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosylbromid (31)^[326-327]

(α -Ac₃6FGalBr)



Es wurden 9.03 g (25.8 mmol) 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α/β -D-galactopyranose (**27**) in 40 mL Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung innerhalb von 1 h mit 25 mL Bromwasserstoff (33%-ig in Eisessig) versetzt. Unter Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Mischung 2 h gerührt. Die Lösung wurde anschließend mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und zur Hydrolyse auf 150 mL Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt und zweimal mit je 100 mL dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert, bevor die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurden. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 6.10 g (16.5 mmol, 64%); gelblicher Feststoff.

$R_f = 0.56$ (c Hex/EtOAc, 2:1).

$C_{12}H_{16}BrFO_7$ ($M = 370.15$ g/mol) [370.01].

ESI-MS (positiv) m/z : 291.08 ($[M-Br]^+$, ber.: 291.08), 371.10 ($[M+H]^+$, ber.: 371.01).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.71 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.9$ Hz, H1-Gal), 5.57 (d, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 7.9$ Hz, H4-Gal), 5.41 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 10.6$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, H3-Gal), 5.06 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = 10.6$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 4.0$ Hz, H2-Gal), 4.57 - 4.33 (m, 3H, H5-Gal, H6a/b-Gal), 2.15, 2.11, 2.01 ($3 \times \text{s}$, 9H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$).

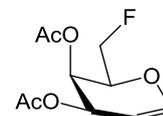
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.3, 170.1, 170.0 (C=O-Ac), 88.2 (C1-Gal), 80.5 (d, $J_{\text{C6,F}} = 173.3$ Hz, C6-Gal), 71.8 (d, $J_{\text{C5,F}} = 23.5$ Hz, C5-Gal), 68.1 (C2-Gal), 67.9 (C3-Gal), 67.2 (d, $J_{\text{C4,F}} = 5.3$ Hz, C4-Gal), 21.0, 20.8, 20.8 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -231.2 (dt, $J_{\text{F,H6a/b}} = 46.8$ Hz, $J_{\text{F,H5}} = 17.0$ Hz, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[190, 326-327]

3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**32**)^[172-173]

(Ac₂6FGal)



Es wurden 9.35 g (0.14 mol, 10 Äquiv.) Zinkpulver mit 75 mL verdünnter Salzsäure (1 M) aktiviert und zweimal mit je 50 mL destilliertem Wasser sowie Methanol, Diethylether und Essigsäureethylester gewaschen. Das aktivierte Zinkpulver wurde in 100 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt und mit 1.14 mL (14.3 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Methylimidazol versetzt. Die Mischung wurde unter Rückfluss erhitzt und mit einer Lösung von 5.30 g (14.3 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosylbromid (**31**), gelöst in 60 mL Essigsäureethylester, versetzt. Es wurde 1 h unter Rückfluss erhitzt, bevor die Reaktionsmischung nach dem Abkühlen durch *Hyflo*[®] filtriert wurde. Es wurde mit 100 mL Essigsäureethylester nachgewaschen und das Filtrat wurde zweimal mit je 100 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und mit 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.66 g (11.4 mmol, 80%); farbloses Öl.

$R_f = 0.51$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1).

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FO}_5$ (M = 232.21 g/mol) [232.07].

EI-MS (*positiv*) m/z : 231.21 ([M⁺], ber.: 232.07), 97.06 ([M-C₄H₄FO₄], ber.: 97.06), 73.06 ([M-C₆H₅FO₄], ber.: 73.06).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.48 (dd, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 6.3$ Hz, $J_{\text{H1,H3}} = 1.6$ Hz, H1-Gal), 5.55 - 5.51 (m, 1H, H3-Gal), 5.47 - 5.43 (m, 1H, H4-Gal), 4.78 - 4.73 (m, 1H, H2-Gal), 4.61 (ddd, 1H, $J_{\text{H6a,F}} = 47.9$ Hz, $J_{\text{H6a,H6b}} = 10.1$ Hz, $J_{\text{H6a,H5}} = 7.4$ Hz, H6a-Gal), 4.51 (ddd, 1H, $J_{\text{H6b,F}} = 46.1$ Hz, $J_{\text{H6b,H6a}} = 10.1$ Hz, $J_{\text{H6b,H5}} = 4.1$ Hz, H6b-Gal), 4.42 - 4.34 (m, 1H, H5-Gal), 2.10, 2.02 ($2 \times \text{s}$, 6H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$).

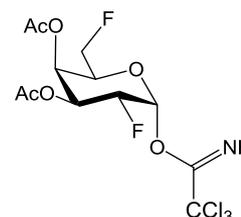
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.5, 170.3 (C=O-Ac), 145.8 (C1-Gal), 99.1 (C2-Gal), 81.4 (d, $J_{\text{C}_6,\text{F}} = 170.7$ Hz, C6-Gal), 73.9 (d, $J_{\text{C}_5,\text{F}} = 22.1$ Hz, C5-Gal), 64.1 (d, $J_{\text{C}_4,\text{F}} = 7.0$ Hz, C4-Gal), 64.0 (C3-Gal), 21.1, 20.9 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -230.2 (dd, $J_{\text{F},\text{H}_{6\text{a/b}}} = 41.0$ Hz, $J_{\text{F},\text{H}_5} = 31.0$ Hz, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[172-173]

3,4-Di-*O*-acetyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**34**)

(α -Ac₂2,6F₂Gal-OC(NH)CCl₃)



Eine Lösung von 4.38 g (18.9 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**32**) in 100 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) wurde mit 13.4 g (37.8 mmol, 2.0 Äquiv.) Selectfluor[®] versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt, nach vollständiger Reaktion wurden 100 mL Wasser zugegeben und es wurde dreimal mit je 100 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde mit 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) gereinigt und das Produkt **33** konnte als Anomerengemisch erhalten werden (α : β , 2.5:1, über NMR-Spektroskopie bestimmt).

Ausbeute: 4.11 g (15.3 mmol, 81%); farbloses Öl.

$R_f = 0.29$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{O}_6$ (M = 268.21 g/mol) [268.08].

ESI-MS (negativ) m/z : 267.07 ($[\text{M-H}]^-$, ber.: 267.07).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): α -Anomer: -207.4 (ddd, 1F, $J_{\text{F}_2,\text{H}_2} = 50.0$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_1} = 11.0$ Hz, $J_{\text{F}_2,\text{H}_3} = 3.3$ Hz, F2-Gal), -231.5 (td, 1F, $J_{\text{F}_6,\text{H}_{6\text{a/b}}} = 46.3$ Hz, $J_{\text{F}_6,\text{H}_5} = 11.0$ Hz, F6-Gal), β -Anomer: -206.7 – -207.1 (m, 1F, F2-Gal), -230.8 (td, 1F, $J_{\text{F}_6,\text{H}_{6\text{a/b}}} = 46.7$ Hz, $J_{\text{F}_6,\text{H}_5} = 12.4$ Hz, F6-Gal).

Eine Lösung von 4.11 g (15.3 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (**33**) in 80 mL absol. Dichlormethan wurde unter Eiskühlung und Argonatmosphäre mit 3.10 mL (30.6 mmol, 2.0 Äquiv.) Trichloracetonitril und wenigen Tropfen DBU versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor nach beendeter Reaktion die Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurden und das Produkt durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 3:1) gereinigt wurde.

Ausbeute: 5.28 g (12.8 mmol, 84%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.32$ (°Hex/EtOAc, 3:1).

$[\alpha]_D^{25} = +126.5$ (c = 1.00, CHCl₃).

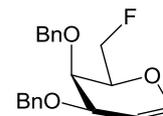
C₁₂H₁₄Cl₃F₂NO₆ (M = 412.59 g/mol) [410.99].

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 267.15 ([M-C₂HCl₃N], ber.: 267.20), 251.15 ([M-C₂HCl₃N], ber.: 251.20).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 8.79 (s, 1H, NH(CCl₃)), 6.70 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, H1-Gal), 5.65 (td, 1H, $J_{H4,H3} = 3.4$ Hz, $J_{H4,H5} = 1.2$ Hz, H4-Gal), 5.50 (td, 1H, $J_{H3,H2} = 10.5$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-Gal), 5.00 (ddd, 1H, $J_{H2,F} = 48.8$ Hz, $J_{H2,H3} = 10.2$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.9$ Hz, H2-Gal), 4.47 (ddd, 1H, $J_{H6a,F} = 47.0$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.1$ Hz, $J_{H6a,H5} = 8.4$ Hz, H6a-Gal), 4.38 (ddd, 1H, $J_{H6b,F} = 45.2$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.1$ Hz, $J_{H6b,H5} = 6.5$ Hz, H6b-Gal), 4.45 (dd, 1H, $J_{H5,H6a/b} = 8.5$ Hz, $J_{H5,H4} = 5.2$ Hz, H5-Gal), 2.16, 2.07 (2 × s, 6H, CH₃-OAc).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 170.0, 169.9 (C=O-Ac), 160.9 (C=NH(CCl₃)), 93.1 (d, $J_{C1,F2} = 22.5$ Hz, C1-Gal), 90.7 (CCl₃), 84.5 (d, $J_{C2,F2} = 192.7$ Hz, C2-Gal), 80.7 (d, $J_{C6,F6} = 173.2$ Hz, C6-Gal), 69.8 (d, $J_{C5,F6} = 23.4$ Hz, C5-Gal), 68.2 (d, $J_{C3,F2} = 25.2$ Hz, C3-Gal), 68.1 (dd, $J_{C4,F2} = 7.6$ Hz, $J_{C4,F6} = 4.6$ Hz, C4-Gal), 20.8, 20.6 (CH₃-OAc).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -209.2 (ddd, 1F, $J_{F2,H2} = 48.9$ Hz, $J_{F2,H1} = 10.9$ Hz, $J_{F2,H3} = 3.3$ Hz, F2-Gal), -231.8 (ddd, 1F, $J_{F6,H6a} = 47.6$ Hz, $J_{F6,H6b} = 45.5$ Hz, $J_{F6,H5} = 12.6$ Hz, F6-Gal).

3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (35)^[209]**(Bn₂6FGal)**

In 40 mL Methanol (HPLC-grade) wurden 2.00 g (8.61 mmol) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**32**) gelöst, bevor durch Zugabe einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol ein pH-Wert von 10 eingestellt wurde. Die Reaktionslösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, im Anschluss mit 60 mL Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert und anschließend in 35 mL Dimethylformamid aufgenommen. Unter Eiskühlung und Argonatmosphäre wurden portionsweise 1.20 g (30.3 mmol, 2.1 Äquiv.) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) zugegeben und die Mischung wurde 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Es wurden 3.06 mL (25.8 mmol, 3.0 Äquiv.) Benzylbromid zugetropft und die Reaktionslösung wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 16 h gerührt, zur Hydrolyse auf 200 mL einer Mischung aus Toluol und Eiswasser (1:1) gegossen und die wässrige Phase wurde dreimal mit je 60 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 80 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt, bevor mit Magnesiumsulfat getrocknet wurde. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand konnte flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 4:1) gereinigt werden.

Ausbeute: 2.79 g (8.49 mmol, 98%); blassgelbes Öl.

$R_f = 0.54$ (°Hex/EtOAc, 4:1).

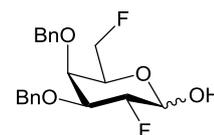
$C_{20}H_{21}FO_3$ (M = 328.38 g/mol) [328.15].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.42 - 7.27 (m, 10H, H_{Ar}-Bn), 6.37 (dd, 1H, $J_{H1,H2} = 6.2$ Hz, $J_{H1,H3} = 1.0$ Hz, H1-Gal), 4.96 - 4.90 (m, 1H, H2-Gal), 4.83 (ddd, 1H, $J_{H6a,F} = 48.7$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.5$ Hz, $J_{H6a,H5} = 8.4$ Hz, H6a-Gal), 4.82 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.8$ Hz, CH₂-Bn), 4.73 (ddd, 1H, $J_{H6b,F} = 48.6$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 10.4$ Hz, $J_{H6b,H5} = 3.1$ Hz, H6b-Gal), 4.71 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz, CH₂-Bn), 4.70 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.64 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH₂-Bn), 4.48 - 4.35 (m, 1H, H5-Gal), 4.13 - 4.07 (m, 1H, H3-Gal), 3.96 (dt, 1H, $J_{H4,H5} = 3.9$ Hz, $J_{H4,H3} = 2.0$ Hz, H4-Gal).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 144.3 (C1-Gal), 138.7, 138.6 (C_q-Bn), 128.8, 128.7, 128.3, 128.3, 128.1, 128.0, 127.8, 127.8 (10 × C_{Ar}-Bn), 99.8 (C2-Gal), 81.9 (d, $J_{C6,F} = 165.6$ Hz, C6-Gal), 75.3 (d, $J_{C5,F} = 20.8$ Hz, C5-Gal), 72.9 (CH₂-Bn), 72.7 (d, $J_{C4,F} = 9.0$ Hz, C4-Gal), 71.4 (CH₂-Bn), 68.5 (C3-Gal).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -225.0 – -226.0 (m, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[209]

3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (36)^[209]**(α/β -Bn₂2,6F₂Gal-OH)**

Es wurden 2.03 g (6.18 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-6-desoxy-6-fluor-D-galactal (**35**) in 100 mL einer Mischung aus Nitromethan und Wasser (4:1) gelöst und mit 4.32 g (12.2 mmol, 2.0 Äquiv.) Selectfluor[®] versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 18 h gerührt und anschließend 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständiger Reaktion wurden 100 mL Wasser zugegeben und es wurde dreimal mit je 100 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 80 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.66 g (4.57 mmol, 75%); farbloses Öl.

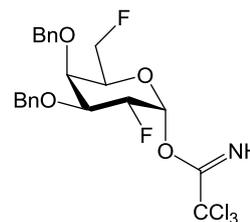
R_f = 0.33 (^cHex/EtOAc, 3:1).

C₂₀H₂₂F₂O₄ (M = 364.38 g/mol) [364.15].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): charakteristische Signale: 5.47 (d, 1H, *J*_{H₁,H₂} = 3.7 Hz, H1- α -Gal), 4.98 (d, 1H, *J*_{CH,CH} = 11.3 Hz, CH₂-Bn), 4.90 (ddd, 1H, *J*_{H₂,F} = 51.8 Hz, *J*_{H₂,H₃} = 6.9 Hz, *J*_{H₂,H₁} = 3.5 Hz, H2-Gal), 4.72 (d, 1H, *J*_{CH,CH} = 12.0 Hz, CH₂-Bn). Eine detaillierte Zuordnung der Signale war aufgrund des vorhandenen Anomerengemisches nicht möglich.

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): **α -Anomer:** -207.4 (ddd, 1F, *J*_{F₂,H₂} = 50.1 Hz, *J*_{F₂,H₁} = 10.5 Hz, *J*_{F₂,H₃} = 4.0 Hz, F2-Gal), -229.9 – -230.3 (m, 1F, F6-Gal), **β -Anomer:** -204.9 – -205.2 (m, 1F, F2-Gal), -229.9 – -230.3 (m, 1F, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[209]

3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (37)^[187, 209]**(α -Bn₂2,6F₂Gal-OC(NH)CCl₃)**

Eine Lösung von 1.10 g (3.02 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (**36**) in 80 mL absol. Dichlormethan wurde unter Eiskühlung und Argonatmosphäre mit 600 μ L (6.00 mmol, 2.0 Äquiv.) Trichloracetonitril und wenigen Tropfen DBU versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor nach beendeter Reaktion das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Das Produkt konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt werden.

Ausbeute: 951 mg (1.87 mmol, 62%); blassgelbes Öl.

R_f = 0.70 (^cHex/EtOAc, 3:1).

$[\alpha]_D^{23} = +81.2$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23} = +77.9$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₂₂H₂₂Cl₃F₂NO₄ (M = 508.77 g/mol) [507.06].

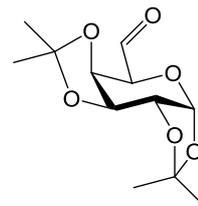
ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 530.09 ([M+Na]⁺, ber.: 530.05), 546.07 ([M+K]⁺, ber.: 546.02).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.69 (s, 1H, NH(CCl₃)), 7.43 - 7.29 (m, 10H, H_{Ar}-Bn), 6.60 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.9$ Hz, H1-Gal), 5.19 (ddd, 1H, $J_{H2,F} = 49.2$ Hz, $J_{H2,H3} = 9.9$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.7$ Hz, H2-Gal), 5.01 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.88 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz, CH₂-Bn), 4.75 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz, CH₂-Bn), 4.65 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.47 (ddd, 1H, $J_{H6a,F} = 45.9$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.2$ Hz, $J_{H6a,H5} = 6.3$ Hz, H6a-Gal), 4.39 (ddd, 1H, $J_{H6b,F} = 46.1$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 8.2$ Hz, $J_{H6b,H5} = 6.1$ Hz, H6b-Gal), 4.24 - 4.19 (m, 1H, H3-Gal), 4.12 (dd, 1H, $J_{H5,H6a/b} = 9.9$ Hz, $J_{H5,H4} = 2.9$ Hz, H5-Gal), 3.96 (pt, 1H, $J_{H4,H5} = 3.3$ Hz, H4-Gal).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 160.7 (C=NH(CCl₃)), 137.7, 137.6 (C_q-Bn), 128.9, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 127.8, 127.8 (10 \times C_{Ar}-Bn), 94.2 (d, $J_{C1,F2} = 23.3$ Hz, C1-Gal), 89.9 (CCl₃), 88.6 (d, $J_{C2,F2} = 189.7$ Hz, C2-Gal), 81.5 (d, $J_{C6,F6} = 167.9$ Hz, C6-Gal), 76.3 (d, $J_{C5,F6} = 16.4$ Hz, C5-Gal), 75.4 (CH₂-Bn), 74.8 (dd, $J_{C4,F2} = 8.6$ Hz, $J_{C4,F6} = 4.5$ Hz, C4-Gal), 73.5 (CH₂-Bn), 71.9 (d, $J_{C3,F2} = 25.1$ Hz, C3-Gal).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -209.3 (ddd, 1F, $J_{F2,H2} = 49.2$ Hz, $J_{F2,H1} = 9.9$ Hz, $J_{F2,H3} = 4.2$ Hz, F2-Gal), -230.8 (td, 1F, $J_{F6,H6a/b} = 46.5$ Hz, $J_{F6,H5} = 10.8$ Hz, F6-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[187, 209]

1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranose (38)^[208, 328-329]

Zu einer Lösung aus 4.20 g (16.1 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**13**) in 100 mL absol. Dichlormethan wurden portionsweise 10.2 g (24.2 mmol, 1.5 Äquiv.) Dess-Martin-Periodinan^[246, 330] zugegeben und die Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Lösung wurden 100 mL Wasser zugesetzt und anschließend wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt konnte nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) als farbloses Öl erhalten werden.

Ausbeute: 3.82 g (14.8 mmol, 92%); farbloses Öl.

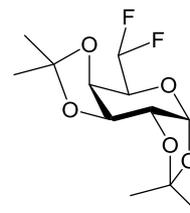
R_f = 0.36 (^cHex/EtOAc, 2:1).

C₁₂H₁₈O₆ (M = 258.26 g/mol) [258.11].

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.57 (s, 1H, H6-Gal), 5.63 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 5.0 Hz, H1-Gal), 4.65 (dd, 1H, $J_{H3,H4}$ = 7.7 Hz, $J_{H3,H2}$ = 2.6 Hz, H3-Gal), 4.60 (m_c, 1H, H4-Gal), 4.36 (dd, 1H, $J_{H2,H1}$ = 5.1 Hz, $J_{H2,H3}$ = 2.6 Hz, H2-Gal), 4.16 (d, 1H, $J_{H5,H4}$ = 2.3 Hz, H5-Gal), 1.47, 1.40, 1.31, 1.28 (4 \times s, 12H, CH₃-Acetal).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 200.3 (C6-Gal), 110.2, 109.3 (2 \times C_q-Acetal), 96.4 (C1-Gal), 73.3 (C5-Gal), 71.8, 71.7 (C3-Gal, C4-Gal), 70.2 (C2-Gal), 26.3, 26.2, 25.2, 24.6 (CH₃-Acetal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[329]

6-Desoxy-6,6-difluor-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (39)^[331]

Es wurden 3.82 g (14.8 mmol) 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden- α -D-galacto-hexodialdo-1,5-pyranose (**38**) in 150 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung und Argonatmosphäre mit 4.0 mL (29.6 mmol, 2.0 Äquiv.) DAST[®] versetzt und unter Erwärmen auf Raumtemperatur 20 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 mL Methanol abgebrochen, die organische Phase wurde zweimal mit je 70 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.95 g (10.5 mmol, 71%); gelbliches Öl.

R_f = 0.73 (^cHex/EtOAc, 2:1), 0.61 (^cHex/EtOAc, 3:1).

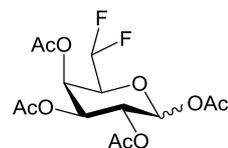
C₁₂H₁₈F₂O₅ (M = 280.26 g/mol) [280.11].

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.82 (ddd, 1H, $J_{\text{H6,Fa}} = 57.9$ Hz, $J_{\text{H6,Fb}} = 53.9$ Hz, $J_{\text{H6,H5}} = 6.6$ Hz, H6-Gal), 5.54 (dd, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 4.9$ Hz, $J_{\text{H1,H3}} = 2.1$ Hz, H1-Gal), 4.63 (ddd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 7.9$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 2.6$ Hz, $J_{\text{H3,F}} = 2.5$ Hz, H3-Gal), 4.38 - 4.32 (m, 2H, H2-Gal, H4-Gal), 3.94 - 3.87 (m, 1H, H5-Gal), 1.53, 1.45, 1.34, 1.33 (4 \times s, 12H, CH₃-Acetal).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 114.6 (dd, $J_{\text{Fa,C6}} = 245.0$ Hz, $J_{\text{Fb,C6}} = 237.0$ Hz, C6-Gal), 110.0, 109.2 (2 \times C_q-Acetal), 96.1 (C1-Gal), 70.5, 70.4 (C2-Gal, C3-Gal), 69.9 (d, $J_{\text{Fa/b,C4}} = 6.8$ Hz, C4-Gal), 68.1 (dd, $J_{\text{Fa,C5}} = 31.8$ Hz, $J_{\text{Fb,C5}} = 23.6$ Hz, C5-Gal), 26.3, 26.2, 25.2, 24.6 (CH₃-Acetal).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -128.6 (ddd, 1F, $J_{\text{Fa,Fb}} = 297.9$ Hz, $J_{\text{Fa,H6}} = 57.9$ Hz, $J_{\text{Fa,H5}} = 11.5$ Hz, F6a-Gal), -130.5 (ddd, 1F, $J_{\text{Fb,Fa}} = 299.7$ Hz, $J_{\text{Fb,H6}} = 54.4$ Hz, $J_{\text{Fb,H5}} = 4.2$ Hz, F6b-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[208, 331]

1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (40)^[208]**(α/β -Ac₃6,6F₂Gal-OAc)**

Es wurden 2.95 g (10.5 mmol) 6-Desoxy-6,6-difluor-1,2:3,4-di-*O*-isopropyliden- α -D-galactopyranose (**39**) mit 100 mL 80%-iger Essigsäure versetzt und 22 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und Dichlormethan kdestilliert. Der vollständig deblockierte Fluorgalactose-Baustein wurde ohne weitere Reinigung in 40 mL Pyridin aufgenommen und mit 20 mL Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt, bevor der Rückstand viermal mit je 60 mL Toluol kdestilliert wurde. Die Reinigung des Produkts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1).

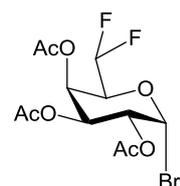
Ausbeute: 3.24 g (8.79 mmol, 84%); gelbes Öl.

$R_f = 0.43$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

C₁₄H₁₈F₂O₉ (M = 368.28 g/mol) [368.09].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 391.0816 ([M+Na]⁺, ber.: 391.0919).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[208]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- α -D-galactopyranosylbromid (41)^[208]**(α -Ac₃6,6F₂GalBr)**

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 2.52 g (6.81 mmol) α/β -Ac₃6,6F₂Gal-OAc **40** in 5 mL Essigsäureanhydrid wurden langsam 25 mL einer 33%-igen Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig zugetropft. Die Lösung wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 20 h gerührt und anschließend auf 100 mL Eiswasser gegossen. Es wurde weitere zweimal mit je 50 mL dest. Wasser gewaschen sowie mit 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert, bevor die vereinigten organischen Phasen mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurden. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt konnte nach flashchromatographischer Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) als Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 1.84 g (4.72 mmol, 70%); gelblicher Feststoff.

$R_f = 0.53$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

$[\alpha]_D^{23} = +157.3$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[208] $[\alpha]_D^{23} = +185.0$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{BrF}_2\text{O}_7$ ($M = 389.14$ g/mol) [387.99].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 309.0781 ($[\text{M}-\text{Br}]^+$, ber.: 309.0780).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.71 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 4.0$ Hz, H1-Gal), 5.79 (ddd, 1H, $J_{\text{H6,Fa}} = 55.8$ Hz, $J_{\text{H6,Fb}} = 54.1$ Hz, $J_{\text{H6,H5}} = 5.6$ Hz, H6-Gal), 5.70 - 5.66 (m, 1H, H4-Gal), 5.38 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, H3-Gal), 5.07 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = 10.6$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 4.0$ Hz, H2-Gal), 4.38 (ddd, 1H, $J_{\text{H5,F}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, $J_{\text{H5,H4}} = 2.6$ Hz, H5-Gal), 2.15, 2.12, 2.01 ($3 \times s$, 9H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$).

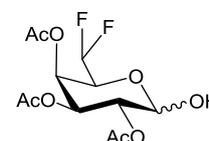
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.1, 169.8, 169.4 ($\text{C}=\text{O}-\text{Ac}$), 112.4 (dd, $J_{\text{Fa,C6}} = 246.7$ Hz, $J_{\text{Fb,C6}} = 241.4$ Hz, C6-Gal), 87.1 (C1-Gal), 72.4 (dd, 1H, $J_{\text{Fa,C5}} = 30.7$ Hz, $J_{\text{Fb,C5}} = 26.4$ Hz, C5-Gal), 67.6 (C3-Gal), 67.5 (C2-Gal), 66.0 (dd, $J_{\text{Fa,C4}} = 5.6$ Hz, $J_{\text{Fb,C5}} = 2.6$ Hz, C4-Gal), 20.8, 20.7, 20.6 ($3 \times s$, $\text{CH}_3\text{-OAc}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -128.5 (ddd, 1F, $J_{\text{Fa,Fb}} = 301.9$ Hz, $J_{\text{Fa,H6}} = 55.6$ Hz, $J_{\text{Fa,H5}} = 10.5$ Hz, F6a-Gal), -130.1 (ddd, 1F, $J_{\text{Fb,Fa}} = 302.0$ Hz, $J_{\text{Fb,H6}} = 54.3$ Hz, $J_{\text{Fb,H5}} = 5.6$ Hz, F6b-Gal).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[208]

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (42)

(α/β -Ac₃6,6F₂Gal-OH)



Eine Lösung von 6.00 g (16.2 mmol) α/β -Ac₃6,6F₂Gal-OAc **40** in 100 mL Tetrahydrofuran wurde mit 1.29 mL (22.5 mmol, 1.4 Äquiv.) Essigsäure und 1.29 mL (19.3 mmol, 1.2 Äquiv.) Ethylendiamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit 100 mL Wasser versetzt. Im Anschluss wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit verdünnter Salzsäure (1 M), einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (je 2×50 mL) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1) gereinigt.

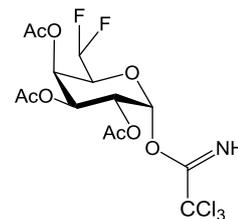
Ausbeute: 4.11 g (12.6 mmol, 78%); gelbliches Öl, Anomerengemisch.

$R_f = 0.26/0.35$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{O}_8$ ($M = 326.25$ g/mol) [326.08].

HR-ESI-MS (negativ) m/z : 325.0741 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 325.0740).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -128.6 – -130.0 (m, 2F, F6a/b-Gal).

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (43)**(α -Ac₃6F₂Gal-OC(NH)CCl₃)**

Eine Lösung von 4.10 g (12.6 mmol) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- α/β -D-galactopyranose (**42**) in 80 mL absol. Dichlormethan wurde unter Eiskühlung und Argonatmosphäre mit 2.53 mL (25.2 mmol, 2.0 Äquiv.) Trichloroacetonitril und wenigen Tropfen DBU versetzt. Die Reaktionslösung wurde 18 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor nach beendeter Reaktion das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Das Rohprodukt konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt werden.

Ausbeute: 4.62 g (9.82 mmol, 78%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.54 (^cHex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: R_t = 5.12 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30) → (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{21} = + 87.9$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₁₄H₁₆Cl₃F₂NO₈ (M = 470.63 g/mol) [468.99].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 309.0781 ([M-TCl]⁺, ber.: 309.0780).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 8.73 (s, 1H, NH(CCl₃)), 6.67 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, H1-Gal), 5.75 (ddd, 1H, $J_{H6,Fa} = 56.0$ Hz, $J_{H6,Fb} = 54.3$ Hz, $J_{H6,H5} = 5.8$ Hz, H6-Gal), 5.73 - 5.71 (m, 1H, H4-Gal), 5.42 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.9$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.8$ Hz, H3-Gal), 5.37 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.9$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.2$ Hz, H2-Gal), 4.32 (dt, 1H, $J_{H5,F} = 11.5$ Hz, $J_{H5,H6} = 5.1$ Hz, $J_{H5,H4} = 5.1$ Hz, H5-Gal), 2.17, 2.03, 2.02 (3 × s, 9H, CH₃-OAc).

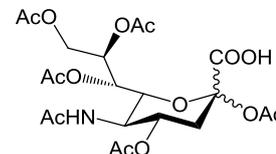
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 170.2, 170.0, 169.6 (C=O-Ac), 160.9 (C=NH(CCl₃)), 112.9 (dd, $J_{Fa,C6} = 246.7$ Hz, $J_{Fb,C6} = 240.8$ Hz, C6-Gal), 93.3 (C1-Gal), 90.7 (CCl₃), 70.9 (dd, 1H, $J_{Fa,C5} = 30.6$ Hz, $J_{Fb,C5} = 26.0$ Hz, C5-Gal), 67.1 (C3-Gal), 66.7 (C2-Gal), 66.6 (dd, $J_{Fa,C4} = 6.1$ Hz, $J_{Fb,C4} = 2.5$ Hz, C4-Gal), 20.8, 20.7, 20.7 (3 × s, CH₃-OAc).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -128.3 (ddd, 1F, $J_{Fa,Fb} = 301.3$ Hz, $J_{Fa,H6} = 56.9$ Hz, $J_{Fa,H5} = 11.5$ Hz, F6a-Gal), -130.2 (ddd, 1F, $J_{Fb,Fa} = 299.5$ Hz, $J_{Fb,H6} = 54.1$ Hz, $J_{Fb,H5} = 4.9$ Hz, F6b-Gal).

5.2.3 Synthese der Neuraminsäure-Bausteine

5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (45)^[210-211, 251]

(α/β -Ac₅SiaCOOH)



Es wurden 10.0 g (32.3 mmol) *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**44**) in 150 mL Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 75 mL Essigsäureanhydrid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde viermal mit je 40 mL Toluol sowie dreimal mit je 40 mL Dichlormethan kodestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 16.7 g (32.3 mmol, quant.); gelblicher amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

R_f = 0.41 (EtOAc/CH₂Cl₂, 5:1).

C₂₁H₂₉NO₁₄ (M = 519.45 g/mol) [519.16].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 537.19 ([M+NH₄]⁺, ber.: 537.19), 542.15 ([M+Na]⁺, ber.: 542.15), 558.12 ([M+K]⁺, ber.: 542.15).

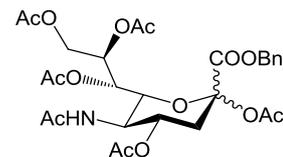
ESI-MS (negativ) *m/z*: 518.15 ([M-H]⁻, ber.: 518.15).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.56 (d, 1H, *J*_{NH,H5} = 9.4 Hz, NH-Sia), 5.40 (dd, 1H, *J*_{H7,H8} = 5.3 Hz, *J*_{H7,H6} = 2.1 Hz, H7-Sia), 5.33 - 5.24 (m, 1H, H4-Sia), 5.13 - 5.09 (m, 1H, H8-Sia), 4.53 (dd, 1H, *J*_{H9a,H9b} = 5.3 Hz, *J*_{H8,H9a} = 2.1 Hz, H9a-Sia), 4.21 - 4.11 (m, 3H, H5-Sia, H6-Sia, H9b-Sia), 2.58 (dd, 1H, *J*_{H3äq,H3ax} = 13.4 Hz, *J*_{H3äq,H4} = 5.0 Hz, H3_{äq}-Sia), 2.22 (m_c, 1H, H3_{ax}-Sia), 2.14, 2.08, 2.06, 2.04, 2.03, 1.90 (6 × s, 18H, CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[210, 251]

Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid
(46)^[210, 251]

(α/β -Ac₄SiaCO₂Bn-OAc)



Zu einer Lösung von 16.7 g (32.2 mmol) α/β -Ac₃SiaCOOH **45** in 60 mL Ethanol wurden 5.26 g (16.2 mmol, 0.5 Äquiv.) Cäsiumcarbonat, gelöst in 12 mL Wasser, gegeben. Es wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der gelbe Rückstand wurde viermal mit je 40 mL Toluol kodestilliert und im Anschluss in 90 mL *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen. Zur Lösung wurden 34.5 mL (291 mmol, 9.0 Äquiv.) Benzylbromid innerhalb von 30 Minuten getropft und das Gemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Ausgefallenes Cäsiumbromid wurde abfiltriert, das Rohprodukt wurde im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit und in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen. Ausgefallenes Cäsiumbromid wurde erneut abfiltriert, bevor das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Das gelbe Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt und das ölige Produkt wurde einmal mit 30 mL Toluol und dreimal mit je 30 mL Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 16.7 g (27.4 mmol, 85%); farbloser amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

$R_f = 0.45/0.51$ (EtOAc).

C₂₈H₃₅NO₁₄ (M = 609.58 g/mol) [609.21].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 627.24 ([M+NH₄]⁺, ber.: 627.24), 632.19 ([M+Na]⁺, ber.: 632.20), 648.17 ([M+K]⁺, ber.: 648.17).

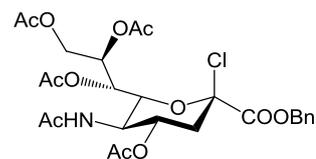
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.37 - 7.30 (m, 5H, H_{Ar}-Bn), 5.34 (d, 1H, $J_{\text{NH,H5}} = 9.0$ Hz, NH-Sia), 5.32 - 5.05 (m, 6H, H₄-Sia, H₆-Sia, H₇-Sia, H₈-Sia, CH₂-Bn), 4.44 (dd, 1H, $J_{\text{H9a,H9b}} = 12.4$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.6$ Hz, H_{9a}-Sia), 4.15 - 4.09 (m, 2H, H₅-Sia, H_{9b}-Sia), 2.54 (dd, 1H, $J_{\text{H3äq,H3ax}} = 13.5$ Hz, $J_{\text{H3äq,H4}} = 5.0$ Hz, H_{3äq}-Sia), 2.12, 2.11, 2.02 (6 \times s, 16H, CH₃-OAc, H_{3ax}-Sia), 1.88 (s, 3H, CH₃-NHAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6, 170.5, 170.5, 170.1, 170.1, 170.0 (5 \times C=O-Ac, -NHAc), 165.6 (C1-Sia), 135.1 (C_q-Bn), 129.1, 128.9, 128.3 (5 \times C_{Ar}-Bn), 97.6 (C2-Sia), 72.9 (C6-Sia), 71.2 (C8-Sia), 68.4 (C4-Sia), 68.1 (C7-Sia), 67.4 (CH₂-Bn), 61.9 (C9-Sia), 49.5 (C5-Sia), 37.4 (C3-Sia), 23.3 (CH₃-NHAc), 20.8, 20.8, 20.7 (5 \times CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[210, 251]

Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-2-chlor-3,5-dideoxy- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat (47)^[210, 251]

(β -Ac₄SiaCO₂BnCl)



Eine auf 0 °C gekühlte Mischung aus 48.7 mL (0.68 mol, 25.0 Äquiv.) Acetylchlorid sowie 0.5 mL Wasser wurde unter Eiskühlung zu 16.7 g (27.4 mmol) α/β -Ac₅SiaCO₂Bn **46** gegeben und das Reaktionsgemisch wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Acetylchlorid wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde viermal mit je 50 mL Toluol und Dichlormethan kodestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 14.7 g (25.1 mmol, 92%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.48$ (EtOAc).

C₂₆H₃₂ClNO₁₂ (M = 585.98 g/mol) [585.16].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 608.19 ([M+Na]⁺, ber.: 608.15).

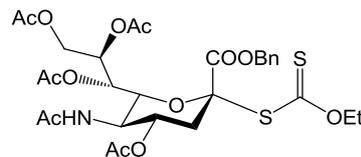
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.41 - 7.34 (m, 5H, H_{Ar}-Bn), 5.49 - 5.34 (m, 5H, NH-Sia, H4-Sia, H6-Sia, H7-Sia, H8-Sia), 5.25 - 5.15 (m, 2H, CH₂-Bn), 4.41 (dd, 1H, $J_{H9a,H9b} = 11.9$ Hz, $J_{H9a,H8} = 2.0$ Hz, H9a-Sia), 4.27 - 4.05 (m, 2H, H5-Sia, H9b-Sia), 2.78 (dd, 1H, $J_{H3\text{äq},H3\text{ax}} = 13.9$ Hz, $J_{H3\text{äq},H4} = 4.8$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.11, 2.04, 2.02 (4 \times s, 13H, CH₃-OAc, H3_{ax}-Sia), 1.90 (s, 3H, CH₃-NHAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.0, 170.5, 170.2, 170.1, 170.0 (5 \times C=O-Ac, -NHAc), 165.6 (C1-Sia), 135.1 (C_q-Bn), 129.1, 128.9, 128.3 (5 \times C_{Ar}-Bn), 97.6 (C2-Sia), 72.8 (C6-Sia), 71.2 (C8-Sia), 68.4 (C4-Sia), 68.1 (C7-Sia), 67.4 (CH₂-Bn), 61.9 (C9-Sia), 49.5 (C5-Sia), 37.4 (C3-Sia), 23.3 (CH₃-NHAc), 20.8, 20.8, 20.7 (4 \times CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[210, 251]

***O*-Ethyl-*S*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat (**48**)^[210, 251]**

(α -Ac₄SiaCO₂BnXan)



Eine Lösung von 14.7 g (25.1 mmol) β -Ac₄SiaCO₂BnCl **47** in 200 mL absol. Ethanol wurde mit 8.05 g (50.2 mmol, 2.0 Äquiv.) Kaliummethylxanthenat versetzt und 24 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurde mit 250 mL Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde im Anschluss flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt.

Ausbeute: 12.0 g (17.9 mmol, 71%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.45 (EtOAc), 0.20 (^cHex/EtOAc, 1:3).

$[\alpha]_D^{23} = +29.9$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[251] $[\alpha]_D^{23} = +34.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₂₉H₃₇NO₁₃S₂ (M = 671.73 g/mol) [671.17].

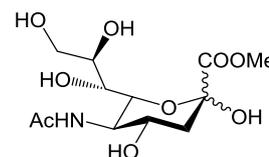
ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 689.20 ([M+NH₄]⁺, ber.: 689.20), 694.15 ([M+Na]⁺, ber.: 694.16).

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 689.2045 ([M+NH₄]⁺, ber.: 689.2045).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.38 - 7.41 (m, 5H, H_{Ar}-Bn), 5.31 (dd, 1H, *J*_{H7,H8} = 6.3 Hz, *J*_{H7,H6} = 2.0 Hz, H7-Sia), 5.26 (td, 1H, *J*_{H8,H7/H9a,b} = 6.4 Hz, *J*_{H8,H9b} = 2.0 Hz, H8-Sia), 5.22 - 5.19 (m, 3H, CH₂-Bn, NH-Sia), 4.84 (td, 1H, *J*_{H4,H5/H3ax} = 11.6 Hz, *J*_{H4,H3äq} = 4.6 Hz, H4-Sia), 4.56 (dd, 1H, *J*_{H6,H5} = 10.8 Hz, *J*_{H6,H7} = 2.0 Hz, H6-Sia), 4.41 - 4.37 (m, 2H, CH₂-OEt), 4.33 (dd, 1H, *J*_{H9a,H9b} = 12.4 Hz, *J*_{H9a,H8} = 2.8 Hz, H9a-Sia), 4.20 (dd, 1H, *J*_{H9b,H9a} = 12.4 Hz, *J*_{H9b,H8} = 5.8 Hz, H9b-Sia), 4.15 - 4.02 (m, 1H, H5-Sia), 2.66 (dd, 1H, *J*_{H3äq,H3ax} = 12.9 Hz, *J*_{H3äq,H4} = 4.6 Hz, H3äq-Sia), 2.13, 2.11, 2.08, 2.01 (4 × s, 12H, CH₃-OAc), 2.03 - 2.01 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.88 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.22 (t, 3H, *J*_{CH3,CH2} = 6.4 Hz, CH₃-OEt).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 207.4 (C=S-Xan), 171.0, 170.8, 170.6, 170.5, 170.4 (4 × C=O-Ac, -NHAc), 168.1 (C1-Sia), 135.1 (C_q-Bn), 129.1, 128.9, 128.3 (5 × C_{Ar}-Bn), 86.8 (C2-Sia), 75.5 (C6-Sia), 70.7 (C8-Sia), 69.1 (C4-Sia), 68.1 (C7-Sia), 67.9 (CH₂-Bn), 67.3 (CH₂-OEt), 62.3 (C9-Sia), 49.5 (C5-Sia), 37.4 (C3-Sia), 23.5 (CH₃-NHAc), 21.4, 21.2, 21.1 (4 × CH₃-OAc), 13.4 (CH₃-OEt).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[210, 251]

Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (50)^[254, 332]**(α/β -SiaCO₂Me)**

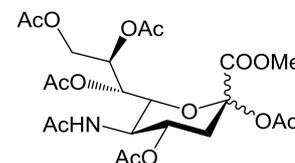
Es wurden 10.0 g (32.3 mmol) *N*-Acetyl-D-neuraminsäure (**44**) in 400 mL Methanol (HPLC-grade) aufgeschlämmt und mit 10.0 g Dowex[®] 40WX-200 Ionentauscher (zuvor dreimal mit Methanol gewaschen) versetzt. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre wurde der Ionentauscher abfiltriert und dreimal mit je 50 mL Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 9.50 g (29.4 mmol, 91%); farbloser Feststoff, Anomerengemisch.

C₁₂H₂₁NO₉ (M = 323.30 g/mol) [323.12].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 346.11 ([M+Na]⁺, ber.: 346.11).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[214]

Methyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α/β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid (51)^[254]**(α/β -Ac₄SiaCO₂Me-OAc)**

Es wurden 20.0 g (61.8 mmol) α/β -SiaCO₂Me **50** in 120 mL Pyridin aufgenommen und auf 0 °C gekühlt, bevor 60 mL Essigsäureanhydrid zur Lösung getropft wurden. Es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend die Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde viermal mit je 100 mL Toluol und zweimal mit je 100 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 32.8 g (61.5 mmol, quant.); gelblicher amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

R_f = 0.76 (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1).

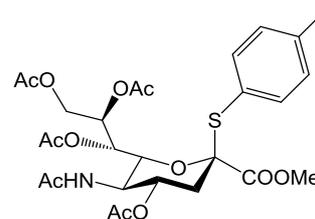
C₂₂H₃₁NO₁₄ (M = 533.48 g/mol) [533.17].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 551.20 ([M+NH₄]⁺, ber.: 551.20), 556.16 ([M+Na]⁺, ber.: 556.16).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[214]

4-Methylphenyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-2-thio- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyransid)onat (52)^[333]

(β -Ac₄SiaCO₂Me-SPhMe)



Zu einer Lösung von 32.8 g (61.5 mmol) α/β -Ac₄SiaCO₂Me-OAc **51** in 150 mL absol. Dichlormethan wurden 9.17 g (73.8 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Methylthiophenol (*p*-Thiokresol) gegeben und die Lösung wurde unter Eiskühlung langsam mit 15.2 mL (0.12 mol, 2.0 Äquiv.) Bortrifluorid-Etherat versetzt. Unter Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung 24 h gerührt. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, dreimal mit je 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie mit je 100 mL dest. Wasser und einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 20.0 g (33.5 mmol, 54%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.60 (EtOAc).

C₂₇H₃₅NO₁₂S (M = 597.63 g/mol) [597.19].

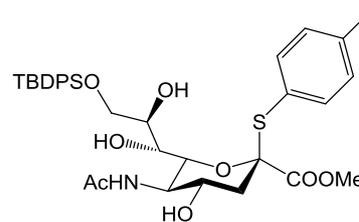
HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 598.1954 ([M+H]⁺, ber.: 598.1953), 615.2219 ([M+NH₄]⁺, ber.: 615.2218).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.26 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 8.1$ Hz, H_{Ar}-Ph), 7.09 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 7.2$ Hz, H_{Ar}-Ph), 5.94 (d, 1H, $J_{\text{NH,H5}} = 10.3$ Hz, NH-Sia), 5.44 (t, 1H, $J_{\text{H7,H8}} = J_{\text{H7,H6}} = 2.4$ Hz, H7-Sia), 5.35 (ddd, 1H, $J_{\text{H4,H5}} = 11.7$ Hz, $J_{\text{H4,H3ax}} = 10.5$ Hz, $J_{\text{H4,H3aq}} = 4.8$ Hz, H4-Sia), 4.94 (dt, 1H, $J_{\text{H8,H9a}} = J_{\text{H8,H9b}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{H8,H7}} = 2.2$ Hz, H8-Sia), 4.60 (dd, 1H, $J_{\text{H6,H5}} = 10.5$ Hz, $J_{\text{H6,H7}} = 2.6$ Hz, H6-Sia), 4.47 (d, 1H, $J_{\text{H9b,H9a}} = 12.2$ Hz, $J_{\text{H9b,H8}} = 2.2$ Hz, H9b-Sia), 4.09 (ddd, 1H, $J_{\text{H5,H4}} = 11.7$ Hz, $J_{\text{H5,NH}} \approx J_{\text{H5,H6}} = 10.3$ Hz, H5-Sia), 3.99 (dd, 1H, $J_{\text{H9a,H9b}} = 12.3$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 8.9$ Hz, H9a-Sia), 3.55 (s, 3H, CH₃-CO₂Me), 2.61 (dd, 1H, $J_{\text{H3aq,H3ax}} = 13.8$ Hz, $J_{\text{H3aq,H4}} = 4.8$ Hz, H3_{aq}-Sia), 2.29 (s, 3H, CH₃-Ph), 2.06, 2.05, 1.99, 1.90, (4 \times s, 12H, CH₃-OAc), 2.05 - 2.00 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.84 (s, 3H, CH₃-NHAc).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 171.2, 171.0, 170.4, 170.3 (5 \times C=O-Ac, -NHAc), 168.3 (C1-Sia), 140.2 (C_q-Ph), 136.6, 136.2, 129.9, 129.7, 125.3 (C_{Ar}-Ph), 89.0 (C2-Sia), 73.2 (C8-Sia), 73.1 (C6-Sia), 69.2 (C4-Sia), 68.9 (C7-Sia), 62.8 (C9-Sia), 52.6 (CH₃-CO₂Me), 49.3 (C5-Sia), 37.5 (C3-Sia), 23.2 (CH₃-NHAc), 21.4, 21.2, 20.9, 20.8 (CH₃-OAc), 21.3 (CH₃-Ph).

4-Methylphenyl-(methyl-5-acetamido-9-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-3,5-dideoxy-2-thio- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyransid)onat (53)

(β -9TBDPS-SiaCO₂Me-SPhMe)



Entsprechend Referenz^[253] wurden 15.0 g (25.1 mmol) β -Ac₄SiaCO₂Me-SPhMe **52** in 100 mL Methanol (HPLC-grade) gelöst und mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 11.0 erreicht wurde. Nach vollständiger Deblockierung des Zuckers wurde mit saurem Ionentauscher Amberlyst 15[®] neutralisiert, dieser abfiltriert und anschließend zweimal mit je 50 mL Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

R_f = 0.26 (EtOAc/MeOH, 5:1).

C₁₉H₂₇NO₈S (M = 429.48 g/mol) [429.14].

ESI-MS (positiv) m/z : 430.15 ([M+H]⁺, ber.: 430.15), 447.18 ([M+NH₄]⁺, ber.: 447.18), 452.13 ([M+Na]⁺, ber.: 452.13).

ESI-MS (negativ) m/z : 428.15 ([M-H]⁻, ber.: 430.15).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 430.1532 ([M+H]⁺, ber.: 430.1536), 452.1349 ([M+Na]⁺, ber.: 452.1355), 468.1089 ([M+K]⁺, ber.: 468.1094).

Es wurden 3.20 g (7.49 mmol) des deblockierten Rohprodukts in 40 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen und unter Argonatmosphäre mit 1.02 g (15.0 mmol, 2.0 Äquiv.) Imidazol sowie 92 mg (0.75 mmol, 0.1 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und anschließend wurden 2.34 mL (8.99 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Chlorid) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 48 h gerührt, bevor das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt wurde. Der Rückstand wurde in 100 mL Essigsäureethylester aufgenommen und zweimal mit je 50 mL verd. Salzsäure (1 M), einer ges. Natriumhydrogencarbonat- sowie einer Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 4.30 g (6.44 mmol, 86%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.34 (EtOAc).

C₃₅H₄₄NO₈SSi (M = 667.89 g/mol) [667.26].

ESI-MS (positiv) m/z : 668.27 ([M+H]⁺, ber.: 668.27), 685.29 ([M+NH₄]⁺, ber.: 685.29).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 668.2710 ([M+H]⁺, ber.: 668.2713), 685.2975 ([M+NH₄]⁺, ber.: 685.2973), 690.2632 ([M+Na]⁺, ber.: 690.2533).

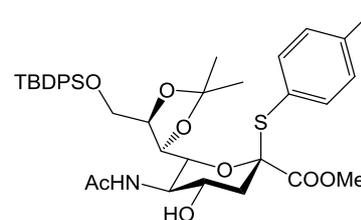
HR-ESI-MS (negativ) m/z : 666.2561 ($[M-H]^-$, ber.: 666.2561).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 7.72 - 7.64 (m, 10H, H_{Ar-Ph}), 7.26 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 8.1$ Hz, H_{Ar-Ph}), 7.09 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 7.2$ Hz, H_{Ar-Ph}), 6.46 (d, 1H, $J_{NH,H5} = 8.4$ Hz, NH-Sia), 4.43 (dd, 1H, $J_{H6,H5} = 10.5$ Hz, $J_{H6,H7} = 2.6$ Hz, H6-Sia), 4.12 - 4.07 (m, 1H, H4-Sia), 4.00 (d, 1H, $J_{OH,H7} = 7.1$ Hz, 7-OH-Sia), 3.94 (dd, 1H, $J_{H9a,H9b} = 12.3$ Hz, $J_{H9a,H8} = 8.9$ Hz, H9a-Sia), 3.94 - 3.85 (m, 3H, H5-Sia {3.92}, H8-Sia {3.91}, H9b-Sia {3.86}), 3.64 (dt, 1H, $J_{H7,OH} = 7.4$ Hz, $J_{H7,H8} = J_{H7,H6} = 2.4$ Hz, H7-Sia), 3.59 (s, 3H, CH_3-CO_2Me), 3.40 - 3.34 (m, 1H, 4-OH-Sia), 2.76 (d, 1H, $J_{OH,H8} = 5.7$ Hz, 8-OH-Sia), 2.61 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 13.8$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.8$ Hz, H3 $\ddot{a}q$ -Sia), 2.29 (s, 3H, CH_3-Ph), 1.97 - 1.91 (m, 1H, H3 $\ddot{a}x$ -Sia), 1.84 (s, 3H, CH_3-NHAc), 1.09 - 1.02 (m, 9H, $CH_3-tBu-Si$).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, HSQC), δ (ppm): 172.8 (C=O-NHAc), 168.3 (C1-Sia), 140.2 (C_q-Ph), 136.6, 136.2, 135.8, 135.7, 135.7, 135.6, 133.6, 133.2, 129.9, 129.7, 128.0, 126.4, 125.3 ($2 \times C_q-Ph$, $15 \times C_{Ar-Ph}$), 90.2 (C2-Sia), 72.3 (C6-Sia), 69.8 (C8-Sia), 69.2 (C7-Sia), 67.5 (C4-Sia), 65.4 (C9-Sia), 53.4 (C5-Sia), 52.6 (CH_3-CO_2Me), 41.1 (C3-Sia), 27.1 ($CH_3-tBu-Si$), 23.2 (CH_3-NHAc), 21.3 (CH_3-Ph), 19.5 ($C_q-tBu-Si$).

4-Methylphenyl-(methyl-5-acetamido-9-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-3,5-dideoxy-7,8-*O*-isopropyliden-2-thio- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyransid)onat (**54**)

(β -9TBDPS-7,8Isopropyl-SiaCO₂Me-SPhMe)



Entsprechend Referenz^[253] wurde eine Lösung von 4.30 g (6.44 mmol)

β -9TBDPS-SiaCO₂Me-SPhMe **53** in 50 mL 2,2-Dimethoxypropan mit 1.49 g (6.44 mmol, 1.0 Äquiv.) Camphersulfonsäure versetzt und die Mischung wurde 16 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1.34 mL (9.66 mmol, 1.5 Äquiv.) Triethylamin abgebrochen, das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}Hex/EtOAc$, 1:2 \rightarrow EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 3.31 g (4.66 mmol, 72%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.14$ ($^{\circ}Hex/EtOAc$, 1:2).

$C_{38}H_{49}NO_8SSi$ (M = 707.95 g/mol) [707.29].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 708.3019 ($[M+H]^+$, ber.: 708.3026), 730.2839 ($[M+Na]^+$, ber.: 730.2846).

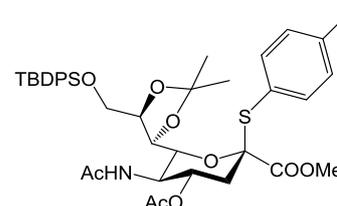
1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 7.69 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 8.1$ Hz, H_{Ar-Ph}), 7.64 - 7.58 (m, 2H, H_{Ar-Ph}), 7.51 - 7.46 (m, 2H, H_{Ar-Ph}), 7.40 - 7.23 (m, 6H, H_{Ar-Ph}), 7.10 - 7.01 (m, 2H, H_{Ar-Ph}), 6.90 (d, 1H, $J_{NH,H5} = 8.2$ Hz, NH-Sia), 4.91 (dd, 1H, $J_{H7,H8} = 10.2$ Hz, $J_{H7,H6} = 6.2$ Hz, H7-Sia), 4.37 - 4.33 (m, 1H, H8-Sia), 4.08 - 3.99 (m, 2H, H4-Sia {4.07}, H9a-Sia {4.01}), 3.91 - 3.88 (m, 1H, H5-Sia), 3.78 (dd, 1H, $J_{H9a,H9b} = 10.4$ Hz, $J_{H9a,H8} = 3.9$ Hz, H9b-Sia), 3.68 - 3.63 (m, 1H, H6-Sia), 3.50 (s, 3H, CH_3-CO_2Me), 2.73 (dd, 1H,

$J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 14.0$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.9$ Hz, $H3\ddot{a}q$ -Sia), 2.31 (s, 3H, CH_3 -Ph), 2.06 - 2.03 (m, 1H, $H3ax$ -Sia), 1.83 (s, 3H, CH_3 -NHAc), 1.70, 1.34 ($2 \times$ s, 6H, CH_3 -Acetal), 1.11 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu-Si).

^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.2 (C=O-NHAc), 168.2 (C-Sia), 139.8 (C_q -Ph), 137.0, 136.6, 135.9, 135.8, 134.8 ($7 \times C_{Ar}$ -Ph), 133.2, 132.9 (C_q -Ph), 130.7, 130.6, 130.0, 129.9, 129.8, 128.5, 128.4, 127.9 (C_{Ar} -Ph), 109.2 (C_q -Acetal), 89.9 (C2-Sia), 77.8 (C8-Sia), 75.6 (C4-Sia), 74.6 (C6-Sia), 69.6 (C7-Sia), 63.9 (C9-Sia), 53.9 (C5-Sia), 52.8 (CH_3 -CO₂Me), 41.4 (C3-Sia), 27.1 (CH_3 -*t*Bu-Si), 27.0, 25.9 (CH_3 -Acetal), 23.3 (CH_3 -NHAc), 21.8 (CH_3 -Ph), 19.3 (C_q -*t*Bu-Si).

4-Methylphenyl-(methyl-5-acetamido-4-*O*-acetyl-9-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-3,5-dideoxy-7,8-*O*-isopropyliden-2-thio- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyransid)onat (55)

(β -9TBDPS-7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO₂Me-SPhMe)



Es wurden 3.31 g (4.66 mmol) β -9TBDPS-7,8Isopropyl-SiaCO₂Me-

SPhMe **54** in 60 mL Pyridin gelöst und mit 30 mL Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 18 h gerührt, mit 30 mL Toluol versetzt und die Lösungsmittel wurden i. Vak entfernt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit je 50 mL Toluol sowie Dichlormethan kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}$ Hex/EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 3.29 g (4.38 mmol, 94%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.39$ ($^{\circ}$ Hex/EtOAc, 1:2).

$C_{40}H_{51}NO_9SSi$ (M = 749.99 g/mol) [749.30].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 750.3134 ($[M+H]^+$, ber.: 750.3127).

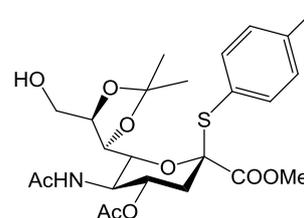
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY), δ (ppm): 7.69 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 8.1$ Hz, H_{Ar} -Ph), 7.64 - 7.58 (m, 2H, H_{Ar} -Ph), 7.51 - 7.46 (m, 2H, H_{Ar} -Ph), 7.40 - 7.23 (m, 6H, H_{Ar} -Ph), 7.10 - 7.01 (m, 2H, H_{Ar} -Ph), 5.95 (d, 1H, $J_{NH,H5} = 9.3$ Hz, NH-Sia), 5.44 - 5.38 (m, 1H, H4-Sia), 4.62 (dd, 1H, $J_{H7,H8} = 10.3$ Hz, $J_{H7,H6} = 3.0$ Hz, H7-Sia), 4.33 - 4.27 (m, 1H, H8-Sia), 4.15 - 4.05 (m, 3H, H5-Sia {4.11}, H6-Sia {4.09}, H9a-Sia {4.02}), 3.93 (dd, 1H, $J_{H9a,H9b} = 12.5$ Hz, $J_{H9a,H8} = 4.9$ Hz, H9b-Sia), 3.43 (s, 3H, CH_3 -CO₂Me), 2.54 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 12.8$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.9$ Hz, $H3\ddot{a}q$ -Sia), 2.32 (s, 3H, CH_3 -Ph), 2.04 (s, 3H, CH_3 -OAc), 1.98 (dd, 1H, $J_{H3ax,H3\ddot{a}q} = 12.8$ Hz, $J_{H3ax,H4} = 11.9$ Hz, $H3ax$ -Sia), 1.91 (s, 3H, CH_3 -NHAc), 1.70, 1.34 ($2 \times$ s, 6H, CH_3 -Acetal), 1.05 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu-Si).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, HMBC, HSQC), δ (ppm): 171.4, 171.2 (C=O-Ac, -NHAc), 168.3 (C1-Sia), 140.0 (C_q -Ph), 133.2, 132.9 (C_q -Ph), 136.7, 135.7, 135.6, 135.6, 135.6, 135.5, 133.2, 132.9, 129.8, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 126.7 ($15 \times C_{Ar}$ -Ph), 109.3 (C_q -Acetal), 89.0 (C2-Sia), 75.6 (C8-Sia), 74.9 (C6-Sia), 71.1

(C7-Sia), 69.7 (C4-Sia), 63.2 (C9-Sia), 52.2 (CH₃-CO₂Me), 51.4 (C5-Sia), 36.7 (C3-Sia), 26.9 (CH₃-*t*Bu-Si), 26.6, 25.9 (CH₃-Acetal), 23.2 (CH₃-NHAc), 21.7 (CH₃-Ph), 20.7 (CH₃-OAc), 19.3 (C_q-*t*Bu-Si).

4-Methylphenyl-(methyl-5-acetamido-4-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-7,8-*O*-isopropyliden-2-thio-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyransid)onat (56)

(β-7,8Isopropyl-4AcSiaCO₂Me-SPhMe)



Es wurden 2.50 g (3.33 mmol) β-9TBDPS-7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO₂Me-SPhMe **55** in 40 mL Tetrahydrofuran gelöst und bei 0 °C mit 5.0 mL einer Lösung aus 1.31 g (5.00 mmol, 1.5 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in Tetrahydrofuran (ca. 0.1 M) versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und einmal mit je 25 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 25 mL Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.19 g (2.33 mmol, 67%); farbloser amorpher Feststoff.

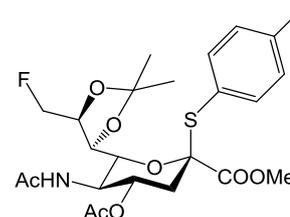
R_f = 0.33 (EtOAc/EtOH, 10:1).

C₂₄H₃₃NO₉S (M = 511.59 g/mol) [511.19].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 512.1952 ([M+H]⁺, ber.: 512.1954), 534.1775 ([M+Na]⁺, ber.: 534.1774).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.38 (d, 2H, *J*_{CH,CH} = 8.1 Hz, H_{Ar}-Ph), 7.12 (d, 2H, *J*_{CH,CH} = 7.8 Hz, H_{Ar}-Ph), 5.89 (d, 1H, *J*_{NH,H5} = 9.1 Hz, NH-Sia), 5.50 (ddd, 1H, *J*_{H4,H5} = 11.3 Hz, *J*_{H4,H3ax} = 10.1 Hz, *J*_{H4,H3äq} = 4.9 Hz, H4-Sia), 4.47 (dd, 1H, *J*_{H7,H8} = 10.3 Hz, *J*_{H7,H6} = 2.5 Hz, H7-Sia), 4.31 (dd, 1H, *J*_{H6,H5} = 6.2 Hz, *J*_{H6,H7} = 2.5 Hz, H6-Sia), 4.21 (d, 1H, *J*_{H5,H4} = 9.4 Hz, H5-Sia), 4.13 (m_c, 1H, H8-Sia), 3.65 (s, 3H, CH₃-CO₂Me), 3.63 - 3.57 (m, 2H, H9a/b-Sia), 2.93 (b_s, 9-OH-Sia), 2.56 (dd, 1H, *J*_{H3äq,H3ax} = 13.9 Hz, *J*_{H3äq,H4} = 5.0 Hz, H3_{äq}-Sia), 2.34 (s, 3H, CH₃-Ph), 2.12 (dd, 1H, *J*_{H3ax,H3äq} = 13.7 Hz, *J*_{H3ax,H4} = 10.1 Hz, H3_{ax}-Sia), 1.98 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.46, 1.35 (2 × s, 6H, CH₃-Acetal).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.0 (C=O-Ac), 170.2 (C=O-NHAc), 168.4 (C1-Sia), 140.4 (C_q-Ph), 136.6, 129.9, 128.5, 125.7 (5 × C_{Ar}-Ph), 108.7 (C_q-Acetal), 89.9 (C2-Sia), 77.5 (C8-Sia), 74.6 (C7-Sia), 70.8 (C6-Sia), 68.9 (C4-Sia), 61.7 (C9-Sia), 52.6 (CH₃-CO₂Me), 51.8 (C5-Sia), 36.6 (C3-Sia), 26.7, 25.6 (CH₃-Acetal), 23.3 (CH₃-NHAc), 21.3 (CH₃-Ph), 21.0 (CH₃-OAc).

Versuch zur Herstellung von**4-Methylphenyl-(methyl-5-acetamido-4-O-acetyl-3,5,9-tridesoxy-9-fluor-7,8-O-isopropyliden-2-thio- β -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyransid)onat (57)****(β -9F-7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO₂Me-SPhMe)**Variante A:

Eine Lösung von 500 mg (0.98 mmol) β -7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO₂Me-SPhMe

56 in 100 mL absol. Dichlormethan wurde unter Argonatmosphäre bei -20 °C mit 0.22 mL (1.47 mmol, 1.5 Äquiv.) DBU versetzt, bevor nach 10 Minuten bei dieser Temperatur 0.15 mL (1.17 mmol, 1.2 Äquiv.) DAST[®] zugetropft wurden. Es wurde 30 Minuten bei -20 °C gerührt und die Reaktionsmischung durch Zugabe einer 5%-igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung abgebrochen. Es wurde mit 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die wässrige Phase wurde zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt.

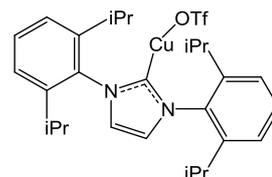
Ausbeute: Es konnte lediglich Eliminierungsprodukt **59** erhalten werden.

Variante B:

Es wurden 246 mg (0.48 mmol) β -7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO₂Me-SPhMe **56** in 50 mL absol. Dichlormethan und 10 mL absol. Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 96 μ L (0.57 mmol, 1.2 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf₂O) versetzt. Anschließend wurde 2 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, bevor mit 100 mL Dichlormethan verdünnt wurde. Die organische Phase wurde zweimal mit je 50 mL verdünnter Salzsäure (1 M), 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie 50 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. unter Kühlung entfernt und das Triflat wurde ohne weitere Reinigungsschritte umgesetzt.

Hierzu wurden 162 mg (0.62 mmol, 1.3 Äquiv.) Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) dreimal mit je 20 mL absol. Toluol und einmal mit 20 mL absol. Tetrahydrofuran kodestilliert, bevor es in 1.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å), suspendiert in 20 mL absol. THF, gegeben und 2 h bei 0 °C gerührt wurde. Das Triflat **58** wurde anschließend in 30 mL absol. THF gelöst und dieser Reaktionsmischung tropfenweise bei -78 °C zugesetzt. Es wurde 3 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt, durch Hyflo[®] filtriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt werden.

Ausbeute: Es konnte lediglich Eliminierungsprodukt **59** erhalten werden.

Variante C:

Herstellung des Katalysators IPrCuOTf:^[257] Es wurden 250 mg (0.51 mmol, 1.0 Äquiv.) des *N*-Heterocyclischen Carben-Komplexes IPrCuCl und 131 mg (0.51 mmol, 1.0 Äquiv.) Silbertrifluormethansulfonat (AgOTf) in 25 mL absol. Tetrahydrofuran gelöst und bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt. Die lilafarbene Reaktionslösung wurde über Hyflo[®] filtriert, i. Vak eingeeengt und zur Fällung mit 10 mL Hexan versetzt. Das IPrCuOTf wurde nach Filtration und Trocknung als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 290 mg (0.48 mmol, 94%); farbloser Feststoff.

C₂₈H₃₆CuF₃N₂O₃S (M = 601.21 g/mol) [600.17].

¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.52 (t, 2H, *J*_{CH,CH} = 7.8 Hz, H_{para}-Ph), 7.32 (d, 4H, *J*_{CH,CH} = 7.8 Hz, H_{meta}-Ph), 7.21 (s, 2H, H3-, H4-Imidazol), 2.51 (m_c, 4H, H-iPr), 1.26, 1.23 (d, 24H, *J*_{H,H} = 7.5 Hz, CH₃-iPr).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, HSQC), δ (ppm): 145.6, 134.1 (2 × C_q-Ph, 4 × C_{ortho}-Ph), 130.8 (2 × C_{para}-Ph), 124.3 (4 × C_{meta}-Ph), 123.6 (C3-, C4-Imidazol), 28.7 (4 × C-iPr), 24.6, 24.0 (8 × CH₃-iPr).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -77.9 (s, 3F, CF₃-OTf).

Entsprechend Referenz^[256] wurden 200 mg (0.39 mmol) β-7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO₂Me-SPhMe **56** in 20 mL absol. Dichlormethan gelöst und auf -78 °C gekühlt, bevor 91 μL (0.78 mmol, 2.0 Äquiv.) 2,6-Lutidin (2,6-Dimethylpyridin) zugegeben wurden. Bei -78 °C wurden im Anschluss 78 μL (0.47 mmol, 1.2 Äquiv.) Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf₂O) über eine Dauer von 5 Minuten zugetropft und das Gemisch wurde 3 h unter Erwärmen auf -40 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit 100 mL Wasser neutral gewaschen, fünfmal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt und das Triflat **58** wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt. Hierzu wurden in einem Schlenkrohr 40 mg (0.68 mmol, 2.0 Äquiv.) ausgeheiztes Kaliumfluorid^a sowie 4.1 mg (6.8 × 10⁻³ mmol, 0.02 Äquiv.) IPrCuOTf in 2.0 mL absol. 1,4-Dioxan gelöst und mit 5.0 mL einer Lösung aus 220 mg (0.34 mmol) des Triflats **58** in absol. 1,4-Dioxan versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 45 °C gerührt und im Anschluss durch Hyflo[®] filtriert. Es wurde mit 50 mL Diethylether gewaschen und das Filtrat wurde i. Vak vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rückstands erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:9).

Ausbeute: Es konnte lediglich Eliminierungsprodukt **59** erhalten werden.

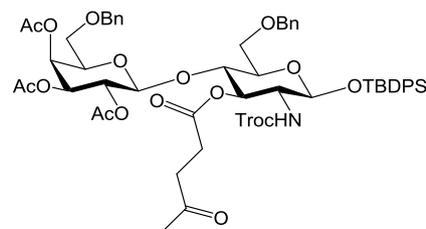
^a Kaliumfluorid wurde hierzu in einem Schlenkrohr im Hochvakuum mit einem Heißluftfön ausgeheizt.

5.3 Die Synthesen der Disaccharid-Bausteine

5.3.1 Synthese des natürlichen Lactosamins

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**67**)**

(β -4-(β -6BnAc₃Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 2.00 g (2.56 mmol) Glucosamin-Akzeptor **9** und 2.08 g (3.84 mmol, 1.5 Äquiv.) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**17**) in 100 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 5.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie auf -78 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 69 μ L (0.38 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **17**) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) in 1.0 mL absol. Dichlormethan gegeben, bevor die Mischung unter Erwärmen auf Raumtemperatur 2.5 h gerührt wurde. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 2.33 g (2.01 mmol, 79%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.33 (°Hex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: R_t = 10.5 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{20}$ = - 7.5 (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₆H₆₆Cl₃NO₁₇Si (M = 1159.57 g/mol) [1157.32].

ESI-MS (positiv) m/z : 1175.35 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1175.35).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1175.3493 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1175.3504).

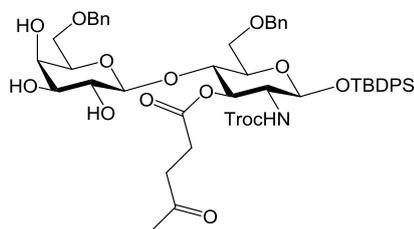
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.74 - 7.70 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.65 - 7.60 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.43 - 7.39 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.37 - 7.24 (m, 14H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.38 (dd, 1H, J_{H_4,H_3} = 3.5 Hz, J_{H_4,H_5} = 1.2 Hz, H4-Gal), 4.93 (dd, 1H, J_{H_2,H_3} = 10.4 Hz, J_{H_2,H_1} = 7.9 Hz, H2-Gal), 4.85 (dd, 1H, J_{H_3,H_2} = 10.2 Hz, J_{H_3,H_4} = 3.5 Hz, H3-Gal), 4.82 (dd, 1H, J_{H_3,H_2} = 10.2 Hz, J_{H_3,H_4} = 9.5 Hz, H3-GlcN), 4.60 (d, 1H,

$J_{\text{CH,CH}} = 12.2$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}\text{-Troc}$), 4.53 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.44 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 7.9$ Hz, H1-Gal), 4.41 (d, 1H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 10.1$ Hz, H1-GlcN), 4.41 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.9$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.37 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.2$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}\text{-Troc}$), 3.94 (t, 1H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 9.4$ Hz, H4-GlcN), 3.87 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.2$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 10.1$ Hz, H2-GlcN), 3.68 (ddd, $J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{a}} = 7.5$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{b}} = 5.7$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 1.3$ Hz, H5-Gal), 3.56 (dd, 1H, $J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_6\text{b}} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_5} = 3.3$ Hz, H6a-GlcN), 3.51 (dd, 1H, $J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_6\text{b}} = 9.3$ Hz, $J_{\text{H}_6\text{a},\text{H}_5} = 5.6$ Hz, H6a-Gal), 3.41 - 3.36 (m, 2H, H6b-Gal, H6b-GlcN), 3.04 (ddd, 1H, $J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 9.8$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{a}} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H}_5,\text{H}_6\text{b}} = 1.8$ Hz, H5-GlcN), 2.65 - 2.57 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Lev}$), 2.51 - 2.46 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Lev}$), 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Lev}$), 2.01, 1.94, 1.88 ($3 \times$ s, 9H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$), 1.07 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 206.0 (C=O-Lev), 172.5, 170.2, 170.1 (C=O-Ac), 169.1 (C=O-Lev), 154.3 (C=O-Troc), 138.0, 137.6 ($2 \times \text{C}_q\text{-Bn}$, $2 \times \text{C}_q\text{-Ph}$), 136.1, 136.0, 133.1, 132.6, 130.2, 130.0, 128.6, 128.0, 128.0, 127.8, 127.6 ($20 \times \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$, -Ph), 100.5 (C1-Gal), 96.5 (C1-GlcN), 95.6 (CCl_3), 74.9 (C5-GlcN), 74.8 (C4-GlcN), 73.9 ($\text{CH}_2\text{-Troc}$), 73.5, 73.4 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 73.0 (C3-GlcN), 71.8 (C5-Gal), 71.5 (C3-Gal), 69.6 (C2-Gal), 67.4 (C4-Gal), 67.2 (C6-Gal), 67.2 (C6-GlcN), 58.1 (C2-GlcN), 38.0 ($\text{CH}_2\text{-Lev}$), 29.8 ($\text{CH}_3\text{-Lev}$), 28.1 ($\text{CH}_2\text{-Lev}$), 26.7 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$), 20.7, 20.7, 20.6 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$), 19.3 ($\text{C}_q\text{-}t\text{Bu-Si}$).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**68**)**

(β -4-(β -6BnGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung aus 2.33 g (2.01 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**67**) in 25 mL Methanol (HPLC-grade) wurde tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Unter ständiger pH-Kontrolle wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 4 h gerührt und anschließend durch Zugabe von Amberlyst® 15 neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit 50 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 1.91 g (1.85 mmol, 92%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.17$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:2), 0.49 ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:4).

RP-HPLC: $R_t = 8.63$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{22} = -1.1$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{50}\text{H}_{60}\text{Cl}_3\text{NO}_{14}\text{Si}$ ($M = 1033.46$ g/mol) [1031.28].

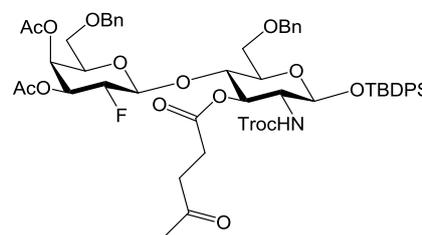
ESI-MS (*positiv*) m/z : 1049.32 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 1049.32).

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1049.3183 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 1049.3187), 1054.2728 ($[M+Na]^+$, ber.: 1054.2746).

5.3.2 Synthese der fluorierten Lactosamin-Analoga

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (69)**

(β -4-(β -6BnAc₂2FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.60 g (2.04 mmol) Glucosamin-Akzeptor **9** und 1.53 g (3.06 mmol, 1.5 Äquiv.) 3,4-Di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**25**) in 80 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (1:1) gelöst und unter Argonatmosphäre mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie auf -40 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 56 μ L (0.30 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **25**) TMSOTf in 1.0 mL absol. Dichlormethan gegeben und die Mischung wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 15 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 1.17 g (1.05 mmol, 51%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.49 (^cHex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: R_t = 11.1 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 25.2 (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₄H₆₃Cl₃FNO₁₅Si (M = 1119.52 g/mol) [1117.30].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 1135.33 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 1135.33).

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1135.3347 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 1135.3355).

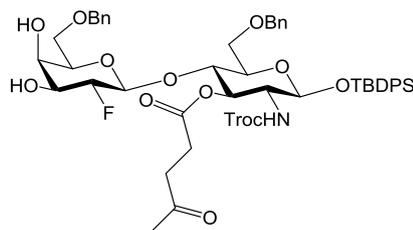
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.74 - 7.58 (m, 4H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.42 - 7.18 (m, 16H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.58 (pd, 1H, $J_{H_4,H_3} = 3.2$ Hz, H4-Gal), 5.43 (td, 1H, $J_{H_3,H_2} = 10.3$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 3.2$ Hz, H3-Gal), 4.80 (dd, 1H, $J_{H_3,H_2} = 10.1$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 9.3$ Hz, H3-GlcN), 4.77 (ddd, 1H, $J_{H_2,F} = 46.4$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.3$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 8.1$ Hz, H2-Gal), 4.69 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.3$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.68 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 8.2$ Hz, H1-Gal), 4.60 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.57 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.3$ Hz, CH_{2b}-Troc), 4.51 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.49 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 10.1$ Hz, H1-GlcN), 4.46 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.8$ Hz, CH₂-Bn), 4.40 (d, 1H, $J_{H_5,H_6} = 6.2$ Hz, H5-Gal), 4.36 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz, CH₂-Bn), 3.96 (t, 1H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_4,H_5} = 9.2$ Hz, H4-GlcN), 3.83 (dd, 1H, $J_{H_2,H_3} = 10.1$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 9.8$ Hz, H2-GlcN), 3.66 (dd, 1H, $J_{H_6a,H_6b} = 10.8$ Hz, $J_{H_6a,H_5} = 3.4$ Hz, H6a-GlcN), 3.49 - 3.40 (m, 2H, H6b-GlcN {3.43}, H6a-Gal {3.42}), 3.34 (dd, 1H, $J_{H_6b,H_6a} = 9.8$ Hz, $J_{H_6b,H_5} = 5.6$ Hz, H6b-Gal), 3.18 - 3.09 (m, 2H, CH₂-Lev), 3.14 (dd, 1H, $J_{H_5,H_4} = 9.7$ Hz, $J_{H_5,H_6} = 4.9$ Hz, H5-GlcN), 2.54 - 2.33 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.08 (s, 3H, CH₃-Lev), 2.00, 1.98 (2 \times s, 6H, CH₃-OAc), 1.06 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 205.9 (C=O-Lev), 170.2, 169.6 (C=O-Ac), 169.1 (C=O-Lev), 154.4 (C=O-Troc), 138.5, 138.2, 137.6 (2 \times C_q-Bn, 2 \times C_q-Ph), 136.1, 136.0, 133.2, 132.6, 130.1, 129.9, 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.8, 127.6, 127.6 (20 \times C_{Ar}-Bn, -Ph), 102.6 (d, $J_{C_1,F_2} = 22.5$ Hz, C1-Gal), 96.3 (C1-GlcN), 95.4 (CCl₃), 85.4 (d, $J_{C_2,F_2} = 191.3$ Hz, C2-Gal), 75.8 (C4-GlcN), 74.7 (CH₂-Troc), 74.6 (C5-GlcN), 73.5, 73.4 (CH₂-Bn), 73.0 (C3-GlcN), 69.0 (C4-Gal), 68.5 (d, $J_{C_3,F_2} = 17.3$ Hz, C3-Gal), 68.4 (C6-GlcN), 68.3 (C5-Gal), 67.5 (C6-Gal), 58.1 (C2-GlcN), 30.6 (CH₂-Lev), 29.8 (CH₃-Lev), 29.7, (CH₂-Lev), 26.8 (CH₃-*t*Bu-Si), 20.9, 20.7 (CH₃-OAc), 19.3 (C_q-*t*Bu-Si).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -205.6 (dd, $J_{F_2,H_2} = 51.5$ Hz, $J_{F_2,H_1} = 13.5$ Hz, F2-Gal).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (73)**

(β -4-(β -6Bn2FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung von 1.10 g (0.98 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**69**) in 20 mL Methanol (HPLC-grade) wurde tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Unter ständiger pH-Kontrolle wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 2.5 h gerührt und durch Zugabe von Amberlyst® 15 neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit 50 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 730 mg (0.71 mmol, 72%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.47$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$).

RP-HPLC: $R_t = 6.58$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

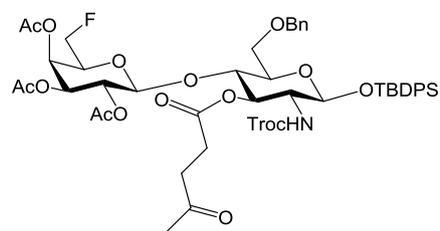
$[\alpha]_D^{22} = +18.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₅₀H₅₉Cl₃NO₁₃Si (M = 1035.45 g/mol) [1033.28].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1051.3136 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1051.3144).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (70)**

(β -4-(β -Ac₃6FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.50 g (1.92 mmol) Glucosamin-Akzeptor **9** und 1.30 g (2.88 mmol, 1.5 Äquiv.) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**29**) in 80 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie auf -78 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 52 μ L (0.29 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **29**) TMSOTf in 1.0 mL absol. Dichlormethan gegeben und es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 1.5 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1).

Ausbeute: 1.55 g (1.45 mmol, 76%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.43$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1).

RP-HPLC: $R_t = 8.38$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{22} = -0.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₄₉H₅₉Cl₃FNO₁₆Si (M = 1071.44 g/mol) [1069.27].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 1087.30 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1087.30).

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1087.2970 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1087.2990).

HR-ESI-MS (negativ) m/z : 1068.2577 ($[M-H]^-$, ber.: 1068.2580).

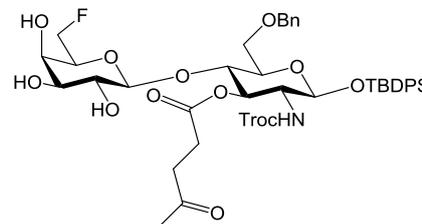
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.72 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 6.8$ Hz, H_{Ar} -Ph, -Bn), 7.66 - 7.60 (m, 2H, H_{Ar} -Ph, -Bn), 7.43 - 7.24 (m, 11H, H_{Ar} -Ph, -Bn), 5.33 (dd, 1H, $J_{H_4,H_3} = 3.5$ Hz, $J_{H_4,H_5} = 1.1$ Hz, H4-Gal), 5.01 - 4.84 (m, 3H, H2-Gal {4.98, dd, $J_{H_2,H_3} = 10.3$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 8.0$ Hz}, H3-GlcN {4.89, dd, $J_{H_3,H_2} = 10.3$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 9.7$ Hz}, H3-Gal {4.88, dd, $J_{H_3,H_2} = 10.1$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 3.4$ Hz}), 4.72 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz, CH_2 -Troc), 4.62 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz, CH_2 -Bn), 4.52 - 4.40 (m, 3H, H1-Gal {4.50, d, $J_{H_1,H_2} = 8.1$ Hz}, H1-GlcN {4.48, d, $J_{H_1,H_2} = 10.1$ Hz}, H6a-Gal {4.44, ddd, $J_{F,H_6a} = 45.9$ Hz, $J_{H_6a,H_6b} = 10.1$ Hz, $J_{H_6a,H_5} = 5.5$ Hz}), 4.39 - 4.29 (m, 2H, CH_2 -Bn {4.36, d, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz}, H6b-Gal {4.30, ddd, $J_{F,H_6b} = 46.1$ Hz, $J_{H_6b,H_6a} = 9.7$ Hz, $J_{H_6b,H_5} = 4.8$ Hz}), 3.97 (t, 1H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_4,H_5} = 9.4$ Hz, H4-GlcN), 3.86 (dd, 1H, $J_{H_2,H_3} = 10.3$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 10.2$ Hz, H2-GlcN), 3.78 - 3.71 (m, 1H, H5-Gal), 3.59 (dd, 1H, $J_{H_6a,H_6b} = 11.3$ Hz, $J_{H_6a,H_5} = 3.1$ Hz, H6a-GlcN), 3.42 - 3.35 (m, 1H, H6b-GlcN), 3.05 (ddd, 1H, $J_{H_5,H_4} = 9.8$ Hz, $J_{H_5,H_6a} = 3.2$ Hz, $J_{H_5,H_6b} = 1.7$ Hz, H5-GlcN), 2.71 (t, 2H, $J_{CH,CH} = 6.4$ Hz, CH_2 -Lev), 2.55 (dd, 2H, $J_{CH,CH} = 7.4$ Hz, $J_{CH,CH} = 6.4$ Hz, CH_2 -Lev), 2.15 (s, 3H, CH_3 -Lev), 2.10, 1.93, 1.89 ($3 \times$ s, 9H, CH_3 -OAc), 1.07 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu-Si).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, HSQC, HMBC), δ (ppm): 206.3 (C=O-Lev), 172.5, 170.3, 170.1 (C=O-Ac), 169.0 (C=O-Lev), 154.4 (C=O-Troc), 138.0 (C_q -Bn, $2 \times C_q$ -Ph), 136.1, 136.0, 133.2, 132.6, 130.1, 129.9, 128.6, 128.0, 128.0, 127.8, 127.5 ($15 \times C_{Ar}$ -Bn, -Ph), 100.6 (C1-Gal), 96.4 (C1-GlcN), 95.6 (CCl_3), 80.9 (d, $J_{F,C_6} = 172.7$ Hz, C6-Gal), 75.1 (C4-GlcN), 74.8 (C5-GlcN), 74.8 (CH_2 -Troc), 73.9 (CH_2 -Bn), 73.0 (C3-GlcN), 71.5 (d, $J_{F,C_5} = 22.8$ Hz, C5-Gal), 71.1 (C3-Gal), 69.2 (C2-Gal), 67.2 (C4-Gal), 67.2 (C6-GlcN), 58.2 (C2-GlcN), 37.9 (CH_2 -Lev), 29.8 (CH_3 -Lev), 28.1 (CH_2 -Lev), 26.8 (CH_3 -*t*Bu-Si), 20.8, 20.6, 20.6 (CH_3 -OAc), 19.2 (C_q -*t*Bu-Si).

^{19}F -NMR (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): -230.7 (td, $J_{F,H_6a/b} = 46.5$ Hz, $J_{F,H_5} = 13.0$ Hz, F6-Gal).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**74**)**

(β -4-(β -6FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung von 1.50 g (1.41 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**70**) in 20 mL Methanol (HPLC-grade) wurde tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Unter ständiger pH-Kontrolle wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 4 h gerührt und durch Zugabe von Amberlyst® 15 neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit 50 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 1.23 g (1.30 mmol, 92%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.13 (^cHex/EtOAc, 1:4).

RP-HPLC: *R_t* = 6.50 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

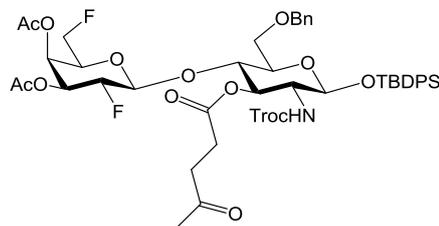
$[\alpha]_D^{22}$ = + 0.0 (c = 1.00, CHCl₃).

C₄₃H₅₃Cl₃FNO₁₃Si (M = 945.32 g/mol) [943.23].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 961.2662 ([M+NH₄]⁺, ber.: 961.2674).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(3,4-di-*O*-acetyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**71**)**

(β -4-(β -Ac₂2,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.67 g (2.13 mmol) Glucosamin-Akzeptor **9** und 1.32 g (3.20 mmol, 1.5 Äquiv.) 3,4-Di-*O*-acetyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**34**) in 60 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst und unter Argonatmosphäre mit 4.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie auf -40 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 38 μ L (0.21 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **34**) TMSOTf in 1.0 mL absol. Dichlormethan gegeben und es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 1.5 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1). Zusätzlich zum gewünschten Produkt konnten der eingesetzte Glucosamin-Akzeptor **9**, sowie Mischfraktionen aus Akzeptor und Disaccharid-Baustein **71** zurückgewonnen werden, welche erneut umgesetzt wurden.

Ausbeute: 1.13 g (1.10 mmol, 52%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.41 (^cHex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: *R_t* = 9.03 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{20} = +14.6$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₄₇H₅₆Cl₃F₂NO₁₄Si (M = 1031.39 g/mol) [1029.25].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 1047.2859 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1047.2842), 1052.2402 ([M+Na]⁺, ber.: 1052.2401).

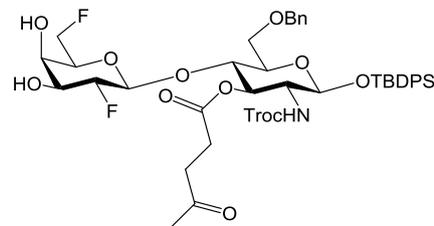
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.74 - 7.60 (m, 4H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.42 - 7.22 (m, 11H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.57 - 5.53 (m, 1H, H4-Gal), 5.51 - 5.47 (m, 1H, H3-Gal), 4.94 (dd, 1H, *J*_{H₃,H₂} = 10.1 Hz, *J*_{H₃,H₄} = 9.5 Hz, H3-GlcN), 4.76 - 4.64 (m, 3H, H2-Gal {4.76}), CH_{2a}-Troc {4.74, d, *J*_{CH,CH} = 12.1 Hz}, CH_{2b}-Troc {4.71, d, *J*_{CH,CH} = 12.0 Hz}, 4.55 - 4.40 (m, 4H, H1-Gal {4.55}, H5-Gal {4.55}, H1-GlcN {4.49}, CH₂-Bn {4.46}), 4.41 - 4.28 (m, 3H, H6a-Gal {4.39}, CH₂-Bn {4.39}, H6b-Gal {4.21}), 3.96 (t, 1H, *J*_{H₄,H₃} = *J*_{H₄,H₅} = 9.2 Hz, H4-GlcN), 3.89 - 3.81 (m, 1H, H2-GlcN), 3.65 (dd, 1H, *J*_{H_{6a},H_{6b}} = 11.5 Hz, *J*_{H_{6a},H₅} = 4.5 Hz, H6a-GlcN), 3.39 (d, 1H, *J*_{H_{6b},H_{6a}} = 11.6 Hz, H6b-GlcN), 3.17 (ddd, 1H, *J*_{H₅,H₄} = 9.6 Hz, *J*_{H₅,H_{6a}} = 3.9 Hz, *J*_{H₅,H_{6b}} = 1.8 Hz, H5-GlcN), 2.75 - 2.60 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.57 - 2.46 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.15 (s, 3H, CH₃-Lev), 2.15, 2.08 (2 × s, 6H, CH₃-OAc), 1.07 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 206.5 (C=O-Lev), 172.8 (C=O-Lev), 171.1, 170.2 (C=O-Ac), 154.4 (C=O-Troc), 138.3, 138.1 ($\text{C}_q\text{-Bn}$, $2 \times \text{C}_q\text{-Ph}$), 136.1, 136.0, 133.1, 132.6, 130.2, 130.0, 128.6, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6 ($15 \times \text{C}_{\text{Ar}}\text{-Bn}$, -Ph), 100.5 (d, $J_{\text{C1,F2}} = 22.1$ Hz, C1-Gal), 96.3 (C1-GlcN), 95.6 (CCl_3), 84.8 (d, $J_{\text{C2,F2}} = 189.4$ Hz, C2-Gal), 81.5 (d, $J_{\text{C6,F6}} = 171.9$ Hz, C6-Gal), 76.7 (C4-GlcN), 74.9 ($\text{CH}_2\text{-Troc}$), 74.4 (C5-GlcN), 73.5 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 73.0 (C3-GlcN), 68.7 (d, $J_{\text{C3,F2}} = 21.8$ Hz, C3-Gal), 67.8 (d, $J_{\text{C4,F6}} = 8.7$ Hz, C4-Gal), 67.2 (d, $J_{\text{C5,F6}} = 22.2$ Hz, C5-Gal), 67.1 (C6-GlcN), 58.3 (C2-GlcN), 37.9 ($\text{CH}_2\text{-Lev}$), 29.8 ($\text{CH}_3\text{-Lev}$), 28.0 ($\text{CH}_2\text{-Lev}$), 26.8 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu-Si}$), 20.8, 20.6 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$), 19.3 ($\text{C}_q\text{-}t\text{Bu-Si}$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -207.2 (ddd, 1F, $J_{\text{F2,H2}} = 50.1$ Hz, $J_{\text{F2,H1}} = 10.8$ Hz, $J_{\text{F2,H3}} = 3.4$ Hz, F2-Gal), -231.3 (td, 1F, $J_{\text{F6,H6a/b}} = 46.5$ Hz, $J_{\text{F6,H5}} = 15.4$ Hz, F6-Gal).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,6-didesoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (75)**

(β -4-(β -2,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung von 1.00 g (0.97 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(3,4-di-*O*-acetyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**71**) in 30 mL Methanol (HPLC-grade) wurde mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 9.0 erreicht wurde. Unter ständiger pH-Kontrolle wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 12 h gerührt und durch Zugabe von Amberlyst® 15 neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit 50 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 40 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 25:1) gereinigt.

Ausbeute: 710 mg (0.75 mmol, 77%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 25:1).

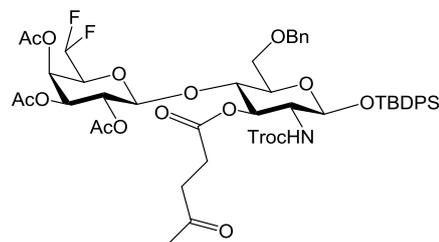
$[\alpha]_D^{23} = +9.2$ (c = 1.00, CHCl_3).

$\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{NO}_{12}\text{Si}$ (M = 947.32 g/mol) [945.23].

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 963.2630 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 963.2631).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**72**)**

(β -4-(β -Ac₃6,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.44 g (1.84 mmol) Glucosamin-Akzeptor **9** und 1.30 g (2.76 mmol, 1.5 Äquiv.) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**43**) in 80 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie auf -78 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 51 μ L (0.28 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **43**) TMSOTf in 1.0 mL absol. Dichlormethan gegeben und es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 1.5 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und anschließend mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 1.40 g (1.29 mmol, 70%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.33 (^cHex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: R_t = 9.04 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{20}$ = - 6.7 (c = 1.00, CHCl₃).

C₄₉H₅₈Cl₃F₂NO₁₆Si (M = 1089.43 g/mol) [1087.26].

ESI-MS (positiv) m/z : 1105.29 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1105.29).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1105.2887 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1105.2897).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.73 - 7.70 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.65 - 7.61 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.45 - 7.22 (m, 11H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.73 (td, 1H, J_{H_6, F_a} = 57.1 Hz, J_{H_6, F_b} = 56.3 Hz, J_{H_6, H_5} = 5.4 Hz, H6-Gal), 5.43 (d, 1H, J_{H_4, H_3} = 3.5 Hz, H4-Gal), 4.98 (dd, 1H, J_{H_2, H_3} = 10.3 Hz, J_{H_2, H_1} = 8.1 Hz, H2-Gal), 4.88 (dd, 1H, J_{H_3, H_2} = 10.1 Hz, J_{H_3, H_4} = 9.2 Hz, H3-GlcN), 4.82 (dd, 1H, J_{H_3, H_2} = 10.4 Hz, J_{H_3, H_4} = 3.5 Hz, H3-Gal), 4.73 (d, 1H, $J_{CH, CH}$ = 12.0 Hz, CH_{2a}-Troc), 4.68 (d, 1H, $J_{CH, CH}$ = 12.2 Hz, CH_{2b}-Troc), 4.65 (d, 1H, $J_{CH, CH}$ = 11.9 Hz, CH₂-Bn), 4.50 (d, 1H, J_{H_1, H_2} = 8.0 Hz, H1-Gal), 4.46 (d, 1H, J_{H_1, H_2} = 8.1 Hz, H1-GlcN), 4.35 (d, 1H, $J_{CH, CH}$ = 12.2 Hz, CH₂-Bn), 3.99 (t, 1H, J_{H_4, H_3} = J_{H_4, H_5} = 9.5 Hz, H4-GlcN), 3.86 (dd, 1H, J_{H_2, H_3} = 10.1 Hz, J_{H_2, H_1} = 10.1 Hz, H2-GlcN), 3.61 - 3.53 (m, 2H, H6a-GlcN {3.58}, H5-Gal {3.57}), 3.42 - 3.35 (m, 1H, H6b-GlcN {3.39}), 3.04 (d, 1H, J_{H_5, H_4} = 9.7 Hz, H5-GlcN), 2.78 - 2.65 (m, 2H, CH₂-Lev),

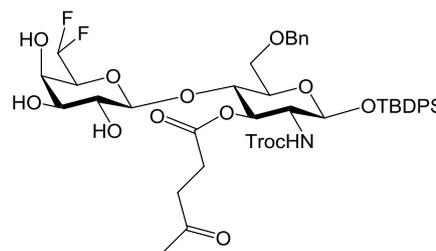
2.60 - 2.49 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.15 (s, 3H, CH₃-Lev), 2.06, 1.93, 1.89 (3 × s, 9H, CH₃-OAc), 1.06 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 206.4 (C=O-Lev), 172.6, 170.0, 169.9 (C=O-Ac), 168.9 (C=O-Lev), 154.3 (C=O-Troc), 138.0, 137.9 (C_q-Bn, 2 × C_q-Ph), 136.1, 136.0, 133.1, 132.6, 130.2, 130.0, 129.2, 128.7, 128.4, 128.0, 127.8, 127.6, 125.4 (15 × C_{Ar}-Bn, -Ph), 112.9 (dd, *J*_{C₆,F_a} = 245.6 Hz, *J*_{C₆,F_b} = 245.6 Hz, C6-Gal), 100.4 (C1-Gal), 96.2 (C1-GlcN), 95.5 (CCl₃), 75.1 (C4-GlcN), 74.8 (CH₂-Troc), 74.6 (C5-GlcN), 73.7 (CH₂-Bn), 72.7 (C3-GlcN), 72.5 (dd, *J*_{C₅,F_a} = 37.5 Hz, *J*_{C₅,F_b} = 31.5 Hz, C5-Gal), 70.5 (C3-Gal), 68.7 (C2-Gal), 66.9 (C6-GlcN), 65.9 (C4-Gal), 58.1 (C2-GlcN), 37.7 (CH₂-Lev), 29.8 (CH₃-Lev), 27.9 (CH₂-Lev), 26.8 (CH₃-*t*Bu-Si), 20.9, 20.8, 20.8 (CH₃-OAc), 19.3 (C_q-*t*Bu-Si).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -128.2 – -129.7 (m, 2F, F_{6a/b}-Gal).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosid (76)**

(β-4-(β-6,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Eine Lösung von 1.40 g (1.29 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl)-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxy-

carbonylamino)-β-D-glucopyranosid (**72**) in 60 mL Methanol (HPLC-grade) wurde tropfenweise mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Unter ständiger pH-Kontrolle wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 4 h gerührt und durch Zugabe von Amberlyst® 15 neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit 100 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 1.14 g (1.18 mmol, 91%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.37 (EtOAc).

RP-HPLC: *R_t* = 6.91 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

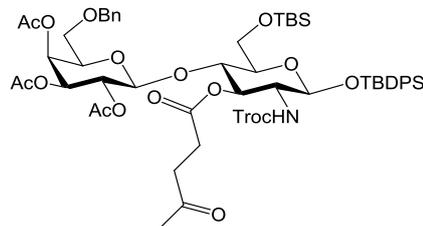
[α]_D²³ = - 4.1 (c = 1.00, CHCl₃).

C₄₃H₅₂Cl₃F₂NO₁₃Si (M = 963.31 g/mol) [961.22].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 979.2575 ([M+NH₄]⁺, ber.: 979.2580), 984.2132 ([M+Na]⁺, ber.: 984.2139).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**77**)**

(β -4-(β -6BnAc₃Gal)-3Lev-6TBSGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 854 mg (1.06 mmol) des Glucosamin-Akzeptor **11** und 860 mg (1.59 mmol, 1.5 Äquiv.) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**17**) in 70 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor sie auf -78 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 30 μ L (0.16 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **17**) TMSOTf in 1.0 mL absol. Dichlormethan gegeben und es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 1.5 h gerührt. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 870 mg (0.73 mmol, 69%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.26 (^cHex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: R_t = 19.7 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{22}$ = - 5.3 (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₅H₇₄Cl₃NO₁₇Si₂ (M = 1183.71 g/mol) [1181.36].

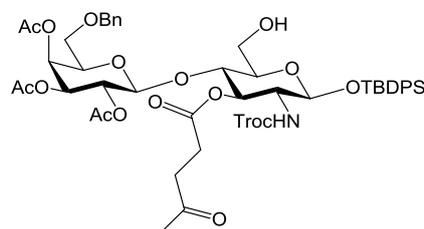
HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1199.3897 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1199.3899).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.71 - 7.69 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.64 - 7.59 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.38 - 7.31 (m, 6H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.31 - 7.26 (m, 5H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.43 (dd, 1H, $J_{H4,H3}$ = 3.5 Hz, $J_{H4,H5}$ = 1.1 Hz, H4-Gal), 4.97 (dd, 1H, $J_{H2,H3}$ = 10.3 Hz, $J_{H2,H1}$ = 7.9 Hz, H2-Gal), 4.88 (dd, 1H, $J_{H3,H2}$ = 10.3 Hz, $J_{H3,H4}$ = 3.5 Hz, H3-Gal), 4.81 (dd, 1H, $J_{H3,H2}$ = 10.8 Hz, $J_{H3,H4}$ = 9.3 Hz H3-GlcN), 4.73 (d, 1H, $J_{NH,H2}$ = 9.9 Hz, NH-GlcN), 4.70 (d, 2H, $J_{CH,CH}$ = 12.0 Hz, CH₂-Troc), 4.63 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 7.9 Hz, H1-Gal), 4.53 (d, 1H, $J_{CH,CH}$ = 11.7 Hz, CH₂-Bn), 4.46 - 4.37 (m, 2H, CH₂-Bn {4.43, d, $J_{CH,CH}$ = 11.8 Hz}, H1-GlcN {4.41, d, $J_{H1,H2}$ = 7.9 Hz}), 3.93 (t, 1H, $J_{H4,H3}$ = $J_{H4,H5}$ = 9.4 Hz, H4-GlcN), 3.81 (ddd, 1H, $J_{H2,H3}$ = 10.5 Hz, $J_{H2,NH}$ = 9.8 Hz, $J_{H2,H1}$ = 7.9 Hz, H2-GlcN), 3.74 (ddd, $J_{H5,H6a}$ = 7.6 Hz, $J_{H5,H6b}$ = 5.6 Hz, $J_{H5,H4}$ = 1.2 Hz, H5-Gal), 3.68 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b}$ = 11.5 Hz, $J_{H6a,H5}$ = 2.7 Hz, H6a-GlcN), 3.59 - 3.52 (m, 2H, H6b-GlcN {3.58}, H6a-Gal {3.55}), 3.42 (m_c, H6b-Gal), 2.92 (dt, 1H, $J_{H5,H4}$ = 9.6 Hz, $J_{H5,H6a/b}$ = 2.8 Hz, H5-GlcN), 2.74 - 2.41 (m, 4H, CH₂-Lev), 2.10 (s, 3H, CH₃-Lev), 2.02, 1.95, 1.94 (3 \times s, 9H, CH₃-OAc), 1.06 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si, TBDPS), 0.91 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si, TBS), 0.06, 0.01 (2 \times s, 6H, CH₃-Me-Si, TBS).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 206.0 (C=O-Lev), 172.7 (C=O-Lev), 170.2, 170.1, 169.0 (C=O-Ac), 154.3 (C=O-Troc), 137.7 (C_q -Bn), 136.1, 135.9 (C_{Ar} -Bn, -Ph), 133.0, 132.8 (C_q -Ph), 130.2, 130.0, 128.6, 128.2, 128.0, 127.8, 127.7 ($13 \times \text{C}_{\text{Ar}}$ -Bn, -Ph), 100.3 (C1-Gal), 96.3 (C1-GlcN), 95.6 (CCl_3), 75.4 (C5-GlcN), 74.8 (CH_2 -Troc), 73.9 (C4-GlcN), 73.5 (CH_2 -Bn), 73.0 (C3-GlcN), 71.8 (C5-Gal), 71.5 (C3-Gal), 69.7 (C2-Gal), 67.4 (C4-Gal), 67.0 (C6-Gal), 60.7 (C6-GlcN), 58.1 (C2-GlcN), 38.1 (CH_2 -Lev), 29.8 (CH_3 -Lev), 28.2 (CH_2 -Lev), 26.8 (CH_3 -*t*Bu-Si, TBDPS), 26.0 (CH_3 -*t*Bu-Si, TBS), 20.9, 20.8, 20.7 (CH_3 -OAc) 19.3 (C_q -*t*Bu-Si, TBDPS), 18.4 (C_q -*t*Bu-Si, TBS), -4.94, -5.33 (CH_3 -Me-Si, TBS).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (79)**

(β -4-(β -6BnAc₃Gal)-3Lev-GlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 850 mg (0.79 mmol) β -4-(β -6BnAc₃Gal)-3Lev-6TBS-GlcNTroc-OTBDPS **77** in 20 mL Essigsäure (80%) aufgenommen und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand wurde dreimal mit je 60 mL Toluol und mit 50 mL Dichlormethan kodestilliert und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 730 mg (0.68 mmol, 86%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.66 ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1).

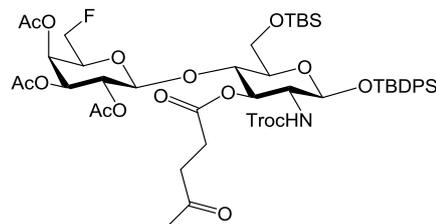
$\text{C}_{49}\text{H}_{60}\text{Cl}_3\text{NO}_{17}\text{Si}$ (M = 1069.44 g/mol) [1067.27].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1085.3038 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 1085.3034).

HR-ESI-MS (*negativ*) m/z : 1066.2619 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 1066.2623).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (78)**

(β -4-(β -Ac₃6FGal)-3Lev-6TBSGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.00 g (1.24 mmol) Glucosamin-Akzeptor **11** und 842 mg (1.86 mmol, 1.5 Äquiv.) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**29**) in 80 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor auf sie -78 °C gekühlt wurde. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 38 μ L (0.19 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **29**) TMSOTf in 1.0 mL absol. Dichlormethan gegeben und es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 1.5 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 60 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit 60 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1).

Ausbeute: 850 mg (0.78 mmol, 63%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.28$ (^cHex/EtOAc, 2:1).

RP-HPLC: $R_t = 14.9$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{22} = +1.7$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₄₈H₆₇Cl₃FNO₁₆Si₂ (M = 1095.57 g/mol) [1093.30].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1111.3385 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1111.3386).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.71 - 7.66 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.64 - 7.58 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.44 - 7.40 (m, 2H, H_{Ar}-Ph), 7.39 - 7.32 (m, 4H, H_{Ar}-Ph), 5.38 (dd, 1H, $J_{H4,H3} = 3.6$ Hz, $J_{H4,H5} = 1.1$ Hz, H4-Gal), 5.03 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.3$ Hz, $J_{H2,H1} = 8.0$ Hz, H2-Gal), 4.89 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.4$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-Gal), 4.85 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.8$ Hz, $J_{H3,H4} = 9.3$ Hz, H3-GlcN), 4.77 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.8$ Hz, NH-GlcN), 4.70 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz, CH₂-Troc), 4.68 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 7.9$ Hz, H1-Gal), 4.51 - 4.34 (m, 3H, H6a-Gal {4.48, ddd, $J_{F,H6a} = 46.0$ Hz, $J_{H6a,H6b} = 10.4$ Hz, $J_{H6a,H5} = 6.8$ Hz}, H1-GlcN {4.43, d, $J_{H1,H2} = 7.8$ Hz}, H6b-Gal {4.38, ddd, $J_{F,H6b} = 45.8$ Hz, $J_{H6b,H6a} = 9.7$ Hz, $J_{H6b,H5} = 5.2$ Hz}), 3.96 (t, 1H, $J_{H4,H3} = J_{H4,H5} = 9.4$ Hz, H4-GlcN), 3.83 - 3.77 (m, 2H, H5-Gal {3.80}, H2-GlcN {3.79}), 3.70 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 11.4$ Hz, $J_{H6a,H5} = 2.6$ Hz, H6a-GlcN), 3.58 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 11.5$ Hz, $J_{H6b,H5} = 1.6$ Hz, H6b-GlcN), 2.92 (dt, 1H, $J_{H5,H4} = 9.8$ Hz, $J_{H5,H6a/b} = 2.0$ Hz, H5-GlcN), 2.72 (t, 2H, $J_{CH,CH} = 6.7$ Hz, CH₂-Lev), 2.55 (t, 2H, $J_{CH,CH} = 6.8$ Hz,

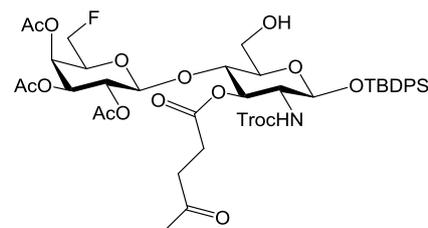
CH₂-Lev), 2.15 (s, 3H, CH₃-Lev), 2.12, 1.96, 1.94 (3 × s, 9H, CH₃-OAc), 1.05 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si, TBDPS), 0.92 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si, TBS), 0.06, 0.01 (2 × s, 6H, CH₃-Me-Si, TBS).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 206.3 (C=O-Lev), 172.7 (C=O-Lev), 170.3, 170.1, 168.9 (C=O-Ac), 154.3 (C=O-Troc), 136.1, 135.9 (C_{Ar}-Ph), 133.0, 132.8 (C_q-Ph), 130.2, 130.0, 127.8, 127.7 (8 × C_{Ar}-Ph), 100.4 (C1-Gal), 96.3 (C1-GlcN), 95.6 (CCl₃), 80.8 (d, *J*_{F,C6} = 173.0 Hz, C6-Gal), 75.2 (C5-GlcN), 74.7 (CH₂-Troc), 74.1 (C4-GlcN), 73.1 (C3-GlcN), 71.6 (d, *J*_{F,C5} = 23.0 Hz, C5-Gal), 71.1 (C3-Gal), 69.2 (C2-Gal), 67.0 (C4-Gal), 60.6 (C6-GlcN), 58.0 (C2-GlcN), 38.0 (CH₂-Lev), 29.9 (CH₃-Lev), 28.2 (CH₂-Lev), 26.8 (CH₃-*t*Bu-Si, TBDPS), 26.0 (CH₃-*t*Bu-Si, TBS), 20.9, 20.7, 20.7 (CH₃-OAc) 19.3 (C_q-*t*Bu-Si, TBDPS), 18.4 (C_q-*t*Bu-Si, TBS), -4.91, -5.35 (CH₃-Me-Si, TBS).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -230.9 (td, *J*_{F,H6a/b} = 46.7 Hz, *J*_{F,H5} = 12.9 Hz, F6-Gal).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-β-D-galactopyranosyl)-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranosid (80)**

(β-4-(β-Ac₃6FGal)-3Lev-GlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 850 mg (0.78 mmol) β-4-(β-Ac₃6FGal)-3Lev-6TBS-GlcNTroc-OTBDPS **78** in 20 mL Essigsäure (80%) aufgenommen und 20 h bei Raumtemperatur erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 60 mL Toluol und 50 mL Dichlormethan kdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 750 mg (0.76 mmol, 97%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.45 (°Hex/EtOAc, 1:1).

C₄₂H₅₃Cl₃NO₁₆Si (M = 981.31 g/mol) [979.22].

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 997.2524 ([M+NH₄]⁺, ber.: 997.2521).

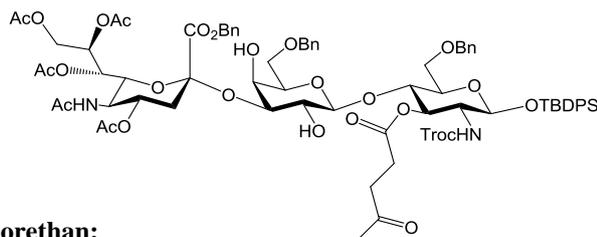
HR-ESI-MS (negativ) *m/z*: 978.2114 ([M-H]⁻, ber.: 978.2110).

5.4 Die Synthesen der Trisaccharid-Bausteine

5.4.1 Synthese des natürlichen Bausteins

tert-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**90**)

(β -4-(β -BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Methylsulphenylbromid-Lösung (1.6 M) in 1,2-Dichlorethan:

Zu einer Lösung von 709 μ L (4.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 mL absol. 1,2-Dichlorethan wurden 410 μ L (4.99 mmol) Brom getropft und es wurde 20 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt.

Sialylierungsreaktion:

Es wurden 3.11 g (4.63 mmol, 2.5 Äquiv.) α -Ac₄SiaCOOBnXan **48** in 30 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 6.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von 1.91 g (1.85 mmol) β -4-(β -BnGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS **68** in 30 mL einer Mischung absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) wurde anschließend zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 1.19 g (4.63 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 12 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Anschließend wurden 2.89 mL (4.63 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulphenylbromid-Lösung (1.6 M) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei -45 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Danach wurde weitere 30 Minuten bei -45 °C gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde durch *Hyflo*[®] filtriert, mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1 → EtOAc). Eine vollständige Abtrennung des Glycals **49** war hierbei allerdings nicht möglich. Dies konnte jedoch für die weitere Umsetzung vernachlässigt werden. Für analytische Zwecke konnte durch semipräparative RP-HPLC (Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min) reines Produkt erhalten werden. Zusätzlich zum gewünschten Produkt **90** wurde eingesetztes Disaccharid **68** zurückgewonnen, welches erneut umgesetzt wurde.

Ausbeute: 3.73 g (noch mit ca. 15% Glycal **49** verunreinigt); farbloser amorpher Feststoff.

Analytische Daten des Reinprodukts:

$R_f = 0.46$ (EtOAc), 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1).

RP-HPLC: $R_t = 9.54$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{22} = -1.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₇₆H₉₁Cl₃N₂O₂₆Si ($M = 1582.99$ g/mol) [1580.47].

ESI-MS (positiv) m/z : 1598.50 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1598.50).

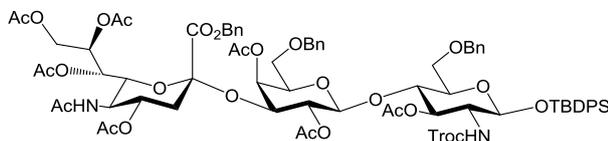
HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1598.5030 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1598.5033).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.73 - 7.67 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.65 - 7.59 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.40 - 7.21 (m, 21H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.40 - 5.35 (m, 2H, H8-Sia {5.36}, NH-GlcN), 5.30 (dd, 1H, $J_{H7,H8} = 8.6$ Hz, $J_{H7,H6} = 1.6$ Hz, H7-Sia), 5.19 - 5.15 (m, 1H, NH-Sia), 4.91 (td, 1H, $J_{H4,H5/H3ax} = 10.2$ Hz, $J_{H4,H3aq} = 4.3$ Hz, H4-Sia), 4.86 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.2$ Hz, $J_{H3,H4} = 9.6$ Hz, H3-GlcN), 4.74 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH_{2a}-Troc), 4.65 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH_{2b}-Troc), 4.54 - 4.50 (m, 2H, CH₂-Bn {d, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz}), 4.49 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 12.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.45 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 12.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.42 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 7.7$ Hz, H1-Gal), 4.39 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.1$ Hz, H1-GlcN), 4.22 (dd, 1H, $J_{H9a,H9b} = 12.4$ Hz, $J_{H9a,H8} = 2.5$ Hz, H9a-Sia), 4.07 (dd, 1H, $J_{H6,H5} = 10.8$ Hz, $J_{H6,H7} = 1.8$ Hz, H6-Sia), 4.04 - 4.00 (m, 2H, H9b-Sia {4.00}, H4-GlcN {4.00}), 3.99 - 3.95 (m, 1H, H5-Sia), 3.92 - 3.86 (m, 2H, H3-Gal {3.89}, H2-GlcN {3.87}), 3.75 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 11.4$ Hz, $J_{H6a,H5} = 3.7$ Hz, H6a-GlcN), 3.57 - 3.52 (m, 3H, H6b-GlcN {3.53}, H6a-Gal {3.53}, H6b-Gal {3.52}), 3.51 - 3.47 (m, 1H, H2-Gal), 3.44 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, H4-Gal), 3.42 (t, 1H, $J_{H5,H6a/b} = 6.1$ Hz, H5-Gal), 3.20 - 3.15 (m, 1H, H5-GlcN), 2.75 (dd, 1H, $J_{H3aq,H3ax} = 13.0$ Hz, $J_{H3aq,H4} = 4.6$ Hz, H3_{aq}-Sia), 2.63 - 2.36 (m, 4H, CH₂-Lev), 2.15 (s, 3H, CH₃-Lev), 2.09, 2.04, 2.00, 1.93 (4 × s, 12H, CH₃-OAc), 2.03 - 1.99 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.87 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.05 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 207.0 (C=O-Lev), 172.9 (C=O-Lev), 170.9, 170.6, 170.5, 170.0 (5 × C=O-Ac, -NHAc), 167.6 (C1-Sia), 154.4 (C=O-Troc), 138.6, 138.1 (3 × C_q-Bn), 136.1, 136.0 (C_q-Ph), 134.4, 133.2, 132.7, 130.1, 129.9, 129.1, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.3, 127.9, 127.7, 127.5, 127.4 (25 × C_{Ar}-Bn, -Ph), 102.3 (C1-Gal), 97.9 (C2-Sia), 96.6 (C1-GlcN), 95.6 (CCl₃), 77.4 (C3-Gal), 75.1 (C5-GlcN), 74.8 (CH₂-Troc), 74.0 (C4-GlcN), 73.4 (CH₂-Bn), 73.2 (C3-GlcN), 73.1, 73.1 (CH₂-Bn), 72.8 (C5-Gal), 72.8 (C6-Sia), 69.7 (C2-Gal), 69.3 (C6-Gal), 68.6 (C4-Sia), 68.5 (C8-Sia), 68.4 (CH₂-Bn), 68.4 (C4-Gal), 67.7 (C6-GlcN), 66.9 (C7-Sia), 62.2 (C9-Sia), 57.9 (C2-GlcN), 49.6 (C5-Sia), 37.9 (C3-Sia), 37.8 (CH₂-Lev), 29.9 (CH₃-Lev), 28.1 (CH₂-Lev), 26.9 (CH₃-*t*Bu-Si), 23.3 (CH₃-NHAc), 21.3, 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃-OAc), 19.2 (C_q-*t*Bu-Si).

tert-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**91**)

(β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Spaltung der Lev-Schutzgruppe:^[225]

Eine Lösung von 3.73 g (max. 1.85 mmol) verunreinigtem β -4-(β -BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS **90** in 60 mL einer Mischung aus Toluol/Ethanol (2:1) wurde mit 204 mg (2.22 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydrazinacetat versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 10 mL Aceton und 50 mL Wasser zugegeben und dreimal mit 80 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde mit 30 mL Dichlormethan kodestilliert und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

RP-HPLC: R_t = 8.66 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

C₇₁H₈₅Cl₃N₂O₂₄Si (M = 1484.89 g/mol) [1482.43].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1500.4659 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1500.4665).

Acetylierung: Der Rückstand wurde in 40 mL Pyridin aufgenommen, mit 20 mL Essigsäureanhydrid sowie 226 mg (1.85 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Anschluss im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol sowie 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1) unter vollständiger Abtrennung des Glycals **49** gereinigt werden.

Ausbeute: 1.63 g (1.01 mmol, 55% bezogen auf **68**); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.39 (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1).

RP-HPLC: R_t = 11.7 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{22} = +5.2$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₇₇H₉₁Cl₃N₂O₂₇Si (M = 1610.99 g/mol) [1608.46].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 1626.50 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1626.50).

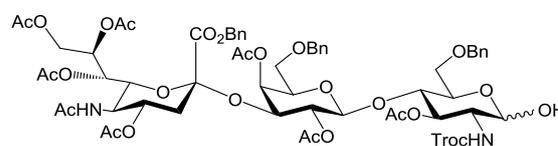
HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1626.4985 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1626.4982).

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3 , COSY, HSQC), δ (ppm): 7.71 - 7.67 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$, -Bn), 7.63 - 7.59 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$, -Bn), 7.43 - 7.23 (m, 21H, $\text{H}_{\text{Ar-Ph}}$, -Bn), 5.47 (dd, 1H, $J_{\text{H8,H7}} = 7.5$ Hz, $J_{\text{H8,H9}} = 2.9$ Hz, H8-Sia), 5.43 - 5.34 (m, 2H, NH-GlcN {5.42}, H7-Sia {5.36}), 5.19 - 5.13 (m, 1H, NH-Sia {5.14}), 5.12 (d, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, H4-Gal), 4.92 - 4.82 (m, 2H, H2-Gal {4.87}, H4-Sia {4.82}), 4.81 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}$ -Troc), 4.74 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 8.2$ Hz, H1-Gal), 4.54 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 12.3$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, H3-Gal), 4.53 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}$ -Troc), 4.52 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.9$ Hz, CH_2 -Bn), 4.46 - 4.41 (m, 4H, CH_2 -Bn {4.44, 4.41}), 4.38 - 4.35 (m, 1H, H1-GlcN {4.36}), 4.29 (dd, 1H, $J_{\text{H9a,H9b}} = 12.5$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.9$ Hz, H9a-Sia), 4.12 - 4.06 (m, 3H, H6-Sia {4.09}, H9b-Sia {4.08}, H5-Sia {4.07}), 4.04 - 3.85 (m, 3H, H3-GlcN {4.03}, H4-GlcN {3.96}, H2-GlcN {3.87}), 3.77 (m, 1H, H5-Gal), 3.58 (dd, 1H, $J_{\text{H6a,H6b}} = 11.2$ Hz, $J_{\text{H6a,H5}} = 4.3$ Hz, H6a-GlcN), 3.49 - 3.42 (m, 2H, H6b-GlcN {3.46}, H6a-Gal {3.54}), 3.33 (dd, 1H, $J_{\text{H6b,H6a}} = 9.7$ Hz, $J_{\text{H6b,H5}} = 7.6$ Hz, H6b-Gal), 3.14 - 3.11 (m, 1H, H5-GlcN), 2.62 (dd, 1H, $J_{\text{H3\ddot{a}q,H3ax}} = 12.7$ Hz, $J_{\text{H3\ddot{a}q,H4}} = 4.6$ Hz, H3_{\ddot{a}q}-Sia), 2.12, 2.11, 2.10, 2.06, 2.02, 1.97, 1.89 (7 \times s, 21H, CH_3 -OAc), 1.95 - 1.91 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.86 (s, 3H, CH_3 -NHAc), 1.05 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu-Si).

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 170.8, 170.6, 170.3, 170.2, 170.2, 170.1 (8 \times C=O-NHAc, -OAc), 168.1 (C1-Sia), 154.2 (C=O-Troc), 138.6, 137.9 (3 \times C_q-Bn, 2 \times C_q-Ph), 136.1, 136.0, 135.2, 135.1, 134.9, 129.0, 128.8, 128.8, 128.7, 128.7, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.6, 127.4 (25 \times C_{Ar}-Bn, -Ph), 100.7 (C1-Gal), 98.9 (C2-Sia), 97.2 (C1-GlcN), 95.5 (CCl_3), 75.0 (C4-GlcN), 74.9 (C5-GlcN), 74.6 (CH_2 -Troc), 73.9 (C2-Gal), 73.7 (C3-GlcN), 73.5, 73.4, 73.3 (CH_2 -Bn), 72.5 (C6-Sia), 71.8 (C3-Gal), 71.6 (C5-Gal), 69.2 (C4-Sia), 68.4 (CH_2 -Bn), 67.9 (C6-GlcN), 67.7 (C4-Gal), 67.7 (C8-Sia), 67.6 (C6-Gal), 67.4 (C7-Sia), 62.4 (C9-Sia), 58.1 (C2-GlcN), 49.4 (C5-Sia), 38.3 (C3-Sia), 26.8 (CH_3 -*t*Bu-Si), 23.3 (CH_3 -NHAc), 21.2, 21.0, 21.0, 20.9, 20.9, 20.8, 20.7 (CH_3 -OAc), 19.2 (C_q-*t*Bu-Si).

4-O-(2,4-Di-O-acetyl-6-O-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-3-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(N-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β -D-glucopyranose (92)

(α/β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OH)



Zu einer Lösung von 1.63 g (1.01 mmol) β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OTBDPS **91** in 100 mL Tetrahydrofuran wurden bei 0 °C gleichzeitig 15.2 mL (397 mg, 1.52 mmol, 1.5 Äquiv.) einer Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in Tetrahydrofuran (0.1 M) und 15.0 mL (3.03 mmol, 3.0 Äquiv.) einer Mischung aus 0.17 mL Essigsäure und 14.8 mL Tetrahydrofuran innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und die Lösung wurde mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und

die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Der Rückstand konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 25:1) gereinigt werden.

Ausbeute: 1.21 g (0.88 mmol, 87%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.22/0.29$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 25:1).

RP-HPLC: $R_t = 3.83$ min/4.12 min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$\text{C}_{61}\text{H}_{73}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O}_{27}$ ($M = 1372.59$ g/mol) [1370.35].

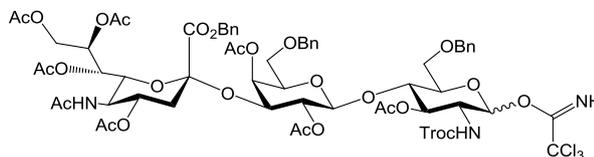
ESI-MS (positiv) m/z : 1388.38 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 1388.38).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1388.3795 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 1388.3805).

HR-ESI-MS (negativ) m/z : 1415.3438 ($[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$, ber.: 1415.3448).

4-O-(2,4-Di-O-acetyl-6-O-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-3-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(N-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- α/β -D-glucopyranosyltrichloracetimidat (93)

(α/β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OC(NH)CCl₃)



Eine Lösung von 700 mg (0.51 mmol) α/β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OH **92** in 60 mL absol. Dichlormethan wurde zu 1.0 g aktiviertem Molsieb (4 Å) unter Argonatmosphäre gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsmischung wurden anschließend unter Eiskühlung 511 μL (5.10 mmol, 10.0 Äquiv.) Trichloracetonitril und vier Tropfen DBU zugegeben. Der Ansatz wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 6 h gerührt, wobei nach 3 h ein weiterer Tropfen DBU zur Vervollständigung der Reaktion zugegeben wurde. Nach beendeter Reaktion wurde mit 20 mL Dichlormethan verdünnt, das Molsieb abfiltriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:9) gereinigt und konnte als Anomerengemisch (α/β , 1:1.8, über analytische RP-HPLC bestimmt) erhalten werden.

Ausbeute: 460 mg (0.30 mmol, 59%); farbloser amorpher Feststoff, Anomerengemisch.

$R_f = 0.45/0.47$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 25:1), 0.41/0.52 (${}^c\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:9).

RP-HPLC: α : $R_t = 4.97$ min, β : $R_t = 5.70$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

α -Anomer: $[\alpha]_D^{22} = +34.4$ ($c = 0.50$, CHCl_3).

$\text{C}_{63}\text{H}_{73}\text{Cl}_6\text{N}_3\text{O}_{27}$ ($M = 1516.97$ g/mol) [1513.26].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1531.2885 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 1531.2901).

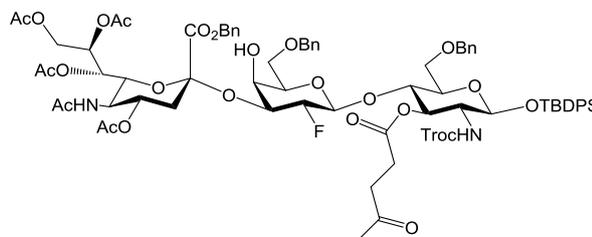
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3 , COSY), δ (ppm): **α -Anomer:** 8.70 (s, 1H, NH-TCl), 7.44 - 7.41 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$), 7.40 - 7.35 (m, 3H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$), 7.35 - 7.30 (m, 10H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$), 6.41 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, H1-GlcN), 5.49 (ddd, 1H, $J_{\text{H8,H7}} = 8.8$ Hz, $J_{\text{H8,H9b}} = 6.0$ Hz, $J_{\text{H8,H9a}} = 2.8$ Hz, H8-Sia), 5.43 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 5.37 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 11.0$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 9.2$ Hz, H3-GlcN), 5.30 (dd, 1H, $J_{\text{H7,H8}} = 8.7$ Hz, $J_{\text{H7,H6}} = 2.8$ Hz, H7-Sia), 5.26 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.2$ Hz, NH-GlcN), 5.15 (dd, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = 3.4$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 1.1$ Hz, H4-Gal), 5.09 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.96 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = 9.8$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 7.9$ Hz, H2-Gal), 4.94 (d, 1H, $J_{\text{NH,H5}} = 9.5$ Hz, NH-Sia), 4.87 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 7.9$ Hz, H1-Gal), 4.84 (ddd, 1H, $J_{\text{H4,H3ax}} = 12.1$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 10.3$ Hz, $J_{\text{H4,H3äq}} = 4.6$ Hz, H4-Sia), 4.71 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}\text{-Troc}$), 4.69 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}\text{-Troc}$), 4.64 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.61 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 10.0$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.4$ Hz, H3-Gal), 4.56 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.53 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.44 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.29 (dd, 1H, $J_{\text{H9a,H9b}} = 12.4$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.8$ Hz, H9a-Sia), 4.18 (t, 1H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H4,H5}} = 9.6$ Hz, H4-GlcN), 4.14 (ddd, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = 11.0$ Hz, $J_{\text{H2,NH}} = 9.2$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.7$ Hz, H2-GlcN), 4.04 - 3.99 (m, 2H, H5-Sia {4.03}, H5-GlcN {4.02}), 3.90 (dd, 1H, $J_{\text{H9b,H9a}} = 12.4$ Hz, $J_{\text{H9b,H8}} = 6.0$ Hz, H9b-Sia), 3.84 (ddd, 1H, $J_{\text{H5,H6a}} = 6.9$ Hz, $J_{\text{H5,H6b}} = 5.5$ Hz, $J_{\text{H5,H4}} = 1.1$ Hz, H5-Gal), 3.81 (dd, 1H, $J_{\text{H6a,H6b}} = 11.5$ Hz, $J_{\text{H6a,H5}} = 3.8$ Hz, H6a-GlcN), 3.72 (dd, 1H, $J_{\text{H6b,H6a}} = 11.6$ Hz, $J_{\text{H6b,H5}} = 1.8$ Hz, H6b-GlcN), 3.50 (dd, 1H, $J_{\text{H6a,H6b}} = 9.6$ Hz, $J_{\text{H6a,H5}} = 5.4$ Hz, H6a-Gal), 3.46 (dd, 1H, $J_{\text{H6,H5}} = 10.8$ Hz, $J_{\text{H6,H7}} = 2.7$ Hz, H6-Sia), 3.39 (dd, $J_{\text{H6b,H6a}} = 9.6$ Hz, $J_{\text{H6b,H5}} = 7.3$ Hz, H6b-Gal), 2.61 (dd, 1H, $J_{\text{H3äq,H3ax}} = 12.6$ Hz, $J_{\text{H3äq,H4}} = 4.7$ Hz, H3äq-Sia), 2.11, 2.11, 2.03, 2.02, 1.99, 1.98, 1.97 ($7 \times$ s, 21H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$), 1.84 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 1.67 (t, 1H, $J_{\text{H3ax,H3äq}} = J_{\text{H3ax,H4}} = 12.4$ Hz, H3ax-Sia).

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.1, 170.7, 170.5, 170.4, 170.2, 169.8, 169.7 ($8 \times$ C=O-NHAc, -OAc), 167.4 (C1-Sia), 161.0 (C=NH-TCl), 154.4 (C=O-Troc), 138.4, 137.9 ($3 \times$ C_q-Bn), 135.0, 129.1, 128.8, 128.5, 128.4, 127.9, 127.9, 127.6, 127.6 ($15 \times$ C_{Ar}-Bn), 100.5 (C1-Gal), 97.1 (C2-Sia), 95.5 (CCl_3), 94.8 (C1-GlcN), 91.0 ($\text{CCl}_3\text{-TCl}$), 74.5 ($\text{CH}_2\text{-Troc}$), 74.2 (C4-GlcN), 73.5, 73.4 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 73.2 (C5-GlcN), 72.2 (C6-Sia), 71.9 (C3-Gal), 71.7 (C5-Gal), 71.3 (C3-GlcN), 70.7 (C2-Gal), 69.2 (C4-Sia), 68.5 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 67.9 (C8-Sia), 67.8 (C4-Gal), 67.7 (C6-Gal), 67.6 (C6-GlcN), 67.1 (C7-Sia), 62.2 (C9-Sia), 54.3 (C2-GlcN), 48.9 (C5-Sia), 37.5 (C3-Sia), 23.2 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 21.6, 21.3, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7, 20.7 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$).

5.4.2 Synthese der fluorierten Bausteine

tert-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**94**)

(β -4-(β -Bn2FGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.14 g (1.69 mmol, 2.5 Äquiv.) α -Ac₄-SiaCO₂BnXan **48** in 24 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von 700 mg (0.68 mmol) β -4-(β -Bn2FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS **73** in 16 mL absol. Acetonitril und 8 mL Dichlormethan wurde anschließend zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde im Anschluss auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 434 mg (1.69 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 9 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Danach wurden 1.06 mL (1.69 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h unter Erwärmen auf -20 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Es wurden weitere 30 Minuten bei -20 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde durch Hyflo[®] filtriert, mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1 → EtOAc) bzw. (°Hex/EtOAc, 1:4 → EtOAc). Eine vollständige Abtrennung des Glycals **49** war hierbei allerdings nicht möglich. Dies konnte jedoch für die weitere Umsetzung vernachlässigt werden. Zusätzlich zum gewünschten Produkt **94** konnte eingesetztes Disaccharid **71** zurückgewonnen werden, welches erneut umgesetzt wurde.

Ausbeute: 930 mg (noch mit ca. 30% Glycal **49** verunreinigt); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.21 (°Hex/EtOAc, 1:4), 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1).

RP-HPLC: *R_t* = 10.5 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

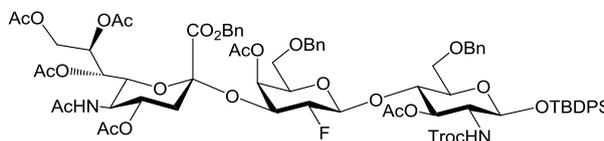
C₇₆H₉₀Cl₃FN₂O₂₅Si (M = 1584.98 g/mol) [1582.47].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 1600.5033 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1600.4990).

Versuch zur Herstellung von

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(4-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (98)**

(β -4-(β -AcBn2FGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OTBDPS)

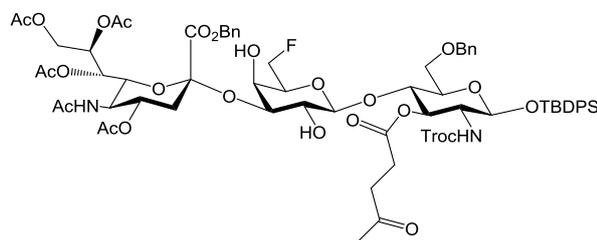


Entsprechend Referenz^[225] wurde eine Lösung von 930 mg (0.58 mmol) verunreinigtem β -4-(β -Bn2FGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS **94** in 30 mL einer Mischung aus Toluol/Ethanol (2:1) mit 65 mg (0.70 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydrazinacetat versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 10 mL Aceton und 30 mL Wasser zugegeben und zweimal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde mit 10 mL Dichlormethan kdestilliert, anschließend in 20 mL Pyridin aufgenommen und mit 10 mL Essigsäureanhydrid sowie 71 mg (0.58 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Anschluss im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol sowie 50 mL Dichlormethan kdestilliert. Die Reinigung erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1).

Ausbeute: Das gewünschte Produkt **98** konnte nicht erhalten werden.

tert-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**95**)

(β -4-(β -6FGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.75 g (2.60 mmol, 2.0 Äquiv.) α -Ac₄-SiaCO₂BnXan **48** in 24 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 3.5 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von 1.23 g (1.30 mmol) β -4-(β -6FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS **74** in 16 mL absol. Acetonitril und 8 mL Dichlormethan wurde zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 688 mg (2.60 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 9 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden 1.63 mL (2.60 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei -45 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Es wurde weitere 30 Minuten bei -45 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde durch Hyflo® filtriert, mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1 → EtOAc). Eine Abtrennung des Glycals **49** war allerdings nicht möglich. Dies konnte jedoch für die weitere Umsetzung vernachlässigt werden. Zusätzlich zum gewünschten Produkt **95** konnte eingesetztes Disaccharid **74** zurückgewonnen werden, welches erneut umgesetzt wurde.

Ausbeute: 2.85 g (noch mit ca. 30% Glycal **49** verunreinigt); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.44 (EtOAc), 0.21 (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1).

RP-HPLC: *R_t* = 7.53 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{23} = + 3.5$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₆₉H₈₄Cl₃FN₂O₂₅Si (M = 1494.85 g/mol) [1492.42].

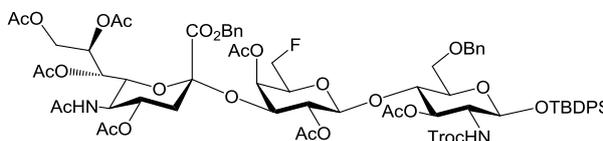
ESI-MS (positiv) *m/z*: 1510.45 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1520.45).

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 1510.4521 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1520.4520).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**99**)**

(β -4-(β -Ac₂6FGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OTBDPS)

Spaltung der Lev-Schutzgruppe:^[225]



Eine Lösung von 2.85 g (max. 1.30 mmol) verunreinigtem β -4-(β -6FGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS **95** in 30 mL einer Mischung aus Toluol/Ethanol (2:1) wurde mit 144 mg (1.56 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydrazinacetat versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 10 mL Aceton und 30 mL Wasser zugegeben und zweimal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde anschließend i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde einmal mit 10 mL Dichlormethan kodestilliert und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

RP-HPLC: R_t = 6.86 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

C₆₄H₇₈Cl₃FN₂O₂₃Si (M = 1396.75 g/mol) [1394.38].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1412.4155 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1412.4153).

Acetylierung: Der Rückstand wurde in 20 mL Pyridin aufgenommen, mit 10 mL Essigsäureanhydrid sowie 159 mg (1.30 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Anschluss im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol sowie 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch zweimalige Flash-chromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1) bzw. (^cHex/EtOAc, 1:4) gereinigt.

Ausbeute: 1.16 g (ca. 40% Glycal **49**); Das gewünschte Produkt **99** konnte aufgrund vergleichbarer polarer Eigenschaften des Glycals **49** nicht isoliert werden.

R_f = 0.19 (^cHex/EtOAc, 1:4), 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1).

RP-HPLC: R_t = 8.90 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

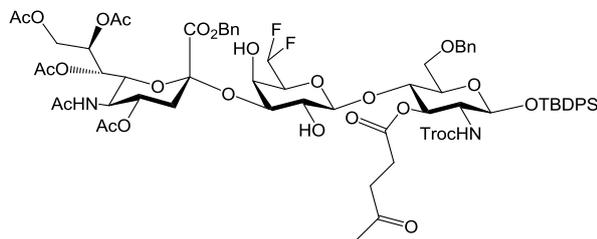
C₇₀H₈₄Cl₃FN₂O₂₆Si (M = 1522.86 g/mol) [1520.41].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 1538.45 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1538.45).

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1538.4475 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1538.4469).

tert-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**97**)

(β -4-(β -6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 1.98 g (2.95 mmol, 2.5 Äquiv.) α -Ac₄-SiaCO₂BnXan **48** in 24 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 3.5 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von 1.14 g (1.18 mmol) β -4-(β -6,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS **76** in 16 mL absol. Acetonitril und 8 mL Dichlormethan wurde zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 758 mg (2.95 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 9 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden langsam 1.84 mL (2.95 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei -45 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Danach wurde weitere 30 Minuten bei -45 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde durch Hyflo[®] filtriert, mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc). Eine vollständige Abtrennung des Glycals **49** war hierbei allerdings nicht möglich. Zusätzlich zum gewünschten Produkt **97** konnte eingesetztes Disaccharid **76** zurückgewonnen werden, welches erneut umgesetzt wurde.

Ausbeute: 1.96 g (noch mit ca. 15% Glycal **49** verunreinigt); farbloser amorpher Feststoff.

Analytische Daten des Reinprodukts:

$R_f = 0.56$ (EtOAc).

RP-HPLC: $R_t = 7.84$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{23} = +6.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₆₉H₈₃Cl₃F₂N₂O₂₅Si (M = 1512.84 g/mol) [1510.41].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1528.4408 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1528.4426).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.71 - 7.67 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.63 - 7.60 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.40 - 7.22 (m, 16H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.82 (td, 1H, $J_{H_6, F_a} = 55.9$ Hz, $J_{H_6, F_b} = 55.9$ Hz, $J_{H_6, H_5} = 6.3$ Hz, H₆-Gal), 5.36 - 5.26 (m, 3H, H₈-Sia {5.33}, H₇-Sia {5.30}, NH-GlcN {5.27, d, $J_{NH, H_2} = 9.8$ Hz}), 5.21 - 5.19 (m, 2H, CH₂-Bn), 4.96 - 4.88 (m, 3H, NH-Sia {4.93}, H₄-Sia {4.92}, H₃-GlcN {4.89}), 4.72 (d,

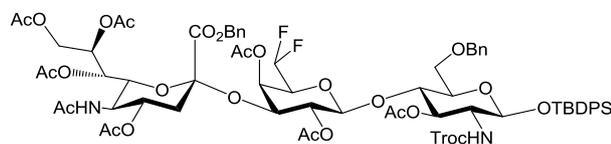
^1H , $J_{\text{CH,CH}} = 11.9$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}$ -Troc), 4.66 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.9$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}$ -Troc), 4.51 - 4.47 (m, 2H, CH_2 -Bn), 4.46 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 7.8$ Hz, H1-Gal), 4.42 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 8.3$ Hz, H1-GlcN), 4.24 (dd, 1H, $J_{\text{H9a,H9b}} = 12.5$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.7$ Hz, H9a-Sia), 4.14 - 3.94 (m, 5H, H6-Sia {4.07, dd, $J_{\text{H6,H5}} = 10.8$ Hz, $J_{\text{H6,H7}} = 1.9$ Hz}, H4-GlcN {4.02}, H9b-Sia {3.99}, H5-Sia {3.98}, H3-Gal {3.95, dd, $J_{\text{H3,H2}} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz}), 3.87 (td, 1H, $J_{\text{H2,NH}} = J_{\text{H2,H3}} = 10.1$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 8.1$ Hz, H2-GlcN), 3.77 (dd, 1H, $J_{\text{H6a,H6b}} = 11.3$ Hz, $J_{\text{H6a,H5}} = 3.5$ Hz, H6a-GlcN), 3.65 - 3.62 (m, 1H, H4-Gal), 3.53 - 3.48 (m, 2H, H6b-GlcN {3.49}, H2-Gal {3.48}), 3.42 - 3.37 (m, 1H, H5-Gal), 3.16 - 3.12 (m, 1H, H5-GlcN), 2.83 (d, 1H, $J_{\text{OH,H4}} = 5.2$ Hz, 4-OH-Gal), 2.80 - 2.74 (m, 1H, CH_2 -Lev), 2.71 (dd, 1H, $J_{\text{H3\text{äq},H3\text{ax}}} = 13.0$ Hz, $J_{\text{H3\text{äq},H4}} = 4.6$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.64 - 2.56 (m, 2H, CH_2 -Lev), 2.50 - 2.42 (m, 1H, CH_2 -Lev), 2.13 (s, 3H, CH_3 -Lev), 2.09, 2.07, 2.02, 1.94 ($4 \times$ s, 12H, CH_3 -OAc), 2.01 - 1.98 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.87 (s, 3H, CH_3 -NHAc), 1.05 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu-Si).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , HMBC, HSQC), δ (ppm): 207.3 (C=O-Lev), 172.8 (C=O-Lev), 171.3, 170.8, 170.6, 170.4, 170.0 ($5 \times$ C=O-Ac, -NHAc), 167.6 (C1-Sia), 154.3 (C=O-Troc), 138.5 ($2 \times$ C_q-Bn), 136.1, 136.0 ($2 \times$ C_q-Ph), 134.2, 133.2, 132.6, 130.1, 129.9, 129.2, 129.0, 128.8, 128.4, 127.7, 127.5 ($20 \times$ C_{Ar}-Bn, -Ph), 113.7 (t, $J_{\text{Fa,C6}} = J_{\text{Fb,C6}} = 242.1$ Hz, C6-Gal), 102.5 (C1-Gal), 98.0 (C2-Sia), 96.6 (C1-GlcN), 95.6 (CCl_3), 76.4 (C3-Gal), 75.0 (C5-GlcN), 74.9 (CH_2 -Troc), 74.6 (C4-GlcN), 73.3 (CH_2 -Bn), 73.3 (dd, $J_{\text{Fa,C5}} = 27.3$ Hz, $J_{\text{Fb,C5}} = 22.4$ Hz, C5-Gal), 73.2 (C3-GlcN), 73.1 (C6-Sia), 69.4 (C2-Gal), 68.6 (C4-Sia), 68.6 (C8-Sia), 68.6 (CH_2 -Bn), 67.6 (C6-GlcN), 67.1 (C7-Sia), 66.8 (C4-Gal), 62.3 (C9-Sia), 58.0 (C2-GlcN), 49.6 (C5-Sia), 37.9 (C3-Sia), 37.6 (CH_2 -Lev), 30.0 (CH_3 -Lev), 28.1 (CH_2 -Lev), 26.9 (CH_3 -*t*Bu-Si), 23.3 (CH_3 -NHAc), 21.3, 21.2, 20.9, 20.8, 20.7 (CH_3 -OAc), 19.2 (C_q-*t*Bu-Si).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -129.1 - -129.6 (m, 2F, F6a/b-Gal).

tert-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**101**)

(β -4-(β -Ac₂6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Spaltung der Lev-Schutzgruppe:^[225]

Eine Lösung von 1.96 g (1.29 mmol) verunreinigtem β -4-(β -6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS **97** in 30 mL einer Mischung aus Toluol/Ethanol (2:1) wurde mit 144 mg (1.56 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydrazinacetat versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 10 mL Aceton und 30 mL Wasser zugegeben und zweimal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde einmal mit 10 mL Dichlormethan kodestilliert und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

RP-HPLC: $R_t = 7.00$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

C₆₄H₇₇Cl₃F₂N₂O₂₃Si (M = 1414.74 g/mol) [1412.37].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1430.4058 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1430.4058).

Acetylierung: Der Rückstand wurde in 20 mL Pyridin aufgenommen, mit 10 mL Essigsäureanhydrid sowie 158 mg (1.29 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Anschluss im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol sowie mit 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel unter vollständiger Abtrennung von Nebenprodukten (^cHex/EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 580 mg (0.38 mmol, 18% bezogen auf **76**); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.33$ (^cHex/EtOAc, 1:2), 0.71 (EtOAc).

RP-HPLC: $R_t = 8.93$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) \rightarrow (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{23} = +9.5$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₇₀H₈₃Cl₃F₂N₂O₂₆Si (M = 1540.85 g/mol) [1538.40].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1556.4377 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1556.4375).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 7.72 - 7.67 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.63 - 7.60 (m, 2H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 7.46 - 7.18 (m, 16H, H_{Ar}-Ph, -Bn), 5.62 (td, 1H, $J_{H_6, Fa} = 55.2$ Hz, $J_{H_6, Fb} = 55.2$ Hz, $J_{H_6, H5} = 5.3$ Hz, H6-

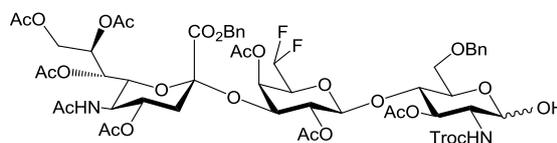
Gal), 5.46 - 5.41 (m, 2H, H8-Sia {5.45, dd, $J_{H8,H7} = 8.3$ Hz, $J_{H8,H9a} = 2.7$ Hz}, CH₂-Bn {5.44, d, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz}), 5.30 (dd, 1H, $J_{H7,H8} = 8.3$ Hz, $J_{H7,H6} = 2.8$ Hz, H7-Sia), 5.20 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.4$ Hz, H4-Gal), 5.09 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH₂-Bn), 4.96 (d, 1H, $J_{NH,H5} = 10.3$ Hz, NH-Sia), 4.91 - 4.81 (m, 4H, NH-GlcN {4.90}, H3-GlcN {4.88}, H2-Gal {4.88}, H4-Sia {4.86}), 4.83 - 4.78 (m, 2H, H1-Gal {4.81, d, $J_{H1,H2} = 7.8$ Hz}, CH_{2a}-Troc {4.80, d, $J_{CH,CH} = 11.8$ Hz}), 4.68 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.1$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, H3-Gal), 4.54 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz, CH_{2b}-Troc), 4.45 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.38 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.1$ Hz, H1-GlcN), 4.33 (dd, 1H, $J_{H9a,H9b} = 12.4$ Hz, $J_{H9a,H8} = 2.8$ Hz, H9a-Sia), 4.03 - 3.97 (m, 3H, H5-Sia {3.99}, H3-Gal {3.98} H4-GlcN {3.98}), 3.94 - 3.85 (m, 2H, H9b-Sia {3.89}, H2-GlcN {3.88}), 3.77 (dd, 1H, $J_{H5,F} = 10.8$ Hz, $J_{H5,H6} = 5.6$ Hz, H5-Gal), 3.59 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 11.4$ Hz, $J_{H6a,H5} = 4.1$ Hz, H6a-GlcN), 3.48 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 11.4$ Hz, $J_{H6b,H5} = 1.7$ Hz, H6b-GlcN), 3.43 (dd, 1H, $J_{H6,H5} = 10.7$ Hz, $J_{H6,H7} = 2.8$ Hz, H6-Sia), 3.14 - 3.09 (m, 1H, H5-GlcN {3.11}), 2.58 (dd, 1H, $J_{H3_{\text{äq}},H3_{\text{ax}}} = 12.4$ Hz, $J_{H3_{\text{äq}},H4} = 4.6$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.14, 2.08, 2.04, 2.03, 2.00, 1.97 (7 × s, 21H, CH₃-OAc), 1.62 (t, 1H, $J_{H3_{\text{ax}},H3_{\text{äq}}/H4} = 12.4$ Hz, H3_{ax}-Sia), 1.81 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.05 (s, 9H, CH₃-*t*Bu-Si).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 170.9, 170.7, 170.6, 170.5, 169.8, 169.6, 169.5, 169.4 (8 × C=O-Ac, -NHAc), 167.4 (C1-Sia), 154.4 (C=O-Troc), 138.5 (2 × C_q-Bn), 136.1, 136.0 (2 × C_q-Ph), 134.8, 133.1, 132.5, 130.2, 130.0, 129.1, 128.8, 128.4, 127.8, 127.6, 127.5 (20 × C_{Ar}-Bn, -Ph), 113.4 (t, $J_{Fa,C6} = J_{Fb,C6} = 242.8$ Hz, C6-Gal), 100.8 (C1-Gal), 97.0 (C2-Sia), 96.5 (C1-GlcN), 95.5 (CCl₃), 75.6 (C4-GlcN), 75.1 (C5-GlcN), 74.7 (CH₂-Troc), 73.6 (CH₂-Bn), 73.5 (C3-GlcN), 72.4 (C6-Sia), 72.3 (dd, $J_{Fa,C5} = 27.5$ Hz, $J_{Fb,C5} = 22.9$ Hz, C5-Gal), 71.2 (C3-Gal), 70.3 (C2-Gal), 69.4 (C4-Sia), 68.7 (CH₂-Bn), 68.3 (C8-Sia), 67.6 (C6-GlcN), 67.2 (C7-Sia), 66.3 (C4-Gal), 62.3 (C9-Sia), 58.2 (C2-GlcN), 49.0 (C5-Sia), 37.5 (C3-Sia), 26.8 (CH₃-*t*Bu-Si), 23.3 (CH₃-NHAc), 21.6, 21.1, 20.9, 20.8, 20.5 (7 × CH₃-OAc), 19.2 (C_q-*t*Bu-Si).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -127.9 (ddd, 1F, $J_{Fa,Fb} = 297.3$ Hz, $J_{Fa,H6} = 55.6$ Hz, $J_{Fa,H5} = 10.3$ Hz, F6a-Gal), -129.1 (ddd, 1F, $J_{Fb,Fa} = 297.3$ Hz, $J_{Fb,H6} = 54.8$ Hz, $J_{Fb,H5} = 6.9$ Hz, F6b-Gal).

4-O-(2,4-Di-O-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl)-3-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(N-2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)-α/β-D-glucopyranose (102)

(α/β-4-(β-Ac₂6,6F₂Gal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OH)



Zu einer Lösung von 580 mg (0.38 mmol) β-4-(β-Ac₂6,6F₂Gal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OTBDPS **101** in 30 mL Tetrahydrofuran wurden bei 0 °C gleichzeitig 6 mL (0.57 mmol, 1.5 Äquiv.) einer Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumfluorid (TBAF) in Tetrahydrofuran (ca. 0.1 M) und 6 mL (1.14 mmol, 3.0 Äquiv.) einer Mischung aus 65 µL Essigsäure und 6 mL Tetrahydrofuran innerhalb von 15 Minuten zutropft. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und die Lösung wurde nacheinander mit 25 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 25 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 25 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 340 mg (0.26 mmol, 69%); gelblicher amorpher Feststoff.

R_f = 0.11 (°Hex/EtOAc, 1:2), 0.51 (EtOAc).

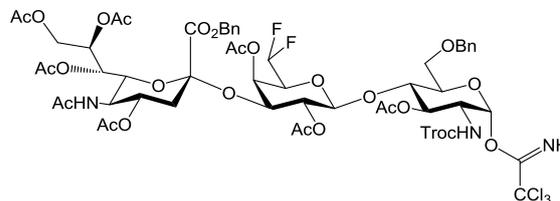
RP-HPLC: R_t = 6.68 min/7.98 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30) → (100:0) in 30 min, (100:0) in 40 min.

C₅₄H₆₅Cl₃F₂N₂O₂₆ (M = 1302.45 g/mol) [1300.29].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1318.3183 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1318.3197).

4-O-(2,4-Di-O-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-3-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-O-acetyl-6-O-benzyl-2-desoxy-2-(N-2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino)- α -D-glucopyranosyltrichloracetimidat (103)

(α -4-(β -Ac₂F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6Bn-GlcNTroc-OC(NH)CCl₃)



Eine Lösung von 340 mg (0.26 mmol) α/β -4-(β -Ac₂-6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OH **102** in 30 mL absol. Dichlormethan wurde zu 500 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) unter Argonatmosphäre gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsmischung wurden unter Eiskühlung 261 μ L (2.60 mmol, 10.0 Äquiv.) Trichloroacetonitril und vier Tropfen DBU zugegeben. Der Ansatz wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 4 h gerührt, wobei nach 2 h ein weiterer Tropfen DBU zur Vervollständigung der Reaktion zugegeben wurde. Nach beendeter Reaktion wurde mit 20 mL Dichlormethan verdünnt, das Molsieb wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt konnte flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt werden.

Ausbeute: 173 mg (0.12 mmol, 46%); gelber amorpher Feststoff.

R_f = 0.70 (^cHex/EtOAc, 1:9), 0.54 (^cHex/EtOAc, 1:4).

RP-HPLC: R_t = 5.81 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min, (100:0) in 40 min.

$[\alpha]_D^{21}$ = + 28.0 (c = 0.10, CHCl₃).

C₅₆H₆₅Cl₆F₂N₃O₂₆ (M = 1446.83 g/mol) [1443.19].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1463.2269 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1463.2265).

¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃, COSY), δ (ppm): 8.70 (s, 1H, NH-TCI), 7.46 - 7.42 (m, 3H, H_{Ar}-Bn), 7.41 - 7.30 (m, 7H, H_{Ar}-Bn), 6.40 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 3.7 Hz, H1-GlcN), 5.67 (td, 1H, $J_{H6,Fa}$ = 56.7 Hz, $J_{H6,Fb}$ = 56.7 Hz, $J_{H6,H5}$ = 6.2 Hz, H6-Gal), 5.49 (ddd, 1H, $J_{H8,H7}$ = 8.8 Hz, $J_{H8,H9b}$ = 6.0 Hz, $J_{H8,H9a}$ = 3.0 Hz, H8-Sia), 5.45 (d, 1H, $J_{CH,CH}$ = 12.0 Hz, CH₂-Bn), 5.36 (dd, 1H, $J_{H3,H2}$ = 11.0 Hz, $J_{H3,H4}$ = 9.2 Hz, H3-GlcN), 5.30 (dd, 1H, $J_{H7,H8}$ = 8.7 Hz, $J_{H7,H6}$ = 2.8 Hz, H7-Sia), 5.28 (d, 1H, $J_{NH,H2}$ = 9.2 Hz, NH-GlcN), 5.23 (dd, 1H, $J_{H4,H3}$ = 3.4 Hz, H4-Gal), 5.10 (d, 1H, $J_{CH,CH}$ = 12.0 Hz, CH₂-Bn), 5.01 (d, 1H, $J_{NH,H5}$ = 9.5 Hz, NH-Sia), 4.98 (dd, 1H, $J_{H2,H3}$ = 10.3 Hz, $J_{H2,H1}$ = 7.9 Hz, H2-Gal), 4.91 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 7.9 Hz, H1-Gal), 4.87 (ddd, 1H, $J_{H4,H3ax}$ = 12.5 Hz, $J_{H4,H5}$ = 8.5 Hz, $J_{H4,H3aq}$ = 4.5 Hz, H4-Sia), 4.72 - 4.68 (m, 3H, H3-Gal {4.72, dd, $J_{H3,H2}$ = 10.2 Hz, $J_{H3,H4}$ = 3.4 Hz}), CH₂-Troc {4.71}), 4.66 (d, 1H, $J_{CH,CH}$ = 11.8 Hz, CH₂-Bn), 4.55 (d, 1H, $J_{CH,CH}$ = 11.9 Hz, CH₂-Bn), 4.27 (dd, 1H, $J_{H9a,H9b}$ = 12.4 Hz, $J_{H9a,H8}$ = 2.8 Hz, H9a-Sia), 4.20 (t, 1H, $J_{H4,H3}$ = $J_{H4,H5}$ = 9.6 Hz, H4-GlcN), 4.15 (ddd, 1H, $J_{H2,H3}$ = 10.9 Hz, $J_{H2,NH}$ = 9.1 Hz, $J_{H2,H1}$ = 3.6 Hz, H2-GlcN), 4.04 - 3.97 (m, 2H, H5-

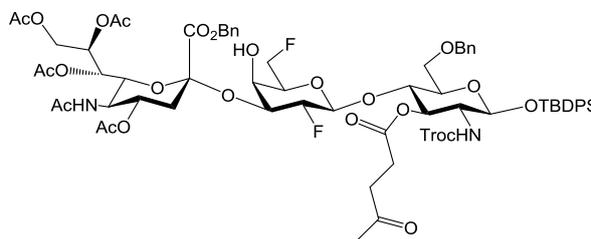
Sia {4.03}, H5-GlcN {4.00}), 3.90 (dd, 1H, $J_{H9b,H9a} = 12.5$ Hz, $J_{H9b,H8} = 6.2$ Hz, H9b-Sia), 3.84 - 3.79 (m, 2H, H6a-GlcN {3.83, dd, $J_{H6a,H6b} = 11.6$ Hz, $J_{H6a,H5} = 3.5$ Hz}, H5-Gal {3.82}), 3.75 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 11.6$ Hz, $J_{H6b,H5} = 1.8$ Hz, H6b-GlcN), 3.44 (dd, 1H, $J_{H6,H5} = 10.8$ Hz, $J_{H6,H7} = 2.8$ Hz, H6-Sia), 2.60 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 12.7$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.6$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.14, 2.13, 2.09, 2.07, 1.99, 1.97, 1.95 (7 × s, 21H, CH₃-OAc), 1.81 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.64 (t, 1H, $J_{H3ax,H3\ddot{a}q} = J_{H3ax,H4} = 12.6$ Hz, H3_{ax}-Sia).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.2, 170.8, 170.7, 170.6, 170.5, 169.8, 169.6, 169.5 (8 × C=O-Ac, -NHAc), 167.4 (C1-Sia), 161.0 (C=NH-TCl), 154.4 (C=O-Troc), 138.2 (2 × C_q-Bn), 134.8, 129.1, 128.9, 128.8, 128.5, 127.7, 127.6 (10 × C_{Ar}-Bn), 113.2 (t, $J_{Fa,C6} = J_{Fb,C6} = 244.3$ Hz, C6-Gal), 100.7 (C1-Gal), 97.0 (C2-Sia), 95.4 (CCl₃), 94.9 (C1-GlcN), 90.9 (CCl₃-TCl), 74.5 (CH₂-Troc), 74.6 (C4-GlcN), 73.4 (CH₂-Bn), 73.3 (C5-GlcN), 72.4 (dd, $J_{Fa,C5} = 27.1$ Hz, $J_{Fb,C5} = 22.6$ Hz, C5-Gal), 72.3 (C6-Sia), 71.1 (C3-Gal), 70.8 (C3-GlcN), 70.2 (C2-Gal), 69.2 (C4-Sia), 68.6 (CH₂-Bn), 67.9 (C8-Sia), 67.4 (C6-GlcN), 67.1 (C7-Sia), 66.2 (C4-Gal), 62.2 (C9-Sia), 54.3 (C2-GlcN), 48.9 (C5-Sia), 37.4 (C3-Sia), 23.2 (CH₃-NHAc), 21.6, 21.2, 20.9, 20.9, 20.8, 20.8 (7 × CH₃-OAc).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -127.9 – -129.6 (m, 2F, F6a/b-Gal).

***tert*-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(2,6-didesoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-6-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-levulinoyl-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**96**)**

(β -4-(β -2,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Es wurden 920 mg (1.37 mmol, 2.5 Äquiv.) α -Ac₄-

SiaCOOBnXan **48** in 30 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Eine Lösung von 520 mg (0.55 mmol) β -4-(β -2,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS **75** in 16 mL absol. Acetonitril und 8 mL Dichlormethan wurde zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 352 mg (1.37 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 9 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden langsam 0.86 mL (1.37 mmol, 1.0 Äquiv. bezogen auf **48**) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h unter Erwärmen auf -20 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Danach wurde weitere 30 Minuten bei -20 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde durch Hyflo[®] filtriert, mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1 → EtOAc). Eine vollständige Abtrennung des Glycals **49** war hierbei allerdings nicht möglich.

Ausbeute: 1.56 g (noch mit ca. 30% Glycal **49** verunreinigt); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.24 (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1).

RP-HPLC: R_t = 7.95 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (90:10) → (100:0) in 20 min, (100:0) in 40 min.

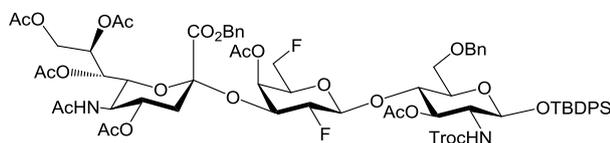
C₆₉H₈₃Cl₃F₂N₂O₂₄Si (M = 1496.84 g/mol) [1494.41].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1512.4473 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1512.4477).

Versuch zur Herstellung von

tert-Butyldiphenylsilyl-4-*O*-(4-*O*-acetyl-2,6-didesoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-(*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosid (**100**)

(β -4-(β -Ac₂,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OTBDPS)



Entsprechend Referenz^[225] wurde eine Lösung von 1.56 g (1.04 mmol) verunreinigtem β -4-(β -2,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS **97** in 60 mL einer Mischung aus Toluol/Ethanol (2:1) mit 115 mg (1.25 mmol, 1.2 Äquiv.) Hydrazinacetat versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 10 mL Aceton und 30 mL Wasser zugegeben und zweimal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde einmal mit 10 mL Dichlormethan kodestilliert, anschließend in 20 mL Pyridin aufgenommen, mit 10 mL Essigsäureanhydrid sowie 126 mg (1.04 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Anschluss im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde mit 50 mL Toluol sowie 50 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 25:1) gereinigt.

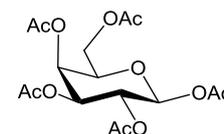
Ausbeute: Das gewünschte Produkt **100** konnte nicht erhalten werden.

5.5 Die Synthesen der Saccharid-Threonin-Konjugate

5.5.1 Synthese des Galactosamin-Bausteins (T_N-Antigen)

1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-β-D-galactopyranose (**108**)^[280]

(βAc₄GalOAc)



Es wurden 25.0 g (278 mmol, 1.0 Äquiv.) Natriumacetat in 300 mL Essigsäureanhydrid aufgenommen, unter Rückfluss erhitzt und portionsweise mit 50.0 g (278 mmol) D-Galactose (**12**) in der Siedehitze versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h erhitzt, auf 1.0 L Eiswasser gegossen und über Nacht unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde nach Filtration als farbloser Feststoff erhalten, viermal mit je 100 mL dest. Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 86.5 g (222 mmol, 80%); farbloser Feststoff.

$R_f = 0.45$ (°Hex/EtOAc, 1:1).

C₁₆H₂₂O₁₁ (M = 390.34 g/mol) [390.12].

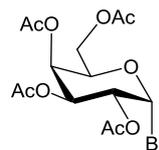
Smp.: 140 - 141 °C, Lit.:^[334] 140 °C.

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 413.11 ([M+Na]⁺, ber.: 413.11).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.69 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.3$ Hz, H1-Gal), 5.42 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.5$ Hz, H4-Gal), 5.33 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.3$ Hz, $J_{H2,H1} = 8.3$ Hz, H2-Gal), 5.07 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 10.3$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, H3-Gal), 4.20 - 4.12 (m, 2H, H6a/b-Gal), 4.05 (dd, 1H, $J_{H5,H6a/b} = 6.7$ Hz, H5-Gal), 2.16, 2.12, 2.09, 2.03, 1.99 (5 × s, 15H, CH₃-OAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6, 170.3, 170.2, 169.5, 169.1 (5 × C=O-Ac), 92.3 (C1-Gal), 71.9 (C4-Gal), 71.0 (C2-Gal), 68.0 (C3-Gal), 66.9 (C6-Gal), 61.5 (C5-Gal), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (5 × CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[334]

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosylbromid (107)**(α Ac₄GalBr)**Variante A:^[279]

In eine Lösung aus 210 mL Essigsäureanhydrid und 1.25 mL Perchlorsäure wurden portionsweise 50.0 g (278 mmol) D-Galactose (**12**) so zugegeben, dass die Temperatur 35 °C nicht überstieg. Nach 75 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurden 230 mL einer Bromwasserstoff-Lösung (33%-ig in Eisessig) zugegeben und das Gemisch wurde weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 150 mL Dichlormethan verdünnt und auf 500 mL Eiswasser gegossen. Es wurde zweimal mit je 200 mL dest. Wasser gewaschen und dreimal mit je 200 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 102.8 g (250 mmol, 90%); farbloses Öl.

Variante B:^[281]

Eine Lösung aus 75 mL Bromwasserstoff (33%-ig in Eisessig) und 15 mL Essigsäureanhydrid wurde 15 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor portionsweise 27.7 g (71.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**108**) zugegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde bei dieser Temperatur 45 Minuten gerührt, mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und auf 300 mL Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 80 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss zweimal mit je 50 mL Wasser gewaschen. Anschließend wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 26.0 g (63.2 mmol, 89%); farbloses Öl.

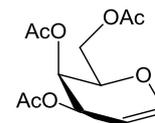
R_f = 0.70 (^cHex/EtOAc, 1:1).

C₁₄H₁₉BrO₉ (M = 411.20 g/mol) [410.02].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 428.05 ([M+NH₄]⁺, ber.: 428.05).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.57 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 4.3 Hz, H1-Gal), 5.51 (d, 1H, $J_{H4,H3}$ = 1.5 Hz, H4-Gal), 5.34 (dd, 1H, $J_{H3,H2}$ = 4.5 Hz, $J_{H3,H4}$ = 3.2 Hz, H3-Gal), 4.48 (t, 1H, $J_{H5,H6a/b}$ = 5.2 Hz, H5-Gal), 4.21 - 4.07 (m, 2H, H6a/b-Gal), 4.00 (dd, 1H, $J_{H2,H1}$ = 5.0 Hz, $J_{H2,H3}$ = 4.5 Hz, H2-Gal), 2.16, 2.06, 2.05, 2.04 (4 \times s, 12H, CH₃-OAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.5, 170.3, 169.9, 168.6 (4 \times C=O-Ac), 88.4 (C1-Gal), 71.2 (C4-Gal), 68.1 (C2-Gal), 67.7 (C3-Gal), 66.8 (C6-Gal), 60.9 (C5-Gal), 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (CH₃-OAc).

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (18)^[279]**(Ac₃Gal)**

Es wurden 164 g (2.51 mol, 13 Äquiv.) Zinkpulver mit 80 mL verd. Salzsäure (1 M) aktiviert und dreimal mit je 200 mL dest. Wasser, Methanol, Essigsäureethylester und Diethylether gewaschen und getrocknet. Das aktivierte Zink wurde in 400 mL Essigsäureethylester aufgeschlämmt und mit 20 mL (0.25 mol, 1.4 Äquiv.) *N*-Methylimidazol versetzt. Die Mischung wurde unter Rückfluss auf 80 °C erhitzt, bevor 74.8 g (0.18 mol) α -Ac₄GalBr **107**, gelöst in 300 mL Essigsäureethylester, innerhalb von 1 h zugetropft wurden. Es wurde 1 h bei dieser Temperatur gerührt, bevor die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und durch *Hyflo*[®] filtriert wurde. Die organische Phase wurde zweimal mit je 100 mL verd. Salzsäure (1 M) gewaschen und dreimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^oHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 31.7 g (116 mmol, 64%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.37$ (^oHex/EtOAc, 2:1).

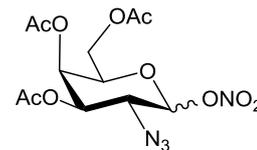
C₁₂H₁₆O₇ (M = 272.25 g/mol) [272.09].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 295.06 ([M+Na]⁺, ber.: 295.08).

¹**H-NMR** (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.46 (dd, 1H, $J_{H1,H2} = 6.3$ Hz, $J_{H1,H3} = 1.7$ Hz, H1-Gal), 5.55 (d, 1H, $J_{H3,H4} = 2.7$ Hz, H3-Gal), 5.43 - 5.41 (m, 1H, H4-Gal), 4.74 - 4.71 (m, 1H, H2-Gal), 4.31 - 4.29 (m, 1H, H5-Gal), 4.26 - 4.18 (m, 2H, H6a/b-Gal), 2.13, 2.09, 2.03 (3 \times s, 9H, CH₃-OAc).

¹³**C-NMR** (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6, 170.3, 170.2 (3 \times C=O-Ac), 145.5 (C1-Gal), 98.9 (C2-Gal), 72.7 (C5-Gal), 63.9, 63.8 (C3-Gal, C4-Gal), 62.0 (C6-Gal), 20.9, 20.8, 20.7 (CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[335]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (109)^[282]**(α/β Ac₃N₃GalONO₂)**

Es wurden 122 g (222 mmol, 3.0 Äquiv.) Cer-(IV)-ammoniumnitrat in 300 mL absol. Acetonitril gelöst und mit 9.62 g (148 mmol, 2.0 Äquiv.) Natriumazid unter Argonatmosphäre versetzt. Die Suspension wurde auf -30 °C gekühlt und mit 20.0 g (74.0 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**18**), gelöst in 90 mL absol. Acetonitril, innerhalb von 40 Minuten tropfenweise versetzt. Anschließend wurde die Suspension 16 h bei -18 °C (Tiefkühltruhe) gerührt. Die gelbe Reaktionslösung wurde mit 400 mL kaltem Essigsäureethylester verdünnt und auf 400 mL Eiswasser gegossen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde zweimal mit je 80 mL Essigsäureethylester extrahiert. Es wurde dreimal mit je 100 mL dest. Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 15.4 g (41.0 mmol, 55%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.32 (^cHex/EtOAc, 3:1).

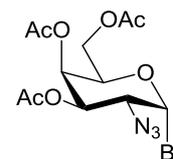
C₁₂H₁₆N₄O₁₀ (M = 376.28 g/mol) [376.09].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 399.14 ([M+Na]⁺, ber.: 399.10).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.32 (d, 1H, $J_{H1\alpha,H2\alpha} = 4.1$ Hz, H1 α -Gal), 5.55 (d, 1H, $J_{H1\beta,H2\beta} = 8.8$ Hz, H1 β -Gal), 5.47 (d, 1H, $J_{H4\alpha,H3\alpha} = 1.9$ Hz, H4 α -Gal), 5.37 (d, 1H, $J_{H4\beta,H3\beta} = 2.0$ Hz, H4 β -Gal), 5.22 (dd, 1H, $J_{H3\alpha,H2\alpha} = 11.3$ Hz, $J_{H3\alpha,H4\alpha} = 3.2$ Hz, H3 α -Gal), 4.93 (dd, 1H, $J_{H3\beta,H2\beta} = 10.6$ Hz, $J_{H3\beta,H4\beta} = 3.3$ Hz, H3 β -Gal), 4.34 (pt, 1H, H5 α -Gal), 4.17 - 3.98 (m, 4H, H2 α -Gal, H5 β -Gal, H6a/b-Gal), 3.80 (dd, 1H, $J_{H2\beta,H3\beta} = 10.7$ Hz, $J_{H2\beta,H1\beta} = 8.8$ Hz, H2 β -Gal), 2.14, 2.05, 2.00 (3 \times s, 9H, CH₃-OAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.4, 169.8, 169.6 (3 \times C=O-Ac), 88.9 (C1-Gal), 71.5 (C2-Gal), 69.9 (C5-Gal), 66.9, 66.6 (C3-Gal, C4-Gal), 59.7 (C6-Gal), 20.7, 20.6, 20.6 (CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[282]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (110)^[282]**(α Ac₃N₃GalBr)**

Zu einer Suspension aus 20.2 g (223 mmol, 8.4 Äquiv.) Lithiumbromid in 200 mL absol. Acetonitril wurden 10.0 g (26.6 mmol) α/β Ac₃N₃GalONO₂ **109**, gelöst in 100 mL absol. Acetonitril, getropft. Die Reaktionsmischung wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 200 mL Dichlormethan verdünnt. Es wurde zweimal mit je 250 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt und die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der erhaltene Rückstand flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.06 g (17.9 mmol, 68%); hellgelber, kristalliner Feststoff.

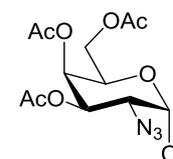
R_f = 0.68 (^cHex/EtOAc, 1:1).

C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (M = 394.18 g/mol) [394.02].

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.47 (d, 1H, $J_{H1,H2}$ = 3.8 Hz, H1-Gal), 5.50 (m, 1H, H4-Gal), 5.34 (dd, 1H, $J_{H3,H2}$ = 10.7 Hz, $J_{H3,H4}$ = 3.2 Hz, H3-Gal), 4.48 (pt, 1H, H5-Gal), 4.20 - 4.07 (m, 2H, H6a/b-Gal), 3.98 (dd, 1H, $J_{H2,H3}$ = 10.7 Hz, $J_{H2,H1}$ = 4.1 Hz, H2-Gal), 2.16, 2.06, 2.05 (3 \times s, 9H, CH₃-OAc).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.3, 169.7, 169.5 (3 \times C=O-Ac), 88.8 (C1-Gal), 71.4 (C4-Gal), 69.7 (C2-Gal), 66.4 (C3-Gal), 60.7 (C6-Gal), 58.6 (C5-Gal), 20.6, 20.6, 20.5 (CH₃-OAc).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[282]

3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylchlorid (111)^[283]**(α Ac₃N₃GalCl)**

Es wurden 28.7 g (105 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**18**) in 200 mL Acetonitril (HPLC-grade) gelöst, auf -30 °C gekühlt und mit 28.5 g (105 mmol, 1.0 Äquiv.) fein gemörsertem Eisen(III)-chlorid und 8.23 g (127 mmol, 1.2 Äquiv.) Natriumazid versetzt. Der Reaktionsmischung wurden anschließend 11.9 mL (385 mmol, 1.2 Äquiv.) Wasserstoffperoxid (33%-ige Lösung) zugesetzt und es wurde 22 h unter Erwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde in 300 mL Essigsäureethylester aufgenommen und zweimal mit je 200 mL dest. Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 100 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 23.9 g (68.3 mmol, 65%); farbloses Öl.

$R_f = 0.44$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1).

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_7$ ($M = 349.72$ g/mol) [349.07].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 367.10 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 367.10), 372.06 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 372.06).

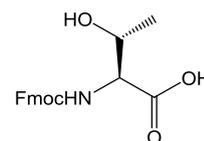
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.15 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.8$ Hz, H1-Gal), 5.49 - 5.47 (m, 1H, H4-Gal), 5.34 (dd, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 10.8$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.2$ Hz, H3-Gal), 4.51 - 4.46 (m, 1H, H5-Gal), 4.12 - 4.04 (m, 2H, H6a/b-Gal), 3.98 (dd, 1H, $J_{\text{H2,H3}} = 10.6$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 4.0$ Hz, H2-Gal), 2.14, 2.04, 2.03 ($3 \times s$, 9H, $\text{CH}_3\text{-OAc}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.5, 170.0, 169.7 ($3 \times \text{C=O-Ac}$), 92.8 (C1-Gal), 69.9 (C4-Gal), 68.9 (C2-Gal), 66.9 (C3-Gal), 60.1 (C6-Gal), 58.7 (C5-Gal), 21.1, 20.8, 20.8 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[283]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin (106)**^[275, 278]

(Fmoc-Thr-OH)



Es wurden 17.7 g (0.15 mol) L-Threonin (**105**) und 12.5 g (0.15 mol, 1.0 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat in 800 mL eines Aceton/Wasser-Gemischs (1:1) gelöst und portionsweise mit 50.0 g (0.15 mol, 1.0 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimid (Fmoc-OSu) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit konz. Salzsäure auf $\text{pH} = 2$ angesäuert. Das Aceton wurde i. Vak. entfernt und die wässrige Phase wurde dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 200 mL verd. Salzsäure (1 M) sowie mit 250 mL ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde viermal mit je 50 mL Toluol und dreimal mit je 30 mL Dichlormethan kdestilliert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 50.0 g (146 mmol, 98%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.64$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1).

$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ ($M = 341.36$ g/mol) [341.13].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 342.13 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 342.13).

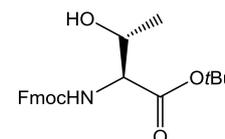
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.70 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.56 - 7.52 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.33 (t, 2H, $J_{\text{H3,H2/H4}} = J_{\text{H6,H5/H7}} = 7.4$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.19 - 7.16 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 6.07 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.1$ Hz, NH-Fmoc), 4.44 - 4.33 (m, 4H, T^α , T^β , $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.17 (t, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 6.9$ Hz, H9-Fmoc), 1.21 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ), 1.03 (bs, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 174.4 (C=O-COOH), 157.1 (C=O-Urethan), 143.7, 143.5 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2, 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 128.1, 128.1 (C3-, C6-Fmoc), 127.0, 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.0, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 119.9, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 67.8 (CH_2 -Fmoc), 67.4 (T^β), 59.9 (T^α), 46.9 (C9-Fmoc), 19.3 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[278]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin-*tert*-butylester (104)**^[141, 278]

(Fmoc-Thr-*Ot*Bu)



Eine Mischung aus 54.5 g (264 mmol, 3.0 Äquiv.) *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 26.1 g (352 mmol, 4.0 Äquiv.) *tert*-Butanol und 1.22 g (12.3 mmol, 0.14 Äquiv.) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wurde fünf Tage lang unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Die Reaktionslösung wurde daraufhin mit 100 mL absol. Dichlormethan verdünnt, auf 0 °C gekühlt und innerhalb von 1 h mit 30.0 g (88.0 mmol) Fmoc-Thr-OH **106**, gelöst in 100 mL absol. Dichlormethan, versetzt. Die Reaktionslösung wurde zunächst 1.5 h unter Eiskühlung und anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit 100 mL kaltem Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und mit 250 mL kaltem Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit je 200 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie dreimal mit je 200 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung zügig ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, i. Vak. deutlich eingeengt, abgekühlt und ausgefallener *N,N*-Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert. Es wurde erneut mit 200 mL kaltem Dichlormethan gewaschen und das Filtrat wurde i. Vak. komplett vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in ca. 30 mL Essigsäureethylester gelöst, wieder gekühlt und erneut wurde ausgefallener Harnstoff abfiltriert. Das restliche Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das erhaltene Rohprodukt konnte durch Flashchromatographie an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1 \rightarrow 2:1) gereinigt werden.

Ausbeute: 23.6 g (59.0 mmol, 67%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.59 ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 2:1).

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ (M = 397.46 g/mol) [397.19].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 415.22 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 415.22), 420.18 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 420.18).

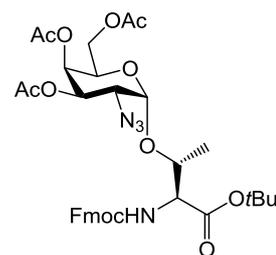
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/\text{H}_7} = 7.6$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.34 (t, 2H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1/\text{H}_3} = J_{\text{H}_7,\text{H}_6/\text{H}_8} = 1.1$ Hz, H2-, H7-Fmoc), 5.60 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}^\alpha} = 8.8$ Hz, NH-Fmoc), 4.42 (d, 2H, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 7.2$ Hz, CH_2 -Fmoc), 4.31 - 4.29 (m, 2H, T^α , T^β), 4.23 (t, 1H, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 7.3$ Hz, H9-Fmoc), 1.92 (bs, 1H, OH), 1.50 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu), 1.25 (d, 3H, $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 174.4 (C=O-Ester), 157.1 (C=O-Urethan), 143.7, 143.5 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.2, 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 128.1, 128.1 (C3-, C6-Fmoc), 127.0, 127.0 (C2-, C7-Fmoc), 125.0, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 119.9, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 83.0 (C_q -*t*Bu), 67.8 (CH_2 -Fmoc), 67.4 (T^β), 59.9 (T^α), 46.9 (C9-Fmoc), 28.1 (CH_3 -*t*Bu), 19.3 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[141, 278]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (112)^[142, 274, 336]**

(Fmoc-Thr-($\alpha\text{Ac}_3\text{N}_3\text{Gal}$)-OtBu)



Variante A:

Eine Lösung aus 7.05 g (17.7 mmol) Fmoc-Thr-OtBu **104** in 100 mL eines Gemisches aus absol. Dichlormethan/Toluol (1:1) wurde 1 h mit 16.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre gerührt. Der Suspension wurden bei 0 °C und unter Lichtausschluss 5.53 g (20.1 mmol, 1.1 Äquiv.) festes Silbercarbonat^b sowie 810 mg (3.60 mmol, 0.2 Äquiv.) Silberperchlorat^c, gelöst in 10 mL absol. Toluol, zugesetzt. Es wurde weitere 30 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor bei dieser Temperatur innerhalb von 1.5 h eine Lösung aus 7.06 g (17.9 mmol, 1.0 Äquiv.) $\alpha\text{Ac}_3\text{N}_3\text{GalBr}$ **110** in einem Gemisch aus 160 mL absol. Dichlormethan und Toluol (1:1) zugetropft wurde. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 24 h gerührt. Es wurde mit 200 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und das Filtrat wurde zweimal mit je 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie mit 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 7.02 g (9.88 mmol, 56%); farbloser amorpher Feststoff.

Variante B:

Eine Lösung aus 13.1 g (32.9 mmol) Fmoc-Thr-OtBu **104** in 120 mL eines Gemisches aus absol. Dichlormethan/Toluol (1:1) wurde 1 h mit 20.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) bei Raumtemperatur und unter Argonatmosphäre gerührt. Der Suspension wurden bei 0 °C und Lichtausschluss 10.9 g (39.5 mmol, 1.2 Äquiv.) festes Silbercarbonat^b sowie 1.50 g (6.60 mmol, 0.2 Äquiv.) Silberperchlorat^c gelöst in 12 mL absol. Toluol, zugesetzt. Es wurde weitere 30 Minuten bei 0 °C gerührt, bevor bei dieser Temperatur innerhalb von 1 h eine Lösung aus 11.5 g (32.9 mmol, 1.0 Äquiv.) $\alpha\text{Ac}_3\text{N}_3\text{GalCl}$ **111** in einem Gemisch aus 100 mL absol. Dichlormethan/Toluol (1:1) zugetropft wurde. Die Reaktionsmischung wurde unter Erwärmen

^b Wurde einige Stunden im Vakuum getrocknet

^c Silberperchlorat Monohydrat wurde mehrfach mit absol. Toluol kodestilliert

auf Raumtemperatur 24 h gerührt. Es wurde mit 200 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und das Filtrat wurde zweimal mit je 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/EtOAc, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 15.2 g (21.4 mmol, 65%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.59 (CH₂Cl₂/EtOAc, 10:1).

$[\alpha]_D^{23} = + 64.6$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209, 336] $[\alpha]_D^{23} = + 69.3$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₃₅H₄₂N₄O₁₂ (M = 710.73 g/mol) [710.28].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 728.31 ([M+NH₄]⁺, ber.: 728.31), 733.27 ([M+Na]⁺, ber.: 733.27).

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 728.3136 ([M+NH₄]⁺, ber.: 728.3138).

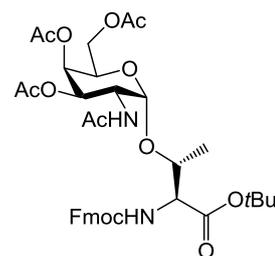
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.42 - 7.31 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 5.65 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.5$ Hz, NH-Fmoc), 5.47 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 2.5$ Hz, H4-GalN), 5.34 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 11.3$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.2$ Hz, H3-GalN), 5.11 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, H1-GalN), 4.46 - 4.42 (m, 1H, T^β), 4.42 - 4.33 (m, 2H, H6a/b-GalN), 4.32 - 4.26 (m, 3H, T^α, H5-GalN, H9-Fmoc), 4.10 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 2.4$ Hz, CH₂-Fmoc), 3.64 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 11.2$ Hz, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, H2-GalN), 2.15, 2.08, 2.05 (3 × s, 9H, CH₃-OAc), 1.50 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.36 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.5$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.3, 170.0, 169.8, 169.2 (4 × C=O-Ac, -Ester), 156.8 (C=O-Urethan), 143.8, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.7, 127.7 (C3-, C6-Fmoc), 127.1, 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.3, 125.3 (C1-, C8-Fmoc), 119.9, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 99.2 (C1-GalN), 82.9 (C_q-*t*Bu), 76.4 (T^β), 68.0 (C3-GalN), 67.5 (C4-GalN, CH₂-Fmoc), 67.0 (C5-GalN), 61.8 (C6-GalN), 59.2 (T^α), 57.7 (C2-GalN), 47.1 (C9-Fmoc), 28.0 (CH₃-*t*Bu), 20.7, 20.6, 20.6 (CH₃-OAc), 18.9 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[145, 290]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (113)^[290]**

(Fmoc-Thr-(α Ac₃GalNAc)-OtBu)



Es wurden 20.4 g (312 mmol, 15.0 Äquiv.) Zinkpulver durch Aufschlämmen in verd. Kupfersulfat-Lösung (15.6 g, 62.4 mmol, 0.2 Äquiv. CuSO₄ × 5 H₂O, gelöst in 200 mL Wasser) aktiviert, dreimal mit je 100 mL Wasser gewaschen und zweimal mit je 100 mL Methanol sowie Diethylether getrocknet. In 400 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (3:2:1) wurden 14.8 g (20.8 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₃N₃Gal)-OtBu **112** gelöst. Zu dieser Lösung wurde das aktivierte Zink gegeben und das Reaktionsgemisch wurde 3 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 300 mL Tetrahydrofuran verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und mit 200 mL Tetrahydrofuran gewaschen. Die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Um verbliebene Reste der Essigsäure zu entfernen, wurde im Anschluss noch viermal mit je 30 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde in 250 mL Dichlormethan gelöst, dreimal mit je 150 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt und mit 200 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:2) gereinigt.

Ausbeute: 9.00 g (12.5 mmol, 60%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.26$ (^cHex/EtOAc, 1:2).

$[\alpha]_D^{23} = +50.1$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[336] $[\alpha]_D^{23} = +61.3$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (M = 726.77 g/mol) [726.30].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 671.28 ([M-*t*Bu+H]⁺, ber.: 671.25), 727.34 ([M+H]⁺, ber.: 727.31), 749.33 ([M+Na]⁺, ber.: 749.29).

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 727.3078 ([M+H]⁺, ber.: 727.3078), 744.3345 ([M+NH₄]⁺, ber.: 744.3338).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 6.9$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.64 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.0$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43 - 7.33 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.07 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 10.2$ Hz, NH-Fmoc), 5.68 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.4$ Hz, NH-GalN), 5.38 (d, 1H, $J_{H_4,H_3} = 3.2$ Hz, H4-GalN), 5.11 (dd, 1H, $J_{H_3,H_2} = 11.4$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 3.2$ Hz, H3-GalN), 4.89 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.7$ Hz, H1-GalN), 4.66 - 4.58 (m, 1H, H2-GalN), 4.48 - 4.43 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.29 - 4.13 (m, 6H, H9-Fmoc, H5-GalN, H6a/b-GalN, T ^{α} , T ^{β}), 2.17 (s, 3H, CH₃-OAc), 2.04 (s, 3H, CH₃-NHAc), 2.00 (2 × s, 6H, CH₃-OAc), 1.46 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.33 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

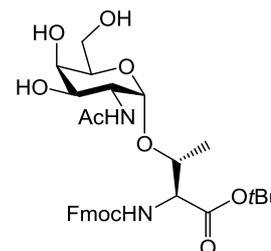
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6, 170.4, 170.4, 170.4, 170.1 (5 × C=O-Ac, -NHAc, -Ester), 156.6 (C=O-Urethan), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8, 127.6 (C3-, C6-Fmoc), 127.1, 127.1 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 99.9

(C1-GalN), 83.3 (C₄-*t*Bu), 77.2 (T^β), 68.7 (C3-GalN), 67.7 (C4-GalN), 67.4 (C5-GalN), 67.3 (CH₂-Fmoc), 62.1 (C6-GalN), 59.0 (T^α), 47.3, 47.2 (C2-, C9-Fmoc), 28.1 (CH₃-*t*Bu), 23.1 (CH₃-NHAc), 20.8, 20.7, 20.6 (CH₃-OAc), 18.6 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[290]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (114)^[144]**

(Fmoc-Thr-(α GalNAc)-OtBu)



In 100 mL Methanol (HPLC-grade) wurden 9.00 g (12.5 mmol) Fmoc-Thr-(α Ac₃NAcGal)-OtBu **112** gelöst und so lange mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Der pH-Wert wurde jede halbe Stunde kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe von weiterer methanolischer Natriummethanolat-Lösung nachreguliert. Nach 16 h wurde die Reaktionslösung durch Zusatz von Essigsäure (1 M) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 30 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 120 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 5.06 g (15.0 mmol, 1.2 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimid versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit DIPEA auf 9.5 eingestellt und die Mischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit saurem Ionentauscher *Amberlyst IR 120* neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1).

Ausbeute: 5.11 g (8.51 mmol, 68%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.23$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

$[\alpha]_D^{23} = +39.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[142] $[\alpha]_D^{23} = +40.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₃₁H₄₀N₂O₁₀ (M = 600.66 g/mol) [600.27].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 601.27 ([M+H]⁺, ber.: 601.28), 623.25 ([M+Na]⁺, ber.: 623.26).

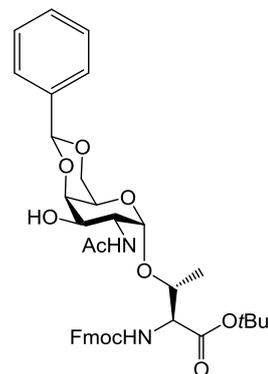
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.61 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.42 - 7.30 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.92 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.3$ Hz, NH-GalN), 5.84 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 4.87 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 2.9$ Hz, H1-GalN), 4.53 - 4.37 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.32 - 4.23 (m, 2H, H2-GalN, H9-Fmoc), 4.19 - 4.07 (m, 3H, H4-GalN, T^α, T^β), 3.93 - 3.82 (m, 4H, H3-GalN, H5-GalN, H6a/b-GalN), 2.08 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.25 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 1.7$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 176.2, 174.2 ($2 \times \text{C}=\text{O-NHAc}$, -Ester), 156.9 ($\text{C}=\text{O-Urethan}$), 144.1, 144.0 (C1a- , C8a-Fmoc), 141.7, 141.7 (C4a- , C5a-Fmoc), 128.1, 128.1 (C3- , C6-Fmoc), 127.4, 127.4 (C2- , C7-Fmoc), 125.4, 125.4 (C1- , C8-Fmoc), 120.4, 120.4 (C4- , C5-Fmoc), 99.9 (C1-GalN), 83.7 ($\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$), 76.9 (T^β), 70.3, 70.0 (C3-GalN , C5-GalN), 67.5 (C4-GalN), 62.9 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 60.7 (C6-GalN), 59.3 (T^α), 51.1 (C2-GalN), 47.5 (C9-Fmoc), 28.4 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$), 23.2 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 19.2 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[227]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (115)^[144]**

(Fmoc-Thr-(α 4,6-BznGalNAc)-*O*tBu)



Zu einer Lösung von 5.11 g (8.51 mmol) Fmoc-Thr-(α GalNAc)-*O*tBu **114** in 100 mL absol. Acetonitril wurden 2.55 mL (17.0 mmol, 2.0 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal zugegeben und es wurde mit *para*-Toluolsulfonsäure der pH-Wert auf 4 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde anschließend 4 h bei 40 °C und 200 mbar am Rotationsverdampfer gerührt und durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 4.22 g (6.13 mmol, 72%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.30 ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:2).

$[\alpha]_D^{23} = +61.9$ ($c = 1.00$, CHCl_3), Lit.:^[144] $[\alpha]_D^{23} = +64.4$ ($c = 1.00$, CHCl_3).

$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}$ ($M = 688.76$ g/mol) [688.33].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 689.31 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 689.31), 711.29 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 711.29).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.54 - 7.50 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.44 - 7.31 (m, 7H, H2-, H7-Fmoc, $\text{H}_{\text{Ar-Bzn}}$), 6.53 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 8.5$ Hz, NH-GalN), 5.54 (s, 1H, CH-Bzn), 5.50 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Fmoc), 4.96 (d, 1H, $J_{\text{H1,H2}} = 3.4$ Hz, H1-GalN), 4.55 - 4.43 (m, 3H, H2-GalN, H6a/b-GalN), 4.28 - 4.26 (m, 2H, T^α , H9-Fmoc), 4.23 - 4.15 (m, 4H, H4-GalN, T^β , $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 3.88 (d, 1H, $J_{\text{H3,H2}} = 11.0$ Hz, H3-GalN), 3.72 (s, 1H, H5-GalN), 2.04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 1.47 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$), 1.24 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 2.7$ Hz, T^γ).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 172.9, 171.5 ($2 \times \text{C}=\text{O-NHAc}$, -Ester), 156.8 ($\text{C}=\text{O-Urethan}$), 144.0, 143.9 (C1a- , C8a-Fmoc), 141.7, 141.6 (C4a- , C5a-Fmoc), 137.8 ($\text{C}_q\text{-Bzn}$), 129.4, 128.5 ($3 \times \text{C}_{\text{Ar-Bzn}}$), 128.2,

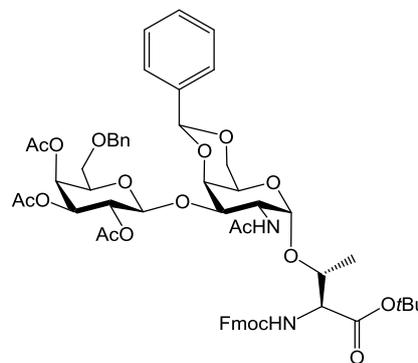
128.1 (C3-, C6-Fmoc), 127.4, 127.4 (C2-, C7-Fmoc), 126.7 ($2 \times C_{Ar}$ -Bzn), 125.4, 125.4 (C1-, C8-Fmoc), 120.3, 120.3 (C4-, C5-Fmoc), 101.3 (CH-Bzn), 100.7 (C1-GalN), 83.6 (C_q -*t*Bu), 76.9 (T^{β}), 75.8 (C4-GalN), 70.0 (C3-GalN), 69.5 (CH_2 -Fmoc), 67.5 (C6-GalN), 64.0 (C5-GalN), 59.2 (T^{α}), 50.7 (C2-GalN), 47.5 (C9-Fmoc), 28.4 (CH_3 -*t*Bu), 23.3 (CH_3 -NHAc), 19.3 (T^{γ}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[290]

5.5.2 Synthese der Disaccharid-Threonin-Konjugate

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (**116**)^[144]

(Fmoc-Thr-(β -Ac₃BnGal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-*Ot*Bu)



Es wurden 2.41 g (3.49 mmol) T_N -Akzeptor **115** und 2.83 g (5.24 mmol, 1.5 Äquiv.) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**17**) in 120 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 6.20 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Suspension wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf -78 °C gekühlt. Zu dieser gekühlten Reaktionslösung wurden 95 μ L (0.52 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **17**) TMSOTf gegeben und es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 18 h gerührt. Es wurde mit 60 mL Dichlormethan verdünnt, durch Zugabe von DIPEA neutralisiert und dreimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (c Hex/EtOAc, 1:1).

Ausbeute: 2.27 g (2.13 mmol, 61%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.25 (c Hex/EtOAc, 1:1).

$[\alpha]_D^{22} = +61.8$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$), Lit.:^[290] $[\alpha]_D^{28} = +62.9$ ($c = 1.00$, $CHCl_3$).

$C_{57}H_{66}N_2O_{18}$ ($M = 1067.15$ g/mol) [1066.43].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 1067.4374 ($[M+H]^+$, ber.: 1067.4389), 1084.4635 ($[M+NH_4]^+$, ber.: 1084.4649), 1089.4197 ($[M+Na]^+$, ber.: 1089.4203).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , COSY, HSQC), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.7$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_7,\text{H}_8} = 7.6$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.58 - 7.51 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.46 - 7.22 (m, 12H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$, -Bzn, H2-, H7-Fmoc), 6.44 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 9.1$ Hz, NH-GalN), 6.17 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}^\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 5.52 (s, 1H, CH-Bzn), 5.43 (d, 1H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 3.5$ Hz, H4-Gal'), 5.20 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 10.5$ Hz, $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 7.9$ Hz, H2-Gal'), 5.02 - 4.92 (m, 2H, H3-Gal' {5.00}, H1-GalN {4.94}), 4.73 - 4.62 (m, 2H, H1-Gal' {4.70}, H2-GalN {4.68}), 4.57 - 4.39 (m, 4H, CH_2 -Fmoc {4.48}, CH_2 -Bn {4.38}), 4.36 - 4.15 (m, 5H, H4-GalN {4.28}, H9-Fmoc {4.25}, T^α {4.21}, T^β {4.19}, H6a-GalN {4.18}), 3.95 - 3.88 (m, 3H, H6b-GalN {3.91}, H5-Gal' {3.88}, H3-GalN {3.85}), 3.64 - 3.48 (m, 3H, H5-GalN {3.62}, H6a-Gal' {3.57}, H6b-Gal' {3.50}), 2.06, 2.03, 1.97 ($3 \times$ s, 9H, CH_3 -OAc), 2.02 (s, 3H, CH_3 -NHAc), 1.45 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu), 1.25 (d, 3H, $J_{\text{T}^\gamma,\text{T}^\beta} = 6.5$ Hz, T^γ).

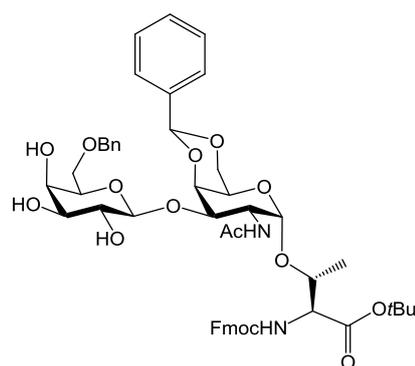
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 175.9, 171.3, 170.5, 170.3, 169.6 ($5 \times$ C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 156.6 (C=O-Urethan), 144.0, 143.9 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5, 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.0, 137.6 ($2 \times$ C_q -Bn, -Bzn), 128.9, 128.7, 128.6, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9 ($10 \times$ C_{Ar} -Bn, -Bzn, C2-, C7-Fmoc), 126.4, 126.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.3, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 101.7 (C1-Gal'), 100.6 (CH-Bzn), 100.5 (C1-GalN), 83.3 (C_q -*t*Bu), 76.2 (T^β), 75.6 (C4-GalN), 67.7 (C4-Gal'), 74.8 (C3-GalN), 73.7 (CH_2 -Bn), 71.3 (C3-Gal'), 72.3 (C5-Gal'), 69.1 (C6-GalN), 69.0 (C2-Gal'), 68.1 (C6-Gal'), 67.0 (CH_2 -Fmoc), 63.8 (C5-GalN), 59.1 (T^α), 48.0 (C2-GalN), 47.3 (C9-Fmoc), 28.2 (CH_3 -*t*Bu), 23.2 (CH_3 -NHAc), 21.2, 20.8, 20.7 (CH_3 -OAc), 19.1 (T^γ).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[144, 290]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (117)^[144]**

(Fmoc-Thr-(β -BnGal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-*Ot*Bu)**

In 60 mL Methanol (HPLC-grade) wurden 2.27 g (2.13 mmol) Fmoc-Thr-(β -Ac₃BnGal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-Bzn-GalNAc)-*O**t*Bu **116** gelöst und unter Argonatmosphäre so lange mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt bis ein pH-Wert von 8.5 eingestellt wurde. Der pH-Wert wurde jede halbe



Stunde kontrolliert und durch Zugabe von weiterer Natriummethanolat-Lösung nachreguliert. Nach 18 h wurde die Reaktionslösung durch Zusatz von Essigsäure (1 M) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 40 mL Toluol und zweimal mit je 25 mL Dichlormethan destilliert. Das Rohprodukt wurde anschließend in 100 mL einer Mischung aus absol. 1,4-Dioxan/Wasser (1:1) gelöst und mit 863 mg (2.56 mmol, 1.2 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimid (Fmoc-OSu) versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von *N*-Methylmorpholin (NMM) auf 9.5 eingestellt und die Mischung 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit verd.

Salzsäure (1 M) auf pH = 6 angesäuert und das Dioxan wurde i. Vak. entfernt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert, zweimal mit je 100 mL verd. Salzsäure (1 M) und Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 1.85 g (1.97 mmol, 92%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.43 (Toluol/EtOH, 4:1), 0.08 (EtOAc), 0.53 (EtOAc/EtOH, 10:1).

$[\alpha]_D^{21} = +74.9$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[290] $[\alpha]_D^{28} = +67.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₁H₆₀N₂O₁₅ (M = 941.04 g/mol) [940.40].

ESI-MS (positiv) m/z: 941.41 ([M+H]⁺, ber.: 941.41), 958.43 ([M+NH₄]⁺, ber.: 958.43).

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 941.4057 ([M+H]⁺, ber.: 941.4072), 958.4320 ([M+NH₄]⁺, ber.: 958.4332).

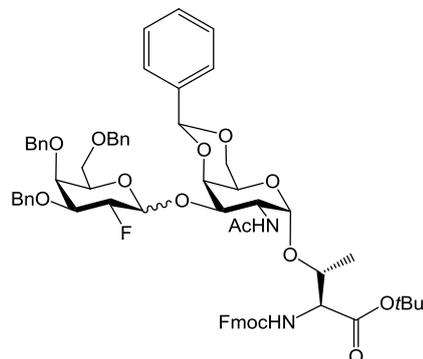
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.78 - 7.73 (m, 2H, H₄-, H₅-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H7,H8} = 7.3$ Hz, H₁-, H₈-Fmoc), 7.51 - 7.47 (m, 2H, H₃-, H₆-Fmoc), 7.39 (t, 2H, $J_{H2,H1} = J_{H7,H8} = 7.2$ Hz, H₂-, H₇-Fmoc), 7.33 - 7.22 (m, 10H, H_{Ar}-Bn, -Bzn), 6.69 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.6$ Hz, NH-GalN), 6.14 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 10.0$ Hz, NH-Fmoc), 5.43 (s, 1H, CH-Bzn), 4.91 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.6$ Hz, H₁-GalN), 4.59 (td, 1H, $J_{H2,H3} = J_{H2,NH} = 10.6$ Hz, $J_{H1,H2} = 3.6$ Hz, H₂-GalN), 4.55 - 4.43 (m, 4H, CH₂-Bn {4.51, 4.49}, CH₂-Fmoc {4.46}), 4.36 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.2$ Hz, H₄-GalN), 4.29 - 4.18 (m, 4H, H₁-Gal' {4.26}, H₉-Fmoc {4.24}, T ^{α} {4.23}, T ^{β} {4.20}), 4.11 - 4.06 (m, 1H, H_{6a}-GalN), 3.89 - 3.79 (m, 2H, H₃-GalN {3.86}, H_{6b}-GalN {3.81}), 3.75 - 3.70 (m, 1H, H_{6a}-Gal'), 3.63 - 3.52 (m, 5H, H₅-GalN {3.60}, H₄-Gal' {3.60}, H_{6b}-Gal' {3.59}, H₂-Gal' {3.59}, H₅-Gal' {3.54}), 3.33 (dt, $J_{H3,H2} = 9.7$ Hz, $J_{H3,H4} = 2.4$ Hz, H₃-Gal'), 2.90 (bs, 3H, OH-Gal'), 2.00 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.42 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.25 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.5$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 172.5, 170.4 (2 \times C=O-NHAc, -Ester), 156.9 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C_{1a}-, C_{8a}-Fmoc), 141.4, 141.3 (C_{4a}-, C_{5a}-Fmoc), 138.2, 137.7 (2 \times C_q-Bn, -Bzn), 129.1, 129.0 (C₂-, C₇-Fmoc), 128.5, 128.3, 127.9, 127.8, 126.8 (10 \times C_{Ar}-Bn, -Bzn, C₃-, C₆-Fmoc), 125.2, 125.1 (C₁-, C₈-Fmoc), 120.1, 120.0 (C₄-, C₅-Fmoc), 105.4 (C₁-Gal'), 101.2 (CH-Bzn), 100.7 (C₁-GalN), 83.2 (C_q-*t*Bu), 76.8 (C₃-GalN), 76.2 (T ^{β}), 75.9 (C₄-GalN), 73.8 (C₅-Gal'), 73.6 (CH₂-Bn), 73.4 (C₃-Gal'), 70.7 (C₂-Gal'), 70.2 (C₆-Gal'), 69.1 (C₄-Gal'), 69.1 (C₆-GalN), 67.1 (CH₂-Fmoc), 63.6 (C₅-GalN), 59.3 (T ^{α}), 48.2 (C₂-GalN), 47.3 (C₉-Fmoc), 28.1 (CH₃-*t*Bu), 23.3 (CH₃-NHAc), 19.3 (T ^{γ}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[290]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α/β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester**
(119)^[173, 209]

(Fmoc-Thr-(α/β -Bn₃2FGal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-OtBu)



Es wurden 400 mg (0.58 mmol) T_N-Akzeptor **115** und 450 mg (0.75 mmol) 3,4,6-Tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**21**) in 40 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 680 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Suspension wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf -20 °C gekühlt. Zu dieser Reaktionslösung wurden 17 μ L (0.09 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **21**) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) gegeben und es wurde unter Erwärmen auf Raumtemperatur 28 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 60 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde dreimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 80 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:1). Durch analytische RP-HPLC konnte ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:10$ bestimmt werden.

Ausbeute: 416 mg (0.37 mmol, 63%); farbloser amorpher Feststoff.

α : $R_f = 0.67$, β : $R_f = 0.60$ (^cHex/EtOAc, 1:1).

RP-HPLC: α : $R_t = 23.5$ min, β : $R_t = 21.1$ min, Jupiter C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH:H₂O (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

α -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = +94.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃), **β -Anomer:** $+39.8$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₆₅H₇₁FN₂O₁₄ (M = 1123.26 g/mol) [1122.49].

ESI-MS (positiv) m/z : 1145.48 ([M+Na]⁺, ber.: 1145.48), 1161.45 ([M+K]⁺, ber.: 1161.45).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): **α -Anomer:** 7.79 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 8.3$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.76 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.6$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.65 - 7.58 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.54 (t, 2H, $J_{H_2,H_1} = J_{H_7,H_8} = 7.7$ Hz, H2-, H7-Fmoc), 7.44 - 7.21 (m, 20H, H_A-Bn, -Bzn), 6.23 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.7$ Hz, NH-GalN), 5.59 (s, 1H, CH-Bzn), 5.54 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.5$ Hz, NH-Fmoc), 5.17 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.9$ Hz, H1-Gal'), 4.99 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.2$ Hz, H1-GalN), 4.96 (ddd, 1H, $J_{H_2,F} = 51.0$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.5$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.6$ Hz, H2-Gal'), 4.88 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.77 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz, CH₂-Bn), 4.70 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.63 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.6$ Hz, CH₂-Bn), 4.62 (td, 1H, $J_{H_2,H_3} = J_{H_2,NH} = 10.0$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.4$ Hz, H2-GalN), 4.52 - 4.50 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.51 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.35 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz, CH₂-Bn), 4.30 - 4.17 (m, 5H, H3-Gal' {4.29}, H4-GalN {4.28}, H6 α -Gal' {4.25}, T ^{α} {4.22}, H9-Fmoc {4.19}), 4.11 - 4.00 (m, 4H, H6 β -Gal' {4.11}, T ^{β} {4.07}, H5-Gal' {4.06}, H4-

Gal' {4.04}), 3.80 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 11.5$ Hz, $J_{H3,H4} = 4.5$ Hz, H3-Gal), 3.69 (s, 1H, H5-Gal), 3.51 (dd, 1H, $J_{H6a,H6b} = 9.4$ Hz, $J_{H6a,H5} = 6.5$ Hz, H6a-GalN), 3.35 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 9.8$ Hz, $J_{H6b,H5} = 5.2$ Hz, H6b-GalN), 1.99 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.46 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.29 (d, 3H, $J_{T\gamma,TP} = 6.4$ Hz, T^γ).

β-Anomer: 7.89 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 6.7$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.80 - 7.77 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.67 - 7.61 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.54 (t, 2H, $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.7$ Hz, H2-, H7-Fmoc), 7.43 - 7.25 (m, 20H, H_{Ar}-Bn, -Bzn), 5.58 - 5.47 (m, 2H, NH-Fmoc, CH-Bzn), 5.03 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.3$ Hz, H1-GalN), 4.89 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.9$ Hz, CH₂-Bn), 4.80 - 4.69 (m, 3H, H2-Gal' {4.82}, CH₂-Bn {4.81}, H2-GalN {4.78}), 4.76 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.66 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz, CH₂-Bn), 4.55 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.62 - 4.52 (m, 2H, CH₂-Bn {4.60}, H1-Gal' {4.57}), 4.55 - 4.50 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.44 - 4.37 (m, 2H, CH₂-Bn), 4.31 - 4.08 (m, 5H, H4-GalN {4.27}, T^α {4.22}, T^β {4.20}, H9-Fmoc {4.17}, H6a-Gal' {4.15, d, $J_{H6a,H6b} = 12.9$ Hz}), 3.95 - 3.85 (m, 3H, H6b-Gal' {3.94, d, $J_{H6b,H6a} = 13.1$ Hz}, H4-Gal' {3.90}, H4-GalN {3.87}), 3.72 (dd, 1H, $J_{H3,H2} = 11.5$ Hz, $J_{H3,H4} = 4.1$ Hz, H3-GalN), 3.63 - 3.45 (m, 5H, H5-Gal' {3.62}, H6a/b-GalN {3.57, 3.50}, H5-GalN {3.60}, H3-Gal' {3.49}), 2.05 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.28 (d, 3H, $J_{T\gamma,TP} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): **α-Anomer:** 170.3, 170.2 (2 × C=O-NHAc, -Ester), 156.6 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.2 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.4, 138.1, 137.7, 137.3 (4 × C_q-Bn, -Bzn), 129.9, 129.1 (C2-, C7-Fmoc), 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 128.2, 128.0, 127.8, 127.7, 127.2 (20 × C_{Ar}-Bn, -Bzn), 126.2, 126.0 (C3-, C6-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 100.8 (CH-Bzn), 100.3 (C1-GalN), 94.8 (d, $J_{C1,F} = 21.8$ Hz, C1-Gal'), 88.3 (d, $J_{C2,F} = 186.0$ Hz, C2-Gal'), 83.2 (C_q-*t*Bu), 76.6 (T^β), 75.3 ($J_{C4,F} = 8.9$ Hz, C4-Gal'), 75.0 (C3-GalN), 74.9, 73.8, 73.7 (CH₂-Bn), 73.5 (d, $J_{C3,F} = 22.7$ Hz, C3-Gal'), 73.3 (C4-GalN), 70.7 (C5-Gal'), 67.5 (C6-Gal'), 67.4 (CH₂-Fmoc), 67.3 (C6-GalN), 63.6 (C5-GalN), 59.1 (T^α), 47.9 (C2-GalN), 47.3 (C9-Fmoc), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 23.3 (CH₃-NHAc), 19.2 (T^γ).

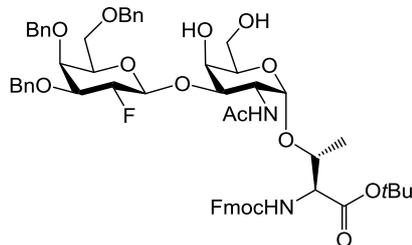
β-Anomer: 170.2 (2 × C=O-NHAc, -Ester), 156.6 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.0, 137.9, 137.7, 136.5 (4 × C_q-Bn, -Bzn), 129.8, 129.1 (C2-, C7-Fmoc), 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.1, 127.9, 127.9, 127.8 (20 × C_{Ar}-Bn, -Bzn), 126.5, 126.5 (C3-, C6-Fmoc), 125.2, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 102.5 (d, $J_{C1,F} = 22.6$ Hz, C1-Gal'), 100.3 (CH-Bzn), 100.2 (C1-GalN), 91.4 (d, $J_{C2,F} = 184.2$ Hz, C2-Gal'), 83.2 (C_q-*t*Bu), 80.0 ($J_{C3,F} = 15.8$ Hz, C3-Gal'), 76.7 (C3-GalN), 76.6 (T^β), 74.9 (CH₂-Bn), 74.0 (d, $J_{C4,F} = 15.0$ Hz, C4-Gal'), 73.7 (C5-GalN), 69.8 (C5-Gal'), 68.7 (C6-Gal'), 67.1 (CH₂-Fmoc), 67.1 (C6-GalN), 59.2 (T^α), 47.8 (C2-GalN), 47.3 (C9-Fmoc), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 23.2 (CH₃-NHAc), 19.0 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer:** -207.7 (ddd, $J_{F,H2} = 50.5$ Hz, $J_{F,H3} = 9.7$ Hz, $J_{F,H1} = 4.2$ Hz, F2-Gal'), **β-Anomer:** -204.4 (dd, $J_{F,H2} = 48.9$ Hz, $J_{F,H3} = 12.4$ Hz, F2-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[173, 209]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (120)**

(Fmoc-Thr-(β Bn₃2FGal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-OtBu)



Entsprechend Referenz^[290] wurden 320 mg (0.28 mmol) Fmoc-Thr-(β Bn₃2FGal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-OtBu **119** in 20 mL 80%iger Essigsäure aufgenommen und 1 h bei einer Temperatur von 80 °C gerührt. Der Reaktionsmischung wurden 20 mL Toluol zugefügt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde weitere dreimal mit je 20 mL Toluol sowie 30 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 220 mg (0.21 mmol, 71%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.50 (^cHex/EtOAc, 1:10).

RP-HPLC: *R_t* = 18.4 min, Jupiter C18, λ = 214 nm, Grad.: MeOH:H₂O (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23}$ = + 40.7 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23}$ = + 33.4 (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₈H₆₇FN₂O₁₄ (M = 1035.16 g/mol) [1034.46].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 1035.46 ([M+H]⁺, ber.: 1035.46), 1057.46 ([M+Na]⁺, ber.: 1057.45), 1073.44 ([M+K]⁺, ber.: 1073.42).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.89 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 6.8$ Hz, H₄-, H₅-Fmoc), 7.78 - 7.75 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc), 7.67 - 7.62 (m, 2H, H₃-, H₆-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H_2,H_1/H_3} = J_{H_7,H_6/H_8} = 7.6$ Hz, H₂-, H₇-Fmoc), 7.36 - 7.27 (m, 15H, H_{Ar}-Bn), 5.55 - 5.50 (m, 1H, NH-Fmoc), 4.90 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 4.0$ Hz, H₁-GalN), 4.90 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.82 - 4.71 (m, 1H, H₂-Gal'), 4.77 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.67 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz, CH₂-Bn), 4.63 - 4.58 (m, 1H, H₂-GalN), 4.55 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.50 - 4.44 (m, 3H, H₁-Gal' {4.50}, CH₂-Fmoc {4.47}), 4.41 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.27 (t, 1H, $J_{CH,CH} = 6.9$ Hz, H₉-Fmoc), 4.25 - 4.09 (m, 3H, H₄-GalN {4.24}, T ^{α} {4.22}, T ^{β} {4.15}), 3.92 - 3.85 (m, 1H, H₄-Gal' {3.90}), 3.85 - 3.77 (m, 1H, H₅-GalN), 3.74 - 3.65 (m, 2H, H_{6a/b}-GalN {3.74, 3.70}), 3.72 (dd, 1H, $J_{H_3,H_2} = 11.7$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 4.5$ Hz, H₃-GalN), 3.61 - 3.54 (m, 3H, H₃-Gal' {3.59}, H₅-Gal' {3.57}, H_{6a}-Gal' {3.56}), 3.50 - 3.46 (m, 1H, H_{6b}-Gal' {3.48}), 2.03 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.28 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 170.0 (2 \times C=O-NHAc, -Ester), 156.4 (C=O-Urethan), 143.7, 143.6 (C_{1a}-, C_{8a}-Fmoc), 141.2, 141.2 (C_{4a}-, C_{5a}-Fmoc), 137.8, 137.7, 137.4 (3 \times C_q-Bn), 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 127.7, 127.6, 127.4, 127.8, 127.0 (15 \times C_{Ar}-Bn, C₂-, C₃-, C₆-, C₇-Fmoc), 125.0, 124.9 (C₁-, C₈-Fmoc), 119.9, 119.9 (C₄-, C₅-Fmoc), 102.3 (d, $J_{C_1,F} = 24.1$ Hz, C₁-Gal'), 100.1 (C₁-GalN), 91.2 (d, $J_{C_2,F} = 183.9$ Hz, C₂-Gal'), 83.0 (C_q-*t*Bu), 79.8 (C₅-Gal'), 79.7 (d, $J_{C_3,F} = 14.2$ Hz, C₃-Gal'), 73.7

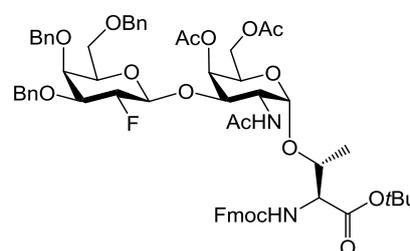
(C3-GalN), 76.5 (T^β), 74.7 (CH₂-Bn), 73.9 (d, $J_{C_4,F} = 9.0$ Hz, C4-Gal'), 73.5, 72.6 (CH₂-Bn), 69.7 (C5-GalN), 69.6 (C4-GalN), 68.7 (C6-Gal'), 66.9 (CH₂-Fmoc), 63.0 (C6-GalN), 59.0 (T^α), 47.5 (C2-GalN), 47.1 (C9-Fmoc), 28.0 (CH₃-*t*Bu), 23.0 (CH₃-NHAc), 18.8 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -205.1 (dd, $J_{F,H_2} = 51.9$ Hz, $J_{F,H_3} = 13.0$ Hz, F2-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[173, 209]

N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[3,4,6-tri-O-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester
(121)^[173, 209]

(Fmoc-Thr-(βBn₃2FGal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-OtBu)



In 15 mL einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1)

wurden 220 mg (0.21 mmol) Fmoc-Thr-(βBn₃2FGal-(1→3)-α-GalNAc)-OtBu **120** gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Anschließend wurde der Rückstand viermal mit je 20 mL Toluol sowie zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt konnte flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:3) gereinigt werden.

Ausbeute: 175 mg (0.16 mmol, 75%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.54 (°Hex/EtOAc, 1:3).

RP-HPLC: *R_t* = 29.6 min, Jupiter C18, λ = 214 nm, Grad.: MeOH:H₂O (70:30) → (100:0) in 30 min.

[α]_D²³ = + 51.8 (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209] [α]_D²³ = + 50.9 (c = 1.00, CHCl₃).

C₆₂H₇₁FN₂O₁₆ (M = 1119.22 g/mol) [1118.48].

ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 1119.53 ([M+H]⁺, ber.: 1119.49), 1141.52 ([M+Na]⁺, ber.: 1141.47).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 6.8$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.38 (t, 2H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 7.4$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.35 - 7.21 (m, 17H, H2-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 5.90 - 5.85 (m, 1H, NH-GalN), 5.57 - 5.51 (m, 1H, NH-Fmoc), 4.89 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 4.0$ Hz, H1-GalN), 4.86 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.6$ Hz, CH₂-Bn), 4.83 - 4.70 (m, 1H, H2-Gal'), 4.71 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.6$ Hz, CH₂-Bn), 4.63 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz, CH₂-Bn), 4.66 - 4.56 (m, 1H, H2-GalN), 4.53 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.6$ Hz, CH₂-Bn), 4.51 - 4.38 (m, 3H, H1-Gal' {4.51}, CH₂-Fmoc {4.43}), 4.46 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.26 (t, 1H, $J_{CH,CH} = 6.8$ Hz, H9-Fmoc), 4.24 - 4.12 (m, 4H, H4-GalN {4.24}, H6a-GalN {4.22}, T^α {4.19}, T^β {4.13}), 4.12 - 4.04 (m, 1H, H5-GalN), 3.97 - 3.86 (m, 2H, H4-Gal' {3.91}, H6b-GalN {3.88}), 3.82 - 3.74 (m, 1H, H3-GalN), 3.60 - 3.47 (m, 4H, H5-Gal' {3.58}, H3-Gal' {3.56}),

H6a/b-Gal' {3.54}), 2.09, 2.03 (2 × s, 6H, CH₃-OAc), 2.02 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.29 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

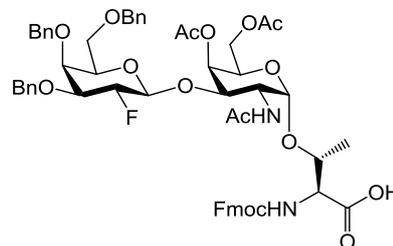
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 170.5, 170.4, 170.3 (4 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 156.6 (C=O-Urethan), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.5, 138.0, 137.9 (3 × C_q-Bn), 128.5, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 127.2 (15 × C_{Ar}-Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 102.3 (d, $J_{C1,F} = 23.8$ Hz, C1-Gal'), 100.2 (C1-GalN), 91.6 (d, $J_{C2,F} = 183.1$ Hz, C2-Gal'), 83.2 (C_q-*t*Bu), 79.9 (d, $J_{C3,F} = 15.8$ Hz, C3-Gal'), 76.3 (T^β), 74.7 (C3-GalN), 73.8 (C5-Gal'), 74.7 (CH₂-Bn), 74.0 (d, $J_{C4,F} = 8.8$ Hz, C4-Gal'), 73.6, 72.5 (CH₂-Bn), 69.5 (C4-GalN), 68.3 (C6-Gal'), 68.2 (C5-GalN), 67.2 (CH₂-Fmoc), 63.5 (C6-GalN), 59.2 (T^α), 48.5 (C2-GalN), 47.3 (C9-Fmoc), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 23.2 (CH₃-NHAc), 21.0, 20.8 (CH₃-OAc), 18.8 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -205.0 (dd, $J_{F,H2} = 52.1$ Hz, $J_{F,H3} = 12.4$ Hz, F2-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[173, 209]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-di-*O*-acetyl-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor-β-*D*-galactopyranosyl]-α-*D*-galactopyranosyl-*L*-threonin (122)^[173, 209]**

(Fmoc-Thr-(β-Bn₃2FGal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-OH)



Es wurden 160 mg (0.14 mmol) Fmoc-Thr-(βBn₃2FGal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-OtBu **121** in 6.6 mL Trifluoressigsäure/Wasser (10:1) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde fünfmal mit je 30 mL Toluol und zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert und durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc → EtOAc/MeOH/AcOH, 2:1:0.01) gereinigt.

Ausbeute: 150 mg (0.14 mmol, 99%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.52 (EtOAc/MeOH, 2:1).

RP-HPLC: *R_t* = 25.3 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (50:50) → (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23} = +43.6$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23} = +64.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₈H₆₃FN₂O₁₆ (M = 1063.12 g/mol) [1062.42].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 1085.40 ([M+Na]⁺, ber.: 1085.41), 1101.37 ([M+K]⁺, ber.: 1101.38).

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 1063.4221 ([M+H]⁺, ber.: 1063.4240).

HR-ESI-MS (negativ) m/z : 1061.4079 ($[M-H]^-$, ber.: 1061.4089).

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , COSY, HSQC), δ (ppm): 12.46 (s, 1H, COOH), 7.93 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.77 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.47 - 7.41 (m, 3H, H3-, H6-Fmoc, NH-Fmoc {7.40}), 7.40 - 7.29 (m, 18H, H2-, H7-Fmoc, NH-GalN, H_{Ar}-Bn), 5.35 (d, 1H, $J_{H4,H3} = 3.3$ Hz, H4-GalN), 4.83 - 4.74 (m, 3H, CH₂-Bn {4.78, d, $J_{CH,CH} = 11.0$ Hz}, H1-GalN {4.72}, CH₂-Bn {4.71, d, $J_{CH,CH} = 12.4$ Hz}), 4.70 - 4.64 (m, 2H, H1-Gal' {4.64}, CH₂-Bn {4.63, d, $J_{CH,CH} = 12.6$ Hz}), 4.59 - 4.45 (m, 5H, CH₂-Bn {4.53}, CH₂-Fmoc {4.50}, CH₂-Bn {4.49, 4.45, d, $J_{CH,CH} = 11.8$ Hz}), 4.37 - 4.27 (m, 3H, T ^{β} {4.31}, H2-Gal' {4.30}, H9-Fmoc {4.27}), 4.26 - 4.14 (m, 2H, H2-GalN {4.18}, T ^{α} {4.13}), 4.11 - 4.03 (m, 3H, H5-GalN {4.06}, H4-Gal' {4.05}, H6a-GalN {4.03}), 3.94 - 3.81 (m, 2H, H3-GalN {3.88}, H6b-GalN {3.81}), 3.79 - 3.71 (m, 2H, H5-Gal' {3.73}, H3-Gal' {3.71}), 3.60 - 3.50 (m, 2H, H6a/b-Gal' {3.53}, 2.06, 2.01 (2 \times s, 6H, CH₃-OAc), 1.95 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.16 (d, 3H, $J_{T^{\gamma},T^{\beta}} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

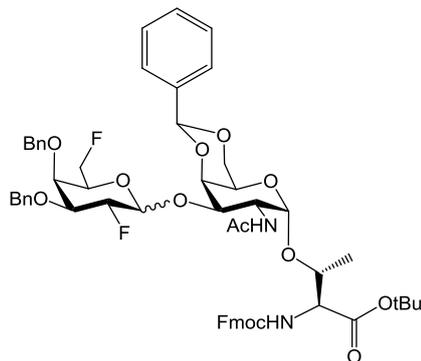
^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.6, 170.9, 170.7, 170.1 (4 \times C=O-NHAc, -OAc, -Carbonsäure), 156.8 (C=O-Urethan), 143.8, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 140.7, 140.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.5, 138.2, 138.1 (3 \times C_q-Bn), 128.2, 128.1, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4, 127.4, 127.0 (15 \times C_{Ar}-Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 101.0 (d, $J_{C1,F} = 22.6$ Hz, C1-Gal'), 99.3 (C1-GalN), 90.7 (d, $J_{C2,F} = 184.0$ Hz, C2-Gal'), 79.1 (d, $J_{C3,F} = 16.0$ Hz, C3-Gal'), 75.1 (T ^{β}), 74.9 (C3-GalN), 74.2 (C5-GalN), 74.0 (CH₂-Bn), 72.6 (C5-Gal'), 72.5, 70.9 (CH₂-Bn), 70.3 (C4-GalN), 67.9 (C6-Gal'), 67.8 (C4-Gal'), 65.4 (CH₂-Fmoc), 63.5 (C6-GalN), 58.6 (T ^{α}), 47.7 (C2-GalN), 46.8 (C9-Fmoc), 22.6 (CH₃-NHAc), 20.7, 20.4 (CH₃-OAc), 18.4 (T ^{γ}).

^{19}F -NMR (376 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): -204.6 (dd, $J_{F,H2} = 52.4$ Hz, $J_{F,H3} = 12.3$ Hz, F2-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[173, 209]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- α/β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butyl-ester (123)**^[187, 209]

(Fmoc-Thr-(α/β -Bn₂2,6F₂Gal-(1→3)- α -4,6-BznGalNAc)-OtBu)



Es wurden 420 mg (0.61 mmol) T_N-Akzeptor **115** und 403 mg (0.79 mmol) 3,4-Di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- α -D-galactopyranosyltrichloracetimidat (**37**) in 50 mL absol. Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre mit 620 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt. Die Mischung wurde anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor auf -20 °C gekühlt wurde. Zu dieser Reaktionslösung wurden 16 μ L (0.07 mmol, 0.1 Äquiv. bezogen auf **37**) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) gegeben, bevor die Mischung unter Erwärmen auf Raumtemperatur 24 h gerührt wurde. Nach beendeter Reaktion wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde dreimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:1). Durch analytische RP-HPLC konnte ein Anomerenverhältnis von $\alpha:\beta = 1:5$ bestimmt werden.

Ausbeute: 372 mg (0.36 mmol, 59%); farbloser amorpher Feststoff.

α : $R_f = 0.51$, β : $R_f = 0.47$ (°Hex/EtOAc, 1:1).

RP-HPLC: α : $R_t = 21.5$ min, β : $R_t = 18.3$ min, Jupiter C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH:H₂O (70:30) → (100:0) in 30 min.

α -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = +90.1$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23} = +99.4$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

β -Anomer: $[\alpha]_D^{23} = +71.7$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23} = +67.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₅₈H₆₄F₂N₂O₁₃ (M = 1035.13 g/mol) [1034.44].

ESI-MS (positiv) m/z : 1057.43 ([M+Na]⁺, ber.: 1057.43), 1073.41 ([M+K]⁺, ber.: 1073.40).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): **α -Anomer:** 7.78 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.64 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.3$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.56 (d, 2H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 6.6$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J_{H_2,H_1} = J_{H_7,H_8} = 7.4$ Hz, H2-, H7-Fmoc), 7.37 - 7.27 (m, 15H, H_{Ar}-Bn, -Bzn), 6.01 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.7$ Hz, NH-GalN), 5.59 (s, 1H, CH-Bzn), 5.48 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Fmoc), 5.19 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.3$ Hz, H1-Gal'), 4.96 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.5$ Hz, H1-GalN), 4.92 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.91 (ddd, 1H, $J_{H_2,F} = 50.8$ Hz, $J_{H_2,H_3} = 10.6$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.7$ Hz, H2-Gal'), 4.81 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.7$ Hz, CH₂-Bn), 4.72 (t, 1H, $J_{H_2,H_3} = J_{H_2,H_1} = 10.6$ Hz, H2-GalN), 4.61 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.7$ Hz, CH₂-Bn), 4.58 - 4.18 (m, 2H, H6a/b-Gal'), 4.54 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.46 - 4.42 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.29 - 4.08 (m,

8H, H4-GalN {4.29}, H6a-GalN {4.26}, H9-Fmoc {4.24}, T^α {4.21}, T^β {4.19}, H5-Gal' {4.11}, H3-Gal' {4.09}, H6b-GalN {4.08}), 3.89 (dd, 1H, $J_{H_3,H_2} = 11.0$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 2.7$ Hz, H3-GalN), 3.84 (s, 1H, H4-GalN), 3.79 (s, 1H, H4-Gal'), 3.71 (s, 1H, H5-GalN), 1.99 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.28 (d, 3H, $J_{T^{\gamma},T^{\beta}} = 6.3$ Hz, T^γ).

β-Anomer: 7.79 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 6.9$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.65 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.3$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.54 (d, 2H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 6.4$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.39 - 7.27 (m, 17H, H2-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bn, -Bzn), 5.79 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 8.9$ Hz, NH-GalN), 5.57 - 5.55 (m, 2H, NH-Fmoc, CH-Bzn), 5.02 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.3$ Hz, H1-GalN), 4.93 - 4.58 (m, 8H, CH₂-Bn {4.91, d, $J_{CH,CH} = 11.6$ Hz}, CH₂-Bn {4.82, d, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz}, H2-GalN {4.86}, H2-Gal' {4.72}, CH₂-Bn {4.66, d, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz}, CH₂-Bn {4.59, d, $J_{CH,CH} = 11.6$ Hz}, H1-Gal' {4.64}, CH₂-Bn {4.62}), 4.64 - 4.52 (m, 1H, H6a-Gal'), 4.52 - 4.24 (m, 1H, H6b-Gal'), 4.54 - 4.44 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 4.36 - 4.19 (m, 5H, H4-GalN {4.36}, H9-Fmoc {4.28}, T^α {4.23}, T^β {4.22}, H6a-GalN {4.20}), 4.06 - 3.98 (m, 1H, H6b-GalN), 3.91 (dd, 1H, $J_{H_3,H_2} = 11.1$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 2.6$ Hz, H3-GalN), 3.82 (s, 1H, H4-Gal'), 3.74 - 3.64 (m, 2H, H5-GalN {3.70}, H5-Gal' {3.69}), 3.60 (t, 1H, $J_{H_3,H_2} = 10.4$ Hz, H3-Gal'), 2.02 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.46 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.28 (d, 3H, $J_{T^{\gamma},T^{\beta}} = 6.2$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): **α-Anomer:** 170.4, 170.2 (2 × C=O-NHAc, -Ester), 156.5 (C=O-Urethan), 143.8, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.1, 137.7 (3 × C_q-Bn, -Bzn), 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.2, 127.9, 127.8, 127.2, 127.2 (15 × C_{Ar}-Bn, -Bzn, C2-, C3-Fmoc), 126.5, 126.5 (C6-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 119.9, 119.8 (C4-, C5-Fmoc), 101.4 (CH-Bzn), 101.0 (C1-GalN), 96.5 (d, $J_{C_1,F_2} = 22.5$ Hz, C1-Gal'), 88.4 (d, $J_{C_2,F_2} = 188.8$ Hz, C2-Gal'), 83.4 (d, $J_{C_6,F_6} = 166.7$ Hz, C6-Gal'), 83.0 (C_q-*t*Bu), 79.2 (d, $J_{C_3,F_2} = 16.5$ Hz, C3-Gal'), 76.8 (T^β), 76.6 (C3-GalN), 75.9 (C4-Gal'), 74.6, 73.8 (CH₂-Bn), 73.4 (C4-GalN), 70.3 (d, $J_{C_5,F_6} = 20.4$ Hz, C5-Gal'), 69.4 (C6-GalN), 67.3 (CH₂-Fmoc), 63.7 (C5-GalN), 59.0 (T^α), 47.8 (C2-GalN), 47.4 (C9-Fmoc), 28.3 (CH₃-*t*Bu), 23.3 (CH₃-NHAc), 19.1 (T^γ).

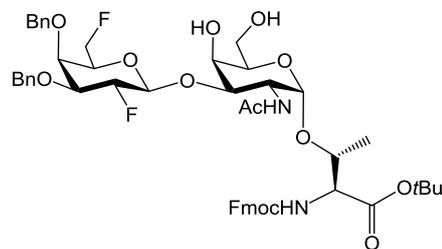
β-Anomer: 170.6, 170.2 (2 × C=O-NHAc, -Ester), 156.5 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 137.7 (3 × C_q-Bn, -Bzn), 128.9, 128.6, 128.5, 128.5, 128.2, 128.2, 127.9, 127.8, 127.2, 126.5, 126.5, 126.4 (15 × C_{Ar}-Bn, -Bzn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.5 (d, $J_{C_1,F_2} = 24.7$ Hz, C1-Gal'), 101.0 (CH-Bzn), 100.8 (C1-GalN), 91.1 (d, $J_{C_2,F_2} = 183.7$ Hz, C2-Gal'), 83.2 (C_q-*t*Bu), 82.0 (d, $J_{C_6,F_6} = 165.4$ Hz, C6-Gal'), 79.6 (d, $J_{C_3,F_2} = 16.7$ Hz, C3-Gal'), 76.9 (T^β), 76.7 (C3-GalN), 75.9 (C4-GalN), 74.5 (CH₂-Bn), 73.6 (C4-Gal'), 73.3 (d, $J_{C_5,F_6} = 20.2$ Hz, C5-Gal'), 73.1 (CH₂-Bn), 69.3 (C6-GalN), 67.1 (CH₂-Fmoc), 63.9 (C5-GalN), 59.3 (T^α), 48.2 (C2-GalN), 47.4 (C9-Fmoc), 28.3 (CH₃-*t*Bu), 23.5 (CH₃-NHAc), 19.3 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): **α-Anomer:** -208.0 (dd, 1F, $J_{F_2,H_2} = 43.2$ Hz, $J_{F_2,H_3} = 7.9$ Hz, F2-Gal'), -227.9 (dt, 1F, $J_{F_6,H_6a/b} = 47.9$ Hz, $J_{F_6,H_5} = 14.4$ Hz, F6-Gal'), **β-Anomer:** -204.1 (d, 1F, $J_{F_2,H_2} = 49.5$ Hz, F2-Gal'), -229.2 (m, 1F, F6-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[187, 209]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (124)^[209]**

(Fmoc-Thr-(β -Bn₂,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-*O*tBu)



Herstellung des NaHSO₄-Kieselgel-Katalysators:^[37]

Zu einer Lösung von 2.00 g (14.5 mmol) Natriumhydrogensulfat-Monohydrat in 10.0 mL Wasser wurden 5.0 g Kieselgel (Porengröße 60 Å) gegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde 10 h bei 100 °C im Trockenschrank aktiviert.

Variante A:

Entsprechend Referenz^[209] wurden 200 mg (0.19 mmol) Fmoc-Thr-(β Bn₂,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-*O*tBu **123** in 50 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (4:1) gelöst und mit 400 mg aktiviertem Natriumhydrogensulfat-Kieselgel-Katalysator versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, bevor der Kieselgel-Katalysator abfiltriert und das Filtrat dreimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen wurde. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 124 mg (0.13 mmol, 71%); farbloser amorpher Feststoff.

Variante B:

Entsprechend Referenz^[290] wurden 256 mg (0.25 mmol) Fmoc-Thr-(β Bn₂,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-*O*tBu **123** in 20 mL 80%-iger Essigsäure aufgenommen und 1 h bei einer Temperatur von 80 °C gerührt. Der Reaktionsmischung wurden 20 mL Toluol zugefügt, bevor die Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurden. Der Rückstand wurde dreimal mit je 20 mL Toluol und Dichlormethan kodestilliert. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:10).

Ausbeute: 198 mg (0.21 mmol, 84%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.54 (^cHex/EtOAc, 1:10).

RP-HPLC: *R_t* = 14.5 min, Jupiter C18, λ = 214 nm, Grad.: MeOH:H₂O (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23} = +41.4$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23} = +42.8$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₁H₆₀F₂N₂O₁₃ (M = 947.02 g/mol) [946.41].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 947.41 ($[M+H]^+$, ber.: 947.41), 969.41 ($[M+Na]^+$, ber.: 969.40), 985.38 ($[M+K]^+$, ber.: 985.37).

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.5$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.55 - 7.49 (m, 4H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 7.41 - 7.27 (m, 10H, H_{Ar} -Bn), 6.34 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH-GalN), 5.69 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.6$ Hz, NH-Fmoc), 4.92 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz, CH_2 -Bn), 4.90 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 4.0$ Hz, H1-GalN), 4.86 - 4.76 (m, 1H, H2-Gal'), 4.80 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.7$ Hz, CH_2 -Bn), 4.67 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH_2 -Bn), 4.62 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.4$ Hz, $J_{H2,H1} = 3.4$ Hz, H2-GalN), 4.58 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.3$ Hz, CH_2 -Bn), 4.55 - 4.51 (m, 1H, H1-Gal'), 4.49 - 4.46 (m, 2H, CH_2 -Fmoc), 4.48 - 4.42 (m, 1H, H6a-Gal'), 4.39 - 4.32 (m, 1H, H6b-Gal'), 4.31 - 4.10 (m, 4H, H4-GalN {4.29}, H9-Fmoc {4.26}, T^{α} {4.22}, T^{β} {4.18}), 3.96 - 3.90 (m, 1H, H6a-GalN), 3.86 - 3.74 (m, 3H, H4-Gal' {3.83}, H5-Gal' {3.79}, H6b-GalN {3.81}), 3.70 - 3.55 (m, 2H, H3-GalN {3.70}, H5-GalN {3.66}), 3.52 (m, 1H, H3-Gal'), 2.83 (bs, 1H, OH), 2.34 (s, 1H, OH), 2.04 (s, 3H, CH_3 -NHAc), 1.44 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu), 1.20 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T^{γ}).

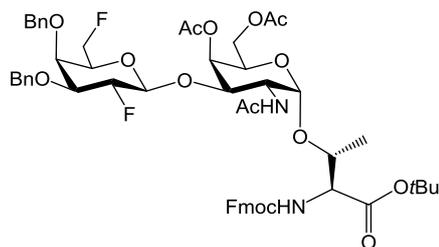
^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.3, 170.6 ($2 \times C=O$ -NHAc, -Ester), 156.7 ($C=O$ -Urethan), 143.9, 143.7 ($C1a$ -, $C8a$ -Fmoc), 141.4, 141.3 ($C4a$ -, $C5a$ -Fmoc), 137.7, 137.6 ($2 \times C_q$ -Bn), 129.8, 129.1, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 128.1, 127.8, 127.7, 127.1, 127.0, 126.9 ($10 \times C_{Ar}$ -Bn, $C2$ -, $C3$ -, $C6$ -, $C7$ -Fmoc), 125.1, 124.9 ($C1$ -, $C8$ -Fmoc), 120.1, 120.1 ($C4$ -, $C5$ -Fmoc), 102.6 (d, $J_{C1,F2} = 24.4$ Hz, $C1$ -Gal'), 100.4 ($C1$ -GalN), 91.3 (d, $J_{C2,F2} = 183.7$ Hz, $C2$ -Gal'), 83.4 (C_q -*t*Bu), 81.8 (d, $J_{C6,F6} = 168.9$ Hz, $C6$ -Gal'), 79.8 ($C3$ -GalN), 79.4 (d, $J_{C3,F2} = 16.2$ Hz, $C3$ -Gal'), 76.8 (T^{β}), 74.8 (CH_2 -Bn), 73.3 ($C5$ -GalN), 73.1 (CH_2 -Bn), 72.9 (d, $J_{C5,F6} = 24.6$ Hz, $C5$ -Gal'), 69.9, 69.8 ($C4$ -GalN, $C4$ -Gal'), 67.1 (CH_2 -Fmoc), 63.0 ($C6$ -GalN), 59.3 (T^{α}), 47.3 ($C2$ -GalN), 47.1 ($C9$ -Fmoc), 28.1 (CH_3 -*t*Bu), 22.9 (CH_3 -NHAc), 19.1 (T^{γ}).

^{19}F -NMR (376 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): -204.6 (dd, 1F, $J_{F2,H2} = 51.8$ Hz, $J_{F2,H3} = 12.6$ Hz, $F2$ -Gal'), -229.8 (dt, 1F, $J_{F6,H6a} = 47.0$ Hz, $J_{F6,H6b} = 46.5$ Hz, $J_{F6,H5} = 11.2$ Hz, $F6$ -Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[209]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester**
(125a)^[187, 209]

(Fmoc-Thr-(β -Bn₂,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-OtBu)



In 15 mL einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid

(2:1) wurden 505 mg (0.53 mmol) Fmoc-Thr-(β Bn₂,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-OtBu **124** gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel i. Vak. entfernt wurde. Anschließend wurde der Rückstand viermal mit je 20 mL Toluol sowie zweimal mit je 10 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt konnte flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:3) gereinigt werden.

Ausbeute: 413 mg (0.40 mmol, 75%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.67 (^cHex/EtOAc, 1:3).

$[\alpha]_D^{22} = + 65.8$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23} = + 67.1$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₅H₆₄F₂N₂O₁₅ (M = 1031.10 g/mol) [1030.43].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1031.4355 ([M+H]⁺, ber.: 1031.4353).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.2$ Hz, H₄-, H₅-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.2$ Hz, H₁-, H₈-Fmoc), 7.40 (t, 2H, $J_{H_3,H_4} = J_{H_6,H_5} = 6.6$ Hz, H₃-, H₆-Fmoc), 7.38 - 7.22 (m, 12H, H₂-, H₇-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 5.78 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.4$ Hz, NH-GalN), 5.45 (d, 1H, $J_{NH,Ta} = 10.3$ Hz, NH-Fmoc), 4.95 - 4.82 (m, 2H, H₁-GalN {4.91}, CH₂-Bn {4.88, d, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz}), 4.80 - 4.70 (m, 2H, H₂-Gal' {4.79}, CH₂-Bn {4.77, d, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz}), 4.70 - 4.46 (m, 7H, CH₂-Bn {4.67}, H₂-GalN {4.62, dd, $J_{H_2,H_3} = 10.4$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 3.4$ Hz}, CH₂-Bn {4.58, d, $J_{CH,CH} = 11.5$ Hz}, H₁-Gal' {4.65}, H_{6a}-Gal' {4.57}, CH₂-Fmoc {4.50}), 4.45 - 4.36 (m, 2H, H₄-GalN, H_{6b}-Gal'), 4.31 - 4.07 (m, 5H, T ^{α} {4.28}, H_{6a}-GalN {4.26}, H₉-Fmoc {4.25}, T ^{β} {4.16}, H₅-GalN {4.13}), 3.95 (dd, 1H, $J_{H_{6b},H_{6a}} = 11.5$ Hz, $J_{H_{6b},H_5} = 7.7$ Hz, H_{6b}-GalN), 3.87 - 3.75 (m, 4H, H₅-Gal', H₄-Gal', H₃-GalN, H₃-Gal'), 2.07, 2.03 (2 \times s, 6H, CH₃-OAc), 2.00 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.46 (s, 9H, CH₃-tBu), 1.30 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.1$ Hz, T ^{γ}).

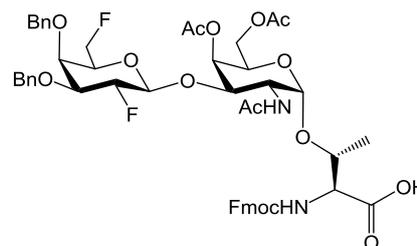
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 170.9, 170.6, 170.4, 170.2 (4 \times C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 156.4 (C=O-Urethan), 143.7, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.0, 137.9 (2 \times C_q-Bn), 128.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6, 127.2 (10 \times C_{Ar}-Bn, C₂-, C₃-, C₆-, C₇-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0 (C₄-, C₅-Fmoc), 101.8 (d, $J_{C_1,F_2} = 23.3$ Hz, C1-Gal'), 100.2 (C1-GalN), 91.3 (d, $J_{C_2,F_2} = 183.2$ Hz, C2-Gal'), 83.2 (C_q-tBu), 81.1 (d, $J_{C_6,F_6} = 167.7$ Hz, C6-Gal'), 79.5 (d, $J_{C_3,F_2} = 16.4$ Hz, C3-Gal'), 76.3 (T ^{β}), 76.2 (C3-GalN), 74.5 (CH₂-Bn), 73.4 (d, $J_{C_4,F_6} = 5.8$ Hz, C4-Gal'), 72.9 (d, $J_{C_5,F_6} = 25.1$ Hz, C5-Gal'), 72.7 (CH₂-Bn), 69.2 (C4-GalN), 68.1 (C5-GalN), 67.1 (CH₂-Fmoc), 63.2 (C6-GalN), 59.1 (T ^{α}), 48.4 (C2-GalN), 47.2 (C9-Fmoc), 28.1 (CH₃-tBu), 23.3 (CH₃-NHAc), 21.0, 20.8 (CH₃-OAc), 18.7 (T ^{γ}).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -204.8 (dd, 1F, $J_{\text{F}_2, \text{H}_2} = 48.8$ Hz, $J_{\text{F}_2, \text{H}_3} = 10.6$ Hz, F2-Gal'), -230.0 (dt, 1F, $J_{\text{F}_6, \text{H}_6\text{a/b}} = 46.6$ Hz, $J_{\text{F}_6, \text{H}_5} = 9.9$ Hz, F6-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[187, 209]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin (125)**

(Fmoc-Thr-(β -Bn₂2,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-OH)



Es wurden 480 mg (0.46 mmol) Fmoc-Thr-(β Bn₂2,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-OtBu **125a** in einem Gemisch aus 9.9 mL Trifluoressigsäure/Wasser (10:1) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde fünfmal mit je 30 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kdestilliert. Der Festphasenbaustein konnte ohne weitere Reinigung in der Festphasensynthese eingesetzt werden.

Ausbeute: 420 mg (0.43 mmol, 93%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.42$ (EtOAc/MeOH, 2:1).

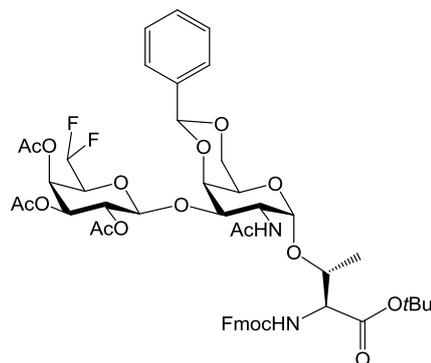
$\text{C}_{51}\text{H}_{57}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{15}$ ($M = 974.99$ g/mol) [974.37].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 975.3733 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 975.3727).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm): -205.0 (dd, 1F, $J_{\text{F}_2, \text{H}_2} = 49.1$ Hz, $J_{\text{F}_2, \text{H}_3} = 10.8$ Hz, F2-Gal'), -230.0 (dt, 1F, $J_{\text{F}_6, \text{H}_6\text{a/b}} = 47.1$ Hz, $J_{\text{F}_6, \text{H}_5} = 10.2$ Hz, F6-Gal').

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (126)^[208]**

(Fmoc-Thr-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-OtBu)



Eine Lösung aus 800 mg (1.18 mmol) Fmoc-Thr-(α -4,6-BznGalNAc)-OtBu **115** und 1.5 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) in 12 mL absol. Dichlormethan/Nitromethan (3:1) wurde 1 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 596 mg (2.36 mmol, 2.0 Äquiv.) Quecksilber(II)-cyanid zugegeben und 30 Minuten gerührt, bevor 1.20 g (3.09 mmol, 2.6 Äquiv.) einer Lösung von Ac₃6,6F₂GalBr **41** in 12 mL absol. Dichlormethan/Nitromethan (3:1) zugetropft wurde. Der Reaktionsansatz wurde 6 h in der Mikrowelle bei 80 °C und 100 W (10 min Aufheizphase, p_{\max} = 5.0 bar) erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde durch Hyflo[®] filtriert und mit 40 mL Dichlormethan nachgewaschen. Es wurde zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 50 mL Dichlormethan extrahiert und die organischen Phasen wurden mit 60 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:2).

Ausbeute: 1.00 g (1.00 mmol, 85%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.45 (^cHex/EtOAc, 1:2).

RP-HPLC: R_t = 11.6 min, Jupiter C18, λ = 214 nm, Grad.: MeOH:H₂O (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23} = +49.9$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[208] $[\alpha]_D^{23} = +55.8$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₅₀H₅₈F₂N₂O₁₇ (M = 996.996 g/mol) [996.37].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 997.3780 ([M+H]⁺, ber.: 997.3782), 1014.4039 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1014.4042), 1019.3597 ([M+Na]⁺, ber.: 1019.3601).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.7$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 6.8$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.52 (dd, 2H, $J_{CH,CH} = 7.9$ Hz, $J_{CH,CH} = 1.9$ Hz, H_{Ar}-Bzn), 7.44 - 7.30 (m, 7H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bzn), 5.89 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.3$ Hz, NH-GalN), 5.82 (ddd, 1H, $J_{H_6,Fa} = 55.4$ Hz, $J_{H_6,Fb} = 55.2$ Hz, $J_{H_6,H_5} = 5.8$ Hz, H6-Gal'), 5.55 - 5.51 (m, 2H, H4-Gal', CH-Bzn), 5.44 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.4$ Hz, NH-Urethan), 5.19 (dd, 1H, $J_{H_2,H_3} = 10.2$ Hz, $J_{H_2,H_1} = 7.2$ Hz, H2-Gal'), 5.00 - 4.93 (m, 2H, H3-Gal' {4.95}, H1-GalN {4.92}), 4.77 - 4.66 (m, 2H, H1-Gal' {4.74}, H2-GalN {4.68}), 4.52 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 6.6$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.33 - 4.15 (m, 5H, H9-Fmoc {4.27}, T ^{α} {4.23}, H6a-GalN {4.22}, T ^{β} {4.20}, H4-GalN {4.19}), 4.04 (d, 1H, $J_{H_6b,H_6a} = 13.1$ Hz, H6b-GalN), 3.92 - 3.80 (m, 2H, H5-Gal' {3.86},

H3-GalN {3.84}), 3.74 - 3.67 (m, 1H, H5-GalN), 2.12, 2.06, 2.01, 1.96 (4 × s, 12H, CH₃-OAc, -NHAc), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.25 (d, 3H, $J_{T\gamma, T\beta} = 6.6$ Hz, T^γ).

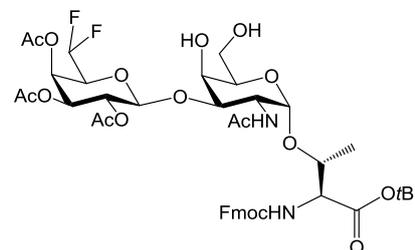
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.2, 169.9, 169.6, 169.2 (5 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 156.5 (C=O-Urethan), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.7 (C_q-Bzn), 129.9, 129.0 (C2-, C7-Fmoc), 128.3, 128.3, 127.9 (3 × C_{Ar}-Bzn), 127.2 (C3-, C6-Fmoc), 126.4, 126.2 (2 × C_{Ar}-Bzn), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 113.2 (dd, $J_{C_6, F_a} = 243.9$ Hz, $J_{C_6, F_b} = 243.9$ Hz, C6-Gal'), 102.0 (C1-Gal'), 100.9 (CH-Bzn), 100.5 (C1-GalN), 83.3 (C_q-*t*Bu), 76.4 (T^β), 76.1 (C4-GalN), 75.4 (C3-GalN), 72.7 (dd, $J_{C_5, F_a} = 27.5$ Hz, $J_{C_5, F_b} = 27.5$ Hz, C5-Gal'), 70.3 (C3-Gal'), 69.2 (C6-GalN), 68.6 (C2-Gal'), 66.8 (CH₂-Fmoc), 65.7 (C4-Gal'), 63.7 (C5-GalN), 59.1 (T^α), 47.9 (C2-GalN), 47.4 (C9-Fmoc), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 21.0, 20.8, 20.7, 20.6 (4 × CH₃-OAc, -NHAc), 19.0 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -128.6 (ddd, 1F, $J_{F_a, F_b} = 301.9$ Hz, $J_{F_a, H_6} = 55.6$ Hz, $J_{F_a, H_5} = 10.5$ Hz, F6a-Gal'), -129.5 (ddd, 1F, $J_{F_b, F_a} = 301.3$ Hz, $J_{F_b, H_6} = 55.9$ Hz, $J_{F_b, H_5} = 10.9$ Hz, F6b-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[208]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (127)^[208]**

(Fmoc-Thr-(β-Ac₃,6F₂Gal-(1→3)-α-GalNAc)-*Ot*Bu)



Entsprechend Referenz^[290] wurden 1.00 g (1.00 mmol) Fmoc-Thr-(βAc₃,6F₂Gal-(1→3)-α-4,6-BznGalNAc)-*Ot*Bu **126** in 20 mL 80%-iger Essigsäure aufgenommen und 1 h bei einer Temperatur von 80 °C gerührt. Der Reaktionsmischung wurden 20 mL Toluol zugefügt und die Lösungsmittel wurden anschließend i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (C₆Hex/EtOAc, 1:10) gereinigt.

Ausbeute: 640 mg (0.70 mmol, 70%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.26 (C₆Hex/EtOAc, 1:10).

RP-HPLC: $R_t = 8.04$ min, Jupiter C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeOH:H₂O (70:30) → (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23} = +31.8$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[208] $[\alpha]_D^{23} = +27.8$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₄₃H₅₄F₂N₂O₁₇ (M = 908.88 g/mol) [908.33].

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 909.3469 ([M+H]⁺, ber.: 909.3469), 931.3289 ([M+Na]⁺, ber.: 931.3288).

¹**H-NMR** (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.7$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41 (t, 2H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.6$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.35 - 7.29 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 6.04 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 8.7$ Hz, NH-GalN), 5.75 (td, 1H, $J_{H6,Fa} = 55.3$ Hz, $J_{H6,Fb} = 55.3$ Hz, $J_{H6,H5} = 5.8$ Hz, H6-Gal'), 5.53 (dd, 1H, $J_{H4,H5} = 3.4$ Hz, $J_{H4,H3} = 1.3$ Hz, H4-Gal'), 5.49 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.3$ Hz, NH-Urethan), 5.20 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.5$ Hz, $J_{H2,H1} = 7.9$ Hz, H2-Gal'), 5.00 - 4.94 (m, 1H, H3-Gal'), 4.86 - 4.82 (m, 1H, H1-GalN), 4.66 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.0$ Hz, H1-Gal'), 4.60 - 4.50 (m, 3H, H2-GalN {4.57}, CH₂-Fmoc {4.52, d, $J_{CH,CH} = 6.6$ Hz}), 4.27 - 4.04 (m, 4H, H9-Fmoc {4.24}, T^α {4.22}, T^β {4.16}, H4-GalN {4.13}), 3.95 - 3.77 (m, 4H, H6a/b-GalN {3.90, 3.82, dd, $J_{H6b,H6a} = J_{H6a,H6b} = 12.4$ Hz}, H5-GalN {3.85}, H5-Gal' {3.83}), 3.69 (d, 1H, $J_{H3,H2} = 7.8$ Hz, H3-GalN), 2.15, 2.04, 2.00, 1.97 (4 × s, 12H, CH₃-OAc, -NHAc), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.23 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, T^γ).

¹³**C-NMR** (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 170.3, 170.1, 169.8, 169.7 (5 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 156.5 (C=O-Urethan), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5, 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 128.0, 127.9 (C2-, C7-Fmoc), 127.2, 127.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.0, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 112.9 (t, $J_{C6,Fa} = 243.6$ Hz, $J_{C6,Fb} = 243.6$ Hz, C6-Gal'), 102.0 (C1-Gal'), 100.1 (C1-GalN), 83.4 (C_q-*t*Bu), 78.1 (C3-GalN), 76.4 (T^β), 72.9 (t, $J_{C5,Fa} = J_{C5,Fb} = 27.9$ Hz, C5-Gal'), 70.3 (C3-Gal'), 70.0 (C5-GalN), 69.9 (C4-GalN), 68.2 (C2-Gal'), 67.0 (CH₂-Fmoc), 66.2 (C4-Gal'), 62.9 (C6-GalN), 59.1 (T^α), 47.7 (C2-GalN), 47.4 (C9-Fmoc), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 21.1, 20.8, 20.7, 20.6 (4 × CH₃-OAc, -NHAc), 18.5 (T^γ).

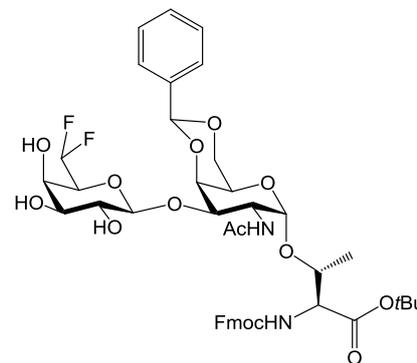
¹⁹**F-NMR** (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -128.9 (dd, 2F, $J_{F,H6} = 55.2$ Hz, $J_{F,H5} = 9.0$ Hz, F6a/b-Gal')

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[208]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (128)**

(Fmoc-Thr-(β -6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-OtBu)

In 40 mL Methanol (HPLC-grade) wurden 1.59 g (1.59 mmol) Fmoc-Thr-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -4,6-BznGalNAc)-OtBu **126** gelöst und unter Argonatmosphäre mit einer frisch hergestellten Natriummethanolat-Lösung (0.5 M) in Methanol versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 eingestellt wurde. Der pH-Wert wurde jede halbe



Stunde kontrolliert und durch Zugabe von weiterer Natriummethanolat-Lösung nachreguliert. Nach 18 h wurde die Reaktionslösung durch Zusatz von Essigsäure (1 M) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 40 mL Toluol und zweimal mit je 25 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde anschließend in 100 mL absol. Dichlormethan gelöst und mit 805 mg (2.39 mmol, 1.5 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimid (Fmoc-OSu) versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von *N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) auf 9.5 eingestellt und die Mischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit saurem Ionentauscher *Amberlyst IR 120* neutralisiert und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (Hex/EtOAc, 1:4).

Ausbeute: 1.02 g (1.17 mmol, 74%); gelblicher amorpher Feststoff.

R_f = 0.12 (Hex/EtOAc, 1:4).

RP-HPLC: *R_t* = 26.8 min, Luna C18, λ = 256 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1% TFA (30:70), 5 min (30:70) → (77:23) in 30 min, (100:0) in 60 min.

[α]_D²¹ = + 67.4 (c = 1.00, CHCl₃).

C₄₄H₅₂F₂N₂O₁₄ (M = 870.89 g/mol) [870.34].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 871.3461 ([M+H]⁺, ber.: 871.3459), 888.3724 ([M+NH₄]⁺, ber.: 888.3725).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.79 - 7.73 (m, 2H, H₄-, H₅-Fmoc), 7.62 (d, 2H, *J*_{H1,H2} = *J*_{H8,H7} = 7.5 Hz, H₁-, H₈-Fmoc), 7.53 - 7.50 (m, 2H, H_{Ar}-Bzn), 7.43 - 7.23 (m, 7H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, H_{Ar}-Bzn), 6.47 (d, 1H, *J*_{NH,H2} = 9.5 Hz, NH-GalN), 6.06 - 5.74 (m, 2H, H₆-Gal' {5.87, ddd, *J*_{H6,Fa} = 56.7 Hz, *J*_{H6,Fb} = 55.9 Hz, *J*_{H6,H5} = 5.9 Hz}, NH-Urethan {5.80, d, *J*_{NH,Tα} = 9.2 Hz}), 5.46 (s, 1H, CH-Bzn), 4.96 (d, 1H, *J*_{H1,H2} = 3.7 Hz, H₁-GalN), 4.63 - 4.31 (m, 4H, H₂-GalN {4.62}, CH₂-Fmoc {4.46}, H₄-GalN {4.38}), 4.30 - 4.12 (m, 5H, H₁-Gal' {4.25}, T^α {4.25}, H₉-Fmoc {4.23}, T^β {4.17}, H_{6a}-GalN {4.14}), 4.06 - 3.97 (m, 1H, H_{6b}-GalN), 3.79 (d, 1H, *J*_{H3,H2} = 10.0 Hz, H₃-GalN), 3.74 - 3.56 (m, 3H, H₅-GalN {3.69}, H₂-Gal' {3.62}, H₄-Gal' {3.58}), 3.41 - 3.31 (m, 1H, H₅-Gal'), 3.24 (d, 1H, *J*_{H3,H2} = 9.6 Hz, H₃-Gal'), 2.04 (s, 3H, CH₃-NHAc), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.25 (d, 3H, *J*_{Tγ,Tβ} = 7.2 Hz, T^γ).

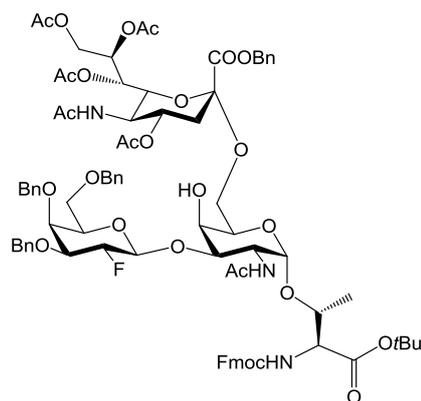
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.3 (C=O-NHAc) 168.7 (C=O-Ester), 156.5 (C=O-Urethan), 143.8, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5, 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 136.6 (C_q-Bzn), 128.9, 128.3, 128.0, 127.9, 127.5, 127.2 (C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc, 5 \times C_{Ar}-Bzn), 125.3 (C1-, C8-Fmoc), 120.3, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 113.3 (dd, $J_{\text{C}_6,\text{F}_a} = 242.7$ Hz, $J_{\text{C}_6,\text{F}_b} = 242.7$ Hz, C6-Gal'), 105.1 (C1-Gal'), 101.7 (CH-Bzn), 100.5 (C1-GalN), 83.4 (C_q-*t*Bu), 77.8 (C3-GalN), 76.9 (T ^{β}), 75.6 (C4-GalN), 73.5 (dd, $J_{\text{C}_5,\text{F}_a} = 26.7$ Hz, $J_{\text{C}_5,\text{F}_b} = 26.7$ Hz, C5-Gal'), 72.8 (C3-Gal'), 70.3 (C4-Gal'), 69.1 (C6-GalN), 67.2 (C2-Gal'), 67.1 (CH₂-Fmoc), 63.6 (C5-GalN), 59.1 (T ^{α}), 48.0 (C2-GalN), 47.2 (C9-Fmoc), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 21.0 (CH₃-NHAc), 19.1 (T ^{γ}).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -129.4 – -130.3 (m, 2F, F6a/b-Gal').

5.5.3 Synthese der sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (**129**)^[209]

(Fmoc-Thr-(β -Bn₃2FGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-*O**t*Bu)



Es wurden 1.14 g (1.71 mmol, 2.5 Äquiv.) $\alpha\text{Ac}_4\text{SiaCO}_2\text{BnXan}$ **48** in 24 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 2.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt.

Es wurden 700 mg (0.68 mmol) Fmoc-Thr-(β Bn₃2FGal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-*O**t*Bu **120**, gelöst in 24 mL absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtabschluss 437 mg (1.71 mmol, 2.5 Äquiv.) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 9 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden langsam 1.06 mL (1.71 mmol, 2.5 Äquiv.) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfonylbromid-Lösung (1.6 M in absol. 1,2-Dichlorethan, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei -45 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Danach wurde weitere 30 Minuten bei -45 °C gerührt und es wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 4:1 \rightarrow EtOAc). Zur vollständigen Abtrennung des Glycals **49** wurde eine zweite säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4) durchgeführt.

Ausbeute: 810 mg (0.51 mmol, 75%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.27$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:4).

RP-HPLC: $R_t = 21.4$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30), 5 min, (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23} = +19.5$ ($c = 1.00$, CHCl₃), Lit.:^[209] $[\alpha]_D^{23} = +19.2$ ($c = 1.00$, CHCl₃).

C₈₄H₉₈FN₃O₂₆ (M = 1584.67 g/mol) [1583.64].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1601.6767 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1601.6761).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.63 (d, 2H, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.4$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.53 (t, 2H, $J_{\text{H3,H4}} = J_{\text{H6,H5}} = 7.4$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.39 - 7.19 (m, 22H, H2-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 5.88 (d, 1H, $J_{\text{NH,H2}} = 9.6$ Hz, NH-GalN), 5.48 (d, 1H, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.5$ Hz, NH-Fmoc), 5.51 - 5.46 (m, 1H, H7-Sia) 5.41 - 5.30 (m, 1H, H8-Sia {5.34, dd, $J_{\text{H8,H9a}} = 5.5$ Hz, $J_{\text{H8,H7}} = 2.3$ Hz}), 5.27 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.3$ Hz, CH₂-Bn), 5.22 (d, 1H, $J_{\text{NH,H5}} = 9.3$ Hz, NH-Sia), 5.13 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.89 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.85 - 4.69 (m, 4H, H4-Sia {4.82}, H1-GalN {4.79}, CH₂-Bn {4.75, d, $J_{\text{CH,CH}} = 12.6$ Hz}), H2-Gal' {4.71}), 4.68 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.58 - 4.43 (m, 5H, H2-GalN {4.55}, CH₂-Bn {4.52, d, $J_{\text{CH,CH}} = 11.4$ Hz}, H1-Gal' {4.49}, CH₂-Fmoc {4.47}), 4.36 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 10.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.34 - 4.25 (m, 2H, H9a-Sia {4.30, dd, $J_{\text{H9a,H9b}} = 12.7$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.5$ Hz}, H9-Fmoc {4.26}), 4.22 - 4.04 (m, 5H, T ^{α} {4.18}, T ^{β} {4.14}, H9b-Sia {4.09}, H5-Sia {4.07}, H6-Sia {4.07}), 3.98 (bs, 1H, H4-GalN), 3.91 - 3.86 (m, 2H, H6a-Gal' {3.90}, H4-Gal' {3.88, d, $J_{\text{H4,H3}} = 3.2$ Hz}), 3.82 (t, 1H, $J_{\text{H5,H6a/b}} = 5.9$ Hz, H5-Gal'), 3.64 - 3.47 (m, 6H, H3-GalN {3.64}, H5-GalN {3.56}, H3-Gal' {3.54}, H6b-Gal' {3.54}, H6a-GalN {3.54}, H6b-GalN {3.49}), 2.58 (dd, 1H, $J_{\text{H3}\ddot{\text{a}}\text{q},\text{H3}\ddot{\text{a}}\text{x}} = 12.9$ Hz, $J_{\text{H3}\ddot{\text{a}}\text{q},\text{H4}} = 4.7$ Hz, H3 _{$\ddot{\text{a}}\text{q}$} -Sia), 2.12, 2.08, 2.02, 2.00 (4 \times s, 12H, CH₃-OAc), 1.96 - 1.82 (m, 1H, H3 _{$\ddot{\text{a}}\text{x}$} -Sia), 1.97, 1.85 (2 \times s, 6H, CH₃-NHAc), 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.27 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.0$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.0, 170.8, 170.8, 170.4, 170.3, 170.3, 170.1 (7 \times C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.5 (C1-Sia), 156.7 (C=O-Urethan), 144.0, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.2, 138.0, 137.7, 134.9 (4 \times C_q-Bn), 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.6, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7 (20 \times C_{Ar}-Bn, C2-, C7-Fmoc), 127.2, 127.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.2, 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.8 (d, $J_{\text{C1,F}} = 24.5$ Hz, C1-Gal'), 100.6 (C1-GalN), 98.9 (C2-Sia), 91.5 (d, $J_{\text{C2,F}} = 182.9$ Hz, C2-Gal'), 83.0 (C_q-*t*Bu), 80.1 (d, $J_{\text{C3,F}} = 15.7$ Hz, C3-Gal'), 79.7 (C3-GalN), 76.8 (T ^{β}), 75.0 (CH₂-Bn), 74.1 (C4-Gal'), 73.8 (C5-GalN), 73.6 (CH₂-Bn), 73.0 (C6-Sia), 72.7 (CH₂-Bn), 69.5 (C8-Sia), 69.2, 69.1 (C5-Gal', C4-Sia), 68.1 (C6-GalN), 68.0 (C4-GalN), 67.8 (CH₂-Bn), 67.4 (C7-Sia), 67.1 (CH₂-Fmoc), 63.8 (C6-Gal'), 62.5 (C9-Sia), 59.5 (T ^{α}), 49.3 (C5-Sia), 47.7 (C2-GalN), 47.4 (C9-Fmoc), 37.6 (C3-Sia), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 23.4, 23.2 (CH₃-NHAc), 21.1, 21.1, 21.0, 20.9 (CH₃-OAc), 19.0 (T ^{γ}).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -204.4 (dd, $J_{\text{F,H2}} = 51.9$ Hz, $J_{\text{F,H3}} = 12.1$ Hz, F2-Gal').

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[209]

H6b-Gal' {3.46}), 2.57 (dd, 1H, $J_{\text{H3äq,H3ax}} = 12.9$ Hz, $J_{\text{H3äq,H4}} = 4.7$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.12, 2.06, 2.02, 2.00 ($4 \times$ s, 12H, CH₃-OAc), 1.95 - 1.84 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.98, 1.88 ($2 \times$ s, 6H, CH₃-NHAc), 1.24 (d, 3H, $J_{\text{T γ ,T β }} = 5.8$ Hz, T $^{\gamma}$).

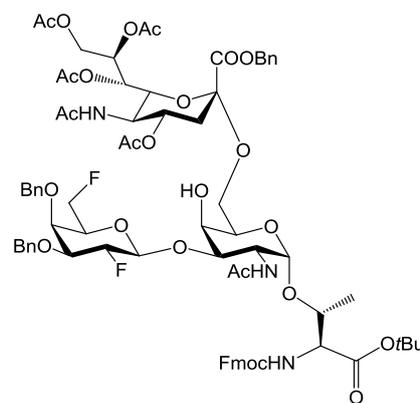
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.2, 171.0, 171.0, 170.9, 170.7, 170.6, 170.3, ($7 \times$ C=O-NHAc, -OAc, -Carbonsäure), 168.6 (C1-Sia), 161.1 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.2, 138.1, 137.8, 134.8 ($4 \times$ C_q-Bn), 128.9, 128.9, 128.7, 128.7, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.0, 128.0, 127.9, 127.7 ($20 \times$ C_{A'}-Bn, C2-, C7-Fmoc), 127.2, 127.2 (C3-, C6-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 102.6 (d, $J_{\text{C1,F}} = 24.8$ Hz, C1-Gal'), 100.5 (C1-GalN), 98.9 (C2-Sia), 91.5 (d, $J_{\text{C2,F}} = 183.4$ Hz, C2-Gal'), 80.2 (d, $J_{\text{C3,F}} = 15.5$ Hz, C3-Gal'), 79.8 (C3-GalN), 76.7 (T $^{\beta}$), 74.9 (CH₂-Bn), 74.0 (C4-Gal'), 73.8 (C5-GalN), 73.6 (CH₂-Bn), 73.0 (C6-Sia), 72.7 (CH₂-Bn), 69.5 (C8-Sia), 69.5, 68.9 (C5-Gal', C4-Sia), 68.3 (C6-GalN), 68.5 (C4-GalN), 67.8 (CH₂-Bn), 67.5 (C7-Sia), 67.2 (CH₂-Fmoc), 64.0 (C6-Gal'), 62.6 (C9-Sia), 60.4 (T $^{\alpha}$), 49.4 (C5-Sia), 46.7 (C2-GalN), 47.2 (C9-Fmoc), 37.6 (C3-Sia), 23.3, 23.2 (CH₃-NHAc), 21.2, 21.1, 21.0, 20.9 (CH₃-OAc), 19.0 (T $^{\gamma}$).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -204.6 (dd, $J_{\text{F,H2}} = 52.1$ Hz, $J_{\text{F,H3}} = 12.0$ Hz, F2-Gal').

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (131)^[338]

(Fmoc-Thr-(β -Bn₂2,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3))- $[\alpha$ -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-*O*tBu)

Es wurden 895 mg (1.33 mmol, 2.5 Äquiv.) α Ac₄SiaCO₂BnXan **48** in 18 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 1.5 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 500 mg (0.53 mmol) Fmoc-Thr-(β -Bn₂2,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-*O*tBu **124**, gelöst in 12 mL absol. Acetonitril und 6 mL Dichlormethan, zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 342 mg (1.33 mmol, 2.5 Äquiv.) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 9 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden 832 μ L (1.33 mmol, 2.5 Äquiv.) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in absol. 1,2-Dichlorethan, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei -45 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Danach wurde weitere 30 Minuten bei -45 °C gerührt und es wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kie-



selgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 4:1 \rightarrow EtOAc). Zur vollständigen Abtrennung des Glycals **49** wurde eine zweite säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:4) durchgeführt.

Ausbeute: 475 mg (0.32 mmol, 60%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.26$ ($^{\circ}\text{Hex}/\text{EtOAc}$, 1:4).

RP-HPLC: $R_t = 15.6$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30), 5 min (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23} = +18.3$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[338] $[\alpha]_D^{23} = +17.9$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₇₇H₉₁F₂N₃O₂₅ (M = 1496.55 g/mol) [1495.59].

ESI-MS (positiv) m/z : 1497.60 ([M+H]⁺, ber.: 1497.61), 1518.67 ([M+Na]⁺, ber.: 1518.58).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1513.6388 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1513.6253).

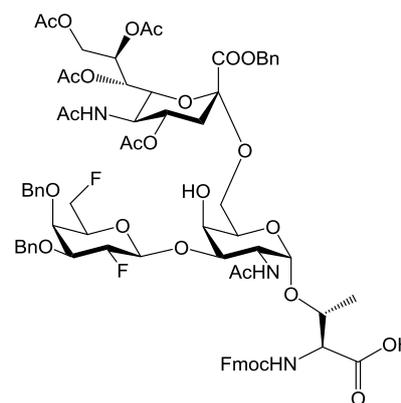
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.74 (d, 2H, $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.4$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.65 (d, 2H, $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = J_{\text{H}_8,\text{H}_7} = 7.6$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.41 - 7.28 (m, 19H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 5.79 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.9$ Hz, NH-GalN), 5.51 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.3$ Hz, NH-Fmoc), 5.40 - 5.29 (m, 3H, H4-Gal' {5.39}, H8-Sia {5.33}, H7-Sia {5.31}), 5.27 - 5.17 (m, 3H, H2-Gal' {5.22}, CH₂-Bn {5.19, d, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 11.5$ Hz}), 5.14 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}_5} = 9.4$ Hz, NH-Sia), 4.92 (d, 1H, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 11.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.84 - 4.76 (m, 3H, H4-Sia {4.81}, H1-GalN {4.78}, CH₂-Bn {4.80, d, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 11.8$ Hz}), 4.70 - 4.63 (m, 1H, H1-Gal' {4.65}), 4.67 (d, 1H, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 12.2$ Hz, CH₂-Bn), 4.57 (d, 2H, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 11.4$ Hz, CH₂-Bn), 4.54 - 4.44 (m, 3H, CH₂-Fmoc {4.52}, H2-GalN {4.50}), 4.44 - 4.41 (m, 1H, H6a-Gal'), 4.40 - 4.25 (m, 3H, H6b-Gal' {4.34}, H9b-Sia {4.31, dd, $J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_9\text{b}} = 12.5$ Hz, $J_{\text{H}_9\text{a},\text{H}_8} = 2.3$ Hz}), H9-Fmoc {4.26}), 4.21 - 4.03 (m, 5H, T ^{α} {4.21}, T ^{β} {4.18}, H9a-Sia {4.12}, H5-Sia {4.07}, H6-Sia {4.03}), 3.99 - 3.87 (m, 3H, H5-Gal' {3.96}, H4-GalN {3.94}, H6a-GalN {3.91}), 3.82 (bs, 1H, H5-GalN), 3.73 - 3.61 (m, 2H, H3-GalN {3.71}, H3-Gal' {3.64}), 3.54 (dd, 1H, $J_{\text{H}6\text{b},\text{H}6\text{a}} = 9.8$ Hz, $J_{\text{H}6\text{b},\text{H}_5} = 5.2$ Hz, H6b-GalN), 2.61 (dd, 1H, $J_{\text{H}3\text{äq},\text{H}3\text{ax}} = 12.8$ Hz, $J_{\text{H}3\text{äq},\text{H}_4} = 4.6$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.11, 2.10, 2.02, 2.01 (4 \times s, 12H, CH₃-OAc), 1.96 - 1.86 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.92, 1.86 (2 \times s, 6H, CH₃-NHAc), 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.25 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.2, 170.9, 170.8, 170.6, 170.3, 170.2, 170.0 (7 \times C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.4 (C1-Sia), 156.8 (C=O-Urethan), 144.0, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 137.8, 137.7 (3 \times C_q-Bn), 128.8, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7 (15 \times C_{Ar}-Bn, C2-, C7-Fmoc), 127.2, 127.2 (C3-, C6-Fmoc), 125.1, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 102.5 (d, $J_{\text{C}_1,\text{F}_2} = 26.2$ Hz, C1-Gal'), 100.3 (C1-GalN), 98.9 (C2-Sia), 91.3 (d, $J_{\text{C}_2,\text{F}_2} = 185.2$ Hz, C2-Gal'), 83.1 (C_q-*t*Bu), 81.8 (d, $J_{\text{C}_6,\text{F}_6} = 165.6$ Hz, C6-Gal'), 79.8 (d, $J_{\text{C}_3,\text{F}_2} = 16.1$ Hz, C3-Gal'), 79.7 (C3-GalN), 77.0 (T ^{β}), 74.9, 74.8 (CH₂-Bn), 73.6 (C4-Gal'), 73.1 (C6-Sia), 73.2 (d, $J_{\text{C}_5,\text{F}_6} = 19.6$ Hz, C5-Gal'), 69.4 (C8-Sia), 69.1, 69.0 (C5-GalN, C4-Sia), 68.2 (C4-GalN), 67.9 (CH₂-Bn), 67.5 (C7-Sia), 67.2 (CH₂-Fmoc), 63.9 (C6-GalN), 62.2 (C9-Sia), 59.2 (T ^{α}), 49.3 (C5-Sia), 47.6 (C2-GalN), 46.6 (C9-Fmoc), 37.5 (C3-Sia), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 23.2, 23.1 (CH₃-NHAc), 21.1, 20.9, 20.9, 20.8 (CH₃-OAc), 18.9 (T ^{γ}).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -204.6 (dd, 1F, $J_{\text{F}_2, \text{H}_2} = 52.1$ Hz, $J_{\text{F}_2, \text{H}_3} = 12.4$ Hz, F2-Gal'), -229.7 (dt, 1F, $J_{\text{F}_6, \text{H}_6\text{a}} = 46.5$ Hz, $J_{\text{F}_6, \text{H}_6\text{b}} = 46.5$ Hz, $J_{\text{F}_6, \text{H}_5} = 11.6$ Hz, F6-Gal').

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin (132)**^[338]

(Fmoc-Thr-(β -Bn₂2,6F₂Gal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OH)



Es wurden 250 mg (0.17 mmol) Fmoc-Thr-(β Bn₂2,6F₂Gal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu **131** in 11 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (10:1) gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin mit 50 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak.

entfernt. Der Rückstand wurde fünfmal mit je 30 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc → EtOAc/MeOH/AcOH, 2:1:0.01) gereinigt.

Ausbeute: 171 mg (0.12 mmol, 71%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.51$ (EtOAc/MeOH/AcOH, 2:1:0.01).

RP-HPLC: $R_t = 3.48$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (67:33) → (50:50) in 10 min, → (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{21} = +26.8$ (c = 1.00, CHCl_3), Lit.:^[338] $[\alpha]_D^{23} = +27.1$ (c = 1.00, CHCl_3).

$\text{C}_{73}\text{H}_{83}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_{25}$ (M = 1440.44 g/mol) [1439.53].

ESI-MS (positiv) m/z : 1440.53 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1440.53), 1462.53 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1462.52).

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1440.5367 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 1440.5362), 1457.5638 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.: 1457.5622), 1462.5188 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1462.5181).

HR-ESI-MS (negativ) m/z : 1438.5146 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 1438.5205).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , COSY, HSQC), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, $J_{\text{H}_4, \text{H}_3} = J_{\text{H}_5, \text{H}_6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.66 - 7.60 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.41 - 7.27 (m, 19H, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 5.69 (d, 1H, $J_{\text{NH}, \text{H}_2} = 8.9$ Hz, NH-GalN), 5.48 (m_c, 1H, NH-Fmoc), 5.42 - 5.31 (m, 3H, H4-Gal' {5.40}, H8-Sia {5.35}, H7-Sia {5.32}), 5.25 - 5.14 (m, 3H, H2-Gal' {5.21}), CH₂-Bn {5.17, d, $J_{\text{CH}, \text{CH}} = 11.4$ Hz}), 5.12 (d, 1H, $J_{\text{NH}, \text{H}_5} = 9.2$ Hz, NH-Sia), 4.94 (d, 1H, $J_{\text{CH}, \text{CH}} = 11.5$ Hz, CH₂-Bn), 4.83 - 4.74 (m, 3H, H4-Sia {4.81}, H1-GalN

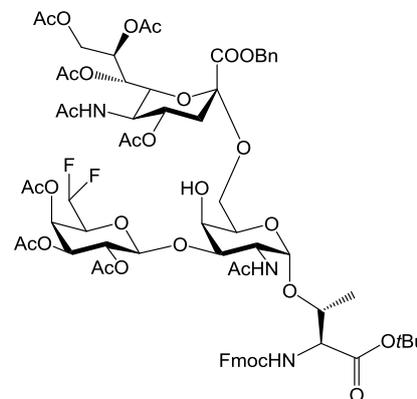
{4.79}, CH₂-Bn {4.77, d, $J_{\text{CH,CH}} = 11.6$ Hz}), 4.72 - 4.65 (m, 1H, H1-Gal' {4.68}), 4.64 (d, 1H, $J_{\text{CH,CH}} = 12.0$ Hz, CH₂-Bn), 4.56 (d, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 11.3$ Hz, CH₂-Bn), 4.52 - 4.43 (m, 3H, CH₂-Fmoc {4.50}, H2-GalN {4.49}), 4.42 - 4.38 (m, 1H, H6a-Gal'), 4.39 - 4.24 (m, 3H, H6b-Gal' {4.32}), H9b-Sia {4.28, dd, $J_{\text{H9a,H9b}} = 11.9$ Hz, $J_{\text{H9a,H8}} = 2.1$ Hz}, H9-Fmoc {4.27}), 4.21 - 4.05 (m, 5H, T^α {4.21}, T^β {4.17}, H9a-Sia {4.14}, H5-Sia {4.08}, H6-Sia {4.05}), 4.01 - 3.89 (m, 3H, H5-Gal' {3.98}, H4-GalN {3.95}, H6a-GalN {3.89}), 3.85 (bs, 1H, H5-GalN), 3.75 - 3.61 (m, 2H, H3-GalN {3.71}, H3-Gal' {3.64}), 3.52 (dd, 1H, $J_{\text{H6b,H6a}} = 9.7$ Hz, $J_{\text{H6b,H5}} = 5.0$ Hz, H6b-GalN), 2.59 (dd, 1H, $J_{\text{H3äq,H3ax}} = 12.7$ Hz, $J_{\text{H3äq,H4}} = 4.4$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.10, 2.09, 2.04, 2.01 (4 × s, 12H, CH₃-OAc), 1.97 - 1.89 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.92, 1.86 (2 × s, 6H, CH₃-NHAc), 1.26 (d, 3H, $J_{\text{Tγ,Tβ}} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃ HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.4, 171.3, 171.1, 170.8, 170.7, 170.5, 170.1, (7 × C=O-NHAc, -OAc, -Carbonsäure), 167.7 (C1-Sia), 156.4 (C=O-Urethan), 144.2, 143.9 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.1, 140.9 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.0, 137.8, 137.6 (3 × C_q-Bn), 128.8, 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 128.1, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6 (15 × C_{Ar}-Bn, C2-, C7-Fmoc), 127.4, 127.3 (C3-, C6-Fmoc), 124.9, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.4, 120.3 (C4-, C5-Fmoc), 102.6 (d, $J_{\text{C1,F2}} = 25.9$ Hz, C1-Gal'), 100.1 (C1-GalN), 98.7 (C2-Sia), 91.4 (d, $J_{\text{C2,F2}} = 184.9$ Hz, C2-Gal'), 81.6 (d, $J_{\text{C6,F6}} = 165.3$ Hz, C6-Gal'), 79.6 (d, $J_{\text{C3,F2}} = 15.8$ Hz, C3-Gal'), 79.6 (C3-GalN), 77.2 (T^β), 74.8 (CH₂-Bn), 74.7 (CH₂-Bn), 73.4 (C4-Gal'), 73.2 (C6-Sia), 73.1 (d, $J_{\text{C5,F6}} = 19.2$ Hz, C5-Gal'), 69.4 (C8-Sia), 69.0, 68.9 (C5-GalN, C4-Sia), 68.2 (C4-GalN), 67.7 (CH₂-Bn), 67.4 (C7-Sia), 67.2 (CH₂-Fmoc), 63.7 (C6-GalN), 62.3 (C9-Sia), 59.1 (T^α), 49.4 (C5-Sia), 47.4 (C2-GalN), 46.7 (C9-Fmoc), 37.4 (C3-Sia), 23.3, 23.0 (CH₃-NHAc), 21.2, 20.9, 20.8, 20.6 (CH₃-OAc), 18.5 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -205.1 (dd, 1F, $J_{\text{F2,H2}} = 52.1$ Hz, $J_{\text{F2,H3}} = 12.7$ Hz, F2-Gal'), -229.8 (m_c, 1F, F6-Gal').

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (133)**

(Fmoc-Thr-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu)



Es wurden 1.11 g (1.65 mmol, 2.5 Äquiv.) α -Ac₄SiaCO₂BnXan **48** in 18 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 1.6 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 600 mg (0.66 mmol) Fmoc-Thr-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-OtBu **127**, gelöst in 12 mL absol. Acetonitril und 6 mL Dichlormethan, zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 424 mg (1.65 mmol, 2.5 Äquiv.) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 9 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden langsam 1.03 mL (1.65 mmol, 2.5 Äquiv.) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in absol. 1,2-Dichlorethan, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei -45 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Es wurde weitere 30 Minuten bei -45 °C gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (Hex/EtOAc, 1:4 \rightarrow EtOAc).

Ausbeute: 700 mg (0.48 mmol, 72%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.18 (EtOAc).

RP-HPLC: R_t = 10.6 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30), 5 min (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23}$ = + 17.7 (c = 1.00, CHCl₃).

C₆₉H₈₅F₂N₃O₂₉ (M = 1458.41 g/mol) [1457.52].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1475.5566 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1475.5575), 1496.4868 ([M+K]⁺, ber.: 1496.4874).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, H₄-, H₅-Fmoc), 7.62 - 7.58 (m, 2H, H₁-, H₈-Fmoc), 7.43 - 7.30 (m, 9H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, H_{Af}-Bn), 6.04 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.5$ Hz, NH-GalN), 5.74 (td, 1H, $J_{H_6,Fa} = 55.4$ Hz, $J_{H_6,Fb} = 55.4$ Hz, $J_{H_6,H_5} = 5.8$ Hz, H₆-Gal'), 5.55 - 5.51 (m, 1H, H₄-Gal'), 5.49 (d, 1H, $J_{NH,Ta} = 9.5$ Hz, NH-Fmoc), 5.38 - 5.30 (m, 2H, H₈-Sia {5.33}, H₇-Sia {5.30}), 5.26 - 5.17 (m, 4H, H₂-Gal' {5.22}, CH₂-Bn {5.20, d, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz}, NH-Sia {5.17, d, $J_{NH,H_5} = 9.4$ Hz}), 5.00 - 4.94 (m, 1H, H₃-Gal'), 4.88 - 4.83 (m, 1H, H₄-Sia), 4.77 - 4.65 (m, 2H, H₁-GalN {4.72},

H1-Gal' {4.65, d, $J_{H1,H2} = 7.7$ Hz}), 4.55 - 4.49 (m, 3H, CH₂-Fmoc {4.52}, H2-GalN {4.50}), 4.46 - 4.26 (m, 2H, H9b-Sia {4.30, dd, $J_{H9a,H9b} = 12.5$ Hz, $J_{H9a,H8} = 2.6$ Hz}), H9-Fmoc {4.26}), 4.19 - 4.05 (m, 5H, T^α {4.14}, T^β {4.09}), H9a-Sia {4.07}, H5-Sia {4.04}, H6-Sia {4.03}), 4.02 - 3.89 (m, 3H, H5-Gal' {3.94}, H4-GalN {3.93}, H6a-GalN {3.90}), 3.81 (bs, 1H, H5-GalN), 3.69 - 3.64 (m, 1H, H3-GalN), 3.54 (dd, 1H, $J_{H6b,H6a} = 10.1$ Hz, $J_{H6b,H5} = 5.2$ Hz, H6b-GalN), 2.55 (dd, 1H, $J_{H3_{\text{äq}},H3_{\text{ax}}} = 13.5$ Hz, $J_{H3_{\text{äq}},H4} = 5.0$ Hz, H3_{eq}-Sia), 2.15, 2.12, 2.11, 2.10, 2.08, 2.06, 2.01, 2.00, 1.98 (9 × s, 27H, CH₃-OAc, -NHAc), 1.94 - 1.86 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.24 (m_c, 3H, T^γ).

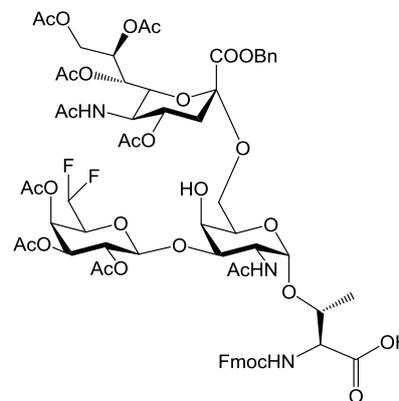
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.0, 170.7, 170.5, 170.2, 170.0, 169.9, 169.6 (10 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.3 (C1-Sia), 156.4 (C=O-Urethan), 143.8, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.8 (C_q-Bn), 129.0, 128.7, 128.6, 128.4, 128.2, 128.1, 127.8 (5 × C_{A'}-Bn, C2-, C7-Fmoc), 127.1, 127.0 (C3-, C6-Fmoc), 125.3, 124.9 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 112.8 (t, $J_{C6,Fa} = 243.6$ Hz, $J_{C6,Fb} = 243.6$ Hz, C6-Gal'), 102.0 (C1-Gal'), 100.3 (C1-GalN), 98.7 (C2-Sia), 83.0 (C_q-*t*Bu), 78.2 (C3-GalN), 76.8 (T^β), 72.9 (C6-Sia), 72.7 (t, $J_{C5,Fa} = J_{C5,Fb} = 27.9$ Hz, C5-Gal'), 71.1 (C3-Gal'), 69.4 (C8-Sia), 69.2 (C5-GalN), 69.1 (C4-Sia), 68.2 (C2-Gal'), 68.4 (C4-GalN), 67.9 (CH₂-Bn), 67.5 (C7-Sia), 66.9 (CH₂-Fmoc), 66.1 (C4-Gal'), 63.9 (C6-GalN), 62.4 (C9-Sia), 59.2 (T^α), 49.3 (C5-Sia), 47.6 (C2-GalN), 47.2 (C9-Fmoc), 37.3 (C3-Sia), 28.0 (CH₃-*t*Bu), 23.3, 23.1 (CH₃-NHAc), 21.4, 21.0, 20.8, 20.7, 20.5, 20.5 (CH₃-OAc), 18.6 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -128.8 (m_c, 2F, F6a/b-Gal').

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-dideoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onaf]- α -D-galactopyranosyl-L-threonin (134)**

(Fmoc-Thr-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OH)

Es wurden 700 mg (0.48 mmol) Fmoc-Thr-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu **133** in 11 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure und Wasser (10:1) gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin mit 50 mL Toluol verdünnt und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde fünfmal mit je 30 mL Toluol sowie zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kostilliert und ohne weitere Reinigungsschritte in der Festphasensynthese eingesetzt.



Ausbeute: 670 mg (0.48 mmol, quant.); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.41 (EtOAc/MeOH/AcOH, 2:1:0.01).

RP-HPLC: *R_t* = 3.93 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (67:33) \rightarrow (50:50) in 10 min, \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{23}$ = + 27.2 (c = 1.00, CHCl₃).

C₆₅H₇₇F₂N₃O₂₉ (M = 1402.31 g/mol) [1401.46].

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 1424.4509 ([M+Na]⁺, ber.: 1424.4508).

HR-ESI-MS (negativ) *m/z*: 1400.4471 ([M-H]⁻, ber.: 1400.4538).

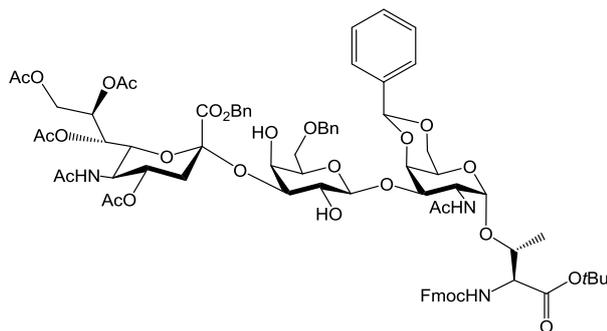
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.75 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, H₄-, H₅-Fmoc), 7.62 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.5$ Hz, H₁-, H₈-Fmoc), 7.40 - 7.14 (m, 9H, H₂-, H₃-, H₆-, H₇-Fmoc, H_{Ar}-Bn), 6.15 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.7$ Hz, NH-GalN), 5.71 (td, 1H, $J_{H_6,Fa} = 55.3$ Hz, $J_{H_6,Fb} = 55.3$ Hz, $J_{H_6,H_5} = 5.7$ Hz, H₆-Gal'), 5.52 - 5.41 (m, 1H, H₄-Gal'), 5.41 (d, 1H, $J_{NH,Ta} = 9.6$ Hz, NH-Fmoc), 5.40 - 5.07 (m, 6H, H₈-Sia {5.34}, H₇-Sia {5.30}, H₂-Gal' {5.22}, NH-Sia {5.19}, CH₂-Bn {5.15, d, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz}), 5.02 - 4.80 (m, 3H, H₃-Gal' {5.01}, H₁-GalN {4.84}, H₄-Sia {4.81}), 4.77 - 4.67 (m, 1H, H₁-Gal' {4.67, d, $J_{H_1,H_2} = 7.5$ Hz}), 4.57 - 4.20 (m, 7H, CH₂-Fmoc {4.46}, H₂-GalN {4.38}, T^a {4.30}, H_{9b}-Sia {4.29, dd, $J_{H_{9a},H_{9b}} = 12.5$ Hz, $J_{H_{9a},H_8} = 2.4$ Hz}), T^b {4.26}, H₉-Fmoc {4.22}), 4.19 - 3.99 (m, 4H, H₆-Sia {4.13}, H₅-Sia {4.06}, H₅-Gal' {4.05}, H_{9a}-Sia {4.03}), 3.96 - 3.77 (m, 3H, H₄-GalN {3.94}, H_{6a}-GalN {3.86}, H₅-GalN {3.83}), 3.76 - 3.69 (m, 1H, H₃-GalN), 3.48 (dd, 1H, $J_{H_{6b},H_{6a}} = 9.9$ Hz, $J_{H_{6b},H_5} = 5.4$ Hz, H_{6b}-GalN), 2.54 (dd, 1H, $J_{H_{3aq},H_{3ax}} = 13.5$ Hz, $J_{H_{3aq},H_4} = 5.0$ Hz, H_{3_{eq}}-Sia), 2.12, 2.10, 2.09, 2.05, 2.01, 2.00, 1.99, 1.97, 1.95 (9 \times s, 27H, CH₃-OAc, -NHAc), 1.91 - 1.86 (m, 1H, H_{3_{ax}}-Sia), 1.25 (m, 3H, T^c).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.4, 171.2, 171.2, 170.8, 170.7, 170.6, 170.2, 170.1, 169.8, 169.7 ($10 \times \text{C}=\text{O-NHAc}$, $-\text{OAc}$, $-\text{Carbonsäure}$), 167.4 (C1-Sia), 156.6 (C=O-Urethan), 143.9, 143.6 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.0 ($\text{C}_q\text{-Bn}$), 129.1, 128.9, 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 127.9 ($5 \times \text{C}_{Ar}\text{-Bn}$, C2-, C7-Fmoc), 127.2, 127.1 (C3-, C6-Fmoc), 125.4, 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.1, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 112.9 (t, $J_{\text{C}_6,\text{Fa}} = J_{\text{C}_6,\text{Fb}} = 243.1$ Hz, C6-Gal'), 101.8 (C1-Gal'), 99.8 (C1-GalN), 97.7 (C2-Sia), 77.8 (C3-GalN), 76.8 (T^β), 72.6 (C6-Sia), 72.7 (t, $J_{\text{C}_5,\text{Fa}} = J_{\text{C}_5,\text{Fb}} = 26.2$ Hz, C5-Gal'), 71.1 (C3-Gal'), 69.4 (C8-Sia), 69.1 (C4-Sia), 69.0 (C5-GalN), 68.3 (C2-Gal'), 68.5 (C4-GalN), 68.0 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 67.5 (C7-Sia), 67.1 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 66.0 (C4-Gal'), 64.0 (C6-GalN), 62.5 (C9-Sia), 58.9 (T^α), 49.3 (C5-Sia), 48.2 (C2-GalN), 47.1 (C9-Fmoc), 37.3 (C3-Sia), 23.1, 22.9 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 21.6, 21.2, 20.9, 20.8, 20.6, 20.5 ($\text{CH}_3\text{-OAc}$), 18.3 (T^γ).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -129.0 (m_c , 2F, F6a/b-Gal').

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-{6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl}-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat])- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (135)^[144]**

(Fmoc-Thr-(β -BnGal-(1 \rightarrow 3))- $[\alpha$ -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α -4,6-BznGalNAc)-*O*tBu)



Es wurden 3.31 g (4.93 mmol, 2.5 Äquiv.) $\alpha\text{Ac}_4\text{-SiaCO}_2\text{BnXan}$ **48** in 60 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 6.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.85 g (1.97 mmol) Fmoc-Thr-(β -BnGal-(1 \rightarrow 3))- α -4,6-BznGalNAc)-*O*tBu **117**, gelöst in 40 mL absol. Acetonitril und 20 mL Dichlormethan, zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 1.27 g (4.93 mmol, 2.5 Äquiv.) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 15 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril/Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden 3.08 mL (4.93 mmol, 2.5 Äquiv.) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfonylbromid-Lösung (1.6 M in absol. 1,2-Dichlorethan, siehe S. 164) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 72 h bei -45 °C bis -35 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Danach wurde weitere 30 Minuten bei -35 °C gerührt und es wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc \rightarrow $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1). Zur vollständigen Abtrennung des Glycals **49** wurde eine weitere säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (EtOAc \rightarrow EtOAc/EtOH, 30:1) durchgeführt. Neben dem gewünschten Produkt **135** konnten nicht umgesetztes Edukt **117** bzw. Mischfraktionen zurückgewonnen werden, welche erneut umgesetzt wurden.

Ausbeute: 1.52 g (1.02 mmol, 52%); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.37$ (EtOAc/EtOH, 20:1), 0.28 (EtOAc/EtOH, 30:1), 0.56 (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1).

RP-HPLC: $R_t = 14.2$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30), 5 min, (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{22} = +30.5$ (c = 1.00, CHCl₃), Lit.:^[290] $[\alpha]_D^{27} = +32.0$ (c = 1.00, CHCl₃).

C₇₇H₉₁N₃O₂₇ (M = 1490.57 g/mol) [1489.58].

ESI-MS (positiv) m/z: 1507.62 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1507.62).

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1490.5890 ([M+H]⁺, ber.: 1490.5918), 1507.6144 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1507.6178).

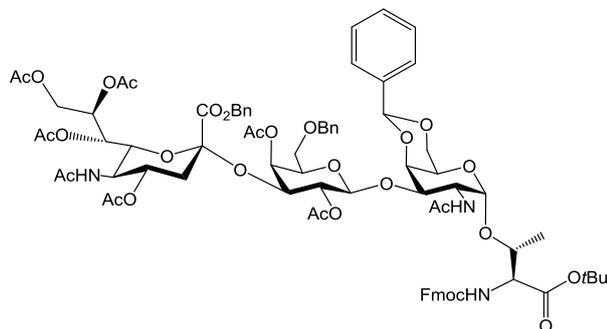
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 7.5$ Hz, H1-Fmoc), 7.58 (d, 1H, $J_{H_8,H_7} = 7.5$ Hz, H8-Fmoc), 7.53 - 7.49 (m, 2H, H3-, H6-Fmoc), 7.43 - 7.27 (m, 17H, H_{Ar}-Bn, -Bzn, H2-, H7-Fmoc), 6.53 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.5$ Hz, NH-GalN), 6.11 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz, NH-Fmoc), 5.47 (s, 1H, CH-Bzn), 5.41 (ddd, 1H, $J_{H_8,H_9a} = 8.6$ Hz, $J_{H_8,H_9b} = 6.5$ Hz, $J_{H_8,H_7} = 2.3$ Hz, H8-Sia), 5.25 - 5.16 (m, 4H, H7-Sia {5.19}, NH-Sia {5.17}, CH₂-Bn {5.13}), 5.01 (d, 1H, $J_{H_1,H_2} = 3.9$ Hz, H1-GalN), 4.87 (td, 1H, $J_{H_4,H_3ax} = J_{H_4,H_5} = 11.6$ Hz, $J_{H_4,H_3\ddot{a}q} = 4.7$ Hz, H4-Sia), 4.71 (td, 1H, $J_{H_2,H_3} = J_{H_2,NH} = 10.3$ Hz, $J_{H_1,H_2} = 3.8$ Hz, H2-GalN), 4.51 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 11.8$ Hz, CH₂-Bn), 4.47 - 4.41 (m, 2H, CH₂-Bn {4.45}, H9a-Sia {4.42}), 4.40 - 4.33 (m, 1H, CH₂-Fmoc), 4.31 - 4.26 (m, 1H, CH₂-Fmoc), 4.30 - 4.04 (m, 7H, H4-GalN {4.27}, T ^{α} {4.22}, T ^{β} {4.21}, H9-Fmoc {4.15}, H1-Gal' {4.10}, H6a-GalN {4.08}, H5-Sia {4.05}), 4.01 - 3.81 (m, 4H, H9b-Sia {3.90}, H3-Gal' {3.88}, H6-Sia {3.87}, H6b-GalN {3.83}), 3.72 - 3.59 (m, 2H, H3-GalN {3.67}, H2-Gal' {3.57}), 3.56 - 3.38 (m, 4H, H6a-Gal' {3.56}, H5-GalN {3.53}, H6b-Gal' {3.46}, H5-Gal' {3.38}), 3.31 (m_c, 1H, H4-Gal'), 2.80 (bs, 1H, 2-OH-Gal'), 2.72 (dd, 1H, $J_{H_3\ddot{a}q,H_3ax} = 12.9$ Hz, $J_{H_3\ddot{a}q,H_4} = 4.7$ Hz, H3 _{$\ddot{a}q$} -Sia), 2.27 (d, 1H, $J_{OH,H_4} = 4.1$ Hz, 4-OH-Gal'), 2.04, 2.01, 1.94, 1.87 (4 \times s, 12H, CH₃-OAc), 2.03, 1.82 (2 \times s, 6H, CH₃-NHAc), 2.02 - 1.98 (m, 1H, H3_{ax}-Sia), 1.44 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.26 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.9$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.9, 171.4, 171.0, 170.9, 170.6, 170.4, 169.9 (7 \times C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.9 (C1-Sia), 157.0 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 143.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.3, 137.7 (C_q-Bn, -Bzn), 134.4 (C_q-Bn), 129.1, 129.0, 129.0, 128.9, 128.7, 128.6, 128.4, 128.2, 127.9, 127.9, 127.7, 127.2, 127.1, 126.6 (15 \times C_{Ar}-Bn, -Bzn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.3, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 106.7 (C1-Gal'), 101.0 (CH-Bzn), 100.5 (C1-GalN), 97.7 (C2-Sia), 83.3 (C_q-*t*Bu), 78.3 (C3-GalN), 75.9 (T ^{β} , C4-GalN, C3-Gal'), 73.6 (CH₂-Bn), 73.5 (C6-Sia), 73.5 (C5-Gal'), 69.8 (C8-Sia), 69.7 (C6-Gal'), 69.1 (C6-GalN), 68.7 C4-Sia), 68.5 (CH₂-Bn), 68.4 (C2-Gal'), 68.2 (C4-Gal', C7-Sia), 67.3 (CH₂-Fmoc), 63.8 (C5-GalN), 63.6 (C9-Sia), 59.3 (T ^{α}), 49.3 (C5-Sia), 47.8 (C2-GalN), 47.2 (C9-Fmoc), 37.5 (C3-Sia), 28.1 (CH₃-*t*Bu), 23.3, 23.1 (CH₃-NHAc), 21.0, 21.0, 20.8, 20.7 (CH₃-OAc), 19.5 (T ^{γ}).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[144, 290]

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-{2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl}-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]) - α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (136)^[144]

(Fmoc-Thr-(β -Ac₂BnGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄Sia-CO₂Bn-(2,3)]- α -4,6-BznGalNAc)-OtBu



Es wurden 1.37 g (0.92 mmol) Fmoc-Thr-(β -Bn-Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α -4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu **135** in 60 mL einer Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid (2:1) gelöst und 18 h bei

Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 50 mL Toluol und mit 30 mL Dichlormethan kdestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH, 50:3).

Ausbeute: 1.39 g (0.88 mmol, 96%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.44 (CH₂Cl₂/MeOH, 50:3).

RP-HPLC: *R_t* = 18.8 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30), 5 min, (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 37.2 (c = 1.00, CHCl₃).

C₈₁H₉₅N₃O₂₉ (M = 1574.63 g/mol) [1573.61].

ESI-MS (positiv) *m/z*: 1591.64 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1591.64).

HR-ESI-MS (positiv) *m/z*: 1574.6101 ([M+H]⁺, ber.: 1574.6129), 1591.6371 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1591.6389).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.65 - 7.51 (m, 4H, H1-, H3-, H6-, H8-Fmoc), 7.43 - 7.23 (m, 17H, H_{Ar}-Bn, -Bzn, H2-, H7-Fmoc), 6.46 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz, NH-GalN), 5.98 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 5.51 (s, 1H, CH-Bzn), 5.49 - 5.41 (m, 2H, H8-Sia {5.48}, CH₂-Bn {5.42}), 5.26 - 5.17 (m, 1H, H7-Sia), 5.12 - 5.05 (m, 3H, H2-Gal' {5.09}, H4-GalN {5.08}, CH₂-Bn {5.07}), 5.00 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, H1-GalN), 4.99 - 4.96 (m, 1H, NH-Sia), 4.84 (td, 1H, $J_{H4,H3ax} = J_{H4,H5} = 11.4$ Hz, $J_{H4,H3\ddot{a}q} = 4.5$ Hz, H4-Sia), 4.69 (ddd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.4$ Hz, $J_{H2,NH} = 9.3$ Hz, $J_{H1,H2} = 3.4$ Hz, H2-GalN), 4.57 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.2$ Hz, H1-Gal'), 4.52 - 4.37 (m, 5H, CH₂-Bn {4.48}, H3-Gal' {4.44}, CH₂-Fmoc {4.42}, H9a-Sia {4.39}), 4.36 - 4.29 (m, 2H, CH₂-Fmoc {4.35}, T ^{β} {4.30}), 4.28 - 4.11 (m, 4H, T ^{α} {4.24}, H9-Fmoc {4.22}, H6a-GalN {4.15}, H4-Gal' {4.13}), 4.07 - 4.00 (m, 1H, H5-Sia), 3.96 (dd, 1H, $J_{H9b,H9a} = 12.2$ Hz, $J_{H9b,H8} = 4.2$ Hz, H9b-Sia), 3.92 - 3.86 (m, 1H, H6b-GalN), 3.83 - 3.75 (m, 2H, H5-Gal' {3.78}, H3-GalN {3.78}), 3.61 (m, 1H, H5-GalN), 3.57 - 3.43 (m, 3H, H6a-Gal' {3.53}, H6-Sia {3.52}, H6b-Gal' {3.47}), 2.62 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 12.7$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.7$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.35, 2.25, 2.17,

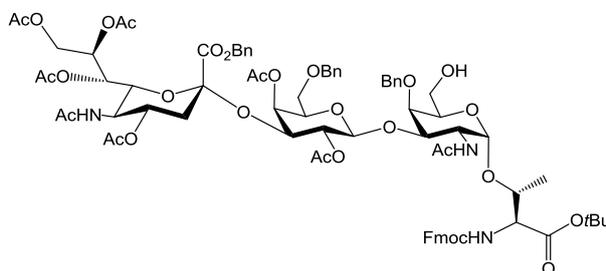
2.12, 2.02, 1.92 (6 × s, 18H, CH₃-OAc), 2.12, 1.80 (2 × s, 6H, CH₃-NHAc), 1.66 (t, 1H, $J_{\text{H3ax,H3äq}} = J_{\text{H3ax,H4}} = 12.4$ Hz, H_{3ax}-Sia), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.29 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.9, 171.3, 171.1, 170.8, 170.7, 170.5, 170.3, 169.8, 168.4 (9 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.4 (C1-Sia), 156.9 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 143.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.0, 137.8 (C_q-Bn, -Bzn), 134.8 (C_q-Bn), 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.7, 127.2, 126.5 (15 × C_{Ar}-Bn, -Bzn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.4, 125.3 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 102.9 (C1-Gal'), 100.7 (CH-Bzn), 100.1 (C1-GalN), 97.8 (C2-Sia), 83.2 (C_q-*t*Bu), 75.9 (C3-GalN), 75.6 (T^β), 73.5 (CH₂-Bn), 72.8 (C4-Gal'), 72.8 (C6-Sia), 72.4 (C5-Gal'), 71.9 (C3-Gal'), 71.2 (C4-GalN), 69.1 (C4-Sia), 69.1 (C6-GalN), 69.1 (C2-Gal'), 69.0 (C8-Sia), 68.7 (C6-Gal'), 68.5 (CH₂-Bn), 67.9 (C7-Sia), 67.3 (CH₂-Fmoc), 63.6 (C5-GalN), 63.4 (C9-Sia), 59.2 (T^α), 48.9 (C5-Sia), 47.8 (C2-GalN), 47.1 (C9-Fmoc), 37.4 (C3-Sia), 28.0 (CH₃-*t*Bu), 23.3, 23.0 (CH₃-NHAc), 21.4, 21.3, 21.0, 20.8, 20.7, 20.7 (CH₃-OAc), 19.6 (T^γ).

Versuch zur Herstellung von

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4-*O*-benzyl-2-desoxy-3-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-*D*-galactopyranosyl]-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-α-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat])-α-*D*-galactopyranosyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (**137**)

(Fmoc-Thr-(β-Ac₂BnGal-(1→3))-[α-Ac₄-SiaCO₂Bn-(2,3)]-α-BnGalNAc)-*Ot*Bu



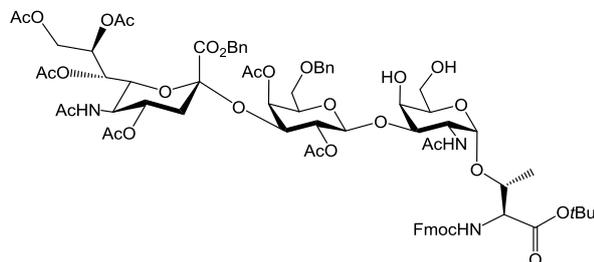
Entsprechend Referenz^[236] wurden 100 mg (0.06 mmol) Fmoc-Thr-(β-BnGal-(1→3))-[α-Ac₄-

SiaCO₂Bn-(2,3)]-α-4,6-BznGalNAc)-*Ot*Bu **136** in 50 mL absol. Dichlormethan gelöst, mit 100 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 1 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, bevor der Reaktionsansatz auf -78 °C gekühlt wurde. Anschließend wurden 30 μL (0.19 mmol, 3.0 Äquiv.) Triethylsilan sowie 26 μL (0.20 mmol, 3.4 Äquiv.) Dichlorphenylboran (PhBCl₂) zugegeben und 1 h -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.0 mL Methanol abgebrochen. Es wurde zweimal mit je 20 mL einer verd. Salzsäure (1 M), mit 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie 30 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Ausbeute: Es konnte kein Umsatz beobachtet werden, jedoch wurde Verbindung **136** zurückgewonnen.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-{2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl}-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat])- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (138)**

(Fmoc-Thr-(β -Ac₂BnGal-(1 \rightarrow 3))- α -Ac₄-SiaCO₂Bn-(2,3))- α -GalNAc)-OtBu)



Eine Lösung von 680 mg (0.43 mmol) des Trisaccharid-Threonin-Konjugats **136** in 20 mL 80%-iger

Essigsäure wurde 2 h bei 80 °C gerührt, mit 20 mL Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 480 mg (0.32 mmol, 74%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.26 (EtOAc/EtOH, 10:1).

RP-HPLC: *R_t* = 7.64 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (70:30), 5 min, (70:30) \rightarrow (100:0) in 30 min.

$[\alpha]_D^{20}$ = + 24.6 (c = 1.00, CHCl₃).

C₇₄H₉₁N₃O₂₉ (M = 1486.53 g/mol) [1485.57].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 1486.5776 ([M+H]⁺, ber.: 1486.5816), 1503.6048 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1503.6076).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, COSY, HSQC), δ (ppm): 7.76 (d, 2H, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.65 - 7.53 (m, 4H, H1-, H3-, H6-, H8-Fmoc), 7.41 - 7.23 (m, 12H, H_{Ar}-Bn, H2-, H7-Fmoc), 6.47 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.3$ Hz, NH-GalN), 5.98 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 5.51 - 5.41 (m, 2H, H8-Sia {5.47}, CH₂-Bn {5.43}), 5.26 - 5.17 (m, 1H, H7-Sia), 5.12 - 5.03 (m, 3H, H2-Gal' {5.09}, H4-GalN {5.08}, CH₂-Bn {5.07}), 4.99 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 3.2$ Hz, H1-GalN), 4.98 - 4.94 (m, 1H, NH-Sia), 4.84 (td, 1H, $J_{H4,H3ax} = J_{H4,H5} = 11.4$ Hz, $J_{H4,H3\ddot{a}q} = 4.5$ Hz, H4-Sia), 4.69 (ddd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.3$ Hz, $J_{H2,NH} = 9.2$ Hz, $J_{H1,H2} = 3.4$ Hz, H2-GalN), 4.55 (d, 1H, $J_{H1,H2} = 8.2$ Hz, H1-Gal'), 4.54 - 4.37 (m, 5H, CH₂-Bn {4.49}, H3-Gal' {4.44}, CH₂-Fmoc {4.41}, H9a-Sia {4.38}), 4.36 - 4.29 (m, 2H, CH₂-Fmoc {4.34}, T ^{β} {4.29}), 4.26 - 4.11 (m, 4H, T ^{α} {4.22}, H9-Fmoc {4.22}, H6a-GalN {4.15}, H4-Gal' {4.13}), 4.07 - 4.00 (m, 1H, H5-Sia), 3.96 (dd, 1H, $J_{H9b,H9a} = 12.2$ Hz, $J_{H9b,H8} = 4.2$ Hz, H9b-Sia), 3.92 - 3.86 (m, 1H, H6b-GalN), 3.83 - 3.75 (m, 2H, H5-Gal' {3.78}, H3-GalN {3.78}), 3.61 (m, 1H, H5-GalN), 3.57 - 3.43 (m, 3H, H6a-Gal' {3.53}, H6-Sia {3.52}, H6b-Gal' {3.47}), 2.62 (dd, 1H, $J_{H3\ddot{a}q,H3ax} = 12.7$ Hz, $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 4.7$ Hz, H3_{äq}-Sia), 2.35, 2.25, 2.17, 2.12, 2.02, 1.92 (6 \times s, 18H, CH₃-OAc), 2.12, 1.80 (2 \times s, 6H, CH₃-NHAc), 1.66 (t, 1H, $J_{H3ax,H3\ddot{a}q} = J_{H3ax,H4} = 12.4$ Hz, H3_{ax}-Sia), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.29 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

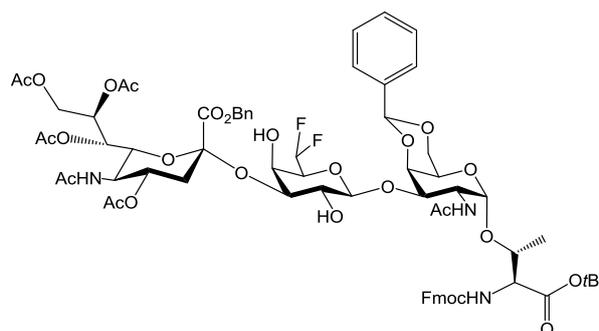
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.9, 171.3, 171.1, 170.8, 170.7, 170.5, 170.3, 169.8, 168.4 (9 \times C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.4 (C1-Sia), 156.9 (C=O-Urethan), 143.9, 143.8 (C1a-,

C8a-Fmoc), 141.4, 143.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.0, 134.8 ($2 \times C_q$ -Bn), 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.7, 127.2, 126.5 ($10 \times C_{Ar}$ -Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.4, 125.3 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 102.9 (C1-Gal'), 100.1 (C1-GalN), 97.8 (C2-Sia), 83.2 (C_q -*t*Bu), 75.9 (C3-GalN), 75.6 (T^{β}), 73.5 (CH_2 -Bn), 72.8 (C4-Gal'), 72.8 (C6-Sia), 72.4 (C5-Gal'), 71.9 (C3-Gal'), 71.2 (C4-GalN), 69.1 (C4-Sia), 69.1 (C6-GalN), 69.1 (C2-Gal'), 69.0 (C8-Sia), 68.7 (C6-Gal'), 68.5 (CH_2 -Bn), 67.9 (C7-Sia), 67.3 (CH_2 -Fmoc), 63.6 (C5-GalN), 63.4 (C9-Sia), 59.2 (T^{α}), 48.9 (C5-Sia), 47.8 (C2-GalN), 47.1 (C9-Fmoc), 37.4 (C3-Sia), 28.0 (CH_3 -*t*Bu), 23.3, 23.0 (CH_3 -NHAc), 21.4, 21.3, 21.0, 20.8, 20.7, 20.7 (CH_3 -OAc), 19.6 (T^{γ}).

Versuch zur Herstellung von

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-{6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl}-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat])- α -D-galactopyranosyl-L-threonin-*tert*-butylester (**141**)

(Fmoc-Thr-(β -6,6F₂Gal-(1→3)-[α -Ac₄Sia-CO₂Bn-(2,3)]- α -4,6-BznGalNAc)-*Ot*Bu)



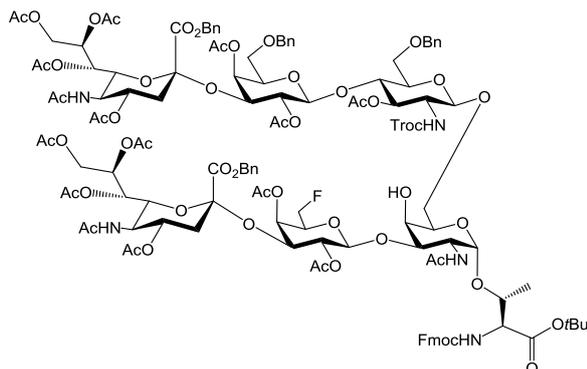
Es wurden 1.26 g (1.87 mmol, 2.5 Äquiv.) α Ac₄-SiaCO₂BnXan **48** in 60 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril und Dichlormethan (2:1) gelöst, mit 3.0 g aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 650 mg (0.75 mmol) Fmoc-Thr-(β -6,6F₂Gal-(1→3)- α -4,6-BznGalNAc)-*Ot*Bu **128**, gelöst in 10 mL absol. Acetonitril und 5 mL Dichlormethan, zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf -45 °C gekühlt, bevor unter Lichtausschluss 480 mg (1.87 mmol, 2.5 Äquiv.) wasserfreies Silbertrifluormethansulfonat, gelöst in 15 mL einer Mischung aus absol. Acetonitril/Dichlormethan (2:1), zugegeben wurden. Im Anschluss wurden 1.20 mL (1.87 mmol, 2.5 Äquiv.) einer auf 0 °C vorgekühlten Methylsulfonylbromid-Lösung (1.6 M in absol. 1,2-Dichlorethan, siehe S. 164) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 72 h bei -45 °C bis -35 °C gerührt, bevor mit DIPEA neutralisiert wurde. Danach wurde weitere 30 Minuten bei -35 °C gerührt und es wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Die Reinigung erfolgte durch zweimalige Flashchromatographie an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 1:4 → ^cHex/EtOAc, 1:2). Nicht umgesetztes Edukt **128** wurden zurückgewonnen und einer erneuten Umsetzung unterworfen.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt **141** konnte nicht isoliert werden, jedoch wurde Verbindung **128** zurückgewonnen.

5.6 Die Synthesen der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-[2-acetamido-6-*O*-(4-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-{*N*-2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino}- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-threonin-*tert*-butylester (**145**)

(Fmoc-Thr-[α -6-(β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc)-3-(β -Ac₂6FGal-(1 \rightarrow 3))-(α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3))]- α GalNAc]-*Ot*Bu)



Eine Lösung von 91 mg (0.060 mmol) α/β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ **93** und 100 mg (0.072 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Thr-(β -Ac₂6FGal-(1 \rightarrow 3))-(α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3))- α GalNAc]-*Ot*Bu **144**^d in 20 mL absol. Dichlormethan wurde mit 250 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf -50 °C gekühlt und mit (0.030 mmol, 0.5 Äquiv. bezogen auf **93**) einer vorgekühlten Mischung aus 5 μ L Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und 500 μ L absol. Dichlormethan innerhalb von 5 Minuten versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Erwärmen auf -40 °C 4 h gerührt, wobei nach 2 h weitere 250 μ L (0.015 mmol, 0.25 Äquiv.) der Mischung aus TMSOTf und absol. Dichlormethan zur Vervollständigung der Umsetzung zugetropft wurden. Die Reaktionsmischung wurde bei -40 °C durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von DIPEA in Dichlormethan unter Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und viermal mit je 80 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1). Dabei konnte neben dem Produkt **145** auch der im Überschuss eingesetzte Akzeptor **144** zurückgewonnen werden.

Ausbeute: 75 mg (0.027 mmol, 45%); farbloser amorpher Feststoff.

R_f = 0.08 (^cHex/EtOAc, 1:9), 0.62 (EtOAc/EtOH, 10:1).

RP-HPLC: *R_t* = 23.1 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (50:50) \rightarrow (90:10) in 20 min \rightarrow (100:0), 40 min.

^d Der fluorierte Akzeptor-Baustein **144** wurde von *Frederik Broszeit* im Rahmen seiner Masterarbeit zur Verfügung gestellt.

$[\alpha]_D^{20} = + 5.2$ ($c = 0.10$, CHCl_3).

$\text{C}_{128}\text{H}_{155}\text{Cl}_3\text{FN}_5\text{O}_{55}$ ($M = 2752.98$ g/mol) [2749.86].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1384.4498 ($[\text{M}+\text{H}+\text{NH}_4]^{2+}$, ber.: 1384.4498).

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3 , COSY, TOCSY, NOESY, HSQC), δ (ppm): 7.78 - 7.74 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.62 - 7.58 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.44 - 7.27 (m, 22H, H_{Ar}-Bn, H3-, H6-Fmoc), 7.28 - 7.23 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 6.54 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}2} = 9.7$ Hz, NH-GlcN), 6.47 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{H}2} = 9.5$ Hz, NH-GalN), 5.84 (d, 1H, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.9$ Hz, NH-Fmoc), 5.57 (td, 1H, $J_{\text{H}8,\text{H}7} = J_{\text{H}8,\text{H}9\text{b}} = 8.1$ Hz, $J_{\text{H}8,\text{H}9\text{a}} = 2.8$ Hz, H8-Sia'), 5.48 (ddd, 1H, $J_{\text{H}8,\text{H}7} = 8.8$ Hz, $J_{\text{H}8,\text{H}9\text{b}} = 6.3$ Hz, $J_{\text{H}8,\text{H}9\text{a}} = 2.8$ Hz, H8-Sia), 5.45 (d, 1H, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 12.0$ Hz, CH_2 -Bn), 5.42 (d, 1H, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 12.0$ Hz, CH_2 -Bn), 5.29 (dd, 1H, $J_{\text{H}7,\text{H}8} = 8.4$ Hz, $J_{\text{H}7,\text{H}6} = 2.7$ Hz, H7-Sia), 5.21 (dd, 1H, $J_{\text{H}7,\text{H}8} = 8.5$ Hz, $J_{\text{H}7,\text{H}6} = 2.7$ Hz, H7-Sia'), 5.14 (dd, 1H, $J_{\text{H}4,\text{H}3} = 3.2$ Hz, $J_{\text{H}4,\text{H}5} = 1.1$ Hz, H4-Gal), 5.10 - 5.00 (m, 7H, H3-GlcN {5.08}, CH_2 -Bn {5.08, 5.06, d, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 12.2$ Hz}, H2-Gal' {5.07}, NH-Sia {5.02}, NH-Sia' {5.01}, H4-Gal' {5.00}), 4.91 (dd, 1H, $J_{\text{H}2,\text{H}3} = 10.1$ Hz, $J_{\text{H}2,\text{H}1} = 7.9$ Hz, H2-Gal), 4.86 - 4.81 (m, 3H, H4-Sia, H4-Sia' {4.84}, H1-GalN {4.82}), 4.77 - 4.69 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{a}}$ -Troc {4.74, d, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 12.1$ Hz}, H1-Gal {4.74}, $\text{CH}_{2\text{b}}$ -Troc {4.71, d, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 12.1$ Hz}, H1-GlcN {4.69}), 4.67 - 4.62 (m, 2H, H1-Gal' {4.65, d, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 8.6$ Hz}, CH_2 -Bn {4.64, d, $J_{\text{CH},\text{CH}} = 12.2$ Hz}), 4.60 - 4.56 (m, 3H, H3-Gal {4.58}, CH_2 -Bn {4.58}, H2-GalN {4.57}), 4.54 - 4.49 (m, 2H, H3-Gal' {4.52}, CH_2 -Bn {4.51}), 4.48 - 4.39 (m, 3H, CH_2 -Fmoc {4.47, 4.40}, CH_2 -Bn {4.42}), 4.39 - 4.28 (m, 4H, H9a-Sia' {4.37}, H6a-Gal' {4.37}, H9a-Sia {4.33}, H6b-Gal' {4.31}), 4.27 - 4.20 (m, 3H, T ^{β} {4.25}, T ^{α} {4.23}, H9-Fmoc {4.23}), 4.11 (m_c, 1H, H4-GalN), 4.06 - 4.00 (m, 2H, H5-Sia' {4.03}, H5-Sia {4.01}), 3.94 - 3.89 (m, 2H, H9b-Sia {3.91}, H4-GlcN {3.90}), 3.89 - 3.64 (m, 9H, H5-Gal' {3.87}, H5-GalN {3.85}, H6a-GlcN {3.81}, H9b-Sia' {3.81}, H5-Gal {3.79}, H2-GlcN {3.74}, H3-GalN {3.73}, H6b-GlcN {3.71}, H6a-GalN {3.70}), 3.63 - 3.56 (m, 2H, H6b-GalN {3.59}, H5-GlcN {3.58}), 3.53 - 3.48 (m, 2H, H6-Sia' {3.51}, H6a-Gal {3.49}), 3.46 (dd, 1H, $J_{\text{H}6,\text{H}5} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H}6,\text{H}7} = 2.7$ Hz, H6-Sia), 3.39 - 3.35 (m, 1H, H6b-Gal), 2.60 (dd, 2H, $J_{\text{H}3\text{äq},\text{H}3\text{ax}} = 12.6$ Hz, $J_{\text{H}3\text{äq},\text{H}4} = 4.9$ Hz, H3_{äq}-Sia, H3_{äq}-Sia'), 2.12, 2.10, 2.10, 2.07, 2.05, 2.03, 2.00, 1.98, 1.97 (13 × s, 39H, CH_3 -OAc), 2.05 (s, 3H, CH_3 -NHAc-GalN), 1.81 (2 × s, 6H, CH_3 -NHAc-Sia, -Sia'), 1.66 (m_c, 2H, H3_{ax}-Sia, H3_{ax}-Sia'), 1.44 (s, 9H, CH_3 -*t*Bu), 1.34 (d, 3H, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$ Hz, T ^{γ}).

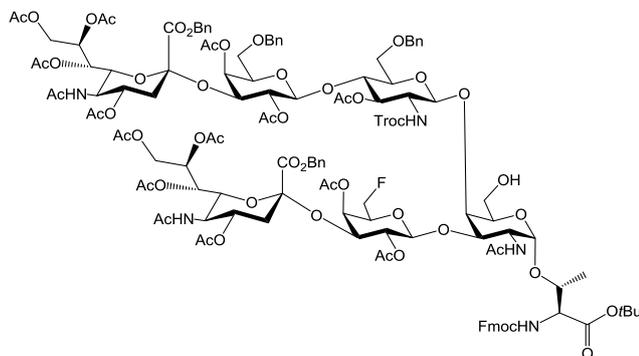
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 170.9, 170.8, 170.8, 170.6, 170.5, 170.5, 170.4, 170.4, 170.2, 170.2, 169.8, 169.7 (17 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.5, 167.4 (C1-Sia, C1-Sia'), 156.8 (C=O-Urethan), 155.1 (C=O-Troc), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.5, 137.9, 137.9 (4 × C_q-Bn), 135.0, 134.7, 129.1, 129.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.5, 128.5, 128.4, 127.9, 127.9, 127.9, 127.6, 127.6, 127.2, 127.1 (20 × C_{Ar}-Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 102.3 (C1-Gal'), 102.0 (C1-GlcN), 100.5 (C1-Gal), 100.2 (C1-GalN), 97.1 (C2-Sia, C2-Sia'), 96.9 (CCl_3), 83.2 (C_q-*t*Bu), 81.4 (d, $J_{\text{F},\text{C}6} = 172.1$ Hz, C6-Gal'), 78.8 (C3-GalN), 76.2 (T ^{β}), 75.5 (C4-GlcN), 74.9 (C5-GlcN), 74.6 (CH_2 -Troc), 74.5 (C3-GlcN), 73.5, 73.5 (CH_2 -Bn), 72.4, 72.4 (C6-Sia', C6-Sia), 71.9 (C3-Gal), 71.9 (d, $J_{\text{F},\text{C}5} = 21.9$ Hz, C5-Gal'), 71.6 (C5-Gal), 71.3 (C3-Gal'), 70.9 (C2-Gal), 70.5 (C6-GalN), 69.4 (C4-Sia, C4-Sia'), 69.1 (C2-Gal'), 68.7 (C6-GlcN), 68.6, 68.6 (CH_2 -Bn), 68.8 (C5-GalN), 68.3 (C4-GalN), 68.2 (C8-Sia), 68.0 (C8-Sia'), 67.9 (C4-Gal), 67.7 (C4-Gal'), 67.7 (C6-Gal),

67.6 (C7-Sia'), 67.4 (C7-Sia), 67.4 (CH₂-Fmoc), 63.3 (C9-Sia'), 62.4 (C9-Sia), 59.4 (T⁶), 56.4 (C2-GlcN), 49.0 (C5-Sia, C5-Sia'), 47.9 (C2-GalN), 47.3 (C9-Fmoc), 37.6 (C3-Sia, C3-Sia'), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 23.4 (CH₃-NHAc-GalN), 23.2 (CH₃-NHAc-Sia, -Sia'), 21.5, 21.5, 21.2, 21.2, 21.1, 20.9, 20.9, 20.9, 20.9, 20.8, 20.8, 20.7 (13 × CH₃-OAc), 19.4 (T⁷).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -230.2 (dt, $J_{F,H6a/b} = 46.9$ Hz, $J_{F,H5} = 13.6$ Hz, F6-Gal').

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-[2-acetamido-4-*O*-(4-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-*D*-galactopyranosyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-α-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-β-*D*-galactopyranosyl]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-{*N*-2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino}-β-*D*-glucopyranosyl)-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor-β-*D*-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-α-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-β-*D*-galactopyranosyl]-2-desoxy-α-*D*-galactopyranosyl]-*L*-threonin-*tert*-butylester (146)**

(Fmoc-Thr-[α-4-(β-4-(β-Ac₂BnGal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc)-3-(β-Ac₂6FGal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)])-αGalNAc]-OfBu)



Analytische Daten des über die 4-Position verknüpften Regioisomers:

Ausbeute: 90 mg (0.033 mmol, 55%); gelblicher amorpher Feststoff.

R_f = 0.17 (cHex/EtOAc, 1:9), 0.76 (EtOAc/EtOH, 10:1).

RP-HPLC: R_t = 23.0 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (50:50) → (90:10) in 20 min → (100:0), 40 min.

C₁₂₈H₁₅₅Cl₃FN₅O₅₅ (M = 2752.98 g/mol) [2749.86].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1384.4498 ([M+H+NH₄]²⁺, ber.: 1384.4498).

¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC), δ (ppm): 7.78 - 7.74 (m, 2H, H4-, H5-Fmoc), 7.62 - 7.58 (m, 2H, H1-, H8-Fmoc), 7.44 - 7.27 (m, 22H, H_{Ar}-Bn, H3-, H6-Fmoc), 7.28 - 7.23 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 6.54 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.7$ Hz, NH-GlcN), 6.47 (d, 1H, $J_{NH,H2} = 9.5$ Hz, NH-GalN), 5.84 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.9$ Hz, NH-Fmoc), 5.54 (td, 1H, $J_{H8,H7} = J_{H8,H9b} = 8.1$ Hz, $J_{H8,H9a} = 2.8$ Hz, H8-Sia'), 5.51 (ddd, 1H, $J_{H8,H7} = 8.8$ Hz, $J_{H8,H9b} = 6.3$ Hz, $J_{H8,H9a} = 2.8$ Hz, H8-Sia), 5.45 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH₂-Bn), 5.43 (d, 1H, $J_{CH,CH} = 12.0$ Hz, CH₂-Bn), 5.30 (dd, 1H, $J_{H7,H8} = 8.4$ Hz, $J_{H7,H6} = 2.7$ Hz, H7-Sia), 5.20 (dd, 1H, $J_{H7,H8} = 8.5$ Hz, $J_{H7,H6} = 2.7$ Hz, H7-Sia'), 5.16 (dd, 1H, $J_{H4,H3} = 3.2$ Hz, $J_{H4,H5} = 1.1$ Hz, H4-Gal), 5.10 - 5.00 (m, 7H, H3-GlcN {5.08}, CH₂-Bn {5.09, 5.07, d, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz}, H2-Gal' {5.07}, NH-Sia {5.02}, NH-Sia' {5.01}, H4-Gal' {5.00}), 4.92 (dd, 1H, $J_{H2,H3} = 10.1$ Hz, $J_{H2,H1} = 7.9$ Hz, H2-Gal), 4.88 - 4.82 (m, 3H,

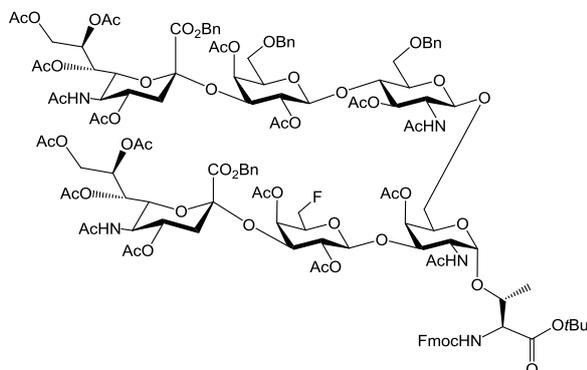
H4-Sia, H4-Sia' {4.86}, H1-GalN {4.79}), 4.77 - 4.69 (m, 4H, CH_{2a}-Troc {4.73, d, $J_{\text{CH,CH}} = 12.1$ Hz}, H1-Gal {4.74}, CH_{2b}-Troc {4.69, d, $J_{\text{CH,CH}} = 12.1$ Hz}, H1-GlcN {4.69}), 4.67 - 4.62 (m, 2H, H1-Gal' {4.67, d, $J_{\text{H1,H2}} = 8.6$ Hz}, CH₂-Bn {4.64, d, $J_{\text{CH,CH}} = 12.2$ Hz}), 4.62 - 4.49 (m, 7H, CH₂-Bn {4.62}, H3-Gal {4.61}, H6a-Gal' {4.58}, H2-GalN {4.57}, H3-Gal' {4.57}, CH₂-Bn {4.53}, H6b-Gal' {4.52}), 4.48 - 4.41 (m, 4H, CH₂-Fmoc {4.47, 4.43}, H9a-Sia' {4.45}, CH₂-Bn {4.44}), 4.39 - 4.28 (m, 1H, H9a-Sia), 4.27 - 4.21 (m, 3H, T^β {4.25}, T^α {4.23}, H9-Fmoc {4.23}), 4.11 (m, 1H, H4-GalN), 4.06 - 4.00 (m, 2H, H5-Sia' {4.03}, H5-Sia {4.01}), 3.99 - 3.89 (m, 3H, H6a-GalN {3.97}, H9b-Sia {3.93}, H4-GlcN {3.90}), 3.89 - 3.64 (m, 8H, H5-Gal' {3.87}, H9b-Sia' {3.85}, H5-GalN {3.83}, H6a-GlcN {3.81}, H5-Gal {3.80}, H2-GlcN {3.74}, H3-GalN {3.73}, H6b-GlcN {3.71}), 3.59 - 3.51 (m, 5H, H6b-GalN {3.59}, H5-GlcN {3.58}, H6-Sia' {3.52}, H6b-GalN {3.51}, H6a-Gal {3.51}), 3.50 (dd, 1H, $J_{\text{H6,H5}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H6,H7}} = 2.7$ Hz, H6-Sia), 3.39 - 3.35 (m, 1H, H6b-Gal), 2.63 - 2.56 (m, 2H, H3_{aq}-Sia, H3_{aq}-Sia'), 2.12, 2.10, 2.10, 2.07, 2.05, 2.03, 2.00, 1.98, 1.97 (13 × s, 39H, CH₃-OAc), 2.05 (s, 3H, CH₃-NHAc-GalN), 1.83, 1.81 (2 × s, 6H, CH₃-NHAc-Sia, -Sia'), 1.68 - 1.62 (m, 2H, H3_{ax}-Sia, H3_{ax}-Sia'), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.29 (d, 3H, $J_{\text{Tγ,Tβ}} = 6.4$ Hz, T^γ).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.3, 171.2, 170.8, 170.8, 170.8, 170.7, 170.6, 170.5, 170.5, 170.4, 170.1, 169.9, 169.8, 169.7 (17 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.2 (C1-Sia, C1-Sia'), 156.8 (C=O-Urethan), 143.9, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4, 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.9, 137.3, 134.9, 134.8 (4 × C_q-Bn), 129.1, 129.0, 128.9, 128.8, 128.8, 128.7, 128.5, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.9, 127.9, 127.8, 127.6, 127.2 (20 × C_{Ar}-Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.3, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 102.1 (C1-Gal'), 101.9 (C1-GlcN), 100.5 (C1-Gal), 100.2 (C1-GalN), 97.1 (C2-Sia, C2-Sia'), 96.9 (CCl₃), 83.2 (C_q-*t*Bu), 80.8 (d, $J_{\text{F,C6}} = 172.1$ Hz, C6-Gal'), 78.8 (C3-GalN), 76.2 (T^β), 75.5 (C4-GlcN), 74.9 (C5-GlcN), 74.5 (CH₂-Troc), 74.5 (C3-GlcN), 73.5, 73.4 (CH₂-Bn), 72.2 (C6-Sia, C6-Sia'), 71.8 (C3-Gal), 71.8 (C3-Gal'), 71.8 (d, $J_{\text{F,C5}} = 22.0$ Hz, C5-Gal'), 71.6 (C5-Gal), 70.7 (C2-Gal), 69.8 (C5-GalN), 69.6 (C2-Gal'), 69.2 (C4-Sia, C4-Sia'), 68.8 (C5-GalN), 68.7 (C6-GlcN), 68.5, 68.5 (CH₂-Bn), 68.3 (C4-GalN), 68.1, 68.1 (C8-Sia, C8-Sia'), 67.7 (C4-Gal), 67.7 (C4-Gal'), 67.6 (C6-Gal), 67.5 (C7-Sia, C7-Sia'), 67.3 (CH₂-Fmoc), 62.7 (C9-Sia'), 62.3 (C9-Sia), 59.3 (T^α), 58.8 (C6-GalN), 56.4 (C2-GlcN), 48.8 (C5-Sia, C5-Sia'), 48.0 (C2-GalN), 47.1 (C9-Fmoc), 37.4 (C3-Sia, C3-Sia'), 28.1 (CH₃-*t*Bu), 23.3 (CH₃-NHAc-GalN), 23.1, 23.1 (CH₃-NHAc-Sia, -Sia'), 21.5, 21.4, 21.4, 21.0, 20.8, 20.8, 20.7, 20.6 (13 × CH₃-OAc), 19.3 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -230.1 (dt, $J_{\text{F,H6a/b}} = 47.1$ Hz, $J_{\text{F,H5}} = 13.4$ Hz, F6-Gal').

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-[2-acetamido-6-*O*-(2-acetamido-4-*O*-{2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-4-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-threonin-*tert*-butylester (**148**)

(Fmoc-Thr-[α -6-(β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNAc)-3-(β -Ac₂6FGal(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3))]-GalNAc]-OtBu)



Spaltung der Troc-Schutzgruppe: In 20 mL Essigsäure wurden 75 mg (0.027 mmol) Fmoc-Thr-[α -6-(β -4-(β -Ac₂6FGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc)-3-(β -Ac₂BnGal(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3))]-GalNAc]-OtBu **145** gelöst und mit etwa 1.0 g Zink versetzt, welches zuvor durch Aufschlänmen in 30 mL verd. Salzsäure (1 M) aktiviert sowie mit je 50 mL Wasser und Methanol gewaschen und mit 50 mL Diethylether getrocknet wurde. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 20 h gerührt, über Hyflo[®] filtriert und gründlich mit 100 mL Essigsäure nachgewaschen. Das Filtrat wurde im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand dreimal mit je 50 mL Toluol kodestilliert.

$R_f = 0.27$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

RP-HPLC: $R_t = 2.93$ min, Luna C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O (50:50) \rightarrow (90:10) in 20 min \rightarrow (100:0), 40 min.

C₁₂₅H₁₅₄FN₅O₅₂ (M = 2577.59 g/mol) [2575.95].

Acetylierung: Zu einer Lösung des Rohprodukts **147** in 20 mL Pyridin wurden 10 mL Essigsäureanhydrid zugegeben und die Mischung 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden Pyridin und überschüssiges Essigsäureanhydrid im Hochvakuum entfernt, der Rückstand viermal mit je 50 mL Toluol kodestilliert, anschließend in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und viermal mit je 50 mL Wasser sowie zweimal mit je 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 50 mL Dichlormethan extrahiert und die organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt schließlich durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1) gereinigt. Das Produkt **148** wurde anschließend über semipräparative RP-HPLC ($R_t = 21.8$ min, Jupiter C18, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (50:50) \rightarrow (90:10) 20 min, \rightarrow (100:0) in 40 min gereinigt und nach Lyophilisation als farbloser amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 63 mg (0.024 mmol, 89% über 2 Stufen bezogen auf **145**); farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.63$ (EtOAc/EtOH, 10:1).

RP-HPLC: R_f = 15.7 min, Luna C18, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O (50:50) → (90:10) in 20 min → (100:0), 40 min.

$[\alpha]_D^{21} = +20.0$ (c = 0.10, CHCl₃).

C₁₂₉H₁₅₈FN₅O₅₄ (M = 2661.66 g/mol) [2659.97].

¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC), δ (ppm): 7.77 (d, 2H, $J_{H_4,H_3} = J_{H_5,H_6} = 7.9$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{H_1,H_2} = J_{H_8,H_7} = 7.5$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.45 - 7.26 (m, 24H, H_{Ar}-Bn, H2-, H3-, H6-, H7-Fmoc), 6.68 (d, 1H, $J_{NH,H_2} = 9.1$ Hz, NH-GalN), 5.81 (d, 1H, $J_{NH,T\alpha} = 9.7$ Hz, NH-Fmoc), 5.61 (td, 1H, $J_{H_8,H_7} = J_{H_8,H_9b} = 7.5$ Hz, $J_{H_8,H_9a} = 2.8$ Hz, H8-Sia'), 5.53 (td, 1H, $J_{H_8,H_7} = J_{H_8,H_9b} = 7.6$ Hz, $J_{H_8,H_9a} = 2.7$ Hz, H8-Sia), 5.45 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz, CH₂-Bn), 5.31 - 5.23 (m, 2H, H4-GalN {5.25}, H7-Sia {5.24}), 5.24 (dd, 1H, $J_{H_7,H_8} = 8.3$ Hz, $J_{H_7,H_6} = 2.6$ Hz, H7-Sia'), 5.14 (d, 1H, $J_{H_4,H_3} = 3.2$ Hz, H4-Gal), 5.09 - 5.04 (m, 4H, NH-Sia, NH-Sia' {5.09, 5.08, d, $J_{NH,H_5} = 9.7$ Hz}, CH₂-Bn {5.06, d, $J_{CH,CH} = 12.1$ Hz}), 5.01 - 4.97 (m, 2H, H4-Gal' {5.00}, H2-Gal' {4.99}), 4.93 - 4.90 (m, 2H, H2-Gal {4.92}, H1-GalN {4.91, d, $J_{H_1,H_2} = 3.5$ Hz}), 4.84 (td, 2H, $J_{H_4,H_3ax} = J_{H_4,H_5} = 11.1$ Hz, $J_{H_4,H_3aq} = 4.7$ Hz, H4-Sia, H4-Sia'), 4.81 - 4.75 (m, 2H, H1-Gal {4.80}, H1-GlcN {4.76, d, $J_{H_1,H_2} = 7.7$ Hz}), 4.65 - 4.60 (m, 2H, CH₂-Bn {4.64}, H1-Gal' {4.62, d, $J_{H_1,H_2} = 7.9$ Hz}), 4.57 - 4.45 (m, 6H, CH₂-Bn {4.59}, H3-Gal {4.58}, H2-GalN {4.54}, CH₂-Bn {4.52}, H3-Gal' {4.51}, CH₂-Fmoc {4.49}), 4.44 - 4.38 (m, 4H, H6a-Gal' {4.43}, CH₂-Bn {4.43}, CH₂-Fmoc {4.41}, H9a-Sia' {4.37}), 4.38 - 4.33 (m, 1H, H6b-Gal'), 4.30 - 4.21 (m, 3H, T ^{β} {4.25}, H9-Fmoc {4.24}, T ^{α} {4.24}), 4.21 - 4.13 (m, 2H, H9a-Sia {4.19}, H5-GalN {4.18}), 4.06 - 3.95 (m, 4H, H5-Sia, H5-Sia' {4.03}, H9b-Sia {3.99}, H3-GlcN {3.97}), 3.92 (dd, 1H, $J_{H_3,H_2} = 11.1$ Hz, $J_{H_3,H_4} = 3.2$ Hz, H3-GalN), 3.91 - 3.83 (m, 4H, H4-GlcN {3.91}, H9b-Sia' {3.86}, H2-GlcN {3.84}, H5-Gal' {3.84}), 3.80 - 3.59 (m, 6H, H6a-GlcN {3.80}, H5-Gal {3.79}, H6b-GlcN {3.71}, H6a-GalN {3.67}, H6b-GalN {3.61}, H5-GlcN {3.60}), 3.50 (dd, 2H, $J_{H_6,H_5} = 10.6$ Hz, $J_{H_6,H_7} = 2.7$ Hz, H6-Sia, H6-Sia'), 3.47 (dd, 1H, $J_{H_6a,H_6b} = 10.7$ Hz, $J_{H_6a,H_5} = 2.7$ Hz, H6a-Gal), 3.38 - 3.35 (m, 1H, H6b-Gal), 2.60 (dd, 2H, $J_{H_3aq,H_3ax} = 12.6$ Hz, $J_{H_3aq,H_4} = 4.6$ Hz, H3_{aq}-Sia, H3_{aq}-Sia'), 2.27, 2.19, 2.13, 2.10, 2.07, 2.05, 1.98 (7 × s, 42H, CH₃-OAc), 2.13 (s, 6H, CH₃-NHAc-GalN, -GlcN), 1.83 (s, 6H, CH₃-NHAc-Sia, -Sia'), 1.65 (t, 2H, $J_{H_3ax,H_3aq} = J_{H_3ax,H_4} = 12.1$ Hz, H3_{ax}-Sia, H3_{ax}-Sia'), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.33 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, T ^{γ}).

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃, HSQC, HMBC), δ (ppm): 171.7, 171.4, 170.9, 170.9, 170.8, 170.7, 170.5, 170.4, 170.1, 170.0, 169.9 (19 × C=O-NHAc, -OAc, -Ester), 167.5 (C1-Sia, C1-Sia'), 156.8 (C=O-Urethan), 143.9, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5, 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 138.2, 137.7 (4 × C_q-Bn), 134.7, 129.1, 128.9, 128.8, 128.0, 127.9, 127.2, 127.2 (20 × C_{Ar}-Bn, C2-, C3-, C6-, C7-Fmoc), 125.2, 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2, 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 101.1 (C1-Gal'), 100.7 (C1-GlcN), 100.1 (C1-Gal), 99.8 (C1-GalN), 96.9 (C2-Sia, C2-Sia'), 83.3 (C_q-*t*Bu), 81.3 (d, $J_{F,C_6} = 172.1$ Hz, C6-Gal'), 76.5 (T ^{β}), 73.7 (C3-GlcN), 73.6 (C3-GalN), 73.6 (C4-GlcN), 73.5, 73.4 (CH₂-Bn), 72.4 (C5-GlcN), 72.3 (C6-Sia, C6-Sia'), 71.8 (d, $J_{F,C_5} = 23.1$ Hz, C5-Gal'), 71.8 (C3-Gal), 71.7 (C5-Gal), 71.4 (C3-Gal'), 70.8 (C2-Gal), 70.5 (C6-GalN), 69.9 (C4-GalN), 69.2 (C4-Sia, C4-Sia'), 69.0 (C2-Gal'), 69.0 (C4-Gal'), 68.7, 68.7 (CH₂-Bn), 68.7 (C6-GlcN), 68.1 (C5-GalN), 68.0 (C8-Sia, C8-Sia'), 67.7 (C6-Gal), 67.7 (C4-Gal), 67.6 (C7-Sia, C7-Sia'), 67.5 (CH₂-Fmoc), 63.1 (C9-Sia, C9-Sia'), 59.8 (C2-GlcN), 59.2 (T ^{α}), 49.0 (C5-Sia, C5-Sia'), 48.9 (C2-GalN), 47.2 (C9-Fmoc),

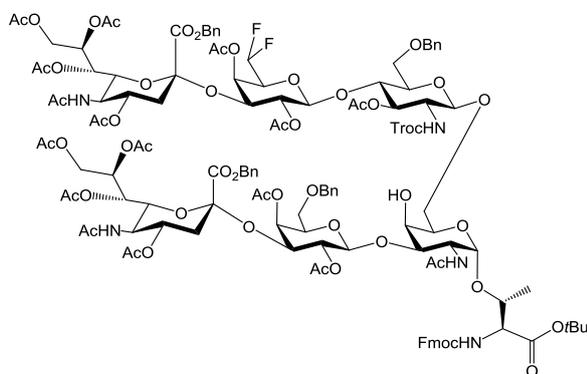
37.5 (C3-Sia, C3-Sia'), 28.2 (CH₃-*t*Bu), 23.2 (CH₃-NHAc-Sia, -NHAc-Sia'), 23.1 (CH₃-NHAc-GalN, -NHAc-GlcN), 21.6, 21.5, 21.1, 20.9, 20.8, 20.8, 20.8 (14 × CH₃-OAc), 19.2 (T^γ).

¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃), δ (ppm): -230.3 (dt, *J*_{F,H6a/b} = 46.8 Hz, *J*_{F,H5} = 13.7 Hz, F6-Gal').

Versuch zur Herstellung von

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-[2-acetamido-6-*O*-(4-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-β-D-galactopyranosyl]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-{*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino}-β-D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-β-D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-β-D-galactopyranosyl]-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl]-*L*-threonin-*tert*-butylester (149)**

(Fmoc-Thr-[α-6-(β-4-(β-Ac₂6,6F₂Gal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc)-3-(β-Ac₂BnGal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)])-αGalNAc]-*O*tBu)



Variante A:

Eine Lösung von 81.0 mg (0.056 mmol) α-4-(β-Ac₂6,6F₂Gal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ **103** und 100 mg (0.067 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Thr-(β-Ac₂BnGal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]-αGalNAc)-*O*tBu **138** in 20 mL absol. Dichlormethan wurde mit 300 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und anschließend unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf -40 °C gekühlt und mit 500 µL (0.028 mmol, 0.5 Äquiv. bezogen auf **103**) einer vorgekühlten Mischung aus 5 µL Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und 495 µL absol. Dichlormethan innerhalb von 2 Minuten versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Erwärmen auf -10 °C 4 h gerührt, wobei nach 2 h weitere 500 µL (0.028 mmol, 0.5 Äquiv.) der Mischung aus TMSOTf und absol. Dichlormethan zugetropft wurden. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei -10 °C durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von DIPEA in Dichlormethan unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und viermal mit je 80 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1).

Ausbeute: Es konnte kein Umsatz beobachtet werden. Der Akzeptorbaustein **138** konnte zurückgewonnen werden.

Variante B:

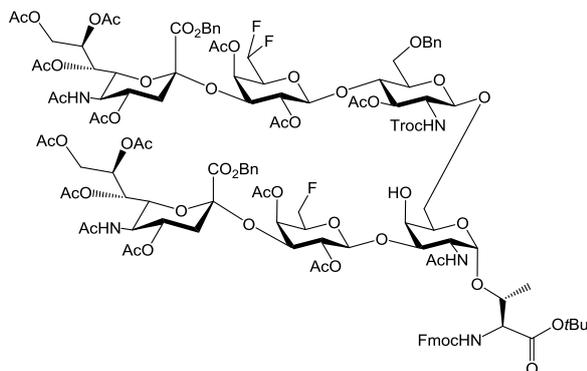
Eine Lösung von 81.0 mg (0.056 mmol) α -4-(β -Ac₂6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ **103** und 100 mg (0.067 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Thr-(β -Ac₂BnGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α GalNAc)-OrBu **138** in 20 mL absol. Dichlormethan wurde mit 300 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf -40 °C gekühlt und mit 1.0 mL (0.11 mmol, 2.0 Äquiv. bezogen auf **103**) einer vorgekühlten Mischung aus 20 μ L Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und 980 μ L absol. Dichlormethan innerhalb von 2 Minuten versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Erwärmen auf -10 °C 4 h gerührt, wobei nach 2 h weitere 500 μ L (0.028 mmol, 0.5 Äquiv.) der Mischung aus TMSOTf und absol. Dichlormethan zugetropft wurden. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei -10 °C durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von DIPEA in Dichlormethan unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und viermal mit je 80 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1).

Ausbeute: Es konnte kein Umsatz beobachtet werden. Der Akzeptorbaustein **138** wurde hierbei zurückgewonnen. Zudem konnte ein Umlagerungsprodukt **151** isoliert werden.

Versuch zur Herstellung von

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-[2-acetamido-6-*O*-(4-*O*-{2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-{*N*-2,2,2-trichlorethoxycarbonylamino}- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-desoxy-6-fluor- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-threonin-*tert*-butylester (**150**)

(Fmoc-Thr-[α -6-(β -4-(β -Ac₂6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc)-3-(β -Ac₂6FGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)])- α GalNAc]-*O*tBu)



Variante A:

Eine Lösung von 87.0 mg (0.06 mmol) α -4-(β -Ac₂6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ **103** und 100 mg (0.072 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Thr-(β -Ac₂6FGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)])- α GalNAc)-*O*tBu **144**^e in 20 mL absol. Dichlormethan wurde mit 350 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf -40 °C gekühlt und mit 500 μ L (0.03 mmol, 0.5 Äquiv. bezogen auf **103**) einer vorgekühlten Mischung aus 5.4 μ L Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und 495 μ L absol. Dichlormethan innerhalb von 2 Minuten versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Erwärmen auf -10 °C 4 h gerührt, wobei nach 2 h weitere 500 μ L (0.03 mmol, 0.5 Äquiv.) der Mischung aus TMSOTf und absol. Dichlormethan zugetropft wurden. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei -10 °C durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von DIPEA in Dichlormethan unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch Hyflo[®] filtriert und viermal mit je 80 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1).

Ausbeute: Es konnte kein Umsatz beobachtet werden. Der Akzeptorbaustein **144** konnte zurückgewonnen werden.

^e Der fluorierte Akzeptor-Baustein **144** wurde von *Frederik Broszeit* im Rahmen seiner Masterarbeit zur Verfügung gestellt.

Variante B:

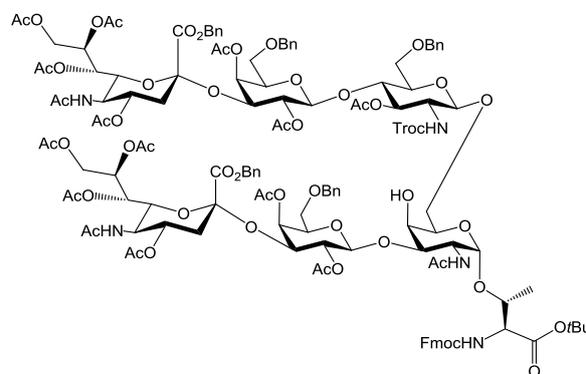
Eine Lösung von 87.0 mg (0.06 mmol) α -4-(β -Ac₂6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ **103** und 100 mg (0.072 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Thr-(β -Ac₂6FGal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α GalNAc)-O*t*Bu **144** in 20 mL absol. Dichlormethan wurde mit 330 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf -40 °C gekühlt und mit 1.0 mL (0.12 mmol, 2.0 Äquiv. bezogen auf **103**) einer vorgekühlten Mischung aus 22 μ L Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und 978 μ L absol. Dichlormethan innerhalb von 2 Minuten versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Erwärmen auf -10 °C 4 h gerührt, wobei nach 2 h weitere 500 μ L (0.028 mmol, 0.5 Äquiv.) der Mischung aus TMSOTf und absol. Dichlormethan zugetropft wurden. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei -10 °C durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von DIPEA in Dichlormethan unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und viermal mit je 80 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 10:1).

Ausbeute: Es konnte kein Umsatz beobachtet werden. Der Akzeptorbaustein **144** wurde hierbei zurückgewonnen. Zudem konnte ein Umlagerungsprodukt **151** isoliert werden.

Versuch zur Herstellung von

N-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-[2-acetamido-6-*O*-(4-*O*-{2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-3-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl-2-desoxy-2-{*N*-2,2,2-trichlor-ethoxycarbonylamino}- β -D-glucopyranosyl)-3-*O*-(2,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl)-3-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- β -D-galactopyranosyl]-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl]-L-threonin-*tert*-butylester (**152**)

(Fmoc-Thr-[α -6-(β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc)-3-(β -Ac₂BnGal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α GalNAc]-O*t*Bu)

Variante A:

Eine Lösung von 85 mg (0.056 mmol) α/β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ **93** und 100 mg (0.067 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Thr-(β -Ac₂BnGal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α GalNAc)-

*Ot*Bu **138** in 25 mL absol. Dichlormethan wurde mit 300 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf -78 °C gekühlt und mit 1 mL (0.028 mmol, 0.5 Äquiv. bezogen auf **93**) einer vorgekühlten Mischung aus 5 µL Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und 1 mL absol. Dichlormethan innerhalb von 5 Minuten versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Erwärmen auf -40 °C 4 h gerührt und anschließend durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von DIPEA in Dichlormethan unter Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und viermal mit je 80 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:9).

Ausbeute: Es konnte kein Umsatz beobachtet werden. Der Akzeptorbaustein **138** konnte zurückgewonnen werden.

Variante B:

Eine Lösung von 85 mg (0.056 mmol) α/β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ **93** und 100 mg (0.067 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Thr-(β -Ac₂BnGal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α GalNAc)-*Ot*Bu **138** in 25 mL absol. Dichlormethan wurde mit 320 mg aktiviertem, gepulvertem Molsieb (4 Å) versetzt und unter Argonatmosphäre 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf -40 °C gekühlt und mit 1 mL (0.11 mmol, 2.0 Äquiv. bezogen auf **93**) einer vorgekühlten Mischung aus 20 µL Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und 1 mL absol. Dichlormethan innerhalb von 5 Minuten versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Erwärmen auf -10 °C 4 h gerührt und anschließend durch tropfenweise Zugabe einer Lösung von DIPEA in Dichlormethan unter Kontrolle des pH-Wertes neutralisiert. Es wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, durch *Hyflo*[®] filtriert und viermal mit je 80 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 50 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 1:9).

Ausbeute: Es konnte kein Umsatz beobachtet werden. Der Akzeptorbaustein **138** konnte zurückgewonnen werden.

5.7 Die Synthesen der Glykokonjugate des epithelialen Mucin MUC1

Die Synthesen der funktionalisierten Glycopeptide sowie ihrer fluorierten Analoga erfolgte unter Verwendung der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Synthesen der Oligosaccharid-Threonin-Konjugate an der festen Phase mit einem modifizierten Triethylglycolspacer für die spätere Konjugation an funktionelle Carrierproteine.

5.7.1 Das allgemeine Protokoll der automatisierten Festphasenpeptidsynthese

Die Peptidfestphasensynthesen wurden an einem *Liberty1*-Peptidsynthesizer der Firma *CEM*, Matthews (USA) unter Mikrowelleneinstrahlung nach der Fmoc-Strategie durchgeführt.

Als polymere Träger kamen *Wang-TentaGel*-Harze der Firma *Novabiochem*, *Merck Millipore* zum Einsatz, welche mit der C-terminalen Startaminosäure L-Alanin beladen waren (Beladung: 0.33 - 0.35 mmol/g). Sämtliche für die Synthesen der Peptide vorhandenen funktionellen Schutzgruppen in den Seitenketten der zum Einsatz kommenden kommerziell erhältlichen *N*-Fmoc-Aminosäuren wurden in Form säurelabiler *tert*-Butylreste (*tert*-Butylether bei L-Serin, L-Tyrosin und L-Threonin bzw. *tert*-Butylester bei L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure) verwendet.

Für die jeweiligen Kupplungsschritte der Aminosäuren wurde der gleiche zweistufige Synthesesyklus verwendet. Zunächst erfolgte nach dem Quellen des mit der Startaminosäure beladenen *Wang*-Harzes die dreimalige Behandlung (von jeweils 2.0 min) mit einer 20%-igen Lösung von Piperidin in *N,N*-Dimethylformamid unter der Einwirkung von Mikrowellenstrahlung. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Durchmischung der Reaktionslösung wurde während der Synthese stetig Stickstoff durch den Reaktor hindurchgeblasen. Nach jedem Abspaltungsvorgang wurde die Effizienz der *N*-terminalen Deblockierung durch Messung der UV-Absorption des freigesetzten Dibenzofulven-Piperidin-Addukts ermittelt. Nach den anschließenden Waschschritten mit *N,N*-Dimethylformamid erfolgte der jeweilige Kupplungsschritt der Aminosäuren. Hierzu wurde jeweils eine Lösung der Fmoc-geschützten Aminosäuren (10 Äquivalente), 10 Äquivalenten HBTU, 10 Äquivalenten HOBt und 20 Äquivalenten *N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in *N,N*-Dimethylformamid in den Reaktor überführt und innerhalb einer Reaktionszeit von acht Minuten bei einer maximalen Temperatur von 80 °C und 23 W umgesetzt. Auf einen nachfolgenden Capping-Schritt wurde in der mikrowellenunterstützten Peptidsynthese verzichtet. Bei problematischen Kupplungen wurden zur Steigerung des Umsatzes Doppelkupplungen durchgeführt. Für die Anknüpfung der Glycosylaminosäure-Bausteine wurde auf die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt zurückgegriffen. Ebenso wurde *N*-Methylmorpholin (NMM) anstelle von *N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) sowie *N*-Methylpyrrolidin-2-on (NMP) statt *N,N*-Dimethylformamid verwendet. Weiterhin wurde die Reaktionszeit für die Kupplung der sterisch anspruchsvollen Glycosylaminosäure-Bausteine auf eine Reaktionszeit von 8 h erhöht. Die Anknüpfung der auf den Glycosylaminosäure-Baustein folgenden beiden Aminosäuren erfolgte zusätzlich unter Verwendung einer Doppelkupplung. Die Reaktionsbedingungen bzw. die Substanzmengen sind den jeweiligen Synthesen und den dazugehörigen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

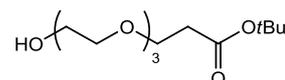
Nach dem erfolgten Aufbau der Glycopeptide durch die Wiederholung des bereits beschriebenen Synthesesyklus wurde die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe der terminalen Aminosäure bzw. des Triethylglycolspacers durch erneute Deblockierung freigesetzt. Nach jedem einzelnen Reaktionsschritt wurde das polymer-

gebundene Peptid durch gründliches Waschen und Filtration mit *N,N*-Dimethylformamid von den eingesetzten Reagenzien befreit. Zur Abspaltung der Glycopeptide vom polymeren Träger wurden diese in einen Merrifield-Reaktor überführt und in einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan stark geschüttelt und anschließend filtriert.

5.7.2 Synthese der Triethylenglycol-Spacer

12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (155)^[290]

$(\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2t\text{Bu})$



Zu einer Lösung von 25.6 mL (188.0 mmol, 2.8 Äquiv.) wasserfreiem Triethylenglycol **153** in 100 mL absol. Tetrahydrofuran wurden unter Argonatmosphäre 40.0 mg (0.90 mmol) Natrium gegeben. Nach vollständigem Auflösen des Natriums wurden 9.6 mL (8.50 g, 66.0 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester (**154**) zur klaren Lösung gegeben und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Zugabe von 1.5 mL verdünnter Salzsäure (1 M) neutralisiert und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit 100 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung versetzt und dreimal mit je 60 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 40 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 14.0 g (50.3 mmol, 76%); farblose Flüssigkeit.

$R_f = 0.32$ (EtOAc).

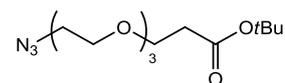
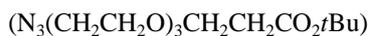
$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_6$ (M = 278.34 g/mol) [278.17].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 301.1626 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 301.1627).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.60 - 3.41 (m, 14H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.01 (bs, 1H, OH), 2.36 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 7.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO}_2t\text{Bu}$), 1.31 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.7 (C=O-Ester), 80.3 ($\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$), 72.4, 70.4, 70.3, 70.2 ($5 \times \text{CH}_2\text{OH}$), 66.7 (3- CH_2), 61.4 (12- CH_2), 36.0 (2- CH_2), 27.9 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[339]

12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (156)^[290]

Eine Lösung von 14.0 g (50.3 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**155**) in 100 mL absol. Dichlormethan wurde mit 17.3 mL (125 mmol, 2.5 Äquiv.) Triethylamin versetzt. In die auf 0 °C gekühlte Lösung wurden langsam 7.7 mL (100 mmol, 2.0 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid (Mesylchlorid) getropft und das Gemisch wurde 4 h bei 0 °C gerührt. Das entstandene Triethylamin-Hydrochlorid wurde über *Hyflo*[®] abfiltriert und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit je 50 mL Eiswasser und zweimal mit je 30 mL einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand wurde in 30 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen. Es wurden 19.5 g (300 mmol, 6.0 Äquiv.) Natriumazid zugegeben und 15 h bei 60 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 50 mL Wasser aufgenommen und viermal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (°Hex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 11.4 g (37.6 mmol, 75%); farbloses Öl.

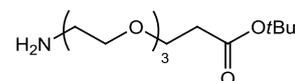
$R_f = 0.22$ (°Hex/EtOAc, 3:1).

$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$ ($M = 303.35$ g/mol) [303.18].

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.68 - 3.54 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.33 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2.45 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO}_2t\text{Bu}$), 1.39 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.9 (C=O-Ester), 80.4 ($\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$), 70.7, 70.7, 70.6, 70.4, 70.0 ($5 \times \text{CH}_2\text{OH}$), 66.9 (3- CH_2), 50.7 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 36.3 (2- CH_2), 28.1 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[340]

12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (157)^[290] $(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2t\text{Bu})$ 

Zu einer Lösung von 11.4 g (37.6 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**156**) in 100 mL Isopropanol wurden 0.5 mL aktivierte *Raney-Nickel*-Suspension (50%-ig in Wasser) gegeben. Durch mehrmaliges Evakuieren und Belüften mit Argon wurde der Kolben von Sauerstoff befreit und mit einer Wasserstoffatmosphäre überschichtet. Die Suspension wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, durch *Hyflo*[®] filtriert und zweimal mit je 50 mL Isopropanol nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 10.3 g (37.6 mmol, quant.); gelbliches Öl.

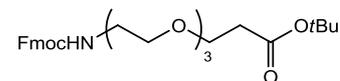
$\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ ($M = 277.36$ g/mol) [277.19].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 278.1966 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 278.1967).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.64 - 3.44 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.25 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 5.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 2.36 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 6.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO}_2t\text{Bu}$), 1.32 (s, 9H, $\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.9 (C=O-Ester), 80.2 ($\text{C}_q\text{-}t\text{Bu}$), 70.5, 70.5, 70.4, 70.2, 69.8 ($5 \times \text{CH}_2\text{OH}$), 66.7 (3- CH_2), 50.5 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 36.1 (2- CH_2), 27.9 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[340]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (158)^[290]**(Fmoc-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO₂*t*Bu)

Zu einer Lösung von 10.3 g (37.6 mmol) des Amins **157** in 200 mL einer Aceton/Wasser-Mischung (1:1) wurden 3.16 g (37.6 mmol, 1.0 Äquiv.) festes Natriumhydrogencarbonat und 12.7 g (37.6 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimid (Fmoc-OSu) unter starkem Rühren zugegeben und die Suspension wurde drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Ansäuern mit 10 mL halbkonzentrierter Salzsäure auf pH = 6 wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der wässrige Rückstand viermal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 200 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und 200 mL Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wurde das Rohprodukt flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt

Ausbeute: 14.8 g (29.7 mmol, 79%); farbloses Öl.

R_f = 0.23 (^cHex/EtOAc, 2:1).

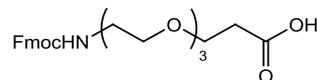
C₂₈H₃₇NO₇ (M = 499.60 g/mol) [499.26].

HR-ESI-MS (*positiv*) *m/z*: 522.2468 ([M+Na]⁺, ber.: 522.2468).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.77 (d, 2H, *J*_{H4,H2} = *J*_{H5,H6} = 7.7 Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.62 (d, 2H, *J*_{H1,H2} = *J*_{H8,H7} = 7.5 Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43 (t, 2H, *J*_{H3,H4} = *J*_{H6,H5} = 7.5 Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.34 - 7.29 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 5.41 (bs, 1H, NH-Urethan), 4.56 (d, 2H, *J*_{CH,CH} = 7.8 Hz, CH₂-Fmoc), 4.34 (t, 1H, *J*_{H9,CH} = 7.3 Hz, H9-Fmoc), 3.71 (t, 2H, *J*_{H8,H7} = 6.6 Hz, 11-CH₂), 3.67 - 3.53 (m, 10H, CH₂-OH), 3.41 - 3.36 (m, 2H, CH₂-NH-Fmoc), 2.50 (t, 2H, *J*_{CH,CH} = 6.6 Hz, CH₂-CO₂*t*Bu), 1.45 (s, 9H, CH₃-*t*Bu)

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.0 (C=O-Ester), 158.7 (C=O-Urethan), 144.0, 139.9 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.4, 127.3 (C3-, C6-Fmoc), 127.0, 126.9 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 119.9 (C4-, C5-Fmoc), 80.4 (C_q-*t*Bu), 70.0 (FmocHN-CH₂CH₂), 70.5, 70.4, 70.3, 70.3 (5 × CH₂OH), 66.9 (3-CH₂), 47.7 (FmocHN-CH₂), 28.1 (CH₃-*t*Bu).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[340]

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure (159)^[290]**(Fmoc-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂COOH)

Es wurden 14.8 g (29.7 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**158**) in einer Mischung aus 60 mL Trifluoressigsäure und 6 mL Wasser über einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit 50 mL Toluol verdünnt, i. Vak. eingeengt und der Rückstand dreimal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 40 mL Dichlormethan kodestilliert.

Ausbeute: 10.5 g (23.8 mmol, 80%); gelbliches Öl.

$R_f = 0.34$ (CH₂Cl₂/MeOH/EtOAc, 19:1:0.5).

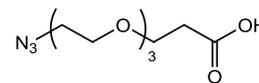
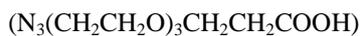
C₂₄H₂₉NO₇ (M = 443.49 g/mol) [443.19].

HR-ESI-MS (*positiv*) m/z : 466.1841 ([M+Na]⁺, ber.: 466.1842).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 7.77 (d, 2H, $J_{H4,H2} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, H4-, H5-Fmoc), 7.60 (d, 2H, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2$ Hz, H1-, H8-Fmoc), 7.43 (t, 2H, $J_{H3,H4} = J_{H6,H5} = 7.5$ Hz, H3-, H6-Fmoc), 7.34 - 7.29 (m, 2H, H2-, H7-Fmoc), 5.41 (bs, 1H, NH-Urethan), 4.42 (d, 2H, $J_{CH,CH} = 7.8$ Hz, CH₂-Fmoc), 4.24 (t, 1H, $J_{H9,CH} = 7.3$ Hz, H9-Fmoc), 3.69 (t, 2H, $J_{H8,H7} = 6.6$ Hz, 11-CH₂), 3.65 - 3.51 (m, 10H, CH₂-OH), 3.41 - 3.36 (m, 2H, CH₂-Fmoc), 2.51 (t, 2H, $J_{CH,CH} = 6.6$ Hz, CH₂-COOH).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.1 (C=O-Säure), 162.5 (C=O-Urethan), 144.0 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.3, 141.3 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.6, 127.5 (C3-, C6-Fmoc), 127.0, 126.9 (C2-, C7-Fmoc), 125.1, 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.0, 120.0 (C4-, C5-Fmoc), 76.9 (FmocHN-CH₂CH₂), 70.5, 70.4, 70.2, 70.1 (5 × CH₂OH), 66.6 (3-CH₂), 47.7 (FmocHN-CH₂), 34.5 (CH₂-COOH).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[340]

12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure (160)^[307]

Es wurden 9.80 g (32.6 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester (**156**) in einer Mischung aus 50 mL verd. Salzsäure (4 M) und 50 mL 1,4-Dioxan über einen Zeitraum von 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit 50 mL Toluol verdünnt und die Lösungsmittel wurden i. Vak. entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde zweimal mit je 20 mL Toluol kodestilliert und flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: 7.29 g (29.5 mmol, 90%); farbloses Öl.

$R_f = 0.36$ (EtOAc).

$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$ (M = 247.25 g/mol) [247.12].

ESI-MS (*positiv*) m/z : 270.1060 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 270.1066).

ESI-MS (*negativ*) m/z : 246.1094 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 246.1095).

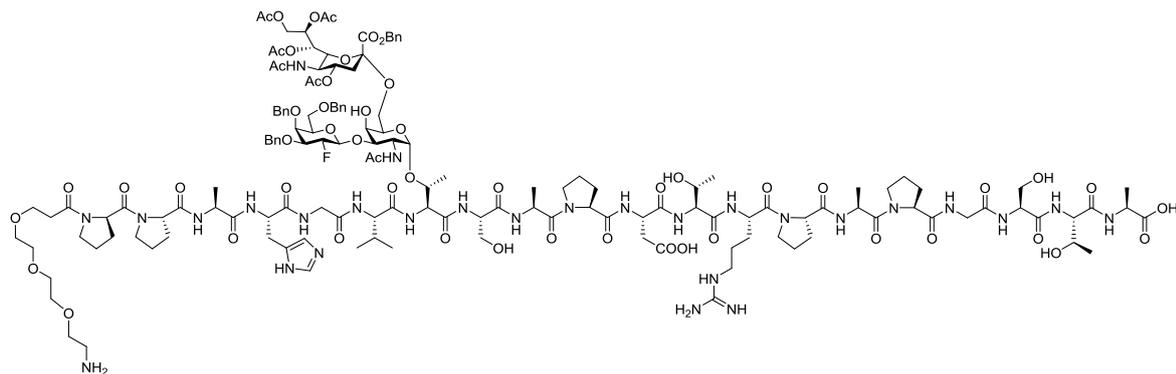
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 11.0 (bs, 1H, COOH), 3.72 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.67 - 3.57 (m, 10H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.34 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 5.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 2.59 (t, 2H, $J_{\text{CH,CH}} = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-COOH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 176.8 (COOH), 70.6, 70.6, 70.5, 70.4, 70.0 ($5 \times \text{CH}_2\text{OH}$), 66.3 (3-CH_2), 50.6 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$), 34.8 (2-CH_2).

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[307]

5.7.3 Synthese der Glycopeptide mit einer Partiaalsequenz aus der *tandem repeat*-Einheit des MUC1

Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-*N*-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3-*O*-[3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-desoxy-2-fluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (161)



Die Synthese des Glycopeptids erfolgte automatisiert, ausgehend von 286 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Ala-OH vorbeladenen *Wang*-Harzes (Beladung 0.35 mmol/g). Nach dem Standardprotokoll (Kapitel 5.7.1) wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren am Peptidsynthesizer gekoppelt. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe der am Harz gebundenen Peptidsequenz mit einer 20%-igen Piperidin-Lösung in *N,N*-Dimethylformamid entfernt.

Im Anschluss wurden 230 mg (0.11 mmol) der Glycosylaminosäure **130** zusammen mit 57 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) HATU und 20 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) HOAt, gelöst in 3 mL *N,N*-Dimethylformamid, sowie mit 60 μ L (50 mg, 0.5 mmol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Die Lösung wurde anschließend in das Reaktionsgefäß des Mikrowellen-Synthesizers überführt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte über eine Dauer von 8 h (10 W, 30 °C). Die beiden Aminosäuren Valin und Glycin wurden anschließend einer Doppelkupplung unterzogen. Die Kupplung der restlichen Aminosäuren sowie des Triethylenglycol-spacers **159** erfolgte nach dem Standardprotokoll. Anschließend wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit 20% Piperidin in DMF entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptids wurde das *Wang*-Harz in einem *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan nachgewaschen und 3 h in 12 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan (10:1:1) geschüttelt. Es wurde filtriert und das Harz zweimal mit 10 mL TFA gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingeeengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde in 2 mL Methanol gelöst und durch Eintropfen in 15 mL kalten Diethylether zur Fällung gebracht. Nach der Zentrifugation wurde die Fällung des Peptids wiederholt, erneut mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohprodukt (200 mg, 0.06 mmol, 60%) wurde durch semi-präparative RP-HPLC (Luna, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) \rightarrow (70:30) 30 min, \rightarrow (100:0) in 80 min gereinigt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 160 mg (0.049 mmol, 49%); farbloses Lyophilisat.

RP-HPLC: $R_t = 14.2$ min, Luna, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) → (70:30) 30 min, → (100:0) in 80 min.

$[\alpha]_D^{23} = -102.7$ ($c = 1.00$, H₂O).

C₁₅₀H₂₁₅FN₂₈O₅₃ ($M = 3277.47$ g/mol) [3275.50].

HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1092.8403 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 1092.8389).

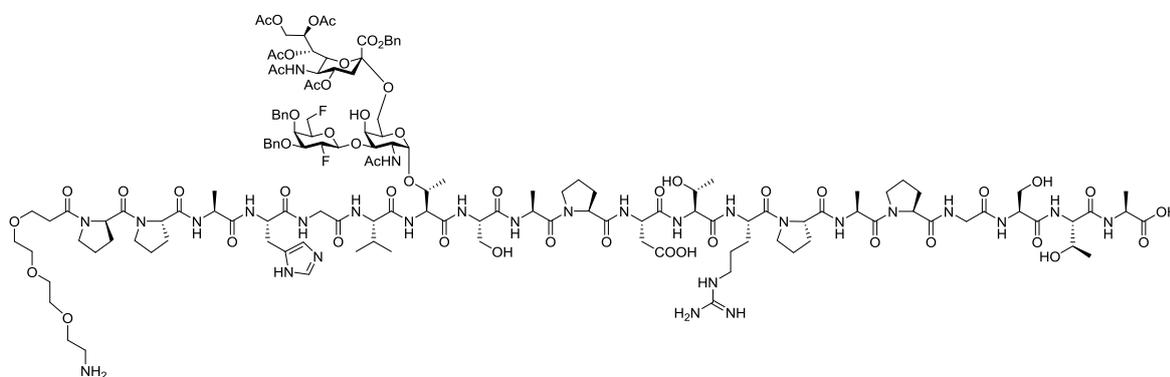
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆, COSY, TOCSY, HSQC), δ (ppm): 8.59 (bs, 1H, H^e), 8.41 (bs, 1H, H^y), 7.36 (bs, 1H, H^δ), 7.35 - 7.10 (m, 20H, H_{Ar}-Bn), 5.20 - 5.13 (m, 4H, CH₂-Bn {5.19, d, $J_{CH,CH} = 11.2$ Hz}, H4-Gal' {5.21}, H8-Sia {5.19}, NH-Sia {5.16}), 5.11 - 5.00 (m, 2H, H7-Sia {5.09}, CH₂-Bn {5.03, d, $J_{CH,CH} = 11.1$ Hz}), 4.90 - 4.83 (m, 2H, H1-GalN {4.84}, H4-Sia {4.83}), 4.77 - 4.50 (m, 13H, D^α {4.73}, H1-Gal' {4.70}, CH₂-Bn {4.67}, CH₂-Bn {4.64, d, $J_{CH,CH} = 12.2$ Hz}, T^{α*} {4.64}, R^α {4.62}, H^α {4.61}, H6a-Gal' {4.60}, H6b-Gal' {4.54}, A₂^α {4.59}, A₃^α {4.54}, CH₂-Bn {4.51, d, $J_{CH,CH} = 11.1$ Hz}), 4.48 - 4.17 (m, 18H, S₁^α {4.51}, A₄^α {4.48}, S₂^α {4.46}, P₁₋₅^α {4.42, 4.39, 4.38, 4.36}, V^α {4.35}, H6a-GalN {4.35}, H6b-GalN {4.18}, T^{β*} {4.34}, T₁₋₂^α {4.33, 4.31}, A₁^α {4.25}, H2-Gal' {4.24}, T₁₋₂^β {4.21, 4.19}), 4.10 - 3.99 (m, 8H, H9a-Sia {4.10}, H2-GalN {4.08}, H5-Sia {4.07}, H3-GalN {4.06}, H5-Gal' {4.02}, H6-Sia {4.02}, H3-Gal' {4.01}, H9b-Sia {4.00}), 3.93 - 3.55 (m, 15H, G_{1,2}^α {3.90, 3.83}, S_{1,2}^β {3.78, 3.75}, H4-GalN {3.69}, P_{1,2}^δ {3.69, 3.64}, CH₂O-Spacer {3.63, 3.60}), 3.54 - 3.42 (m, 12H, P₃₋₅^δ {3.53, 3.49, 3.42}, H5-GalN {3.53}, CH₂O-Spacer {3.54, 3.53, 3.51, 3.43}), 3.25 (dd, 1H, $J_{H\beta a, H\alpha} = 5.6$ Hz, $J_{H\beta a, H\beta b} = 15.8$ Hz, H^{βa}), 3.11 - 3.03 (m, 5H, R^δ {3.07}, R^{βa} {3.06}, CH₂NH₂-Spacer {3.06}, H^β {2.99}), 2.84 (dd, 1H, $J_{D\beta a, D\alpha} = 5.9$ Hz, $J_{D\beta a, D\beta b} = 16.8$ Hz, D^{βa}), 2.76 (dd, 1H, $J_{D\beta b, D\alpha} = 6.8$ Hz, $J_{D\beta b, D\beta a} = 16.6$ Hz, D^{βb}), 2.62 - 2.37 (m, 3H, H3_{aq}-Sia {2.55}, CH₂Amid-Spacer {2.52}), 2.20 - 2.08 (m, 6H, P₁₋₃^β {2.18, 2.16, 2.12}), 2.01 - 1.67 (m, 27H, CH₃-OAc {2.00, 1.98, 1.91, 1.89}, V^β {1.99}, P₁₋₅^γ {1.97, 1.95, 1.88, 1.81, 1.76}, CH₃-NHAc {1.83, 1.76}, P_{4,5}^β {1.82, 1.75}, H3_{ax}-Sia {1.78}), 1.56 - 1.48 (m, 3H, R^{βb} {1.54}, R^γ {1.52}), 1.32 - 1.22 (m, 9H, A₁₋₃^β {1.29, 1.25, 1.22}), 1.17 (d, 3H, $J_{A\beta, A\alpha} = 7.5$ Hz, A₄^β), 1.11 (d, 3H, $J_{T\gamma^*, T\beta^*} = 6.5$ Hz, T^{γ*}), 1.08 (d, 3H, $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.6$ Hz, T₁^γ), 1.04 (d, 3H, $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.4$ Hz, T₂^γ), 0.83 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta} = 6.4$ Hz, V^γ), 0.81 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta} = 6.2$ Hz, V^γ).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆, HSQC, HMBC), δ (ppm): 176.0, 175.9, 174.7, 174.6, 174.2, 174.1, 174.0, 173.9, 173.8, 173.8, 173.4, 173.4, 173.2, 172.8, 172.8, 172.5, 172.3, 172.3, 172.1, 171.6, 171.4, 171.2, 171.1, 170.5, 170.3 (26 × C=O-Amid, -NHAc, -OAc, C1-Sia, 2 × Carbonsäure), 156.6 (C=NH (Arg)), 137.0, 136.8, 136.6, 136.6 (4 × C_q-Bn), 132.7 (H^e), 127.9 (H^y), 129.1, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6 (20 × C_{Ar}-Bn), 116.7 (H^δ), 103.3 (d, $J_{C1, F2} = 25.1$ Hz, C1-Gal'), 99.4 (C1-GalN), 97.4 (C2-Sia), 90.9 (d, $J_{C2, F2} = 181.9$ Hz, C2-Gal'), 80.1 (d, $J_{C3, F2} = 15.8$ Hz, C3-Gal'), 77.3 (T^{β*}), 75.0, 74.9, 74.8 (CH₂-Bn), 73.6 (C4-Gal'), 73.5 (C3-GalN), 73.2 (C6-Sia), 69.4, 69.3, 68.9, 68.0 (CH₂O-Spacer), 69.2 (C8-Sia), 69.2 (C5-Gal'), 69.1 (C5-GalN), 69.0 (C4-Sia), 68.4 (C7-Sia), 68.5 (C4-GalN), 68.1 (CH₂-Bn), 67.0 (T₁^β), 66.8 (T₂^β), 66.2, 66.0 (CH₂-Spacer), 63.8 (C6-Gal'), 62.3 (C9-Sia), 61.5, 61.1 (S_{1,2}^β), 60.8, 60.5, 60.1, 60.0 (P₁₋₅^α), 60.7 (C6-GalN), 59.4 (V^α), 59.2, 58.9 (T_{1,2}^α), 57.0 (T^{α*}), 56.0, 55.7 (S_{1,2}^α), 52.7 (H^α), 50.9 (R^α), 50.1 (D^α), 49.9 (C5-Sia), 49.6, (A₁^α), 48.1, 47.9, 47.8, (P₁₋₃^δ), 48.0, 47.8 (A₂₋₄^α), 47.6 (C2-GalN), 47.6, 47.5 (P_{4,5}^δ), 42.4, 42.3 (G_{1,2}^α), 40.5 (CH₂NH₂-Spacer), 38.9 (R^δ), 36.3 (C3-Sia), 34.2 (D^β), 33.8 (CH₂Amid-Spacer), 30.5 (V^β), 29.5, 29.2, 29.2, 28.8 (P₁₋₅^β), 26.5 (R^β), 26.2

(H^β), 24.6, 24.5, 24.4, 24.3, 24.2 (P₁₋₅^γ), 23.9 (R^γ), 22.1, 21.6 (CH₃-NHAc), 20.5, 20.1, 20.1, 20.0 (CH₃-OAc), 18.9, 18.7 (T_{1,2}^γ), 18.2 (V^{γa}), 17.9 (V^{γb}), 17.4 (T^{γ*}), 16.0, 15.8, 15.2, 15.1 (A₁₋₄^β).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): -204.4 (dd, J_{F,H2} = 51.8 Hz, J_{F,H3} = 12.2 Hz, F2-Gal').

Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-N-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3-O-[3,4-di-O-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor-β-D-galactopyranosyl]-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alalin (162)



Die Synthese des Glycopeptids erfolgte automatisiert, ausgehend von 303 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Ala-OH vorbeladenen *Wang*-Harzes (Beladung 0.33 mmol/g). Nach dem Standardprotokoll (Kapitel 5.7.1) wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren am Peptidsynthesizer gekoppelt. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe der am Harz gebundenen Peptidsequenz mit einer 20%-igen Piperidin-Lösung in *N,N*-Dimethylformamid entfernt.

Im Anschluss wurden 216 mg (0.15 mmol) der Glycosylaminosäure **132** zusammen mit 57 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) HATU und 20 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) HOAt, gelöst in 3 mL *N,N*-Dimethylformamid, sowie mit 60 µL (50 mg, 0.5 mmol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Die Lösung wurde anschließend in das Reaktionsgefäß des Mikrowellen-Synthesizers überführt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte über eine Dauer von 8 h (10 W, 30 °C). Die beiden Aminosäuren Valin und Glycin wurden anschließend einer Doppelkupplung unterzogen. Die Kupplung der restlichen Aminosäuren sowie des Triethylenglycol-spacers **159** erfolgte nach dem Standardprotokoll. Anschließend wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit einer 20%-igen Piperidin-Lösung in DMF entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptids wurde das *Wang*-Harz in einem *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan nachgewaschen und 3 h in 15 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan (10:1:1) geschüttelt. Anschließend wurde filtriert und das Harz zweimal mit je 10 mL TFA gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde in 2 mL Methanol gelöst und durch Eintropfen in 15 mL kalten Diethylether zur Fällung gebracht. Nach der Zentrifugation wurde die Fällung des Peptids wiederholt, erneut mit 10 mL Wasser versetzt und anschließend lyophilisiert. Das

Rohprodukt (240 mg) wurde durch semipräparative RP-HPLC (Luna, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) 20 min, → (40:60) 40 min, → (100:0) in 60 min gereinigt und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 180 mg (0.056 mmol, 56%), farbloses Lyophilisat.

RP-HPLC: R_f = 13.0 min, Luna, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) 20 min, → (40:60) 40 min, → (100:0) in 60 min.

$[\alpha]_D^{23}$ = - 110.8 (c = 1.00, H₂O).

C₁₄₃H₂₀₈F₂N₂₈O₅₂ (M = 3189.33 g/mol) [3187.45].

ESI-MS (positiv) m/z: 1063.49 ([M+3H]³⁺, ber.: 1063.49).

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1063.4900 ([M+3H]³⁺, ber.: 1063.4893).

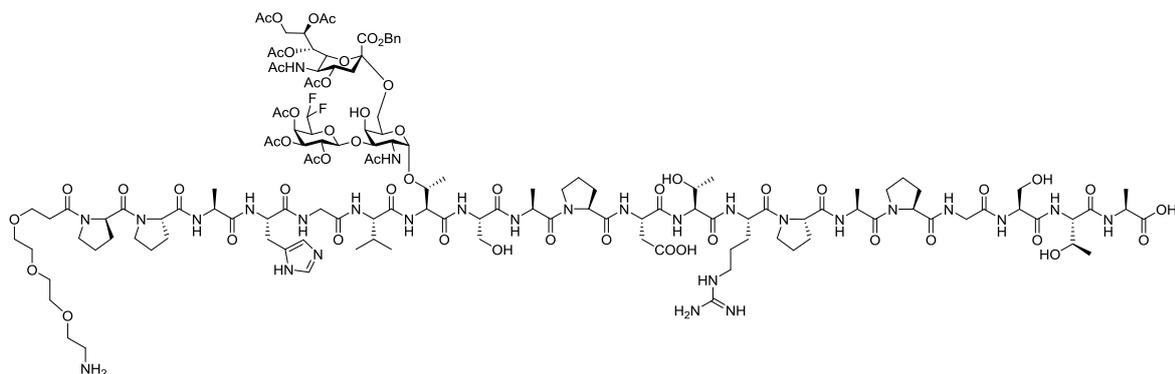
¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC), δ (ppm): 8.62 (bs, 1H, H^c), 8.44 (bs, 1H, H^y), 7.35 (bs, 1H, H^δ), 7.32 - 7.14 (m, 15H, H_{Ar}-Bn), 5.22 - 5.12 (m, 4H, CH₂-Bn {5.21, d, $J_{CH,CH}$ = 11.0 Hz}), H4-Gal' {5.20}, H8-Sia {5.19}, NH-Sia {5.14}), 5.09 - 5.03 (m, 2H, H7-Sia {5.08}, CH₂-Bn {5.06, d, $J_{CH,CH}$ = 10.8 Hz}), 4.84 - 4.80 (m, 2H, H1-GalN {4.82}, H4-Sia {4.80}), 4.76 - 4.55 (m, 11H, D^α {4.68}, H1-Gal' {4.69}, CH₂-Bn {4.64, d, $J_{CH,CH}$ = 12.2 Hz}, H^α {4.67}, H6a-Gal' {4.66}, H6b-Gal' {4.53}, T^{α*} {4.64}, R^α {4.63}, A₂^α {4.59}, CH₂-Bn {4.56, d, $J_{CH,CH}$ = 11.5 Hz}, A₃^α {4.54}), 4.54 - 4.17 (m, 18H, S₁^α {4.51}, A₄^α {4.48}, S₂^α {4.46}, P₁₋₅^α {4.42, 4.39, 4.38, 4.36}, V^α {4.35}, H6a-GalN {4.35}, H6b-GalN {4.18}, T^{β*} {4.34}, T₁₋₂^α {4.33, 4.31}, A₁^α {4.25}, H2-Gal' {4.24}, T₁₋₂^β {4.21, 4.19}), 4.15 - 3.99 (m, 8H, H9a-Sia {4.11}, H2-GalN {4.10}, H5-Sia {4.07}, H3-GalN {4.05}, H5-Gal' {4.04}, H6-Sia {4.03}, H3-Gal' {4.03}, H9b-Sia {4.02}), 3.91 - 3.59 (m, 15H, G_{1,2}^α {3.90, 3.83}, S_{1,2}^β {3.78, 3.75}, H4-GalN {3.69}, P_{1,2}^δ {3.69, 3.64}, CH₂O-Spacer {3.63, 3.61}), 3.58 - 3.42 (m, 12H, P₃₋₅^δ {3.54, 3.48, 3.44}, H5-GalN {3.53}, CH₂O-Spacer {3.54, 3.53, 3.51, 3.46}), 3.25 (dd, 1H, $J_{H\beta a, H\alpha}$ = 5.7 Hz, $J_{H\beta a, H\beta b}$ = 15.7 Hz, H^{βa}), 3.11 - 3.03 (m, 5H, R^δ {3.07}, R^{βa} {3.06}, CH₂NH₂-Spacer {3.06}, H^β {2.99}), 2.84 (dd, 1H, $J_{D\beta a, D\alpha}$ = 5.9 Hz, $J_{D\beta a, D\beta b}$ = 16.8 Hz, D^{βa}), 2.76 (dd, 1H, $J_{D\beta b, D\alpha}$ = 6.8 Hz, $J_{D\beta b, D\beta a}$ = 16.6 Hz, D^{βb}), 2.62 - 2.37 (m, 3H, H_{3-äq}-Sia {2.55}, CH₂Amid-Spacer {2.52}), 2.20 - 2.08 (m, 6H, P₁₋₃^β {2.18, 2.16, 2.12}), 2.01 - 1.67 (m, 27H, CH₃-OAc {2.00, 1.98, 1.91, 1.89}, V^β {1.99}, P₁₋₅^γ {1.97, 1.95, 1.88, 1.81, 1.76}, CH₃-NHAc {1.83, 1.76}, P_{4,5}^β {1.82, 1.75}, H_{3-ax}-Sia {1.78}), 1.56 - 1.48 (m, 3H, R^{βb} {1.54}, R^γ {1.52}), 1.32 - 1.22 (m, 9H, A₁₋₃^β {1.29, 1.25, 1.22}), 1.17 (d, 3H, $J_{A\beta, A\alpha}$ = 7.5 Hz, A₄^β), 1.11 (d, 3H, $J_{T\gamma^*, T\beta^*}$ = 6.5 Hz, T^{γ*}), 1.08 (d, 3H, $J_{T1\gamma, T1\beta}$ = 6.6 Hz, T₁^γ), 1.04 (d, 3H, $J_{T2\gamma, T2\beta}$ = 6.4 Hz, T₂^γ), 0.83 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta}$ = 6.4 Hz, V^γ), 0.81 (d, 3H, $J_{V\gamma, V\beta}$ = 6.2 Hz, V^β).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HSQC, HMBC), δ (ppm): 176.1, 176.1, 174.7, 174.7, 174.1, 174.0, 174.0, 173.9, 173.9, 173.8, 173.4, 173.4, 173.3, 172.8, 172.8, 172.5, 172.4, 172.3, 172.1, 171.6, 171.4, 171.2, 171.1, 170.5, 170.4 (26 × C=O-Amid, -NHAc, -OAc, C1-Sia, 2 × Carbonsäure), 156.6 (C=NH (Arg)), 137.0, 136.8, 136.6 (3 × C_q-Bn), 132.7 (H^c), 127.9 (H^y), 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.2, 128.1, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6 (15 × C_{Ar}-Bn), 116.6 (H^δ), 103.3 (d, $J_{C1, F2}$ = 25.8 Hz, C1-Gal'), 99.2 (C1-GalN), 97.4 (C2-Sia), 90.7 (d, $J_{C2, F2}$ = 182.6 Hz, C2-Gal'), 80.4 (d, $J_{C6, F6}$ = 164.2 Hz, C6-Gal'), 77.3 (T^{β*}), 75.0, 74.8 (CH₂-Bn), 73.6 (C4-Gal'), 73.5 (C3-GalN), 73.3 (d, $J_{C5, F6}$ = 20.2 Hz, C5-Gal'), 73.2 (C6-Sia), 71.8 (C3-Gal'),

69.4, 69.3, 68.9, 68.0 (CH₂O-Spacer), 69.2 (C8-Sia), 69.1 (C5-GalN), 69.0 (C4-Sia), 68.4 (C7-Sia), 68.5 (C4-GalN), 68.1 (CH₂-Bn), 67.0 (T₁^β), 66.8 (T₂^β), 66.2, 66.0 (CH₂-Spacer), 62.3 (C9-Sia), 61.5, 61.1 (S_{1,2}^β), 60.8, 60.5, 60.1, 60.0 (P₁₋₅^α), 60.7 (C6-GalN), 59.4 (V^α), 59.2, 58.9 (T_{1,2}^α), 57.0 (T^{α*}), 56.0, 55.7 (S_{1,2}^α), 52.7 (H^α), 50.9 (R^α), 50.1 (D^α), 49.9 (C5-Sia), 49.6, (A₁^α), 48.1, 47.9, 47.8, (P₁₋₃^δ), 48.0, 47.8 (A₂₋₄^α), 47.6 (C2-GalN), 47.6, 47.5 (P_{4,5}^δ), 42.4, 42.3 (G_{1,2}^α), 40.5 (CH₂NH₂-Spacer), 38.9 (R^δ), 36.3 (C3-Sia), 34.2 (D^β), 33.8 (CH₂Amid-Spacer), 30.5 (V^β), 29.5, 29.2, 29.2, 28.8 (P₁₋₅^β), 26.5 (R^β), 26.2 (H^β), 24.6, 24.5, 24.4, 24.3, 24.2 (P₁₋₅^γ), 23.9 (R^γ), 22.1, 21.6 (CH₃-NHAc), 20.5, 20.1, 20.1, 20.0 (CH₃-OAc), 18.9, 18.7 (T_{1,2}^γ), 18.2 (V^{γa}), 17.9 (V^{γb}), 17.4 (T^{γ*}), 16.0, 15.8, 15.2, 15.1 (A₁₋₄^β).

¹⁹F-NMR (376 MHz, D₂O): δ (ppm): -204.4 (dd, 1F, J_{F₂,H₂} = 51.9 Hz, J_{F₂,H₃} = 12.3 Hz, F2-Gal'), -229.7 (dt, 1F, J_{F₆,H_{6a}} = 46.6 Hz, J_{F₆,H_{6b}} = 46.6 Hz, J_{F₆,H₅} = 11.4 Hz, F6-Gal').

Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-N-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3-O-[2,3,4-tri-O-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl]-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alalin (163)



Die Synthese des Glycopeptids erfolgte automatisiert, ausgehend von 294 mg (0.10 mmol) eines mit Fmoc-Ala-OH vorbeladenen Wang-Harzes (Beladung 0.34 mmol/g). Nach dem Standardprotokoll (Kapitel 5.7.1) wurden jeweils zehn Äquivalente der Fmoc-Aminosäuren am Peptidsynthesizer gekoppelt. Zunächst wurde die Fmoc-Schutzgruppe der am Harz gebundenen Peptidsequenz mit einer 20%-igen Piperidin-Lösung in *N,N*-Dimethylformamid entfernt.

Im Anschluss wurden 210 mg (0.15 mmol) der Glycosylaminosäure **134** zusammen mit 57 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) HATU und 20 mg (0.15 mmol, 1.0 Äquiv.) HOAt, gelöst in 3 mL *N,N*-Dimethylformamid, sowie mit 60 µL (50 mg, 0.50 mmol) *N*-Methylmorpholin (NMM) versetzt. Die Lösung wurde anschließend in das Reaktionsgefäß des Mikrowellen-Synthesizers überführt. Die Kupplung der Glycosylaminosäure erfolgte über eine Dauer von 8 h (10 W, 30 °C). Die beiden Aminosäuren Valin und Glycin wurden anschließend einer Doppelkupplung unterzogen. Die Kupplung der restlichen Aminosäuren sowie des Triethylenglycol-spacers **159** erfolgte nach dem Standardprotokoll. Anschließend wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit einer 20%-igen Piperidin-Lösung in DMF entfernt. Zur Abspaltung des Glycopeptids

wurde das *Wang*-Harz in einem *Merrifield*-Reaktor überführt, mit Dichlormethan nachgewaschen und 3 h in 12 mL einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Wasser und Triisopropylsilan (10:1:1) geschüttelt. Es wurde filtriert und das Harz zweimal mit je 10 mL TFA gewaschen. Die Filtrate wurden i. Vak. eingengt, dreimal mit je 30 mL Toluol kodestilliert, mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde in 5 mL Methanol gelöst und durch Eintropfen in 15 mL kalten Diethylether zur Fällung gebracht. Nach der Zentrifugation wurde die Fällung des Peptids wiederholt, erneut in 10 mL Wasser aufgenommen und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt (240 mg) wurde durch semipräparative RP-HPLC (Luna, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) → (70:30) 30 min, → (100:0) in 80 min) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 190 mg (0.060 mmol, 60%); farbloses Lyophilisat.

RP-HPLC: $R_t = 18.1$ min, Luna, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) → (70:30) 30 min, → (100:0) in 80 min.

$[\alpha]_D^{23} = -61.4$ (c = 1.00, H₂O).

C₁₃₅H₂₀₂F₂N₂₈O₅₆ (M = 3151.20 g/mol) [3149.38].

HR-ESI-MS (positiv) m/z: 1051.1341 ([M+3H]³⁺, ber.: 1051.1351).

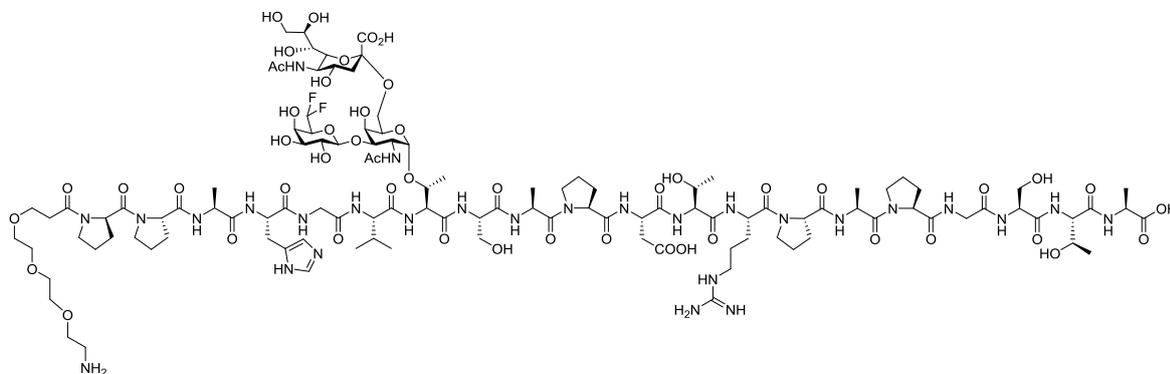
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm): 8.93 (bs, 1H, H^c), 8.65 - 7.68 (m, 14H, S^{NH} {8.60}, A^{NH} {8.34, 8.20}, D^{NH} {8.20}, V^{NH} {8.19}, T^{NH} {8.07}, G^{NH} {8.03}, R^{NH} {7.94}, T^{NH*} {7.91}, S_{1,2}^{NH} {7.78}, 7.44 - 7.14 (m, 6H, H_{Ar}-Bn, H^δ {7.34}), 6.05 - 5.95 (m, 1H, H6-Gal' {5.99, t, $J_{H6, Fa} = J_{H6, Fb} = 55.3$ Hz}), 5.39 - 5.13 (m, 6H, H4-Gal' {5.32}, H8-Sia {5.32}, CH₂-Bn {5.26, d, $J_{CH, CH} = 12.5$ Hz}, CH₂Bn {5.17, d, $J_{CH, CH} = 11.9$ Hz}, H7-Sia {5.17}, H3-Gal' {5.14}), 4.93 - 4.24 (m, 22H, H2-Gal' {4.98}, H1-Gal' {4.80}, H1-GalN {4.71}, H4-Sia {4.71}, H^a {4.55}, D^a {4.51}, R^a {4.51}, V^a {4.50}, T^{a*} {4.50}, T_{1,2}^a {4.47, 4.43}, A₂^a {4.44}, P₁₋₅^a {4.43, 4.36, 4.32, 4.28, 4.24}, H5-Sia {4.40}, H5-GalN {4.35}, S₁^a {4.35}, H5-Gal' {4.27}, S₂^a {4.27}), 4.23 - 4.10 (m, 6H, A₃^a {4.16}, A₄^a {4.15}, H4-GalN {4.15}, A₁^a {4.13}, H9a-Sia {4.12}, T^{b*} {4.10}), 4.08 - 4.00 (m, 3H, H3-GalN {4.03}, T₂^b {4.03}, H6-Sia {4.00}), 3.99 - 3.35 (m, 27H, H9b-Sia {3.99}, T₁^b {3.92}, S_{1,2}^b {3.87, 3.75}, H2-GalN {3.85}, G₁^a {3.83}, H6a-GalN {3.63, dd, $J_{H6a, H6b} = 10.8$ Hz, $J_{H6a, H5} = 5.8$ Hz}, G₂^a {3.68}, P_{1,2}^δ {3.59, 3.46}, H6b-GalN {3.55, dd, $J_{H6b, H6a} = 10.5$ Hz, $J_{H6b, H5} = 4.4$ Hz}, CH₂O-Spacer {3.72, 3.61, 3.58, 3.56, 3.56, 3.52}), 3.33 - 2.84 (m, 12H, P₃₋₅^δ {3.32, 3.20, 3.14}, H^{ba} {3.10}, R^δ {3.06}, H^{bb} {2.95}, CH₂NH₂-Spacer {2.94}), 2.77 - 2.39 (m, 5H, D^{ba} {2.71}, H3_{ax}-Sia {2.55}, CH₂Amid-Spacer {2.52, 2.45}, D^{bb} {2.49}), 2.17 - 1.62 (m, 42H, CH₃-OAc {2.08, 2.01, 1.95, 1.93, 1.93, 1.90, 1.87}, P₁₋₃^β {2.00, 1.80, 1.73}, V^β {1.96}, P_{1,2}^γ {1.85, 1.81}, CH₃-NHAc {1.82, 1.64}), P₄^β {1.67}, R^{ba} {1.67}, H3_{ax}-Sia {1.63}), 1.57 - 1.35 (m, 11H, P₃₋₅^γ {1.49, 1.43, 1.36}, P₅^β {1.49}, R^γ {1.52, 1.48}, R^{bb} {1.49}), 1.31 - 1.16 (m, 9H, A₁₋₃^β {1.30, 1.26, 1.16, d, $J_{Aβ, Aα} = 6.8$ Hz}), 1.15 (d, 3H, $J_{Aβ, Aα} = 7.5$ Hz, A₄^β), 1.09 (d, 3H, $J_{Tγ*, Tβ*} = 6.3$ Hz, T^{γ*}), 1.02 (d, 3H, $J_{T1γ, T1β} = 6.8$ Hz, T₁^γ), 0.97 (d, 3H, $J_{T2γ, T2β} = 6.4$ Hz, T₂^γ), 0.89 (d, 3H, $J_{Vγa, Vβ} = 6.7$ Hz, V^{γa}), 0.82 (d, 3H, $J_{Vγb, Vβ} = 6.4$ Hz, V^{γb}).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆, HSQC, HMBC), δ (ppm): 174.4, 174.4, 174.3, 174.3, 174.3, 173.6, 173.6, 173.4, 172.9, 172.9, 172.9, 172.6, 172.5, 172.4, 171.3, 171.3, 171.1, 171.1, 170.8, 170.8, 170.5, 170.2, 170.1, 169.7, 169.4, 169.3, 169.1 (29 × C=O-Amid, -NHAc, -OAc, 2 × Carbonsäure), 167.4 (C1-Sia), 157.9

(C=NH (Arg)), 135.7 (C_q-Bn), 134.2 (H^c), 129.5 (H^γ), 129.2, 129.0, 128.7, 128.2, 127.6 (5 × C_{Ar}-Bn), 117.5 (H^δ), 113.9 (t, $J_{C_6, F_a} = J_{C_6, F_b} = 243.5$ Hz, C6-Gal'), 101.9 (C1-Gal'), 99.3 (C1-GalN), 98.7 (C2-Sia), 75.8 (T^{β*}), 72.4 (C6-Sia), 71.7 (t, $J_{C_5, F_a} = J_{C_5, F_b} = 27.6$ Hz, C5-Gal'), 70.5 (C3-Gal'), 70.2, 70.1, 69.7 (CH₂O-Spacer), 69.5 (C4-Sia), 68.6 (C2-Gal'), 67.7 (C7-Sia), 67.6 (CH₂-Bn), 67.3 (T₁^β), 66.7 (C3-GalN), 66.7 (T₂^β), 66.7 (CH₂O-Spacer), 66.5 (C8-Sia), 66.5 (C4-Gal'), 65.9, 65.9 (CH₂-Spacer), 62.3 (C9-Sia), 62.3 (C6-GalN), 61.3, 61.0 (S_{1,2}^β), 60.2, 59.8, 59.6, 58.8, 58.6 (P₁₋₅^α), 58.8 (T₂^α), 58.2 (T₁^α), 57.6 (V^α), 57.5 (T^{α*}), 55.4 (C5-GalN), 55.4, 55.1 (S_{1,2}^α), 51.9 (H^α), 50.5 (C5-Sia), 50.0 (R^α), 50.0 (D^α), 49.0, (A₁^α), 48.3 (C2-GalN), 48.1 (C4-GalN), 48.1, 47.7, 46.7 (A₂₋₄^α), 47.2, 47.2, 46.9, 46.3, 46.3 (P₁₋₅^δ), 42.5, 42.5 (G_{1,2}^α), 41.0 (R^δ), 39.1 (CH₂NH₂-Spacer), 38.0 (C3-Sia), 36.0 (D^β), 34.7 (CH₂Amid-Spacer), 31.6 (V^β), 29.6, 29.5, 29.5, 28.9, 28.5 (P₁₋₅^β), 28.5 (R^β), 27.4 (H^β), 25.8, 25.2, 25.0, 25.0, 24.1 (P₁₋₅^γ), 24.5 (R^γ), 23.4, 23.1 (CH₃-NHAc), 21.3, 21.1, 21.0, 21.0, 20.9, 20.8, 20.6 (CH₃-OAc), 20.2, 20.0 (T_{1,2}^γ), 19.6 (V^{γb}), 18.6 (V^{γa}), 17.7 (T^{γ*}), 18.0, 17.4, 17.1, 16.4 (A₁₋₄^β).

¹⁹F-NMR (376 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): -124.1 (d, 2F, $J_{F, H_6} = 55.2$ Hz, F6a/b-Gal')

Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-N-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3-O-[6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl]-6-O-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alalin (164)



Es wurden 100 mg (0.032 mmol) des Glycopeptids **163** in 30 mL wässriger NaOH-Lösung (pH = 11) gelöst und drei Tage lang unter ständiger pH-Kontrolle gerührt. Es wurde mit verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex-LUNA, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) → (70:30) 30 min, → (100:0) in 80 min) gereinigt.

Ausbeute: 47 mg (0.017 mmol, 54%); farbloses Lyophilisat.

RP-HPLC: $R_t = 14.8$ min, Luna, $\lambda = 214$ nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) → (70:30) 30 min, → (100:0) in 80 min.

$[\alpha]_D^{23} = -72.3$ (c = 1.00, H₂O).

$C_{114}H_{182}F_2N_{28}O_{49}$ ($M = 2766.82$ g/mol) [2765.26].

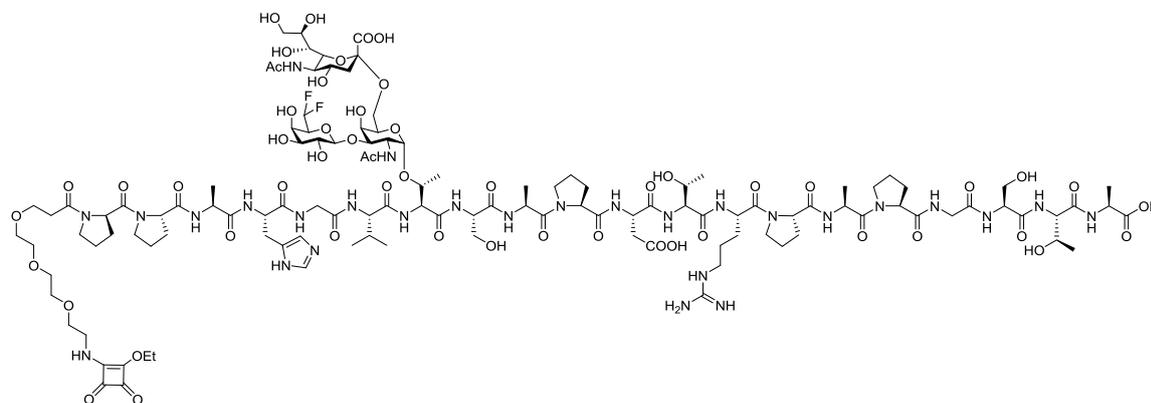
HR-ESI-MS (positiv) m/z : 1383.6353 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1383.6368).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , COSY, TOCSY, HSQC), δ (ppm): 8.95 (bs, 1H, H^e), 8.40 - 7.68 (m, 11H, A^{NH} {8.35}, G^{NH} {8.27, 8.23}, D^{NH} {8.22}, H^{NH} {8.14}, T^{NH} {8.08}, T^{NH*} {8.07}, R^{NH} {7.96}, $S_{1,2}^{NH}$ {7.78}, 7.40 - 7.32 (m, 1H, H^d {7.35}), 5.98 (td, 1H, $J_{H6, Fa} = 55.3$ Hz, $J_{H6, Fb} = 55.3$ Hz, $J_{H6, H5} = 6.2$ Hz, H6-Gal'), 4.92 - 3.81 (m, 29H, H1-GalN {4.79}, H^a {4.55}, D^a {4.51}, R^a {4.48}, V^a {4.48}, $T_{1,2}^a$ {4.48, 4.43}, A_2^a {4.42}, P_{1-5}^a {4.42, 4.37, 4.27, 4.24}, H5-Sia {4.40}, S_1^a {4.35}, T^{a*} {4.33}, H5-GalN {4.32}, S_2^a {4.27}, H1-Gal' {4.25}, A_3^a {4.15}, H4-GalN {4.15}, $A_{1,4}^a$ {4.15}, T^{b*} {4.14}, H2-GalN {4.13}, T_2^b {4.03}, T_1^b {3.91}, G_1^a {3.85}, H7-Sia {3.84}), 3.81 - 3.29 (m, 38H, H8-Sia {3.80}, CH_2O -Spacer {3.73}, H9a-Sia {3.69}, H3-GalN {3.69}, G_2^a {3.68}, H6a-GalN {3.61, dd, $J_{H6a, H6b} = 10.6$ Hz, $J_{H6a, H5} = 5.9$ Hz}, CH_2O -Spacer {3.61, 3.58}, H5-Gal' {3.59}, H6-Sia {3.59}, S_1^b {3.58}, CH_2O -Spacer {3.57, 3.53, 3.47}, $P_{1,2}^b$ {3.55, 3.47}, H4-Sia {3.54}, H6b-GalN {3.52, dd, $J_{H6b, H6a} = 10.5$ Hz, $J_{H6b, H5} = 4.6$ Hz}, H3-Gal' {3.47}, H9b-Sia {3.42}, S_2^b {3.36}, H2-Gal' {3.35}, P_{3-5}^b {3.33, 3.21, 3.14}, H4-Gal' {3.32}), 3.21 - 2.80 (m, 5H, H^{ba} {3.09}, R^{da} {3.06}, H^{bb} {2.96}, CH_2NH_2 -Spacer {3.06, 2.45}), 2.73 (dd, 1H, $J_{D\beta a, D\beta b} = 16.9$ Hz, $J_{D\beta a, D\alpha} = 6.2$ Hz, D^{ba}), 2.61 - 2.32 (m, 6H, $H_{3_{aq}}-Sia$ {2.59}, CH_2 Amid-Spacer {2.53, 2.45}, D^{bb} {2.49}, R^{db} {2.45}, R^{ba} {2.39}), 2.06 - 1.72 (m, 23H, P_{1-3}^b {1.99, 1.81, 1.73}, V^b {1.94}, $P_{1,2}^y$ {1.87, 1.83}, CH_3-NHAc {1.85, 1.80}, P_4^b {1.78}, R^{bb} {1.78}, R^y {1.73}, $H_{3_{ax}}-Sia$ {1.73}), 1.69 - 1.16 (m, 16H, P_5^b {1.65}, P_{3-5}^y {1.49, 1.43}, A_{1-4}^b {1.30, 1.26, 1.16, 1.16}), 1.15 (d, 3H, $J_{T\gamma^*, T\beta^*} = 6.7$ Hz, T^{γ^*}), 1.02 (d, 3H, $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.4$ Hz, T_1^y), 0.96 (d, 3H, $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.1$ Hz, T_2^y), 0.90 (d, 3H, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.7$ Hz, $V^{\gamma a}$), 0.86 (d, 3H, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.6$ Hz, $V^{\gamma b}$).

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , HSQC, HMBC), δ (ppm): 173.9, 172.1, 172.1, 171.9, 171.9, 171.6, 171.3, 171.0, 170.9, 170.9, 170.8, 170.3, 170.3, 170.1, 170.0, 169.7, 169.5, 168.9, 168.7 ($22 \times C=O$ -Amid, -NHAc, $2 \times$ Carbonsäure), 166.5 (C1-Sia), 158.0 (C=NH (Arg)), 133.4 (H^e), 129.1 (H^y), 117.5 (H^d), 114.7 (t, $J_{C6, Fa} = J_{C6, Fb} = 243.5$ Hz, C6-Gal'), 105.4 (C1-Gal'), 99.2 (C1-GalN), 98.1 (C2-Sia), 76.0 (T^{b*}), 73.9 (t, $J_{C5, Fa} = J_{C5, Fb} = 25.6$ Hz, C5-Gal'), 72.4 (C4-Gal'), 71.8 (C6-Sia), 70.5 (C2-Gal'), 70.2, 70.1, 70.1 (CH_2O -Spacer), 70.1 (C4-Sia), 70.1 (C3-Gal'), 69.9 (C7-Sia), 68.4 (C8-Sia), 67.6 (C3-GalN), 67.2 (T_1^b), 67.1, 66.6 (CH_2O -Spacer), 66.7 (T_2^b), 65.9, 65.8 (CH_2O -Spacer), 63.5 (C9-Sia), 63.4, 63.4 ($S_{1,2}^b$), 62.2 (C6-GalN), 60.2, 59.8, 59.6, 58.9 (P_{1-5}^a), 58.4 (T_2^a), 58.2 (T_1^a), 57.6 (V^a), 57.0 (T^{a*}), 55.8 (C5-GalN), 55.4, 55.3 ($S_{1,2}^a$), 51.9 (H^a), 50.6 (C5-Sia), 50.5 (D^a), 50.0 (R^a), 48.9 (A_1^a), 48.4 (C2-GalN), 48.1 (C4-GalN), 48.1, 46.7 (A_{2-4}^a), 47.2, 47.2, 46.9, 46.3, 46.3 (P_{1-5}^b), 42.5, 42.5 ($G_{1,2}^a$), 41.0 (R^b), 40.5 (CH_2NH_2 -Spacer), 39.1 (C3-Sia), 36.0 (D^b), 34.7 (CH_2 Amid-Spacer), 31.7 (V^b), 29.6, 29.5, 29.5, 28.9, 28.4 (P_{1-5}^b), 28.4 (R^b), 27.5 (H^b), 25.2, 25.0, 25.0, 24.1 (P_{1-5}^y), 24.0 (R^y), 23.5, 23.2 (CH_3-NHAc), 20.3, 20.1 ($T_{1,2}^y$), 19.6 ($V^{\gamma b}$), 18.7 ($V^{\gamma a}$), 17.5 (T^{γ^*}), 18.0, 17.4, 17.1, 16.6 (A_{1-4}^b).

^{19}F -NMR (376 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): -124.2 (d, 2F, $J_{F, H6} = 54.8$ Hz, F6a/b-Gal').

1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanyl-amido-*N*-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3-*O*-[6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alalin)-2-ethoxy-3-cyclobuten-3,4-dion (166)



Zu einer Lösung von 28 mg (0.010 mmol) Glycopeptid **164** in 5 mL einer Mischung aus Ethanol und Wasser (1:1) wurden mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette 1.63 μ L (0.011 mmol, 1.1 Äquiv.) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **165** pipettiert. In jeweils 5 μ L Schritten wurde eine ges. Natriumcarbonat-Lösung in Abständen von zwei Minuten (insgesamt ca. 25 μ L) zugegeben und auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt (Reaktionskontrolle über analytische RP-HPLC), mit zwei Tropfen verd. Essigsäure (1 M) neutralisiert und lyophilisiert. Die Reinigung des mit dem Quadratsäuremonoester-funktionalisierten Glycopeptids **166** erfolgte durch semipräparative RP-HPLC (Luna, Grad.: MeCN: H₂O + 0.1 % TFA (5:95) \rightarrow (70:30) 30 min, \rightarrow (100:0) in 80 min) gereinigt.

Ausbeute: 21 mg (0.007 mmol, 73%); farbloses Lyophilisat.

RP-HPLC: R_t = 15.9 min, Luna, λ = 214 nm, Grad.: MeCN:H₂O + 0.1 % TFA (5:95) \rightarrow (70:30) 30 min, \rightarrow (100:0) in 80 min.

$[\alpha]_D^{23}$ = - 79.5 (c = 1.00, H₂O).

C₁₂₀H₁₈₆F₂N₂₈O₅₂ (M = 2890.91 g/mol) [2889.27].

MALDI-TOF-MS (α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure, positiv) m/z : 2974.724 ([M+Na+H₂CO₃]⁺, ber. 2974.264), 2990.610 ([M+K+H₂CO₃]⁺, ber. 2990.238).

6 LITERATUR

- [1] H. Ghazarian, B. Idoni, S. B. Oppenheimer, *A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics*, *Acta Histochem.* **2011**, *113*, 236-247.
- [2] J. Heimbürg-Molinaro, M. Lum, G. Vijay, M. Jain, A. Almogren, K. Rittenhouse-Olson, *Cancer vaccines and carbohydrate epitopes*, *Vaccine* **2011**, *29*, 8802-8826.
- [3] S. F. Slovin, S. J. Keding, G. Ragupathi, *Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer*, *Immunol. Cell. Biol.* **2005**, *83*, 418-428.
- [4] M. Fukuda, S. Tsuboi, *Mucin-type O-glycans and leukosialin*, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1999**, *1455*, 205-217.
- [5] Y. Rosenstein, A. Santana, G. Pedraza-Alva, *CD43, a molecule with multiple functions*, *Immunol. Res.* **1999**, *20*, 89-99.
- [6] J. K. Park, Y. J. Rosenstein, E. Remold-O'Donnell, B. E. Bierer, F. S. Rosen, S. J. Burakoff, *Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome*, *Nature* **1991**, *350*, 706-709.
- [7] O. Saitoh, F. Piller, R. Fox, M. Fukuda, *T-lymphocytic leukemia expresses complex, branched O-linked oligosaccharides on a major sialoglycoprotein, leukosialin*, *Blood* **1991**, *77*, 1491-1499.
- [8] F. A. Bonilla, H. C. Oettgen, *Adaptive immunity*, *J. Allergy Clin. Immun.* **2010**, *125*, S33-S40.
- [9] D. D. Chaplin, *Overview of the immune response*, *J. Allergy Clin. Immun.* **2010**, *125*, S3-S23.
- [10] J. Parkin, B. Cohen, *An overview of the immune system*, *The Lancet*, *357*, 1777-1789.
- [11] R. Warrington, W. Watson, H. Kim, F. Antonetti, *An introduction to immunology and immunopathology*, *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2011**, *7*, S1.
- [12] L. Morelli, L. Poletti, L. Lay, *Carbohydrates and Immunology: Synthetic Oligosaccharide Antigens for Vaccine Formulation*, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 5723-5777.
- [13] M. C. Rose, *Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases*, *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, L413-L429.
- [14] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation*, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5021-5034.
- [15] P. Nangia-Makker, J. Conklin, V. Hogan, A. Raz, *Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents*, *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 187-192.
- [16] J. Taylor-Papadimitriou, A. A. Epenetos, *Exploiting altered glycosylation patterns in cancer: Progress and challenges in diagnosis and therapy*, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 227-233.
- [17] G. Forstner, *Signal Transduction Packaging and Secretion of Mucins*, *Annu. Rev. Phylog.* **1995**, *57*, 585-605.
- [18] J. Perez-Vilar, R. L. Hill, *The Structure and Assembly of Secreted Mucins*, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31751-31754.
- [19] J. R. Gum, *Mucin Genes and the Proteins They Encode: Structure, Diversity, and Regulation*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1992**, *7*, 557-564.
- [20] S. D. Rosen, *Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond*, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 129-156.
- [21] R. P. McEver, R. D. Cummings, *Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 485-491.
- [22] F.-G. Hanisch, S. Müller, *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439-449.
- [23] M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*, *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 45-60.
- [24] K. M. McDermott, P. R. Crocker, A. Harris, M. D. Burdick, Y. Hinoda, T. Hayashi, K. Imai, M. A. Hollingsworth, *Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of tumor cells*, *Int. J. Cancer* **2001**, *94*, 783-791.
- [25] I. Brockhausen, *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects* **1999**, *1473*, 67-95.
- [26] K. L. Carraway, V. P. Ramsauer, B. Haq, C. A. Carothers Carraway, *Cell signaling through membrane mucins*, *BioEssays* **2003**, *25*, 66-71.
- [27] M. Yamamoto, A. Bharti, Y. Li, D. Kufe, *Interaction of the DF3/MUC1 Breast Carcinoma-associated Antigen and β -Catenin in Cell Adhesion*, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12492-12494.

- [28] W. Kuhns, R. K. Jain, K. L. Matta, H. Paulsen, M. A. Baker, R. Geyer, I. Brockhausen, *Characterization of a novel mucin sulphotransferase activity synthesizing sulphated O-glycan core 1, 3-sulphate-Gal β 1-3GalNAc-R*, *Glycobiology* **1995**, *5*, 689-697.
- [29] C. Capon, J.-M. Wieruszkeski, J. Lemoine, J. C. Byrd, H. Leffler, Y. S. Kim, *Sulfated Lewis X Determinants as a Major Structural Motif in Glycans from LS174T-HM7 Human Colon Carcinoma Mucin*, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31957-31968.
- [30] S. R. Carter, A. Slomiany, K. Gwozdziński, Y. H. Liao, B. L. Slomiany, *Enzymatic sulfation of mucus glycoprotein in gastric mucosa. Effect of ethanol*, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11977-11984.
- [31] W. Kuhns, V. Rutz, H. Paulsen, K. Matta, M. Baker, M. Barner, M. Granovsky, I. Brockhausen, *Processing O-glycan core 1, Gal β 1-3GalNAc-R. Specificities of core 2, UDP-GlcNAc: Gal β 1-3GalNAc-R(GlcNAc to GalNAc) β 6-N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-sialic acid:Gal β 1-3GalNAc-R α 3-sialyltransferase*, *Glycoconj. J.* **1993**, *10*, 381-394.
- [32] Y.-C. Lee, N. Kurosawa, T. Hamamoto, T. Nakaoka, S. Tsuji, *Molecular cloning and expression of Gal β 1,3GalNAc2,3-sialyltransferase from mouse brain*, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 377-385.
- [33] T. Bremell, R. Holmdahl, A. Tarkowski, *Protective role of sialophorin (CD43)-expressing cells in experimental Staphylococcus aureus infection*, *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 4637-4640.
- [34] J. L. Cannon, A. Collins, P. D. Mody, D. Balachandran, K. J. Henriksen, C. E. Smith, J. Tong, B. S. Clay, S. D. Miller, A. I. Sperling, *CD43 Regulates Th2 Differentiation and Inflammation*, *J. Immunol. (Baltimore, Md. : 1950)* **2008**, *180*, 7385-7393.
- [35] H. D. Ochs, A. J. Thrasher, *The Wiskott-Aldrich syndrome*, *J. Allergy Clin. Immun.* **2006**, *117*, 725-738.
- [36] M. D. Gallego, E. Aguado, J. M. Kindelan, J. Pena, M. Santamaria, I. J. Molina, *Altered expression of CD43-hexasaccharide isoform on peripheral T lymphocytes from HIV-infected individuals*, *AIDS (London, England)* **2001**, *15*, 477-481.
- [37] M. Leivonen, S. Nordling, J. Lundin, K. von Boguslawski, C. Haglund, *STn and Prognosis in Breast Cancer*, *Oncology* **2001**, *61*, 299-305.
- [38] Y. Kim, J. Gum, Jr., I. Brockhausen, *Mucin glycoproteins in neoplasia*, *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 693-707.
- [39] Y. Kim, A. Varki, *Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer*, *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 569-576.
- [40] Y. Dutronc, S. A. Porcelli, *The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens*, *Tissue Antigens* **2002**, *60*, 337-353.
- [41] S. Huang, H. Yu, X. Chen, *Chemoenzymatic synthesis of α 2-3-sialylated carbohydrate epitopes*, *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 117-128.
- [42] R. W. McMurray, *Adhesion molecules in autoimmune disease*, *Semin. Arthritis Rheu.* **1996**, *25*, 215-233.
- [43] M. Fukuda, *Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy*, *Glycobiology* **1991**, *1*, 347-356.
- [44] B. Ardman, M. A. Sikorski, M. Settles, D. E. Staunton, *Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes*, *J. Exp. Med.* **1990**, *172*, 1151-1158.
- [45] E. A. Higgins, K. A. Siminovitch, D. L. Zhuang, I. Brockhausen, J. W. Dennis, *Aberrant O-linked oligosaccharide biosynthesis in lymphocytes and platelets from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome*, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6280-6290.
- [46] P. R. Crocker, *Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling*, *Current Opinion in Structural Biology* **2002**, *12*, 609-615.
- [47] L. Nimrichter, M. M. Burdick, K. Aoki, W. Laroy, M. A. Fierro, S. A. Hudson, C. E. Von Seggern, R. J. Cotter, B. S. Bochner, M. Tiemeyer, K. Konstantopoulos, R. L. Schnaar, *E-selectin receptors on human leukocytes*, *Vol. 112*, **2008**.
- [48] C. Balagué, J.-P. Audié, N. Porchet, F. X. Real, *In situ hybridization shows distinct patterns of mucin gene expression in normal, benign, and malignant pancreas tissues*, *Gastroenterology* **1995**, *109*, 953-964.
- [49] C. G. Ioannides, B. Fisk, K. R. Jerome, T. Irimura, J. T. Wharton, O. J. Finn, *Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides*, *J. Immunol.* **1993**, *151*, 3693-3703.
- [50] D. W. Miles, J. Linehan, P. Smith, I. Filipe, *Expression of sialyl-Tn in gastric cancer: correlation with known prognostic factors*, *Brit. J. Cancer* **1995**, *71*, 1074-1076.

- [51] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Mechanisms Underlying Aberrant Glycosylation of MUC1 Mucin in Breast Cancer Cells*, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607-617.
- [52] J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes*, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691-696.
- [53] M. Komatsu, C. A. C. Carraway, N. L. Fregien, K. L. Carraway, *Reversible Disruption of Cell-Matrix and Cell-Cell Interactions by Overexpression of Sialomucin Complex*, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 33245-33254.
- [54] J. Wesseling, S. W. van der Valk, J. Hilkens, *A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1*, *Mol. Biol. Cell* **1996**, 7, 565-577.
- [55] T. Fujita, K. Murayama, T. Hanamura, T. Okada, T. Ito, M. Harada, A. Komatsu, H. Koyama, T. Kanai, K. Maeno, Y. Mochizuki, Y. Hama, K.-i. Ito, J. Amano, M. Fujimori, *CSLEX (Sialyl Lewis X) is a Useful Tumor Marker for Monitoring of Breast Cancer Patients*, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2011**, 41, 394-399.
- [56] M. Phillips, E. Nudelman, F. Gaeta, M. Perez, A. Singhal, S. Hakomori, J. Paulson, *ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex*, *Science* **1990**, 250, 1130-1132.
- [57] C. Foxall, S. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa, B. Brandley, *The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide*, *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 895-902.
- [58] E. L. Berg, M. K. Robinson, O. Mansson, E. C. Butcher, J. L. Magnani, *A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1*, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 14869-14872.
- [59] D. Madariaga, N. Martínez-Sáez, V. J. Somovilla, H. Coelho, J. Valero-González, J. Castro-López, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. H. Busto, A. Avenoza, F. Marcelo, R. Hurtado-Guerrero, F. Corzana, J. M. Peregrina, *Detection of Tumor-Associated Glycopeptides by Lectins: The Peptide Context Modulates Carbohydrate Recognition*, *ACS Chem. Biol.* **2014**.
- [60] R. D. Cummings, *Structure and function of the selectin ligand PSGL-1*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1999**, 32, 519-528.
- [61] D. Sako, X.-J. Chang, K. M. Barone, G. Vachino, H. M. White, G. Shaw, G. M. Veldman, K. M. Bean, T. J. Ahern, B. Furie, D. A. Cumming, G. R. Larsen, *Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin*, *Cell* **1993**, 75, 1179-1186.
- [62] D. Sako, K. M. Comess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming, G. D. Shaw, *A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding*, *Cell* **1995**, 83, 323-331.
- [63] C. Kneuer, C. Ehrhardt, M. W. Radomski, U. Bakowsky, *Selectins – potential pharmacological targets?*, *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 1034-1040.
- [64] J. B. Lowe, *Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation*, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, 15, 531-538.
- [65] C. Ehrhardt, C. Kneuer, U. Bakowsky, *Selectins—an emerging target for drug delivery*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, 527-549.
- [66] C. J. Dimitroff, L. Descheny, N. Trujillo, R. Kim, V. Nguyen, W. Huang, K. J. Pienta, J. L. Kutok, M. A. Rubin, *Identification of Leukocyte E-Selectin Ligands, P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 and E-Selectin Ligand-1, on Human Metastatic Prostate Tumor Cells*, *Cancer Res.* **2005**, 65, 5750-5760.
- [67] R. Lotan, A. Raz, *Endogenous lectins as mediators of tumor cell adhesion*, *J. Cell. Biochem.* **1988**, 37, 107-117.
- [68] L. Barbieri, V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, N. Basilico, M. Mondani, D. Taramelli, *Immunomodulatory α -Galactoglycosphingolipids: Synthesis of 2'-Fluoro-2'-deoxy- α -galactosylceramide and an Evaluation of Its Immunostimulating Properties*, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005, 3279-3285.
- [69] P. H. H. Lopez, R. L. Schnaar, *Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation*, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2009**, 19, 549-557.
- [70] S.-i. Hakomori, *Tumor Malignancy Defined by Aberrant Glycosylation and Sphingo(glyco)lipid Metabolism*, *Cancer Res.* **1996**, 56, 5309-5318.
- [71] P. H. Black, *Shedding from Normal and Cancer-Cell Surfaces*, *New Engl. J. Med.* **1980**, 303, 1415-1416.

- [72] R. Olshefski, S. Ladisch, *Intercellular transfer of shed tumor cell gangliosides*, *FEBS Lett.* **1996**, 386, 11-14.
- [73] J. W. Chu, F. J. Sharom, *Gangliosides interact with interleukin-4 and inhibit interleukin-4-stimulated helper T-cell proliferation*, *Immunology* **1995**, 84, 396-403.
- [74] C. Dumontet, A. Rebbaa, J. Bienvenu, J. Portoukalian, *Inhibition of immune cell proliferation and cytokine production by lipoprotein-bound gangliosides*, *Cancer Immunol Immunother* **1994**, 38, 311-316.
- [75] S. Ladisch, H. Becker, L. Ulsh, *Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses*, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1992**, 1125, 180-188.
- [76] H. Offner, T. Thieme, A. A. Vandenbark, *Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes*, *J. Immunol.* **1987**, 139, 3295-3305.
- [77] S. R. Carlsson, M. Fukuda, *Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes*, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 12779-12786.
- [78] F. M. Tuccillo, A. de Laurentiis, C. Palmieri, G. Fiume, P. Bonelli, A. Borrelli, P. Tassone, I. Scala, F. M. Buonaguro, I. Quinto, G. Scala, *Aberrant Glycosylation as Biomarker for Cancer: Focus on CD43*, *BioMed Research International* **2014**, 2014, 13.
- [79] J. Cyster, C. Somoza, N. Killeen, A. F. Williams, *Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence*, *Eur. J. Immunol.* **1990**, 20, 875-881.
- [80] K. S. Dorfman, W. Litaker, C. M. Baecher, J. G. Frelinger, *The nucleotide sequence of Ly 48 (mouse leukosialin, sialophorin): the mouse homolog of CD43*, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 4932.
- [81] G. Pedraza-Alva, L. B. Mérida, S. J. Burakoff, Y. Rosenstein, *T Cell Activation through the CD43 Molecule Leads to Vav Tyrosine Phosphorylation and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Activation*, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 14218-14224.
- [82] L. Cermák, S. á. Símová, A. Pintzas, V. Hořejší, L. Anděra, *Molecular Mechanisms Involved in CD43-mediated Apoptosis of TF-1 Cells: ROLES OF TRANSCRIPTION, Daxx EXPRESSION, AND ADHESION MOLECULES*, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 7955-7961.
- [83] M. C. Clark, L. G. Baum, *T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2012**, 1253, 58-67.
- [84] T. J. Brown, W. W. Shuford, W.-C. Wang, S. G. Nadler, T. S. Bailey, H. Marquardt, R. S. Mittler, *Characterization of a CD43/Leukosialin-mediated Pathway for Inducing Apoptosis in Human T-Lymphoblastoid Cells*, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 27686-27695.
- [85] G. Pedraza-Alva, Y. Rosenstein, *CD43 – One molecule, many tales to recount*, *Signal Transduction* **2007**, 7, 372-385.
- [86] D. Baeckström, K. Zhang, N. Asker, U. Rüetschi, M. Ek, G. C. Hansson, *Expression of the Leukocyte-associated Sialoglycoprotein CD43 by a Colon Carcinoma Cell Line*, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 13688-13692.
- [87] D. Mazurov, A. Ilinskaya, G. Heidecker, A. Filatov, *Role of O-Glycosylation and Expression of CD43 and CD45 on the Surfaces of Effector T Cells in Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Cell-to-Cell Infection*, *J. Virol.* **2012**, 86, 2447-2458.
- [88] L. Kadaja-Saarepuu, M. Looke, A. Balikova, T. Maimets, *Tumor suppressor p53 down-regulates expression of human leukocyte marker CD43 in non-hematopoietic tumor cells*, *Int. J. Oncol.* **2012**, 40, 567-576.
- [89] A. O. Galindo-Albarrán, O. Ramírez-Pliego, R. G. Labastida-Conde, E. I. Melchy-Pérez, A. Liquitaya-Montiel, F. R. Esquivel-Guadarrama, G. Rosas-Salgado, Y. Rosenstein, M. A. Santana, *CD43 Signals Prepare Human T Cells to Receive Cytokine Differentiation Signals*, *J. Cell. Physiol.* **2014**, 229, 172-180.
- [90] S. Eda, M. Yamanaka, M. Beppu, *Carbohydrate-mediated Phagocytic Recognition of Early Apoptotic Cells Undergoing Transient Capping of CD43 Glycoprotein*, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 5967-5974.
- [91] F. Piller, V. Piller, R. I. Fox, M. Fukuda, *Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis*, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 15146-15150.
- [92] M. Fukuda, S. R. Carlsson, J. C. Klock, A. Dell, *Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells*, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 12796-12806.
- [93] V. Hird, A. Maraveyas, D. Snook, B. Dhokia, W. P. Soutter, C. Meares, J. S. Stewart, P. Mason, H. E. Lambert, A. A. Epenetos, *Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody*, *Brit. J. Cancer* **1993**, 68, 403-406.

- [94] T. A. Waldmann, *Immunotherapy: past, present and future*, *Nat Med* **2003**, *9*, 269-277.
- [95] D. P. Galonic, D. Y. Gin, *Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines*, *Nature* **2007**, *446*, 1000-1007.
- [96] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836-863.
- [97] C. Palena, S. I. Abrams, J. Schlom, J. W. Hodge, in *Advances in Cancer Research, Vol. Volume 95*, Academic Press, **2006**, pp. 115-145.
- [98] M. Vergati, C. Intrivici, N.-Y. Huen, J. Schlom, K. Y. Tsang, *Strategies for Cancer Vaccine Development*, *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*.
- [99] A. Hoffmann-Roder, J. Schoenhentz, S. Wagner, E. Schmitt, *Perfluoroalkylated amphiphilic MUC1 glycopeptide antigens as tools for cancer immunotherapy*, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 382-384.
- [100] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Towards a Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccine: Synthesis and Immunological Evaluation of a Lipidated Glycopeptide Containing the Tumor-Associated Tn Antigen*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5985-5988.
- [101] G.-A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. F. Delmas, *Synthesis and Biological Evaluation of a Multiantigenic Tn/TF-Containing Glycopeptide Mimic of the Tumor-Related MUC1 Glycoprotein*, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965-968.
- [102] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Vollsynthetische Vakzinen aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden und einem Lipopeptid-Liganden des Toll-like Rezeptors 2*, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772-3776.
- [103] G. Ragupathi, F. Koide, P. O. Livingston, Y. S. Cho, A. Endo, Q. Wan, M. K. Spassova, S. J. Keding, J. Allen, O. Ouerfelli, R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *Preparation and evaluation of unimolecular pentavalent and hexavalent antigenic constructs targeting prostate and breast cancer: a synthetic route to anticancer vaccine candidates*, *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 2715-2725.
- [104] J. Zhu, Q. Wan, D. Lee, G. Yang, M. K. Spassova, O. Ouerfelli, G. Ragupathi, P. Damani, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *From Synthesis to Biologics: Preclinical Data on a Chemistry Derived Anticancer Vaccine*, *JACS* **2009**, *131*, 9298-9303.
- [105] S. J. Danishefsky, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, K. Koseki, D. A. Griffith, T. Oriyama, S. P. Marsden, *Application of Glycals to the Synthesis of Oligosaccharides: Convergent Total Syntheses of the Lewis X Trisaccharide Sialyl Lewis X Antigenic Determinant and Higher Congeners*, *JACS* **1995**, *117*, 1940-1953.
- [106] K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, N. J. Bockovich, C. H. Wong, *Stereocontrolled synthesis of sialyl Lex, the oligosaccharide binding ligand to ELAM-1 (sialyl =N-acetylneuramin)*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 870-872.
- [107] U. Sprengard, G. Kretschmar, E. Bartnik, C. Hüls, H. Kunz, *Synthese eines RGD-Sialyl-Lewisx-Glycokonjugats: ein neuer, hochwirksamer Ligand für P-Selektin*, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1104-1107.
- [108] G. J. McGarvey, C.-H. Wong, *Chemical, Enzymatic and Structural Studies in Molecular Glycobiology*, *Liebigs Annalen* **1997**, *1997*, 1059-1074.
- [109] P. V. Nikrad, M. A. Kashem, K. B. Wlasichuk, G. Alton, A. P. Venot, *Use of human-milk fucosyltransferase in the chemoenzymic synthesis of analogues of the sialyl Lewis and sialyl Lewis tetrasaccharides modified at the C-2 position of the reducing unit*, *Carbohydr. Res.* **1993**, *250*, 145-160.
- [110] N. Bézay, G. Dudziak, A. Liese, H. Kunz, *Chemoenzymatisch-chemische Synthese eines (2-3)-Sialyl-T-Threonin-Bausteins und dessen Einsatz in der Synthese der N-terminalen Sequenz von Leukämie-assoziiertem Leukosialin (CD43)*, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2350-2353.
- [111] L. Ding, H. Yu, K. Lau, Y. Li, S. Muthana, J. Wang, X. Chen, *Efficient chemoenzymatic synthesis of sialyl Tn-antigens and derivatives*, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8691-8693.
- [112] M. A. Kashem, K. B. Wlasichuk, J. M. Gregson, A. P. Venot, *Chemoenzymic synthesis of sialylated and fucosylated oligosaccharides having an N-acetylglucosaminyl core*, *Carbohydr. Res.* **1993**, *250*, 129-144.
- [113] R. Oehrlein, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Use of the "core-2"-N-acetylglucosaminyltransferase in the chemical-enzymatic synthesis of a sialyl-Lex-containing hexasaccharide found on O-linked glycoproteins*, *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 149-159.
- [114] S. Zeng, R. Gutiérrez Gallego, A. Dinter, M. Malissard, J. Kamerling, J. G. Vliegthart, E. Berger, *Complete enzymic synthesis of the mucin-type sialyl Lewis x epitope, involved in the interaction between PSGL-1 and P-selectin*, *Glycoconj. J.* **1999**, *16*, 487-497.

- [115] J. Yan, X. Chen, F. Wang, H. Cao, *Chemoenzymatic synthesis of mono- and di-fluorinated Thomsen-Friedenreich (T) antigens and their sialylated derivatives*, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 842-848.
- [116] K. Lau, H. Yu, V. Thon, Z. Khedri, M. E. Leon, B. K. Tran, X. Chen, *Sequential two-step multienzyme synthesis of tumor-associated sialyl T-antigens and derivatives*, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2784-2789.
- [117] E. Eichler, H. J. Jennings, M. Gilbert, D. M. Whitfield, *Synthesis of a disialylated hexasaccharide of Type VIII Group B Streptococcus capsular polysaccharide*, *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 1-16.
- [118] C. Filser, D. Kowalczyk, C. Jones, M. K. Wild, U. Ipe, D. Vestweber, H. Kunz, *Vom E-Selektin-Liganden 1 abgeleitete Glycopeptide mit variiertem Sialyl-Lewisx-Struktur als Zelladhäsionsinhibitoren für E-Selektin*, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2155-2159.
- [119] W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretschmar, H. Kunz, *Synthesis of Deoxy Sialyl Lewisx Analogues, Potential Selectin Antagonists*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2096-2098.
- [120] J. Xia, T. Srikrishnan, J. L. Alderfer, R. K. Jain, C. F. Piskorz, K. L. Matta, *Chemical synthesis of sulfated oligosaccharides with a β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-(α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]- α -D-GalNAc sequence*, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 561-577.
- [121] A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Stereoselective synthesis of sialyl-lactotetraosylceramide and sialylneolactotetraosylceramide*, *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 269-285.
- [122] A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Total synthesis of sialyl Lewis X*, *Carbohydr. Res.* **1991**, *209*, C1-C4.
- [123] H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi, *Stereoselective Synthesis of Oligo- α -(2,8)-Sialic Acids*, *JACS* **2006**, *128*, 7124-7125.
- [124] D. Crich, W. Li, *O-Sialylation with N-Acetyl-5-N,4-O-Carbonyl-Protected Thiosialoside Donors in Dichloromethane: Facile and Selective Cleavage of the Oxazolidinone Ring*, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2387-2391.
- [125] A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *Communication: Synthetic Studies on Sialoglycoconjugates 25: Reactivity of Glycosyl Promoters in α -Glycosylation of N-Acetyl-Neuraminic Acid with the Primary and Secondary Hydroxyl Groups in the Suitably Protected Galactose and Lactose Derivatives*, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 493-498.
- [126] S. Cai, B. Yu, *Efficient Sialylation with Phenyltrifluoroacetimidates as Leaving Groups*, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3827-3830.
- [127] T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Efficient sialylation with phosphite as leaving group*, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6123-6126.
- [128] H. Paulsen, H. Tietz, *Synthesis of Trisaccharide Moieties from N-Acetylneuraminic Acid and N-Acetylglucosamine*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 927-928.
- [129] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X.-S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C.-H. Wong, *Programmable One-Pot Oligosaccharide Synthesis*, *JACS* **1999**, *121*, 734-753.
- [130] J. C. Castro-Palomino, Y. E. Tsvetkov, R. R. Schmidt, *8-O-Sialylation of Neuraminic Acid*, *JACS* **1998**, *120*, 5434-5440.
- [131] T. Ercegovic, G. Magnusson, *Highly Stereoselective α -Sialylation. Synthesis of GM3-Saccharide and a Bis-Sialic Acid Unit*, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3378-3384.
- [132] D. Crich, W. Li, *Efficient Glycosidation of a Phenyl Thiosialoside Donor with Diphenyl Sulfoxide and Triflic Anhydride in Dichloromethane*, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 959-962.
- [133] F. Koichi, H. Atsushi, K. Shoichi, *A novel method for activation of thioglycosides, combination of N-bromosuccinimide and triflic acid salts*, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2187-2190.
- [134] T. Terada, T. Toyoda, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Synthetic Studies on Sialoglycoconjugates 74: Synthesis of KDN-gangliosides GM1, GM2, and GD1a*, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 769-790.
- [135] S. J. Danishefsky, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, K. Koseki, T. Oriyama, D. A. Griffith, C. H. Wong, D. P. Dumas, *Remarkable regioselectivity in the chemical glycosylation of glycal acceptors: a concise solution to the synthesis of sialyl-Lewis X glycal*, *JACS* **1992**, *114*, 8329-8331.
- [136] K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Totalsynthese der Glycopeptid-Erkennungsregion des P-Selektin-Glycoprotein-Liganden 1*, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3494-3498.
- [137] W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1*, *Cell* **2000**, *103*, 467-479.
- [138] C. Schlemmer, C. Wiebe, D. Ferenc, D. Kowalczyk, S. Wedepohl, P. Ziegelmlüller, J. Dervedde, T. Opatz, *Chemoenzymatic Synthesis of Functional Sialyl LewisX Mimetics with a Heteroaromatic Core*, *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 2119-2125.

- [139] H. Iijima, T. Ogawa, *Total synthesis of 3-O-[2-acetamido-6-O-(N-acetyl- α -D-neuraminy)]-2-deoxy- α -D-galactosyl]-L-serine and a stereoisomer*, *Carbohydr. Res.* **1988**, 172, 183-193.
- [140] Z.-G. Wang, X.-F. Zhang, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Stereocontrolled syntheses of O-glycans of core class 2 with a linear tetrameric lactosamine chain and with three lactosamine branches*, *Carbohydr. Res.* **1996**, 295, 25-39.
- [141] B. Liebe, H. Kunz, *Festphasensynthese eines tumorassozierten Sialyl-TN-Antigen-Glycopeptids mit einer Partialsequenz aus dem Tandem-Repeat des MUC-1-Mucins*, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629-631.
- [142] B. Liebe, H. Kunz, *Solid-Phase Synthesis of a Sialyl-Tn-Glycoundecapeptide of the MUC1 Repeating Unit*, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473-1482.
- [143] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and Bovine Serum Albumin*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7624-7630.
- [144] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Biomimetic Synthesis of the Tumor-Associated (2,3)-Sialyl-T Antigen and Its Incorporation into Glycopeptide Antigens from the Mucins MUC1 and MUC4*, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4150-4162.
- [145] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Synthesis and Structural Model of an α (2,6)-Sialyl-T Glycosylated MUC1 Eicosapeptide under Physiological Conditions*, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4981-4993.
- [146] L. Singh, Y. Nakahara, Y. Ito, Y. Nakahara, *An efficient access to protected disialylated glycohexaosyl threonine present on the leukosialin of activated T-lymphocytes*, *Carbohydr. Res.* **2000**, 325, 132-142.
- [147] F.-Y. Dupradeau, M. R. Stroud, D. Boivin, L. Li, S.-i. Hakomori, A. K. Singhal, T. Toyokuni, *Solid-phase synthesis and immunoreactivity of penta-O-(N-acetyl- α -D-galactosaminy)]-MUC1 eicosapeptide, a glycosylated counter part of the highly immunogenic tandem repeat sequence of carcinoma-associated mucin*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 1813-1818.
- [148] T. Toyokuni, B. Dean, S. Cai, D. Boivin, S. Hakomori, A. K. Singhal, *Synthetic vaccines: synthesis of a dimeric Tn antigen-lipopeptide conjugate that elicits immune responses against Tn-expressing glycoproteins*, *JACS* **1994**, 116, 395-396.
- [149] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G.-J. Boons, *Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine*, *Nat Chem Biol* **2007**, 3, 663-667.
- [150] S. Ingale, M. A. Wolfert, T. Buskas, G.-J. Boons, *Increasing the Antigenicity of Synthetic Tumor-Associated Carbohydrate Antigens by Targeting Toll-Like Receptors*, *ChemBioChem* **2009**, 10, 455-463.
- [151] S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Dériaud, C. Leclerc, P. Dumy, *Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccines*, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1149-1159.
- [152] O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi, P. Dumy, *Towards a Self-Adjuvanting Multivalent B and T cell Epitope Containing Synthetic Glycolipopeptide Cancer Vaccine*, *ChemMedChem* **2008**, 3, 737-741.
- [153] D. J. Lee, S.-H. Yang, G. M. Williams, M. A. Brimble, *Synthesis of Multivalent Neoglyconjugates of MUC1 by the Conjugation of Carbohydrate-Centered, Triazole-Linked Glycoclusters to MUC1 Peptides Using Click Chemistry*, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 7564-7571.
- [154] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Towards a Fully Synthetic MUC1-Based Anticancer Vaccine: Efficient Conjugation of Glycopeptides with Mono-, Di-, and Tetravalent Lipopeptides Using Click Chemistry*, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 6396-6406.
- [155] H. Cai, Z.-Y. Sun, M.-S. Chen, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Synthetic Multivalent Glycopeptide-Lipopeptide Antitumor Vaccines: Impact of the Cluster Effect on the Killing of Tumor Cells*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 1699-1703.
- [156] P. Chefalo, Y. Pan, N. Nagy, C. Harding, Z. Guo, *Preparation and immunological studies of protein conjugates of N-acylneuraminic acids*, *Glycoconj. J.* **2003**, 20, 407-414.
- [157] S. Sahabuddin, T.-C. Chang, C.-C. Lin, F.-D. Jan, H.-Y. Hsiao, K.-T. Huang, J.-H. Chen, J.-C. Horng, J.-a. A. Ho, C.-C. Lin, *Synthesis of N-modified sTn analogs and evaluation of their immunogenicities by microarray-based immunoassay*, *Tetrahedron* **2010**, 66, 7510-7519.
- [158] J. Wu, Z. Guo, *Improving the Antigenicity of sTn Antigen by Modification of Its Sialic Acid Residue for Development of Glycoconjugate Cancer Vaccines*, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 1537-1544.
- [159] Q. Wang, Z. Guo, *Synthetic and Immunological Studies of sTn Derivatives Carrying Substituted Phenylacetylsialic Acids as Cancer Vaccine Candidate*, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 2, 373-378.

- [160] S. J. Danishefsky, Y.-K. Shue, M. N. Chang, C.-H. Wong, *Development of Globo-H Cancer Vaccine*, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 643-652.
- [161] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *The development of synthetic antitumour vaccines from mucin glycopeptide antigens*, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4421-4442.
- [162] F. Peri, *Clustered carbohydrates in synthetic vaccines*, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4543-4556.
- [163] G. Ragupathi, S. F. Slovin, S. Adluri, D. Sames, I. J. Kim, H. M. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, K. O. Lloyd, H. I. Scher, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *A Fully Synthetic Globo H Carbohydrate Vaccine Induces a Focused Humoral Response in Prostate Cancer Patients: A Proof of Principle*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 563-566.
- [164] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and a T-Cell Epitope for the Induction of a Highly Specific Humoral Immune Response*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551-7556.
- [165] R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *A Vision for Vaccines Built from Fully Synthetic Tumor-Associated Antigens: From the Laboratory to the Clinic*, *JACS* **2013**, *135*, 14462-14472.
- [166] J. Yu, U. Westerlind, *Synthesis of a Glycopeptide Vaccine Conjugate for Induction of Antibodies Recognizing O-Mannosyl Glycopeptides*, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 939-945.
- [167] L. Awad, R. Madani, A. Gillig, M. Kolympani, M. Philgren, A. Muhs, C. Gérard, P. Vogel, *A C-Linked Disaccharide Analogue of Thomsen-Friedenreich Epitope Induces a Strong Immune Response in Mice*, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8578-8582.
- [168] D. R. Bundle, J. R. Rich, S. Jacques, H. N. Yu, M. Nitz, C.-C. Ling, *Thiooligosaccharide Conjugate Vaccines Evoke Antibodies Specific for Native Antigens*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7725-7729.
- [169] T. Gustafsson, M. Saxin, J. Kihlberg, *Synthesis of a C-Glycoside Analogue of β -D-Galactosyl-threonine*, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2506-2509.
- [170] S. Knapp, E. Darout, B. Amorelli, *New Glycomimetics: Anomeric Sulfonates, Sulfenamides, and Sulfonamides*, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1380-1389.
- [171] C.-X. Huo, X.-J. Zheng, A. Xiao, C.-C. Liu, S. Sun, Z. Lv, X.-S. Ye, *Synthetic and immunological studies of N-acyl modified S-linked STn derivatives as anticancer vaccine candidates*, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3677-3690.
- [172] C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Röder, *Synthesis of Fluorinated Analogues of Tumor-Associated Carbohydrate and Glycopeptide Antigens*, *Synlett* **2009**, *2009*, 2167-2171.
- [173] S. Wagner, C. Mersch, A. Hoffmann-Röder, *Fluorinated Glycosyl Amino Acids for Mucin-Like Glycopeptide Antigen Analogues*, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7319-7330.
- [174] T. Tashiro, R. Nakagawa, T. Hirokawa, S. Inoue, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *RCAI-56, a carbocyclic analogue of KRN7000: its synthesis and potent activity for natural killer (NK) T cells to preferentially produce interferon- γ* , *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3343-3347.
- [175] T. Tashiro, R. Nakagawa, T. Hirokawa, S. Inoue, H. Watarai, M. Taniguchi, K. Mori, *RCAI-37, 56, 59, 60, 92, 101, and 102, cyclitol and carbasugar analogs of KRN7000: Their synthesis and bioactivity for mouse lymphocytes to produce Th1-biased cytokines*, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6360-6373.
- [176] B. E. Smart, *Fluorine substituent effects (on bioactivity)*, *J. Fluorine Chem.* **2001**, *109*, 3-11.
- [177] C.-L. Schengrund, P. Kováč, *UDP-6-deoxy-6-fluoro- α -D-galactose binds to two different galactosyltransferases, but neither can effectively catalyze transfer of the modified galactose to the appropriate acceptor*, *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 24-28.
- [178] S. P. Vincent, M. D. Burkart, C.-Y. Tsai, Z. Zhang, C.-H. Wong, *Electrophilic Fluorination-Nucleophilic Addition Reaction Mediated by Selectfluor: Mechanistic Studies and New Applications*, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5264-5279.
- [179] J. Xue, V. Kumar, S. D. Khaja, E. V. Chandrasekaran, R. D. Locke, K. L. Matta, *Syntheses of fluorine-containing mucin core 2/core 6 structures using novel fluorinated glucosaminyl donors*, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8325-8335.
- [180] E. Matei, S. André, A. Glinschert, A. S. Infantino, S. Oscarson, H.-J. Gabius, A. M. Gronenborn, *Fluorinated Carbohydrates as Lectin Ligands: Dissecting Glycan-Cyanovirin Interactions by Using ^{19}F NMR Spectroscopy*, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5364-5374.
- [181] S. G. Withers, K. Rupitz, I. P. Street, *2-Deoxy-2-fluoro-D-glycosyl fluorides. A new class of specific mechanism-based glycosidase inhibitors*, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7929-7932.
- [182] S. G. Withers, I. P. Street, P. Bird, D. H. Dolphin, *2-Deoxy-2-fluoroglucosides: a novel class of mechanism-based glycosidase inhibitors*, *JACS* **1987**, *109*, 7530-7531.

- [183] J. D. McCarter, M. J. Adam, N. G. Hartman, S. G. Withers, *In vivo inhibition of beta-glucosidase and beta-mannosidase activity in rats by 2-deoxy-2-fluoro-beta-glycosyl fluorides and recovery of activity in vivo and in vitro*, *Biochem. J* **1994**, *301*, 343-348.
- [184] A. Hoffmann-Röder, M. Johannes, *Synthesis of a MUC1-glycopeptide-BSA conjugate vaccine bearing the 3'-deoxy-3'-fluoro-Thomsen-Friedenreich antigen*, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9903-9905.
- [185] A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Synthetic Antitumor Vaccines from Tetanus Toxoid Conjugates of MUC1 Glycopeptides with the Thomsen-Friedenreich Antigen and a Fluorine-Substituted Analogue*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8498-8503.
- [186] M. Johannes, M. Reindl, B. Gerlitzki, E. Schmitt, A. Hoffmann-Röder, *Synthesis and biological evaluation of a novel MUC1 glycopeptide conjugate vaccine candidate comprising a 4'-deoxy-4'-fluoro-Thomsen-Friedenreich epitope*, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 155-161.
- [187] T. Oberbillig, C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Röder, *Antibody recognition of fluorinated MUC1 glycopeptide antigens*, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1487-1489.
- [188] H.-Y. Lee, C.-Y. Chen, T.-I. Tsai, S.-T. Li, K.-H. Lin, Y.-Y. Cheng, C.-T. Ren, T.-J. R. Cheng, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, *Immunogenicity Study of Globo H Analogues with Modification at the Reducing or Nonreducing End of the Tumor Antigen*, *JACS* **2014**, *136*, 16844-16853.
- [189] X.-J. Zheng, F. Yang, M. Zheng, C.-X. Huo, Y. Zhang, X.-S. Ye, *Improvement of the immune efficacy of carbohydrate vaccines by chemical modification on the GM3 antigen*, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6399-6406.
- [190] S. Wagner, *Synthese und biologische Evaluierung von fluorierten und carbaanalogen Glycopeptiden für die Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen*, *Dissertation* **2012**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [191] F. Yang, X.-J. Zheng, C.-X. Huo, Y. Wang, Y. Zhang, X.-S. Ye, *Enhancement of the Immunogenicity of Synthetic Carbohydrate Vaccines by Chemical Modifications of STn Antigen*, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *6*, 252-259.
- [192] S. Hader, A. G. Watts, *The synthesis of a series of deoxygenated 2,3-difluoro-N-acetylneuraminic acid derivatives as potential sialidase inhibitors*, *Carbohydr. Res.* **2013**, *374*, 23-28.
- [193] V. Gouge-Ibert, C. Pierry, F. Poulain, A.-L. Serre, C. Largeau, V. Escriou, D. Scherman, P. Jubault, J.-C. Quirion, E. Leclerc, *Synthesis of fluorinated C-mannopeptides as sialyl Lewis x mimics for E- and P-selectin inhibition*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1957-1960.
- [194] N. Kaila, L. Chen, Thomas, D. Tsao, S. Tam, P. W. Bedard, R. T. Camphausen, J. C. Alvarez, G. Ullas, *β -C-Mannosides as Selectin Inhibitors*, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1563-1566.
- [195] C.-Y. Tsai, W. K. C. Park, G. Weitz-Schmidt, B. Ernst, C.-H. Wong, *Synthesis of sialyl Lewis X mimetics using the Ugi four-component reaction*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2333-2338.
- [196] S. Colombel, N. Van Hijfte, T. Poisson, X. Pannecoucke, F. Monneaux, E. Leclerc, *Synthesis and immunological evaluation of fluorinated α -C-galactosylceramide analogs*, *J. Fluorine Chem.* **2015**, *173*, 84-91.
- [197] M. Kronenberg, *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes*, *Annu Rev Immunol* **2005**, *23*, 877-900.
- [198] L. Van Kaer, *alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles*, *Nature reviews. Immunology* **2005**, *5*, 31-42.
- [199] T. Natori, K. Akimoto, K. Motoki, Y. Koezuka, T. Higa, *[Development of KRN7000, derived from agelasphin produced by Okinawan sponge]*, *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* **1997**, *110 Suppl 1*, 63P-68P.
- [200] K. Akimoto, T. Natori, M. Morita, *Synthesis and stereochemistry of agelasphin-9b*, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5593-5596.
- [201] A. Banchet-Cadecdu, E. Henon, M. Dauchez, J.-H. Renault, F. Monneaux, A. Haudrechy, *The stimulating adventure of KRN 7000*, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3080-3104.
- [202] R. Raju, B. F. Castillo, S. K. Richardson, M. Thakur, R. Severins, M. Kronenberg, A. R. Howell, *Synthesis and evaluation of 3"- and 4"-deoxy and -fluoro analogs of the immunostimulatory glycolipid, KRN7000*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4122-4125.
- [203] P. B. Savage, L. Teyton, A. Bendelac, *Glycolipids for natural killer T cells*, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 771-779.
- [204] T. Tashiro, *Structure-Activity Relationship Studies of Novel Glycosphingolipids That Stimulate Natural Killer T-Cells*, *Biosci. Biotech. Bioch.* **2012**, *76*, 1055-1067.

- [205] T. Delaunay, T. Poisson, P. Jubault, X. Pannecoucke, *First synthesis of diethyl N-acetyl-glycosamine-1-difluoromethylphosphonate from 2-nitroglycals as phosphate analog*, *J. Fluorine Chem.* **2015**, 171, 56-59.
- [206] X. Zhu, R. R. Schmidt, *Neue Prinzipien für die Bildung von glycosidischen Bindungen*, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1932-1967.
- [207] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Synthese der glycopeptide O-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-(1→3)-L-serin und -L-threonin*, *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89-107.
- [208] M. Johannes, *Synthese fluorierter Glycopeptidkonjugate zur Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen*, *Dissertation* **2011**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [209] C. Mersch, *Synthese von MUC1-Glycopeptid-Konjugaten mit fluorierten Analoga des Thomsen-Friedenreich Antigens*, *Dissertation* **2011**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [210] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Towards the Development of Antitumor Vaccines: A Synthetic Conjugate of a Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigen and a Tetanus Toxin Epitope*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366-369.
- [211] A. Marra, P. Sinaÿ, *Stereoselective synthesis of 2-thioglycosides of N-acetylneuraminic acid*, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 35-42.
- [212] G. Zemplén, A. Kunz, *Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1923**, 56, 1705-1710.
- [213] H. Kunz, C. Unverzagt, *Schutzgruppenabhängige Stabilität von Intersaccharid-Bindungen – Synthese eines Fucosyl-Chitobiose-Glycopeptids*, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1763-1765.
- [214] K. Baumann, *Mucinartige Glycopeptide als Inhibitoren selektinvermittelter Zelladhäsionsprozesse*, *Dissertation* **2007**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [215] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Nitriles as Solvents in Glycosylation Reactions: Highly Selective β-Glycoside Synthesis I*, *Synlett* **1990**, 1990, 694-696.
- [216] J. Cunningham, R. Gigg, C. D. Warren, *The allyl ether as a protection group in carbohydrate chemistry*, *Tetrahedron Lett.* **1964**, 5, 1191-1196.
- [217] F. Guibé, *Allylic protecting groups and their use in a complex environment part I: Allylic protection of alcohols*, *Tetrahedron* **1997**, 53, 13509-13556.
- [218] P. Fügedi, P. Garegg, H. Lönn, T. Norberg, *Thioglycosides as glycosylating agents in oligosaccharide synthesis*, *Glycoconj. J.* **1987**, 4, 97-108.
- [219] J. Fried, D. E. Walz, *Ethyl Thioglycosides of D-Mannose and D-Galactose and a New Synthesis of Styracitol*, *JACS* **1949**, 71, 140-143.
- [220] P. Li, L. Sun, D. W. Landry, K. Zhao, *Synthesis of 1-thioglycosides*, *Carbohydr. Res.* **1995**, 275, 179-184.
- [221] D. Saibal Kumar, N. Roy, *An improved method for the preparation of some ethyl 1-thioglycosides*, *Carbohydr. Res.* **1996**, 296, 275-277.
- [222] S. Hanessian, P. Lavalley, *The Preparation and Synthetic Utility of tert-Butyldiphenylsilyl Ethers*, *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 2975-2977.
- [223] T. D. Nelson, R. D. Crouch, *Selective Deprotection of Silyl Ethers*, *Synthesis* **1996**, 1996, 1031-1069.
- [224] J. Dinkelaar, M. D. Witte, L. J. van den Bos, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, *NIS/TFA: a general method for hydrolyzing thioglycosides*, *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1723-1729.
- [225] T. J. Boltje, C. Li, G.-J. Boons, *Versatile Set of Orthogonal Protecting Groups for the Preparation of Highly Branched Oligosaccharides*, *Org. Lett.* **2010**, 12, 4636-4639.
- [226] T. B. Windholz, D. B. R. Johnston, *Trichloroethoxycarbonyl: a generally applicable protecting group*, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 2555-2557.
- [227] U. Ellervik, G. Magnusson, *Glycosylation with N-Troc-protected glycosyl donors*, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 251-260.
- [228] C. Filser, *Synthese von Sialyl-Lewis^x-Glycopeptiden und -Mimetika als Zelladhäsionsinhibitoren für E-Selektin*, *Dissertation* **2005**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [229] M. Johannes, T. Oberbillig, A. Hoffmann-Röder, *Synthesis of fluorinated Thomsen-Friedenreich antigens: direct deoxyfluorination of αGalNAc-threonine tert-butyl esters*, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5541-5546.
- [230] W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *N-Trichloroethoxycarbonyl-glycosamine derivatives as glycosyl donors*, *Carbohydr. Res.* **1996**, 296, 135-147.
- [231] J. Zhang, P. Kováč, *An Alternative Method for Regioselective, Anomeric Deacylation of Fully Acylated Carbohydrates*, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, 18, 461-469.

- [232] S. K. Chaudhary, O. Hernandez, *4-dimethylaminopyridine: an efficient and selective catalyst for the silylation of alcohols*, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 99-102.
- [233] M. Takatani, T. Nakama, K. Kubo, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, Y. Nakahara, *Synthesis of N-linked pentasaccharides with isomeric glycosidic linkage*, *Glycoconj. J.* **2000**, 17, 361-375.
- [234] U. Ellervik, G. Magnusson, *Guanidine/guanidinium nitrate; a mild and selective O-deacetylation reagent that leaves the N-Troc group intact*, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1627-1628.
- [235] M. P. DeNinno, J. B. Etienne, K. C. Duplantier, *A method for the selective reduction of carbohydrate 4,6-O-benzylidene acetals*, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 669-672.
- [236] M. Sakagami, H. Hamana, *A selective ring opening reaction of 4,6-O-benzylidene acetals in carbohydrates using trialkylsilane derivatives*, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5547-5551.
- [237] M. Ohlin, R. Johnsson, U. Ellervik, *Regioselective reductive openings of 4,6-benzylidene acetals: synthetic and mechanistic aspects*, *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 1358-1370.
- [238] C.-R. Shie, Z.-H. Tzeng, S. S. Kulkarni, B.-J. Uang, C.-Y. Hsu, S.-C. Hung, *Cu(OTf)₂ as an Efficient and Dual-Purpose Catalyst in the Regioselective Reductive Ring Opening of Benzylidene Acetals*, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1693-1696.
- [239] R. Johnsson, M. Ohlin, U. Ellervik, *Reductive Openings of Benzylidene Acetals Revisited: A Mechanistic Scheme for Regio- and Stereoselectivity*, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 8003-8011.
- [240] P. J. Garegg, H. Hultberg, S. Wallin, *A novel, reductive ring-opening of carbohydrate benzylidene acetals*, *Carbohydr. Res.* **1982**, 108, 97-101.
- [241] W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, D. W. Schmidt, H. Kunz, *Synthesis of Sulfated Lex-Trisaccharides*, *J. Prak. Chem./Chem.-Ztg.* **1995**, 337, 441-445.
- [242] M. D. Burkart, Z. Zhang, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *A New Method for the Synthesis of Fluoro-Carbohydrates and Glycosides Using Selectfluor*, *JACS* **1997**, 119, 11743-11746.
- [243] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B. J. Paul, *Synthesis of deoxyfluoro sugars from carbohydrate precursors*, *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 47-86.
- [244] M. Albert, K. Dax, J. Ortner, *A novel direct route to 2-deoxy-2-fluoro-aldoses and their corresponding derivatives*, *Tetrahedron* **1998**, 54, 4839-4848.
- [245] R. P. Singh, J. n. M. Shreeve, *Nucleophilic fluorination of amino alcohols and diols using Deoxofluor*, *J. Fluorine Chem.* **2002**, 116, 23-26.
- [246] D. B. Dess, J. C. Martin, *Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones*, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155-4156.
- [247] A. Duschek, S. F. Kirsch, *2-Iodoxybenzoesäure – ein einfaches Oxidationsmittel mit einer Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten*, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 1562-1590.
- [248] K. Omura, D. Swern, *Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study*, *Tetrahedron* **1978**, 34, 1651-1660.
- [249] A. Bisai, M. Chandrasekhar, V. K. Singh, *An alternative to the Swern oxidation*, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8355-8357.
- [250] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer, *Zur Darstellung von Glucosiden aus Acetobromglucose*, *Liebigs Ann. Chem.* **1949**, 563, 139-145.
- [251] S. Keil, *Synthese von MUC1-Glycopeptiden zur Entwicklung von synthetischen Tumorkvakzinen*, *Dissertation* **2000**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [252] K. Furuhashi, K. Komiyama, H. Ogura, T. Hata, *Studies on Glycosylation of the Mitomycins. Syntheses of 7-N-(4-O-Glycosylphenyl)-9a-methoxy-mitosanes*, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1991**, 39, 255-259.
- [253] C.-H. Wang, S.-T. Li, T.-L. Lin, Y.-Y. Cheng, T.-H. Sun, J.-T. Wang, T.-J. R. Cheng, K. K. T. Mong, C.-H. Wong, C.-Y. Wu, *Synthesis of Neisseria meningitidis Serogroup W135 Capsular Oligosaccharides for Immunogenicity Comparison and Vaccine Development*, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 9327-9331.
- [254] A. Malapelle, A. Coslovi, G. Doisneau, J.-M. Beau, *An Expedient Synthesis of N-Acetylneuraminic Acid α -C-Glycosyl Derivatives (" α -C-Glycosides") from the Anomeric Acetates*, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007, 3145-3157.
- [255] J. P. Kamerling, R. Schauer, A. K. Shukla, S. Stoll, H. Van Halbeek, J. F. G. Vliegthart, *Migration of O-acetyl groups in N,O-acetylneuraminic acids*, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 162, 601-607.
- [256] H. Dang, M. Mailig, G. Lalic, *Mild Copper-Catalyzed Fluorination of Alkyl Triflates with Potassium Fluoride*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 6473-6476.
- [257] C. Munro-Leighton, E. D. Blue, T. B. Gunnoe, *Anti-Markovnikov N-H and O-H Additions to Electron-Deficient Olefins Catalyzed by Well-Defined Cu(I) Anilido, Ethoxide, and Phenoxide Systems*, *JACS* **2006**, 128, 1446-1447.

- [258] S. Hartlieb, A. Günzel, R. Gerardy-Schahn, A. K. Münster-Kühnel, A. Kirschning, G. Dräger, *Chemoenzymatic synthesis of CMP-N-acetyl-7-fluoro-7-deoxy-neuraminic acid*, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2075-2082.
- [259] H. A. Chokhawala, H. Cao, H. Yu, X. Chen, *Enzymatic Synthesis of Fluorinated Mechanistic Probes for Sialidases and Sialyltransferases*, *JACS* **2007**, *129*, 10630-10631.
- [260] F. Broszeit, *Studies toward the Synthesis of modified Glycophorin Epitopes*, *Masterarbeit* **2015**, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- [261] R. R. Schmidt, J. Michel, *Facile Synthesis of α - and β -O-Glycosyl Imidates; Preparation of Glycosides and Disaccharides*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 731-732.
- [262] R. R. Schmidt, J. Michel, *Einfache Synthese von α - und β -O-Glykosylimidaten; Herstellung von Glykosiden und Disacchariden*, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763-764.
- [263] O. P. Chevallier, M. E. Migaud, *Investigation of acetyl migrations in furanosides*, *Beilstein J. Org. Chem.* **2006**, *2*, 14.
- [264] K. Okamoto, T. Goto, *Glycosidation of sialic acid*, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5835-5857.
- [265] G.-J. Boons, A. V. Demchenko, *Recent Advances in O-Sialylation*, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4539-4566.
- [266] V. Martichonok, G. M. Whitesides, *Stereoselective α -Sialylation with Sialyl Xanthate and Phenylsulfenyl Triflate as a Promotor*, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1702-1706.
- [267] M. Karplus, *Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments*, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
- [268] M. Karplus, *Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance*, *JACS* **1963**, *85*, 2870-2871.
- [269] H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohru, H. Meguro, *A simple method to determine the anomeric configuration of sialic acid and its derivatives by ^{13}C -NMR*, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6317-6320.
- [270] U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *^1H -NMR studies at N-acetyl-D-neuraminic acid ketosides for the determination of the anomeric configuration II*, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4637-4640.
- [271] H. Paulsen, H. Tietz, *Synthese eines trisaccharides aus N-acetylneuraminsäure und N-acetyllactosamin*, *Carbohydr. Res.* **1984**, *125*, 47-64.
- [272] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Glycosylation of 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-2-deoxy-2 β ,3 β -epoxy-N-acetylneuraminic Acid Methyl Ester*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 637-643.
- [273] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *An effective synthesis of α -glycosides of N-acetylneuraminic acid by use of 2 β -halo-3 β -hydroxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid methyl ester*, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5233-5236.
- [274] C. Brocke, *Synthese von tumorassozierten Glycopeptid-Antigenen aus der repetitiven Sequenz des epithelialen Mucins MUC4*, *Dissertation* **2003**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [275] A. Paquet, *Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl, and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into O-unprotected hydroxyamino acids using succinimidyl carbonates*, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976-980.
- [276] E. Vowinkel, *Darstellung von Carbonsäureestern mittels O-Alkyl-N,N'-dicyclohexyl-isoharnstoff*, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16-22.
- [277] M. Schultz, H. Kunz, *Synthetic O-glycopeptides as model substrates for glycosyltransferases*, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1205-1220.
- [278] G. Braum, *Synthese von Glycopeptiden mit photoaktivierbaren Gruppen im Saccharidteil*, *Dissertation* **1991**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [279] A. P. Kozikowski, J. Lee, *A synthetic approach to the cis-fused marine pyranopyrans, (3E)- and (3Z)-dactomelyne. X-ray structure of a rare organomercurial*, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863-870.
- [280] M. L. Wolfrom, A. Thompson, *in Methods in Carbohydrate Chemistry* **1963**, *2*, 211-215.
- [281] H. Ohle, W. Marecek, W. Bourjau, *Über Schwefelsäure-Verbindungen der Zucker, II. Mitteil.: Eine Reaktion zur Unterscheidung ring-isomerer acylierter Halogenzucker*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 833-854.
- [282] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal*, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244-1251.
- [283] C. Plattner, M. Höfener, N. Sewald, *One-Pot Azidochlorination of Glycals*, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 545-547.
- [284] W. Koenigs, E. Knorr, *Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose*, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.
- [285] N. Bézay, *Chemische und chemoenzymatische Synthesen von immunologisch relevanten Glycopeptiden mit Sialyl-T-Struktur*, *Dissertation* **2000**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- [286] M. E. Evans, *Methyl 4,6-O-benzylidene- α - and - β -D-glucosides*, *Carbohydr. Res.* **1972**, *21*, 473-475.
- [287] J. C. Castro-Palomino, R. R. Schmidt, *N-Tetrachlorophthaloyl-protected trichloroacetimidate of glucosamine as glycosyl donor in oligosaccharide synthesis*, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5343-5346.
- [288] R. R. Schmidt, *Recent developments in the synthesis of glycoconjugates*, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1257-1270.
- [289] B. Helferich, K. Weis, *Zur Synthese von Glucosiden und von nicht-reduzierenden Disacchariden*, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 314-321.
- [290] S. Dziadek, *Entwicklung synthetischer Antitumorvakzine basierend auf komplexen tumorassoziierten Glycopeptidkonjugaten aus dem epithelialen Mucin MUC1*, Dissertation **2004**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [291] O. P. Chevallier, M. E. Migaud, *Investigation of acetyl migrations in furanosides*, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2*, 14-14.
- [292] H. Malekan, G. Fung, V. Thon, Z. Khedri, H. Yu, J. Qu, Y. Li, L. Ding, K. S. Lam, X. Chen, *One-pot multi-enzyme (OPME) chemoenzymatic synthesis of sialyl-Tn-MUC1 and sialyl-T-MUC1 glycopeptides containing natural or non-natural sialic acid*, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4778-4785.
- [293] R. B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, *JACS* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [294] R. B. Merrifield, *Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture)*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 799-810.
- [295] L. A. Carpino, G. Y. Han, *9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group*, *JACS* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [296] R. Ramage, J. Green, A. J. Blake, *An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine*, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6353-6370.
- [297] P. Sieber, B. Riniker, *Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group*, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6031-6034.
- [298] W. König, R. Geiger, *Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolinen*, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [299] L. A. Carpino, *1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive*, *JACS* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [300] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *A New Method of Forming Peptide Bonds*, *JACS* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [301] J. Sheehan, P. Cruickshank, G. Boshart, *Notes- A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides*, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525-2528.
- [302] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest*, *Synthesis* **1984**, 1984, 572-574.
- [303] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace*, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1269-1272.
- [304] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 201-203.
- [305] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Kupplungsreagentien vom Uronium-/Guanidinium-Typ: Synthese und Charakterisierung der authentischen Uroniumsalze*, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457-461.
- [306] O. Seitz, H. Kunz, *HYCRON, an Allylic Anchor for High-Efficiency Solid Phase Synthesis of Protected Peptides and Glycopeptides*, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813-826.
- [307] L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Water-Soluble Polymers Coupled with Glycopeptide Antigens and T-Cell Epitopes as Potential Antitumor Vaccines*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10652-10656.
- [308] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes*, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711.
- [309] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides*, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

- [310] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Fully Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptides and a Lipopeptide Ligand of the Toll-like Receptor 2*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688-3692.
- [311] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Gl üsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Anticancer Agents, 15. Squaric Acid Diethyl Ester: A New Coupling Reagent for the Formation of Drug Biopolymer Conjugates. Synthesis of Squaric Acid Ester Amides and Diamides*, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215-1221.
- [312] L. F. Tietze, C. Schroeter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Conjugation of p-aminophenyl glycosides with squaric acid diester to a carrier protein and the use of the neoglycoprotein in the histochemical detection of lectins*, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148-153.
- [313] W. L. F. Armarego, C. C. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier **2008**, Vol. 6th.
- [314] G. Lippke, H. Thaler, *Die spezifische Drehung des Sorbits und des Sorbit-Molybdat-Komplexes*, *Starch - Stärke* **1970**, *22*, 344-351.
- [315] *International Union of Pure and Applied Chemistry, International Union of Biochemistry, Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 595.
- [316] K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Total Synthesis of the Glycopeptide Recognition Domain of the P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3445-3449.
- [317] K. Daragics, P. t. Fügedi, *(2-Nitrophenyl)acetyl: A New, Selectively Removable Hydroxyl Protecting Group*, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2076-2079.
- [318] O. T. Schmidt, in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II*, (Eds.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom, J. N. BeMiller), Academic Press Inc., New York, London, **1963**, Vol. II, p. 318.
- [319] G. D. Kishore Kumar, S. Baskaran, *A Facile, Catalytic, and Environmentally Benign Method for Selective Deprotection of tert-Butyldimethylsilyl Ether Mediated by Phosphomolybdic Acid Supported on Silica Gel*, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4520-4523.
- [320] H. Herzner, J. Eberling, M. Schultz, J. Zimmer, H. Kunz, *Oligosaccharide Synthesis via Electrophile-Induced Activation of Glycosyl-N-Allylcarbamates*, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 759-776.
- [321] N. V. Bovin, S. É. Zurabyan, A. Y. Khorlin, *Addition of halogenoazides to glycals*, *Carbohydr. Res.* **1981**, *98*, 25-35.
- [322] M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Use of dichlorophthaloyl (DCPhth) group as an amino protecting group in oligosaccharide synthesis*, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 1381-1394.
- [323] S. Wagner, *Synthese von fluorierten Glycosylaminosäuren als Bausteine für tumorassoziierte Glycopeptidantigene des epithelialen Mucins MUC1*, *Diplomarbeit* **2008**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [324] N. F. Taylor, P. W. Kent, *168. Fluorocarbohydrates. Part I. The synthesis of 6-deoxy-6-fluoro- α -D-galactose and 5-deoxy-5-fluoro- α/β -D-ribose*, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1958**, 872-875.
- [325] T. Oberbillig, *Synthese mehrfach fluorierter MUC1-Glycopeptide für die Entwicklung tumorselektiver Vakzine und Untersuchung Mikroreaktorunterstützter Bausteinsynthesen*, *Dissertation* **2012**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [326] P. W. Kent, J. R. Wright, *Fluorocarbohydrates : Part XXIV. Chemical and enzymic reduction and phosphorylation of 6-deoxy-6-fluoro- α -D-galactose*, *Carbohydr. Res.* **1972**, *22*, 193-200.
- [327] T. L. Lowary, O. Hindsgaul, *Recognition of synthetic deoxy and deoxyfluoro analogs of the acceptor α -L-Fucp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galp-OR by the blood-group A and B gene-specified glycosyltransferases*, *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 163-195.
- [328] G. C. Daskhan, N. Jayaraman, *Increased glycosidic bond stabilities in 4-C-hydroxymethyl linked disaccharides*, *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2394-2400.
- [329] B. Streicher, B. Wünsch, *Synthesis of amino-substituted hexo- and heptopyranoses from D-galactose*, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2375-2385.
- [330] D. B. Dess, J. C. Martin, *A useful 12-I-5 triacetoxypiperidine (the Dess-Martin periodinane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5 species*, *JACS* **1991**, *113*, 7277-7287.
- [331] R. A. Sharma, I. Kavai, Y. L. Fu, M. Bobek, *Synthesis of gem-difluorosaccharides*, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 3433-3436.
- [332] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. Macdonald, *Synthese anomerer Sialinsäure-methylketoside*, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 611-617.
- [333] X.-S. Ye, X. Huang, C.-H. Wong, *Conversion of the carboxy group of sialic acid donors to a protected hydroxymethyl group yields an efficient reagent for the synthesis of the unnatural beta-linkage*, *Chem. Commun.* **2001**, 974-975.

- [334] R. Kumar, P. Tiwari, P. R. Maulik, A. K. Misra, *Comparative structural analysis of 5,6,7,9-tetra-O-acetyl-4,8-anhydro-1,3-dideoxy-D-glycero-L-gluco-nonulose and its 1-O-acetylated analog, 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-β-D-galactopyranose using X-ray crystallography*, *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2335-2339.
- [335] J. Zhao, S. Wei, X. Ma, H. Shao, *A simple and convenient method for the synthesis of pyranoid glycals*, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 168-171.
- [336] H. Paulsen, K. Adermann, *Synthese von O-Glycopeptid-Sequenzen des N-Terminus von Interleukin-2*, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 751-769.
- [337] Y. Niu, N. Wang, X. Cao, X.-S. Ye, *Efficient Formation and Cleavage of Benzylidene Acetals by Sodium Hydrogen Sulfate Supported on Silica Gel*, *Synlett* **2007**, *2007*, 2116-2120.
- [338] M. Daum, *Synthese mehrfach-fluorierter Glycosylaminosäure-Bausteine für den Aufbau tumorassoziierter Glycopeptidantigene des epithelialen Mucins MUC1*, *Diplomarbeit* **2012**, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- [339] S. Dziadek, S. Jacques, D. R. Bundle, *A Novel Linker Methodology for the Synthesis of Tailored Conjugate Vaccines Composed of Complex Carbohydrate Antigens and Specific TH-Cell Peptide Epitopes*, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5908-5917.
- [340] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Dendrimers of Vaccines Consisting of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens and T Cell Epitope Peptides*, *Synthesis* **2009**, *2009*, 1355-1369.

7 ANHANG

7.1 NMR-Spektren

β -3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (9)

^1H , ^{13}CIII

α -Ac₃,6F₂Gal-OC(NH)CCl₃ (43)

^1H , ^{13}C , ^{19}FIV

β -4-(β -6BnAc₃Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (67)

^1H , ^{13}CVI

β -4-(β -Ac₃,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (72)

^1H , ^{13}C , ^{19}FVII

α -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OC(NH)CCl₃ (93)

^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC.....IX

α -4-(β -Ac₂,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OC(NH)CCl₃ (103)

^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HSQC, HMBC.....XII

Fmoc-Thr-(β -Bn₃,2FGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu (129)

^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HSQC, HMBC.....XV

Fmoc-Thr-(β -Bn₂,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu (131)

^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HSQC, HMBC.....XVIII

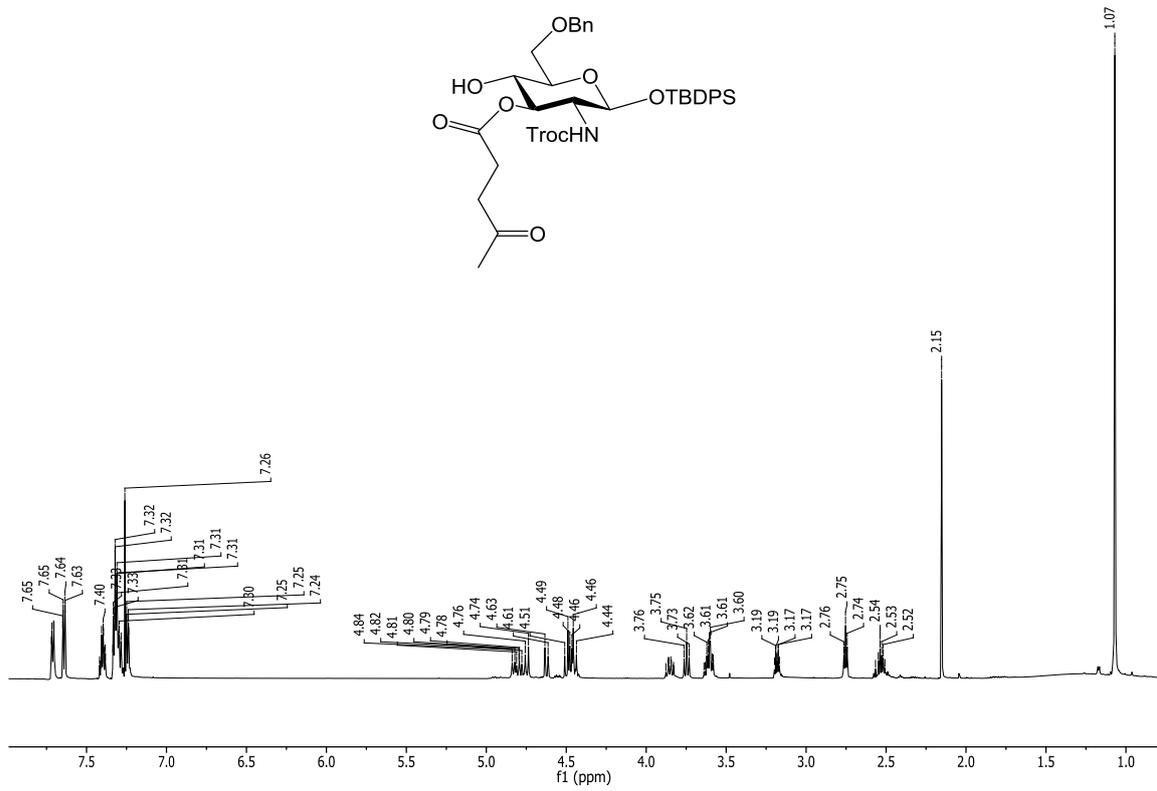
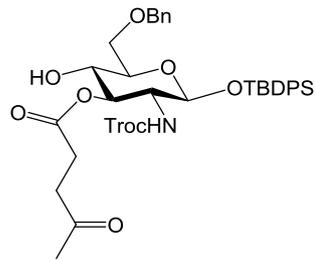
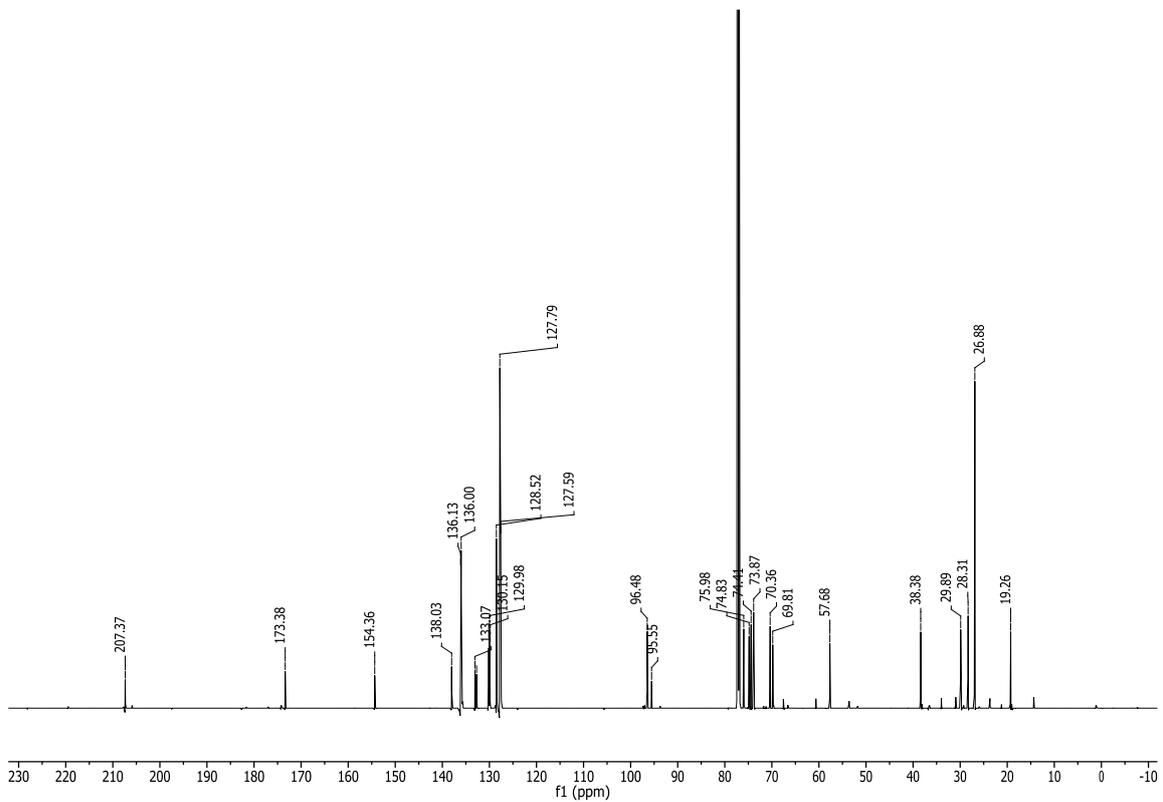
Fmoc-Thr-(β -Ac₃,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu (133)

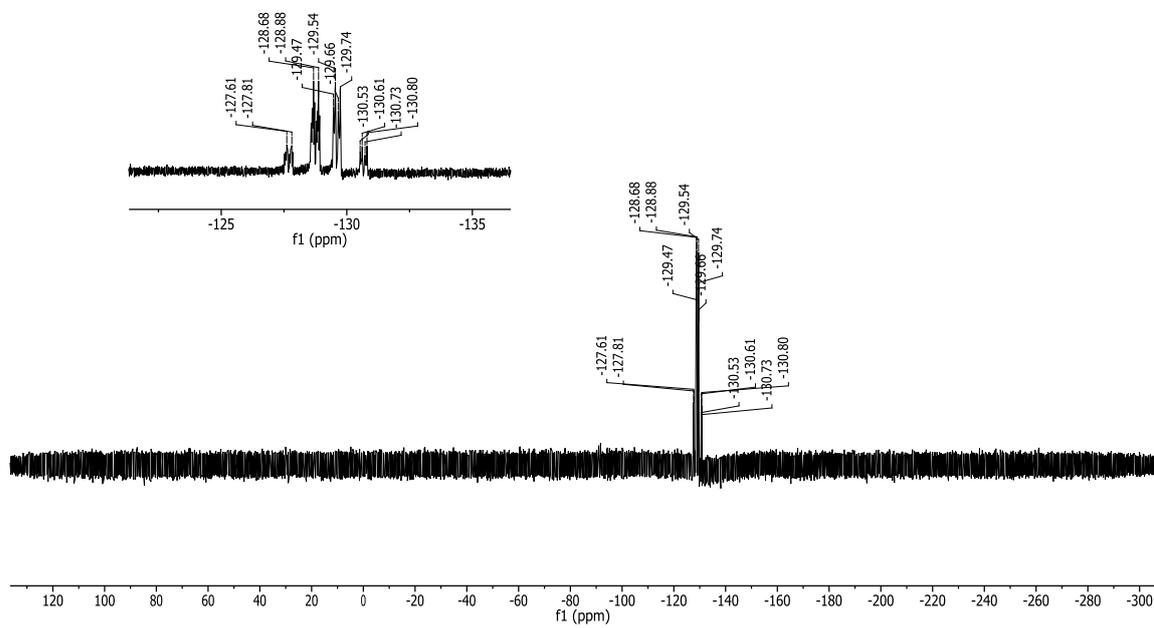
^1H , ^{13}C , ^{19}F , COSY, HSQC, HMBC.....XXI

Fmoc-Thr-(β -Ac₂BnGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α -GalNAc)-OtBu (138)

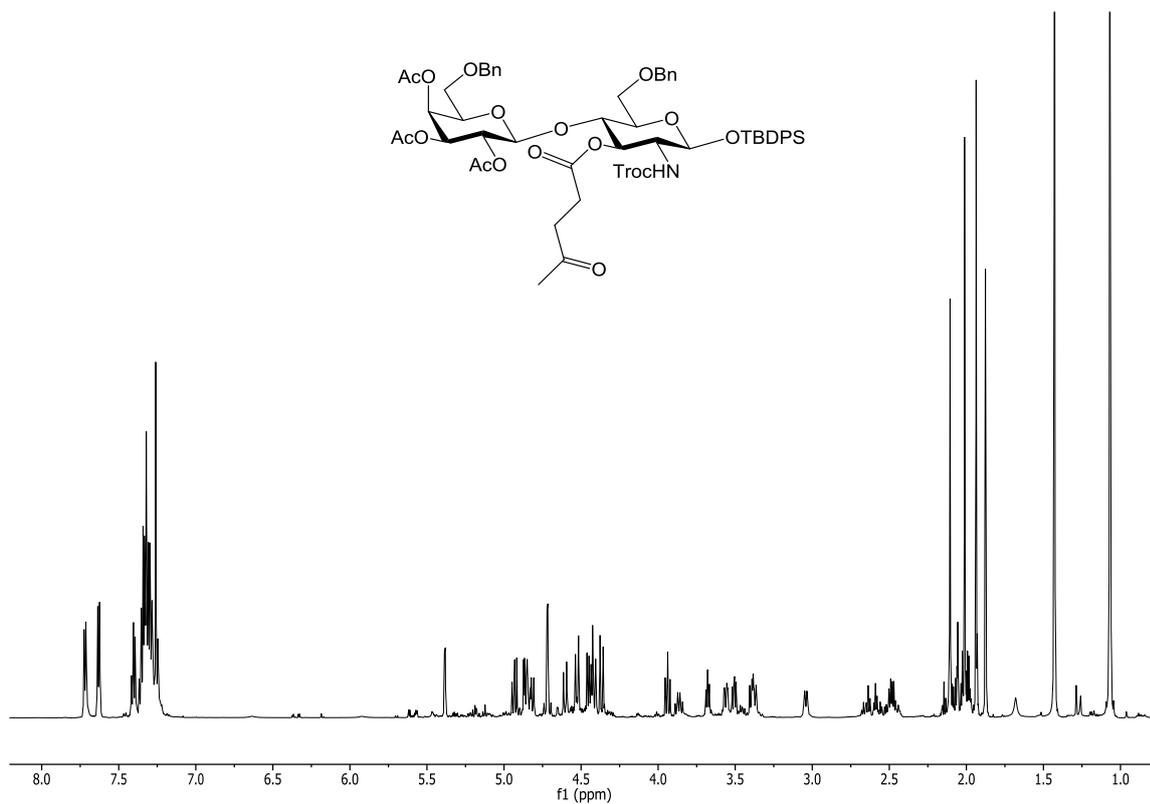
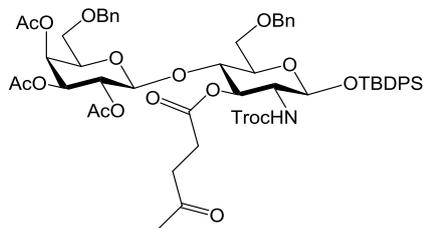
^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC.....XXIV

Fmoc-Thr-(β -Ac₂6FGal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α -GalNAc)-OtBu (144)¹H, ¹³C, ¹⁹F, COSY, HSQC, HMBC.....XXVII**Fmoc-Thr-[α -6-(β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNAc)-3-(β -Ac₂6FGal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]-AcGalNAc]-OtBu (148)**¹H, ¹³C, ¹⁹F, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, TOCSY.....XXX**Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(β -Bn₃2,6F₂Gal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂-Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala (162)**¹H, ¹⁹F, COSY, HSQC.....XXXIV**Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂-Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala (163)**¹H, ¹⁹F, COSY, HSQC.....XXXVI**Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(β -6,6F₂Gal-(1→3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala (164)**¹H, ¹³C, ¹⁹F, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC.....XXXVIII

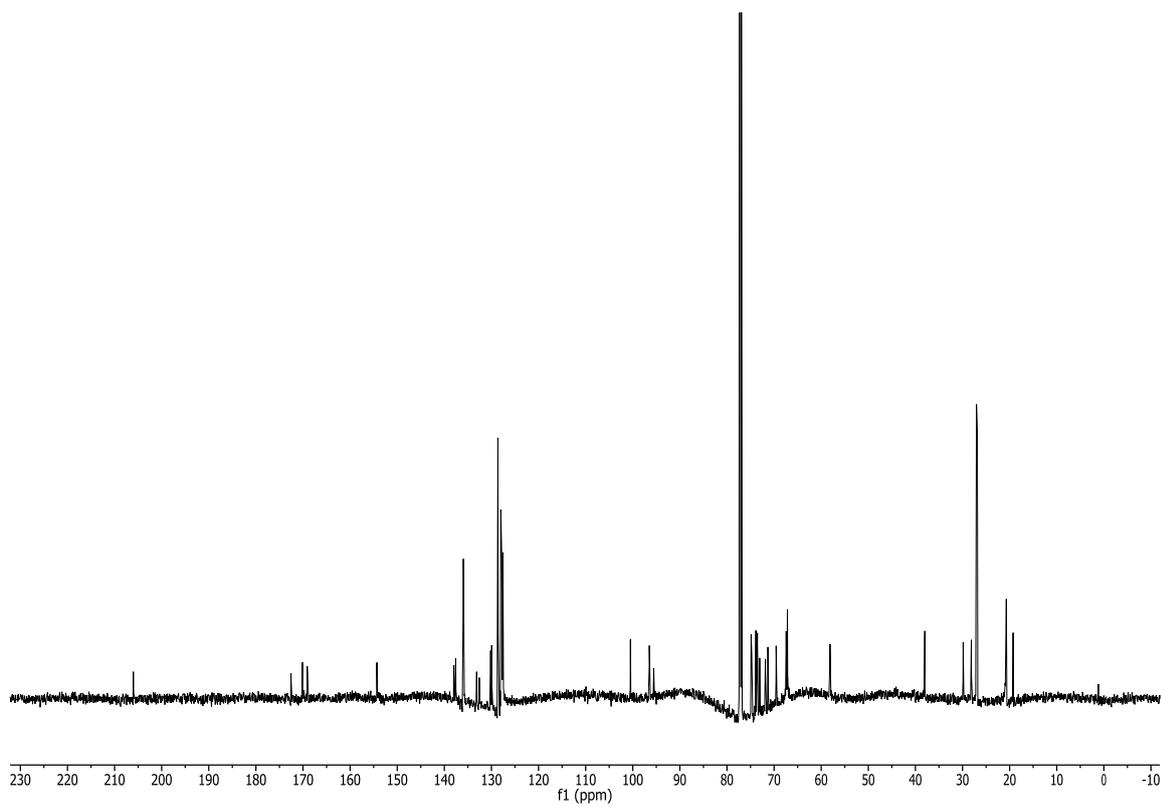
β -3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (9) **^1H -Spektrum (600 MHz, CDCl_3)** **^{13}C -Spektrum (150 MHz, CDCl_3)**



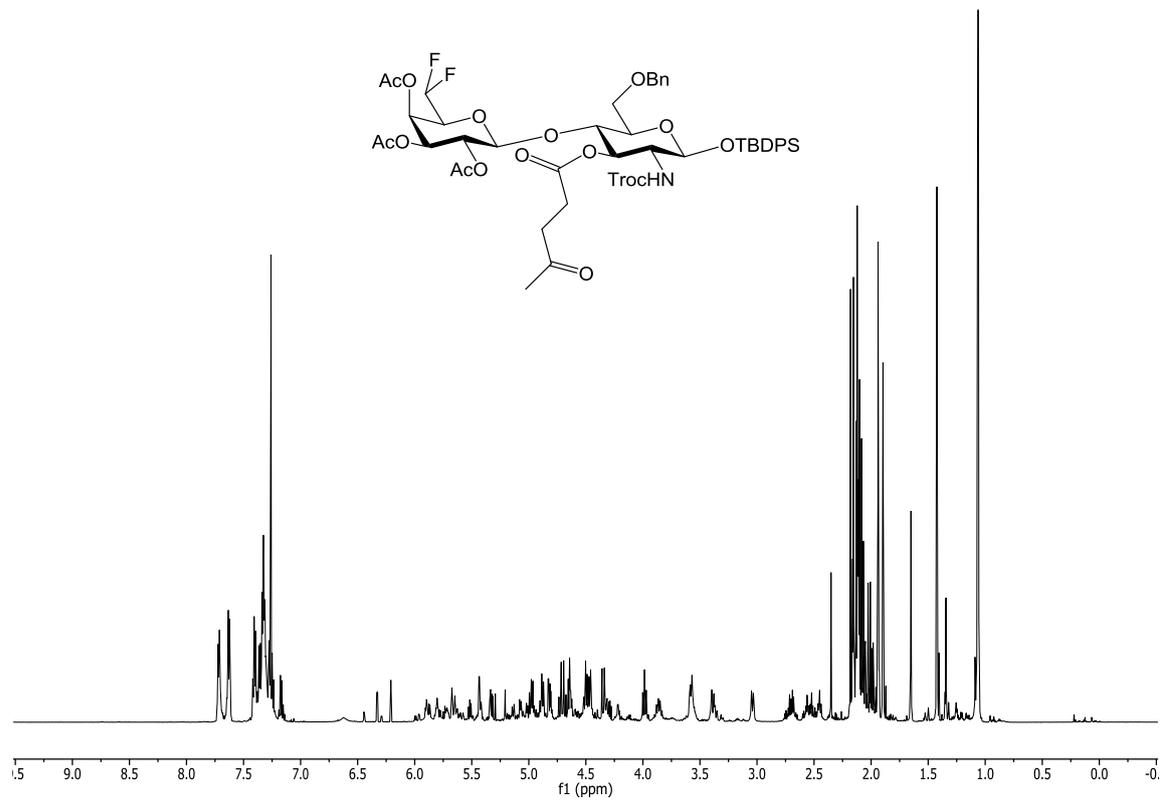
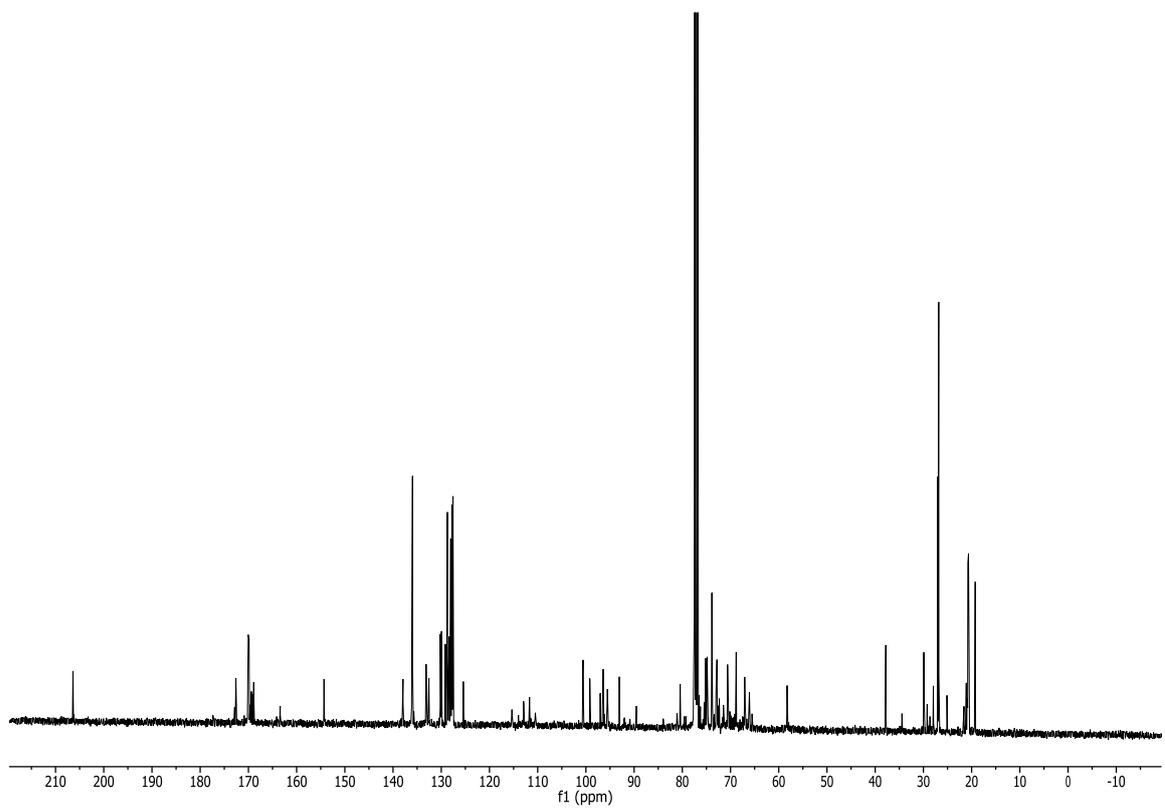
^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)

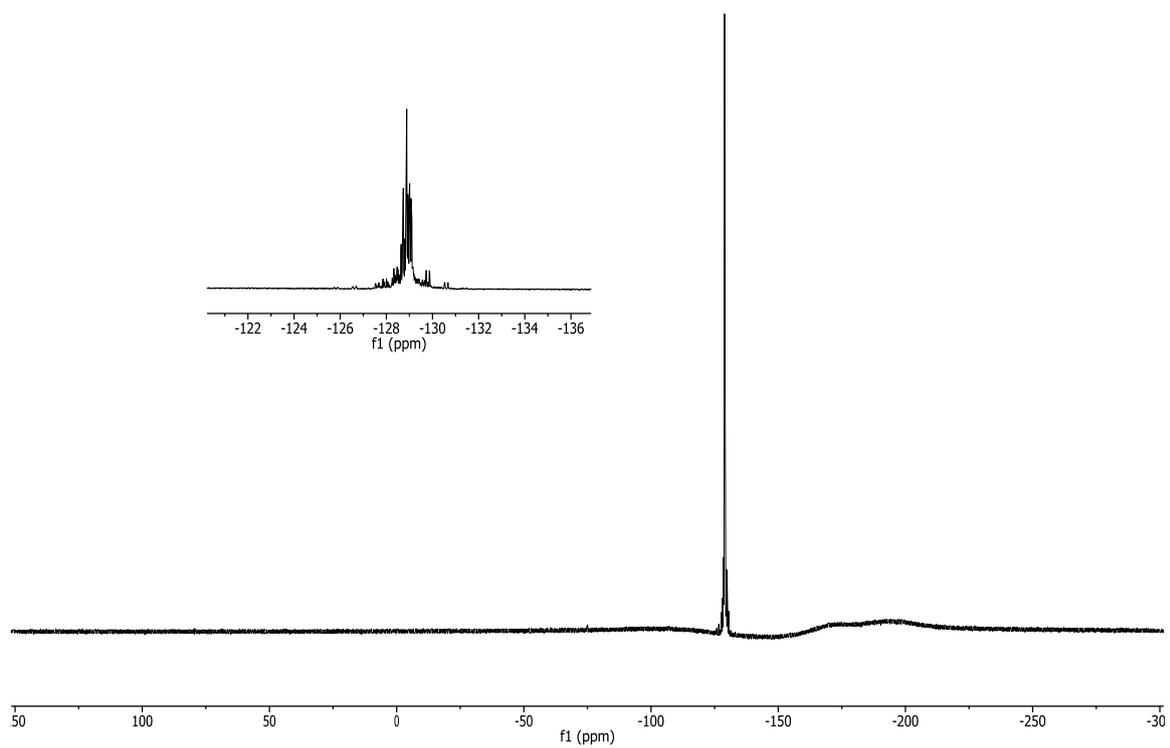
β -4-(β -6BnAc₃Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (67)

¹H-Spektrum (600 MHz, CDCl₃)

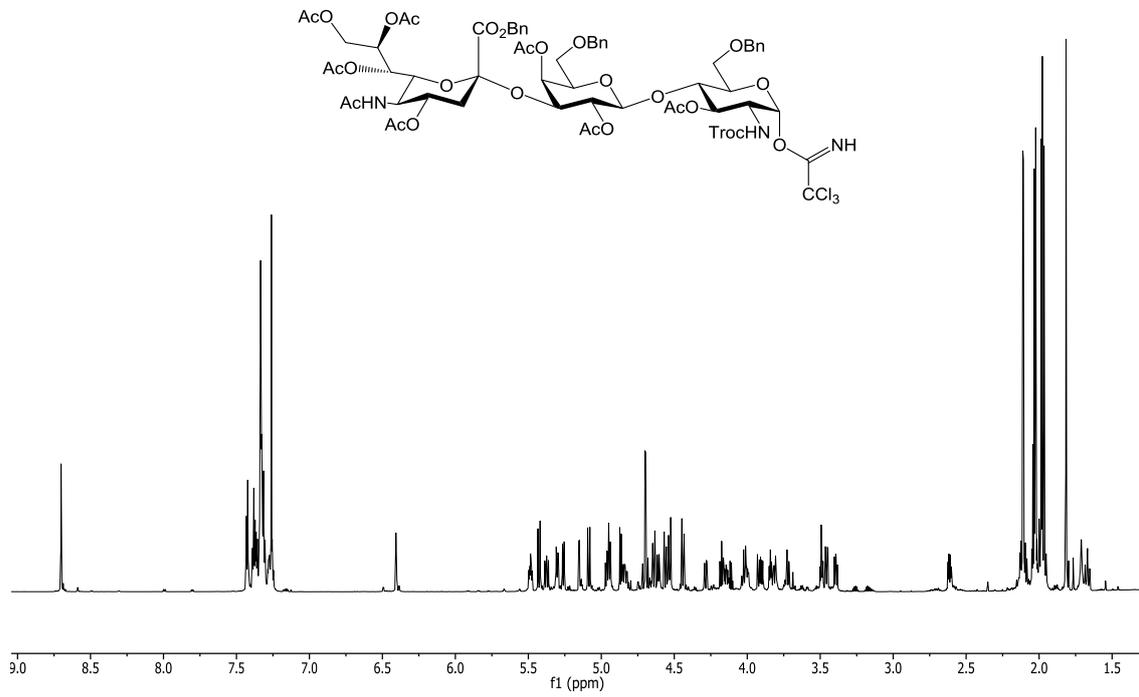
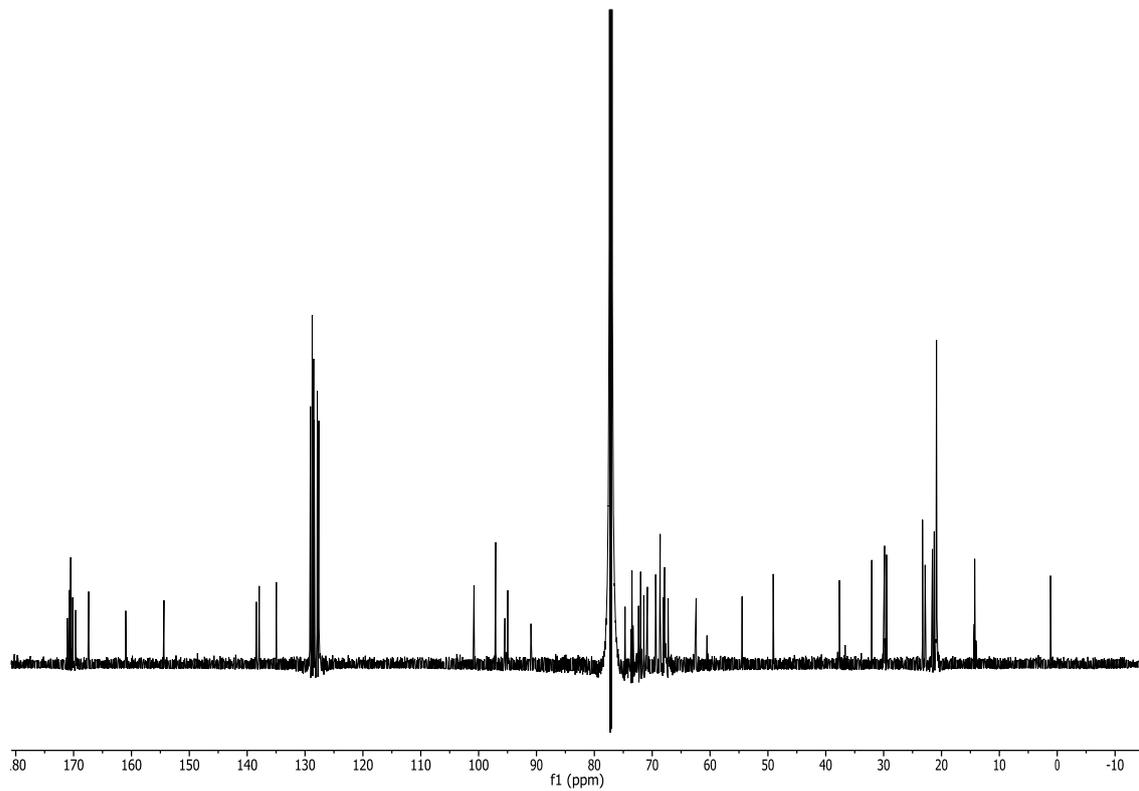


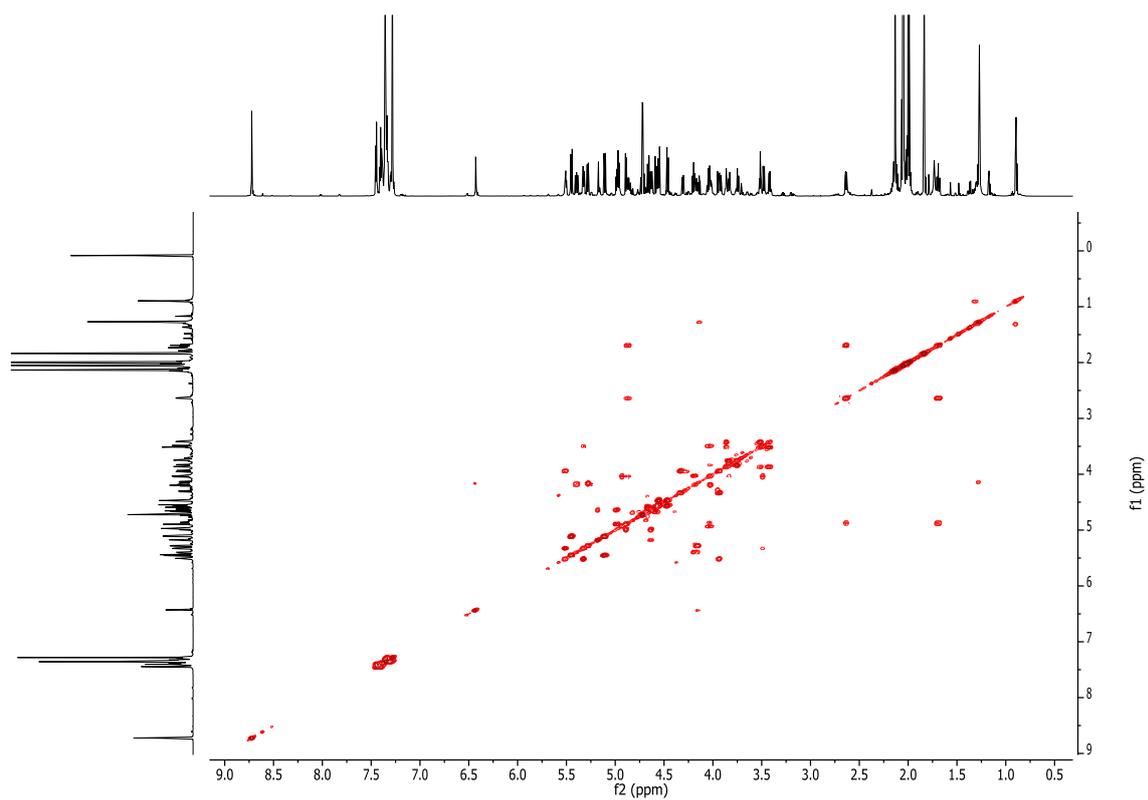
¹³C-Spektrum (150 MHz, CDCl₃)

β -4-(β -Ac₃6,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (72)**¹H-Spektrum (600 MHz, CDCl₃)****¹³C-Spektrum (150 MHz, CDCl₃)**

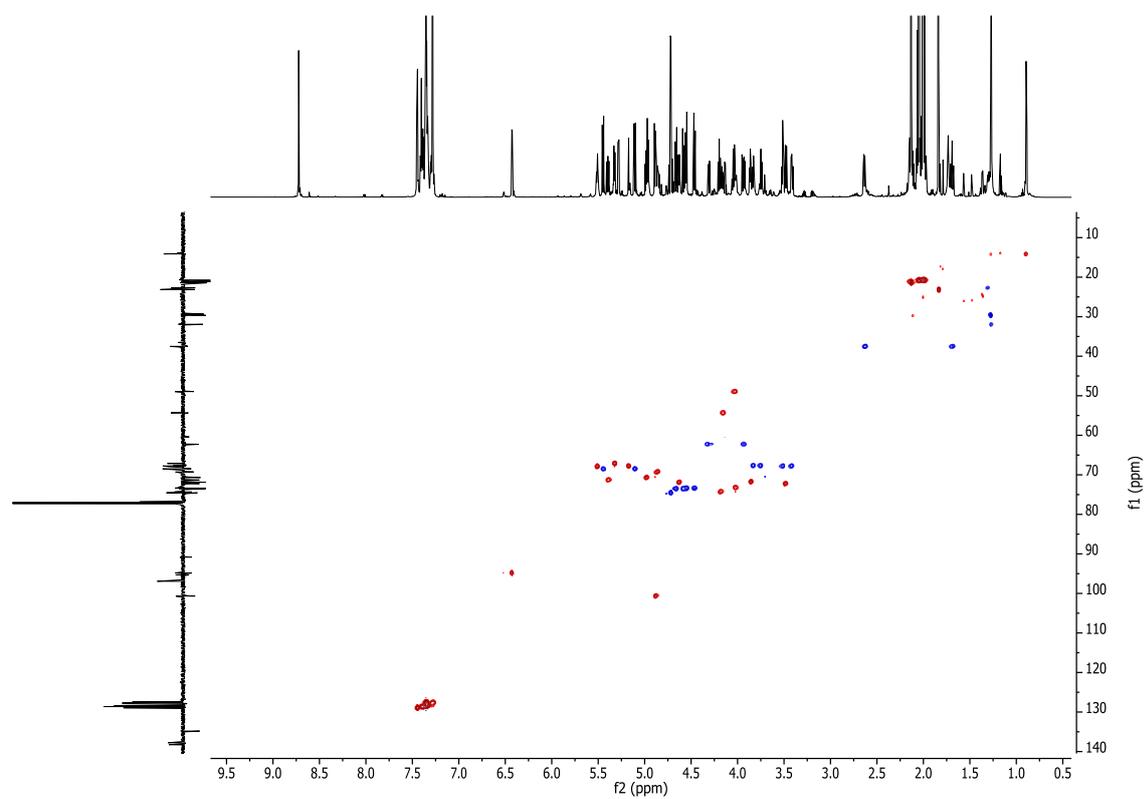


^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)

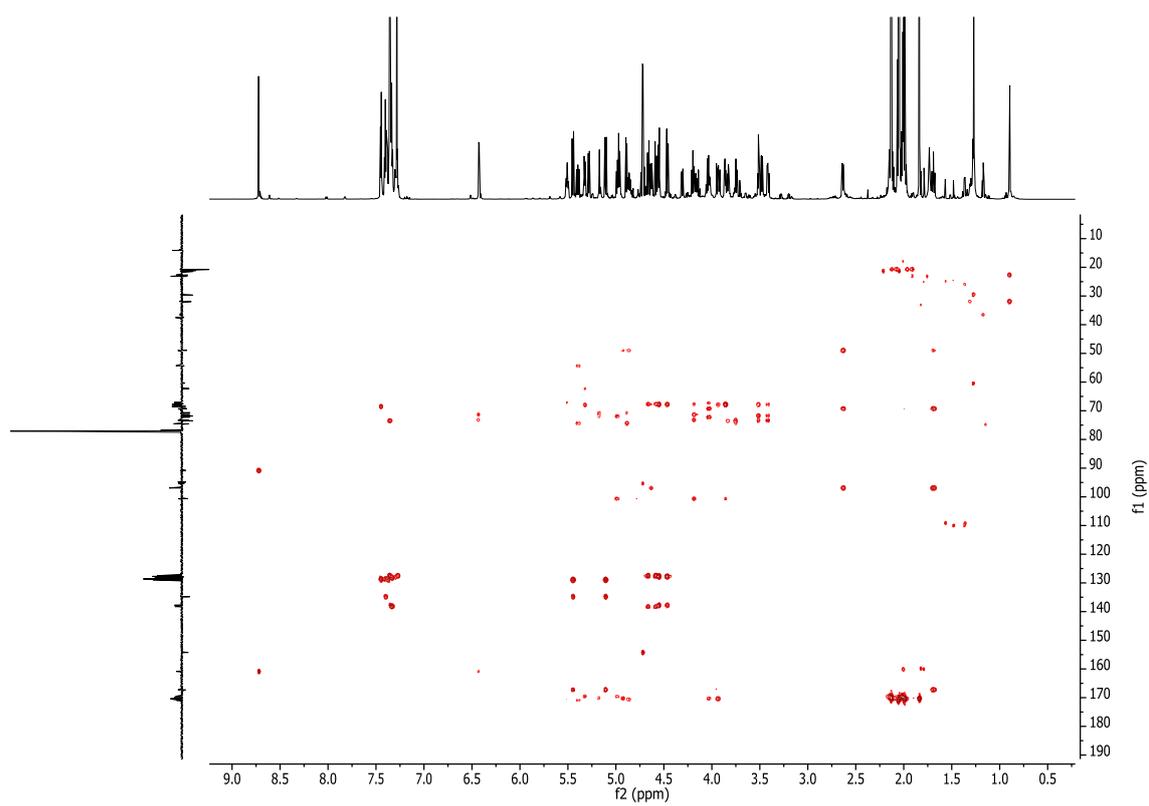
α -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OC(NH)CCl₃ (93)¹H-Spektrum (800 MHz, CDCl₃)¹³C-Spektrum (200 MHz, CDCl₃)



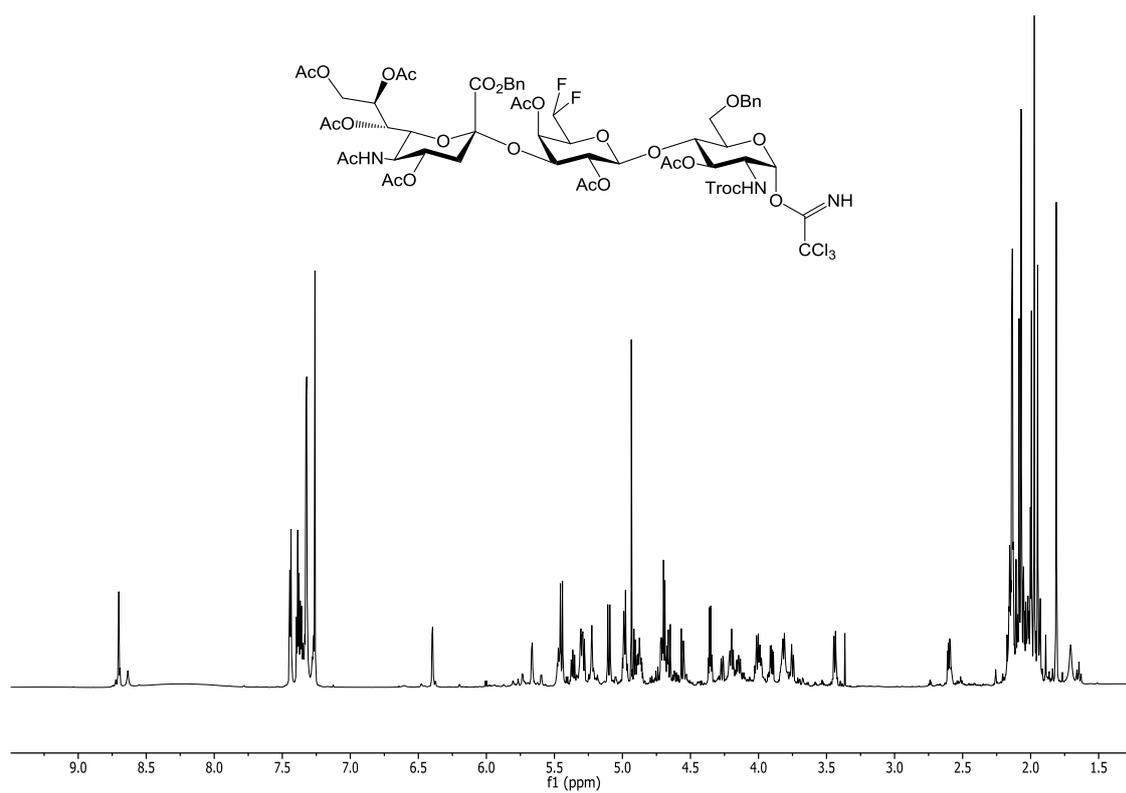
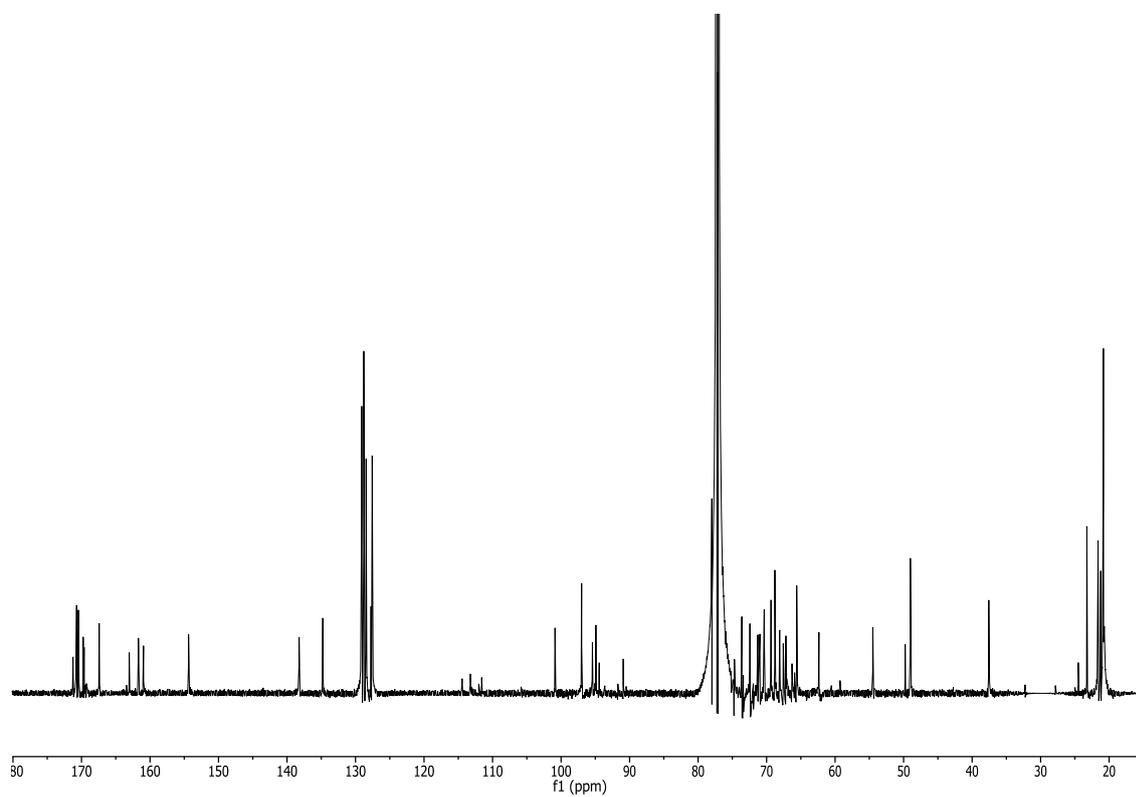
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (800 MHz, CDCl_3)

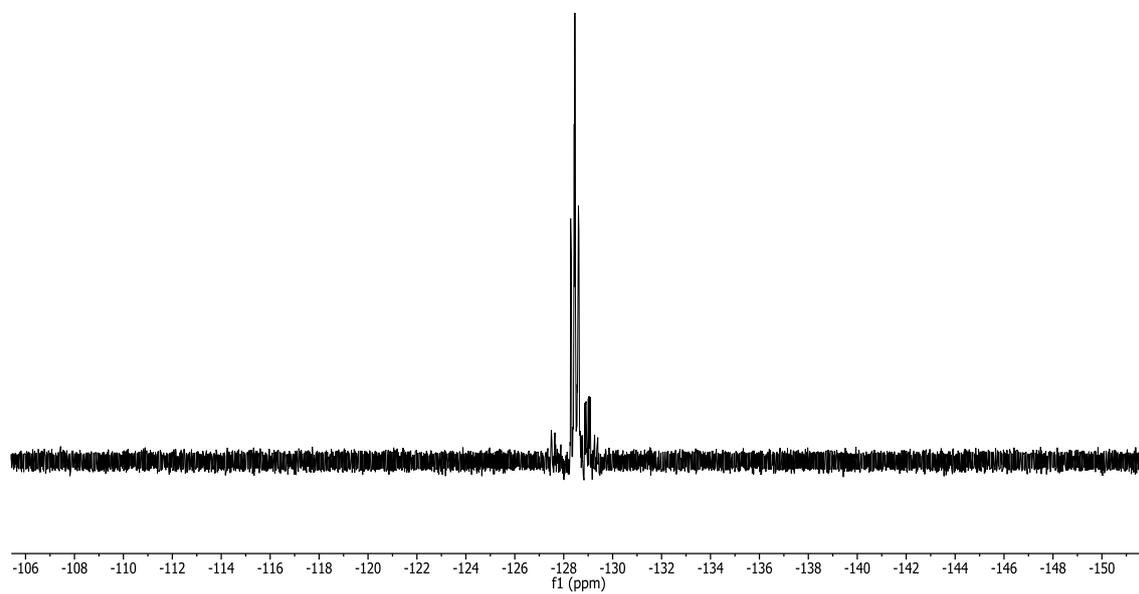


^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (200 MHz, CDCl_3)

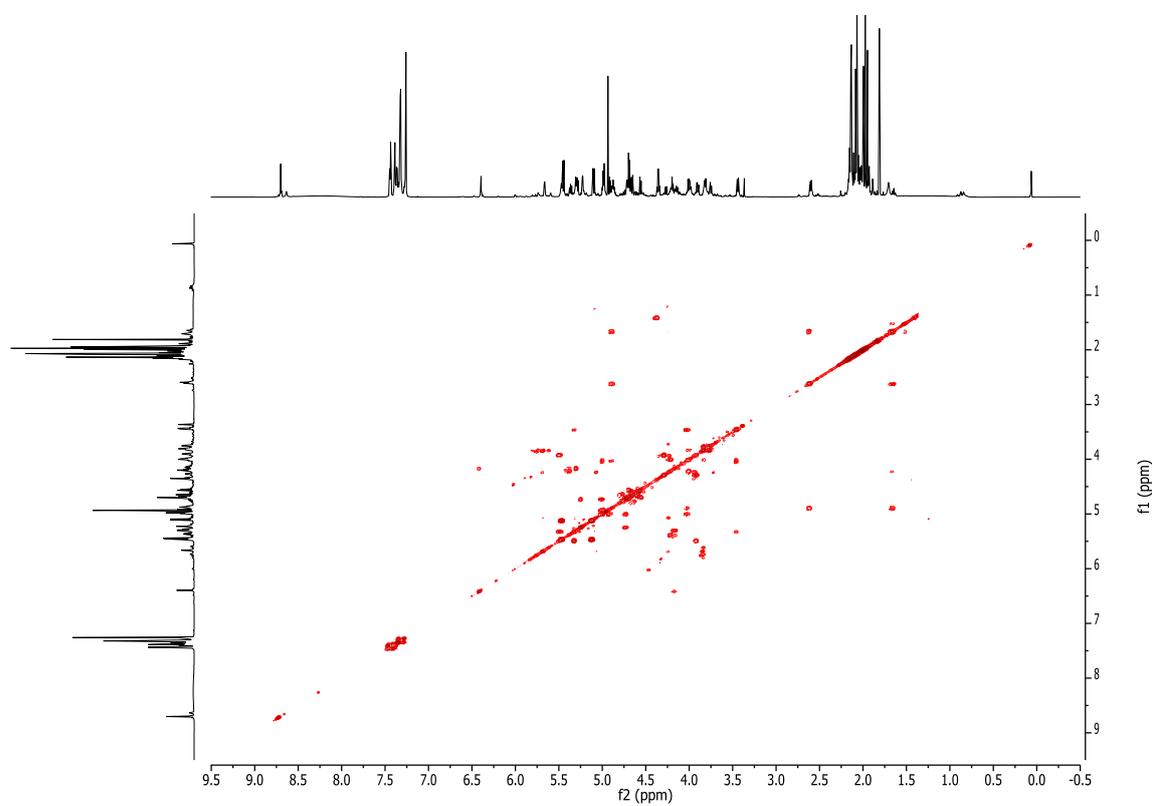


^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (200 MHz, CDCl_3)

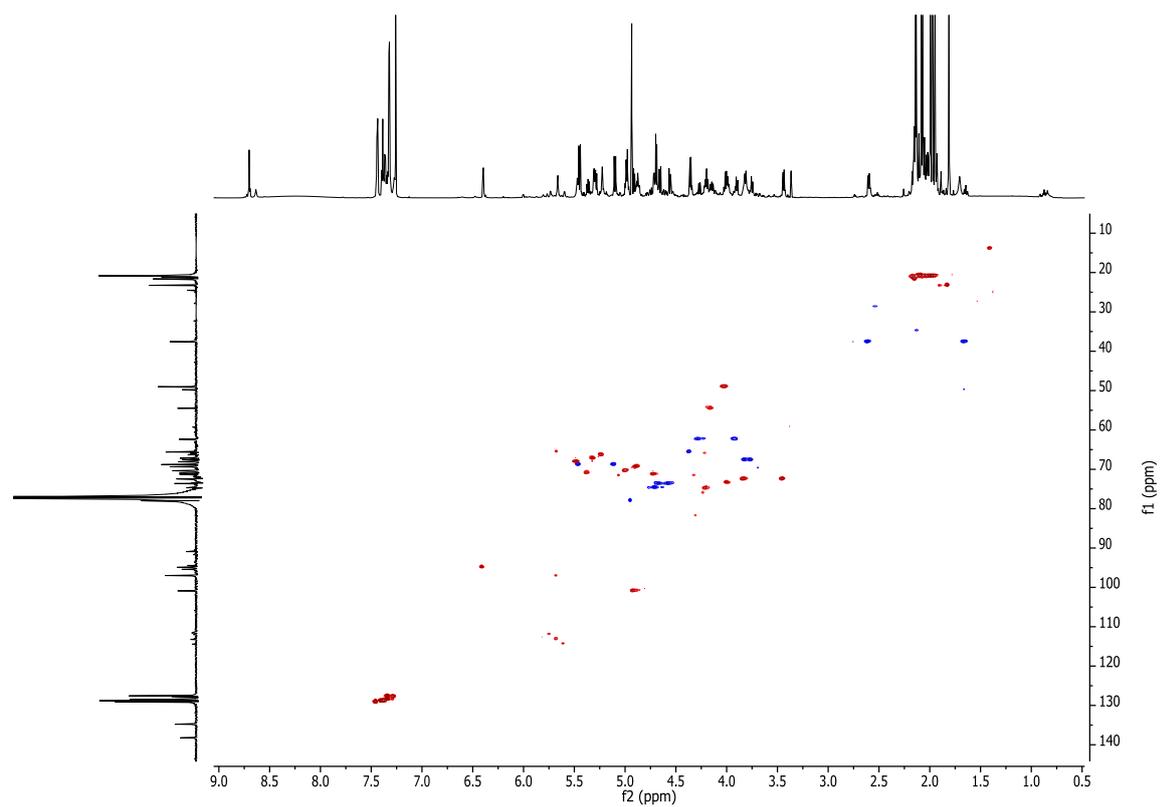
α -4-(β -Ac₂6,6F₂Gal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-6BnGlcNTroc-OC(NH)CCl₃ (103)¹H-Spektrum (800 MHz, CDCl₃)¹³C-Spektrum (200 MHz, CDCl₃)



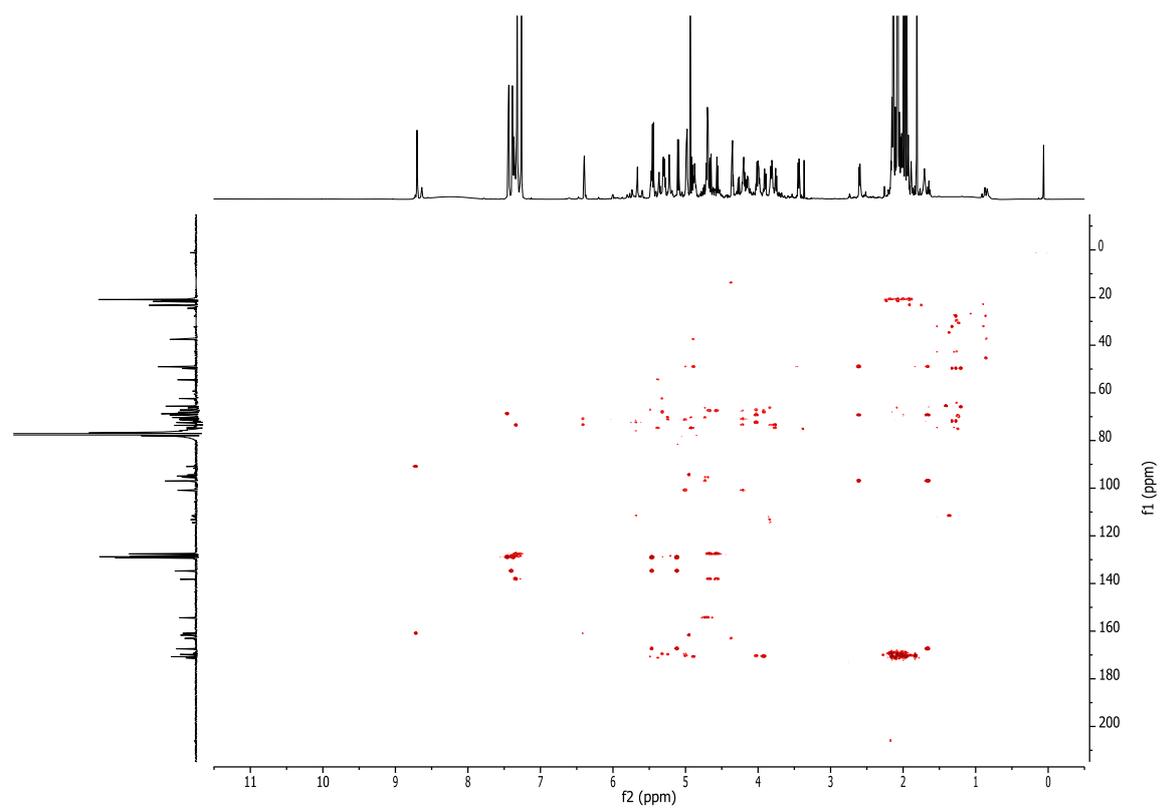
^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)



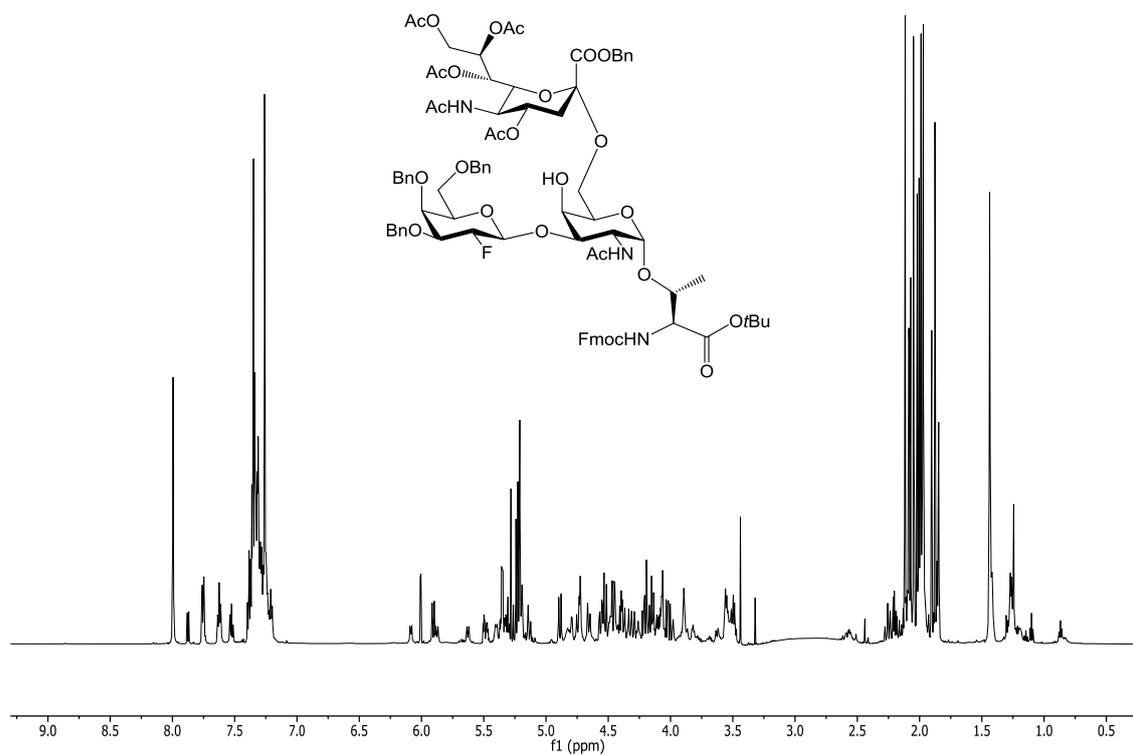
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (800 MHz, CDCl_3)



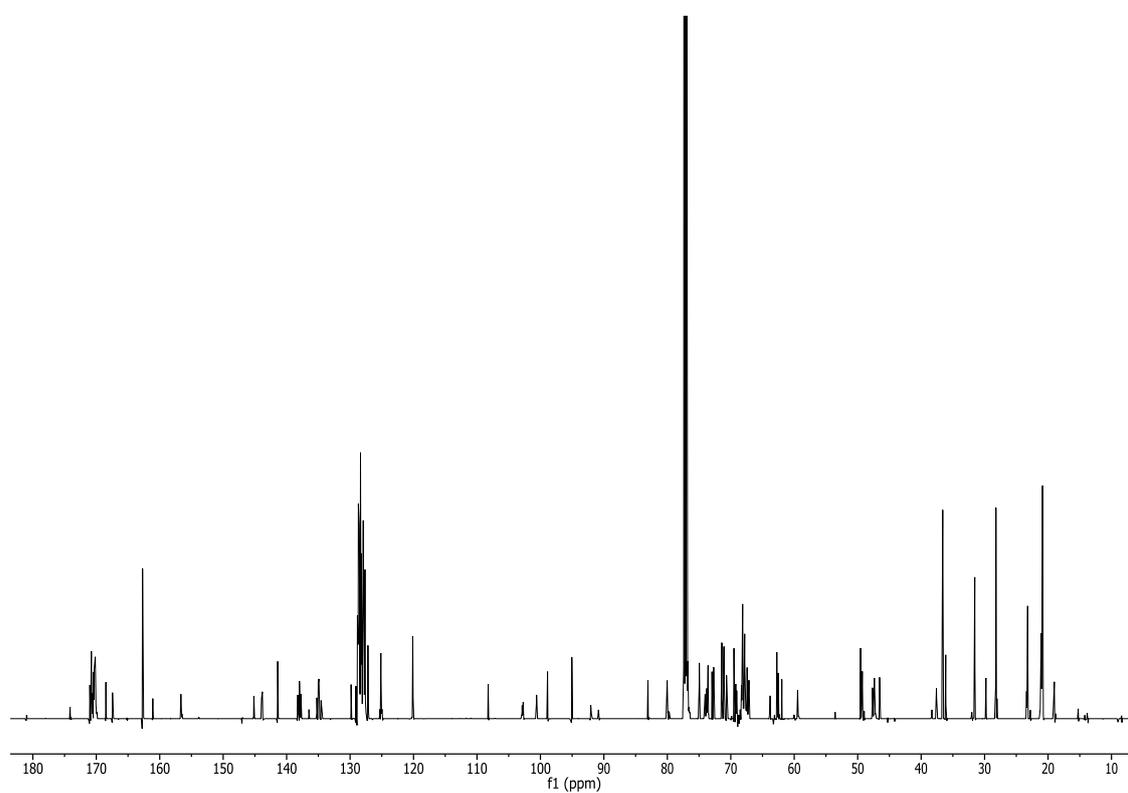
^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (200 MHz, CDCl_3)



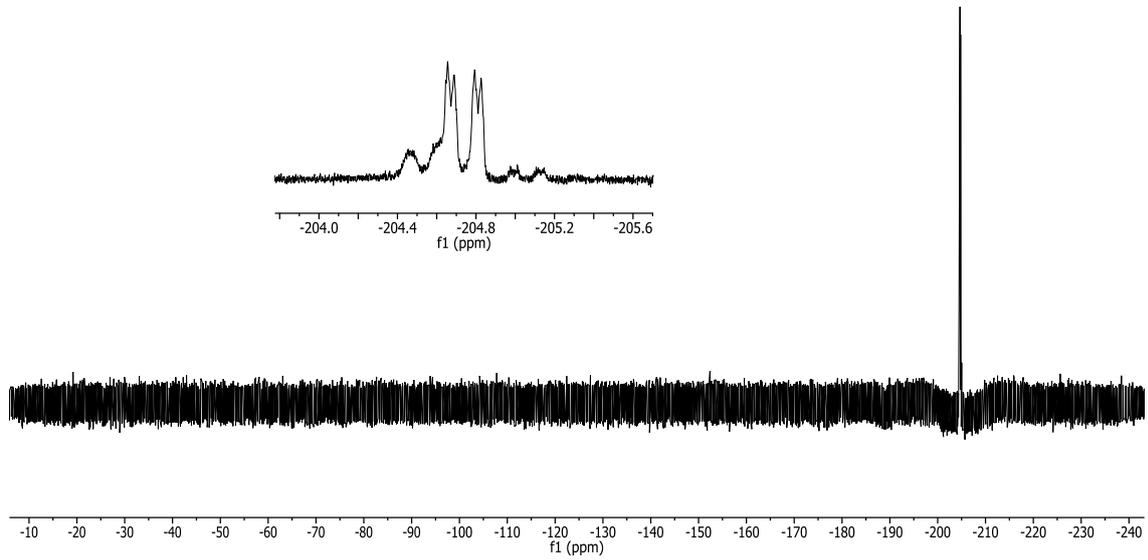
^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (200 MHz, CDCl_3)

Fmoc-Thr-(β -Bn₃2FGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu (129)

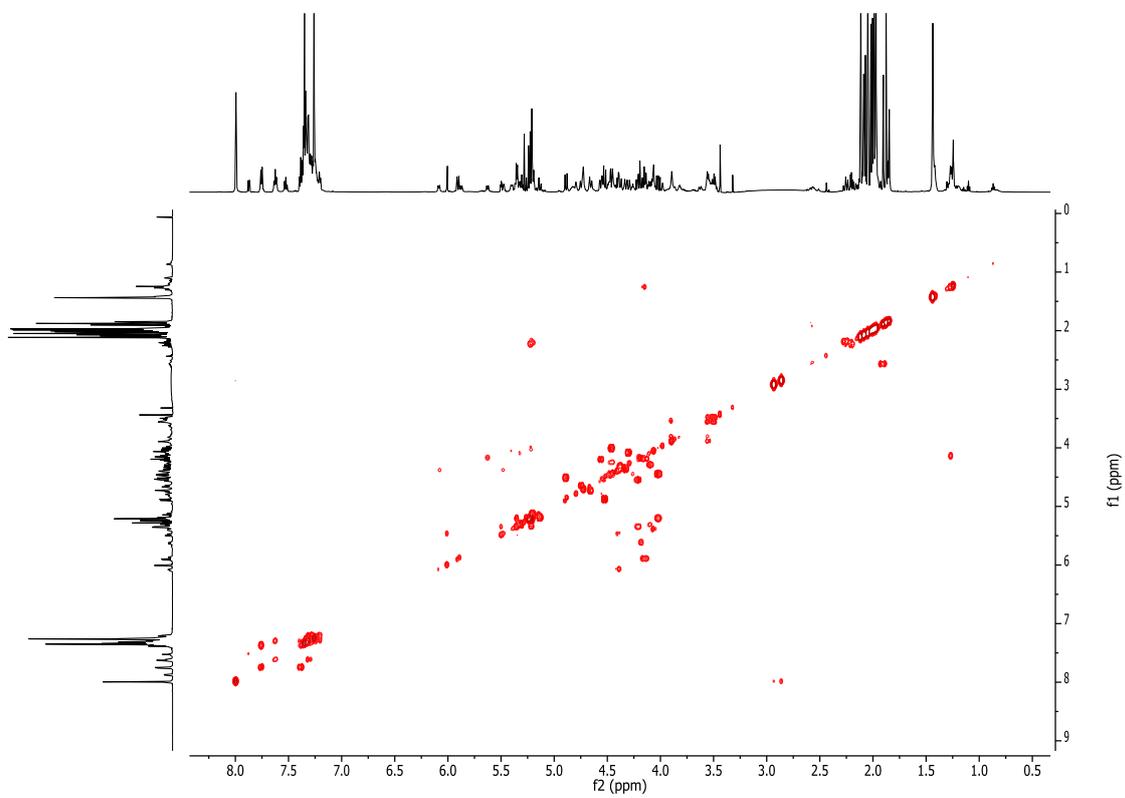
¹H-Spektrum (600 MHz, CDCl₃)



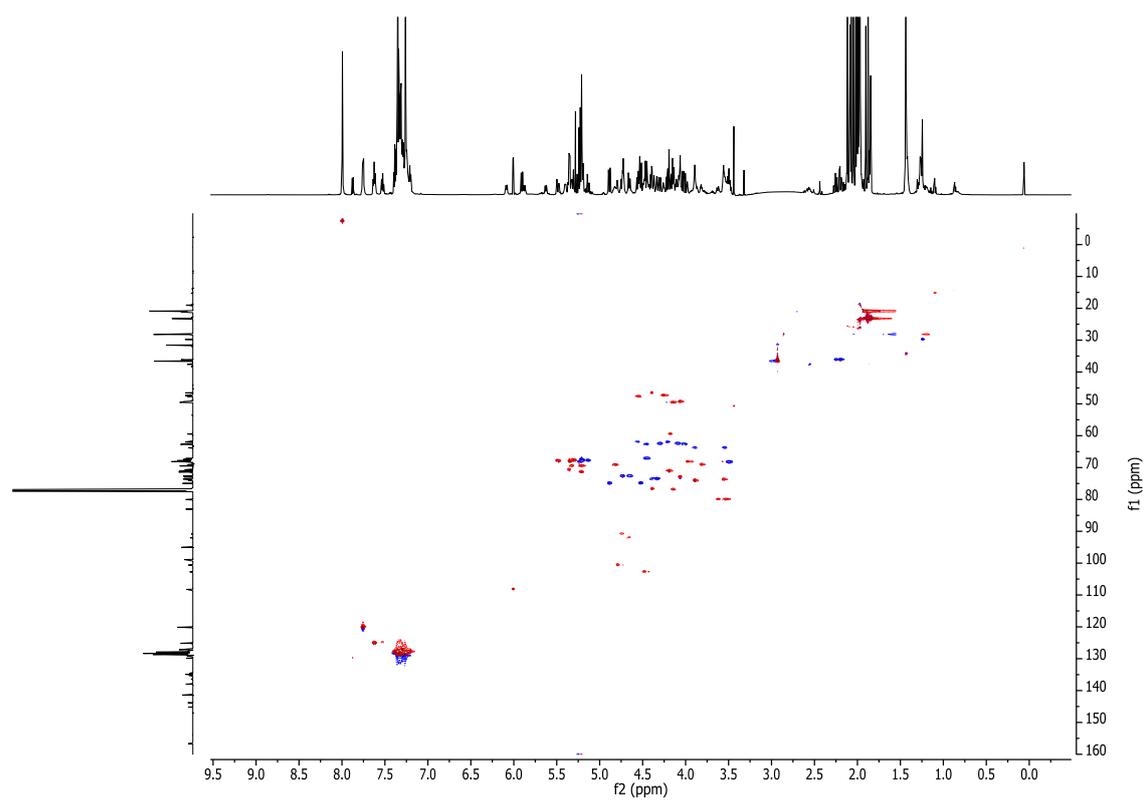
¹³C-Spektrum (150 MHz, CDCl₃)



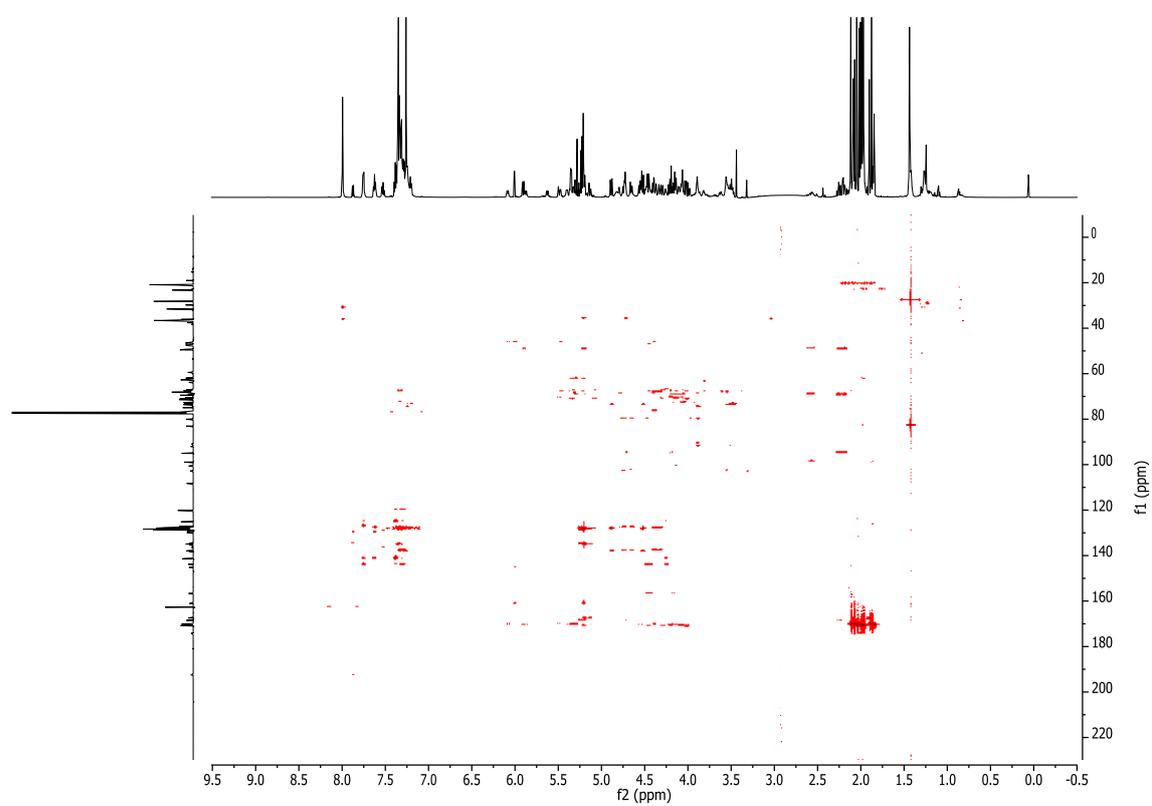
^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)



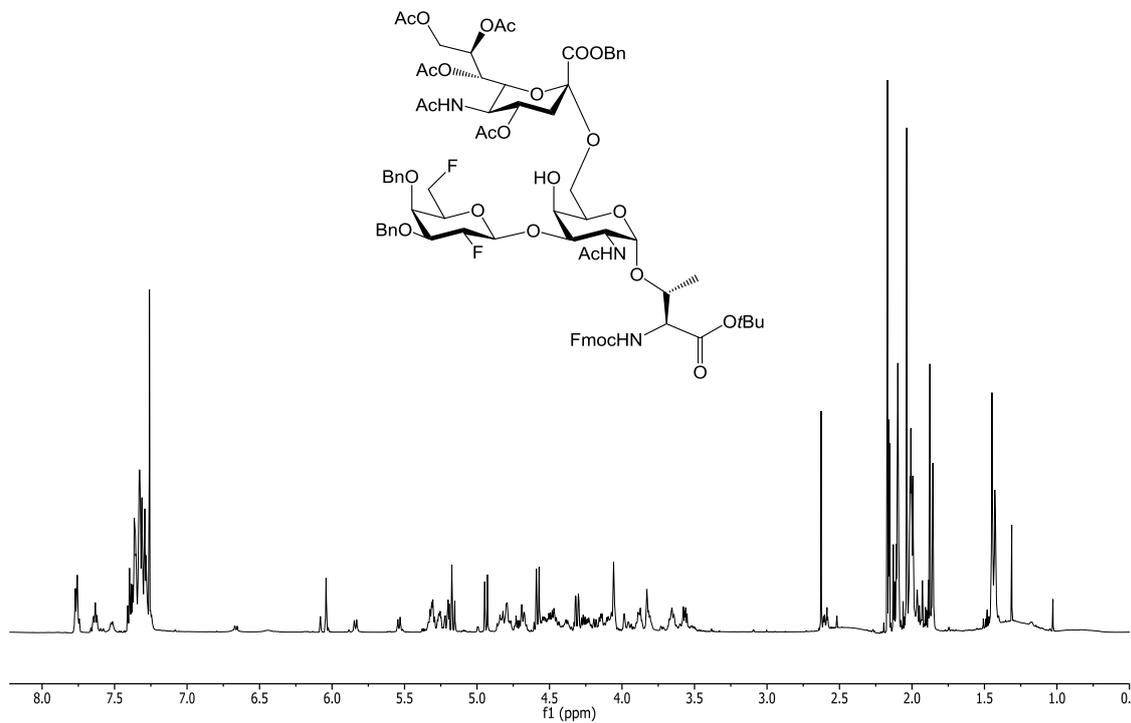
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3)



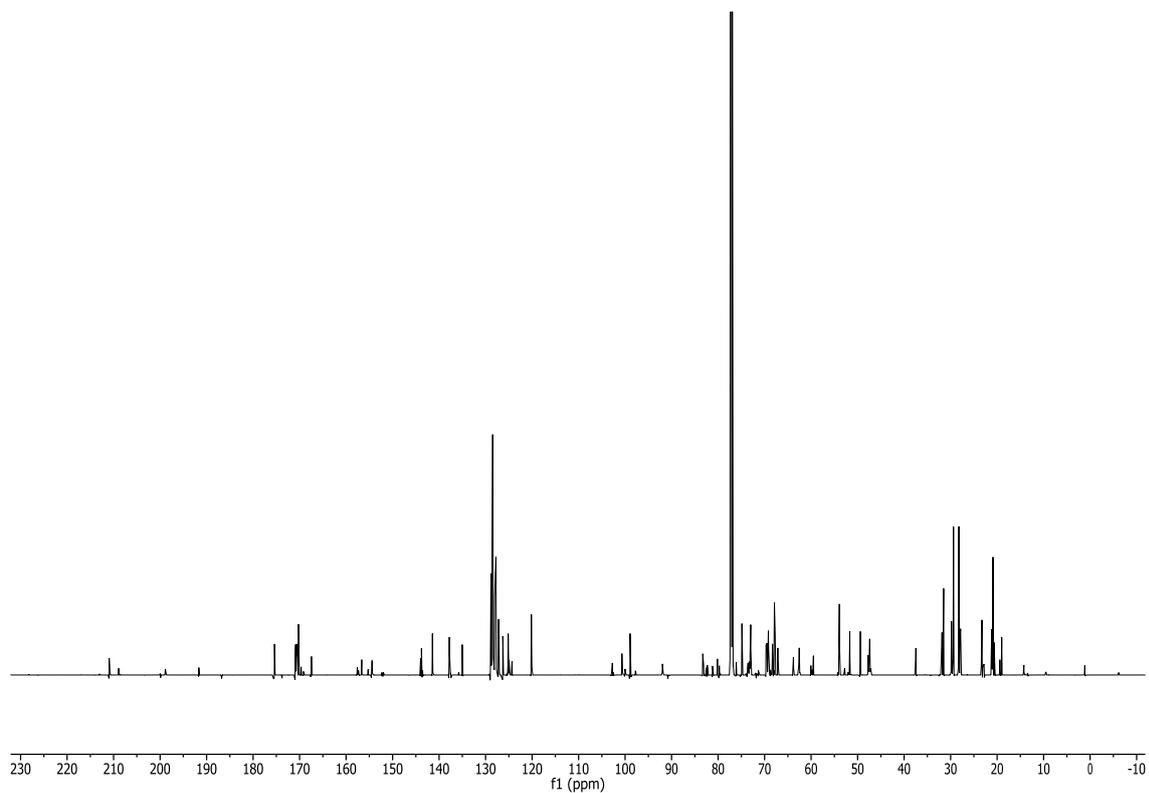
^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)



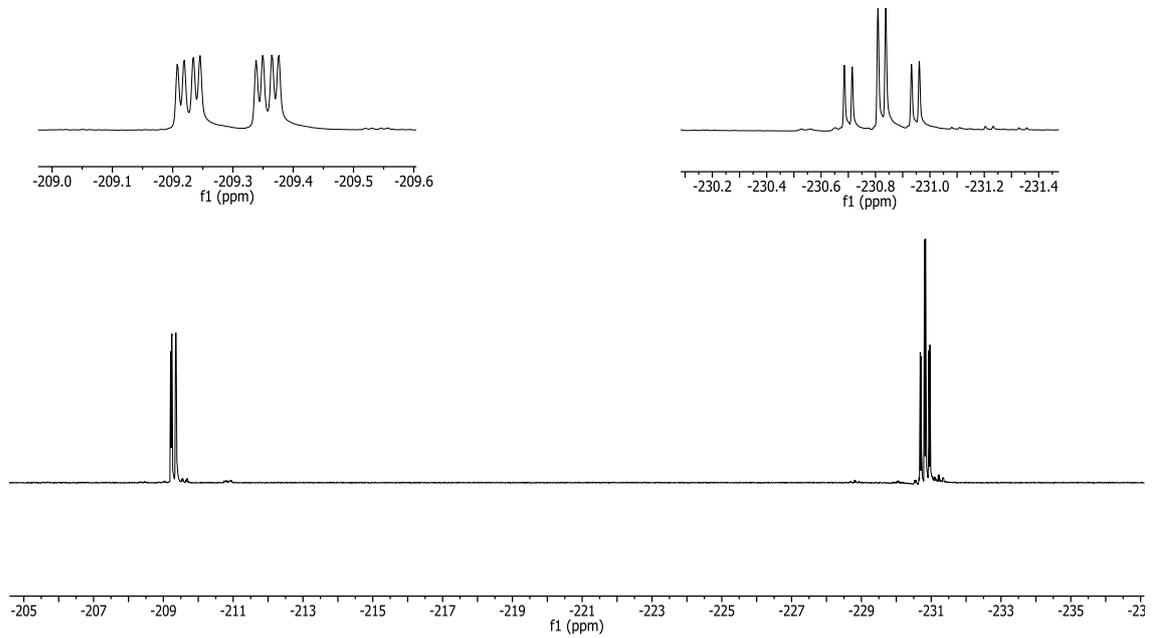
^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)

Fmoc-Thr-(β -Bn₂2,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3))- [α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OtBu (131)

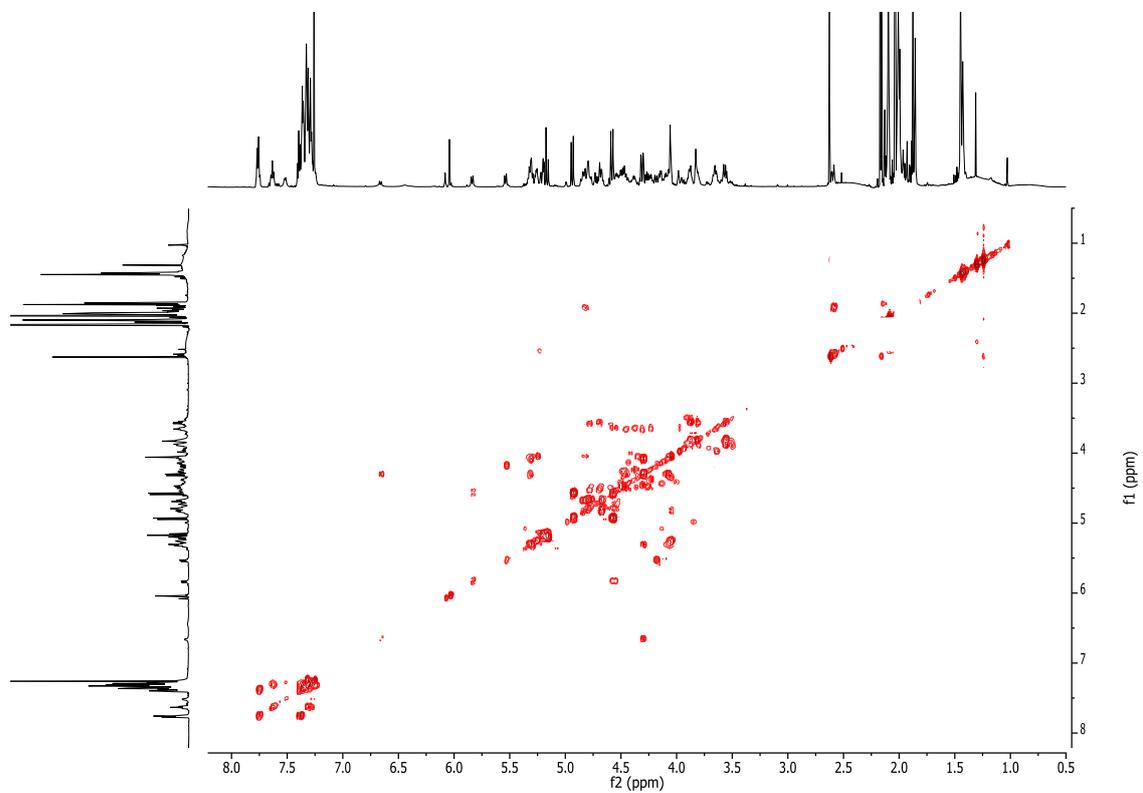
¹H-Spektrum (600 MHz, CDCl₃)



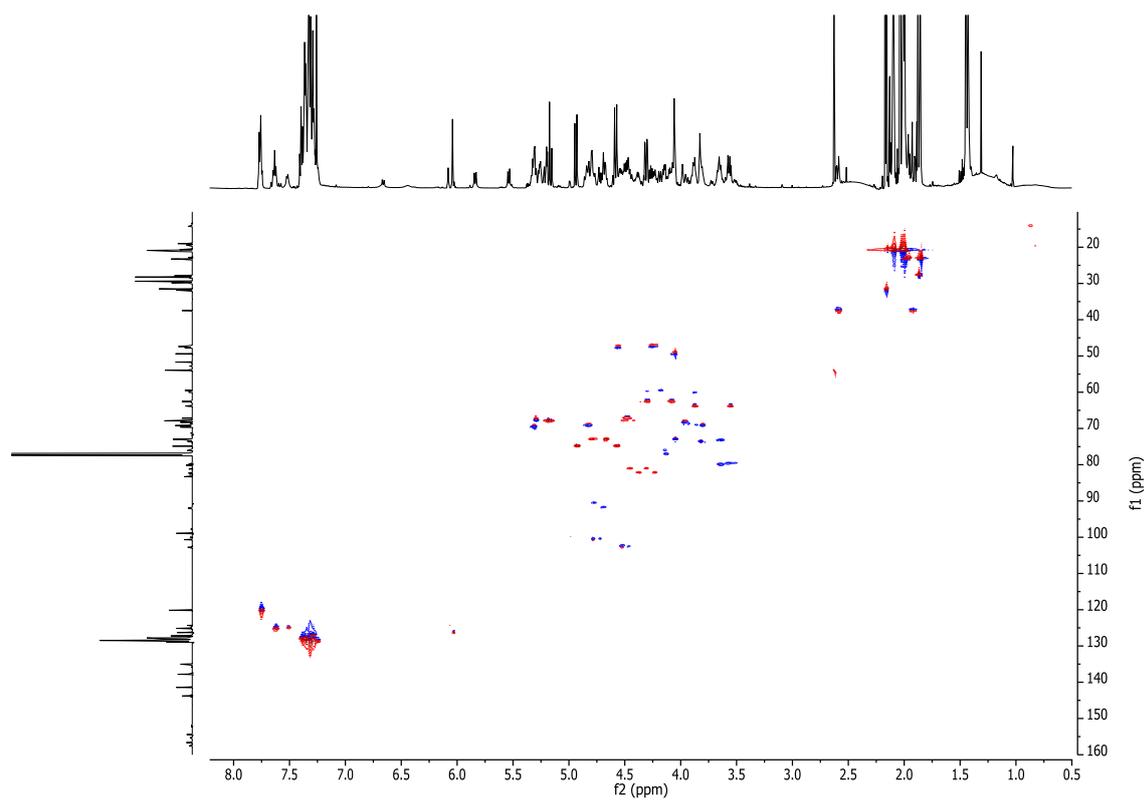
¹³C-Spektrum (150 MHz, CDCl₃)



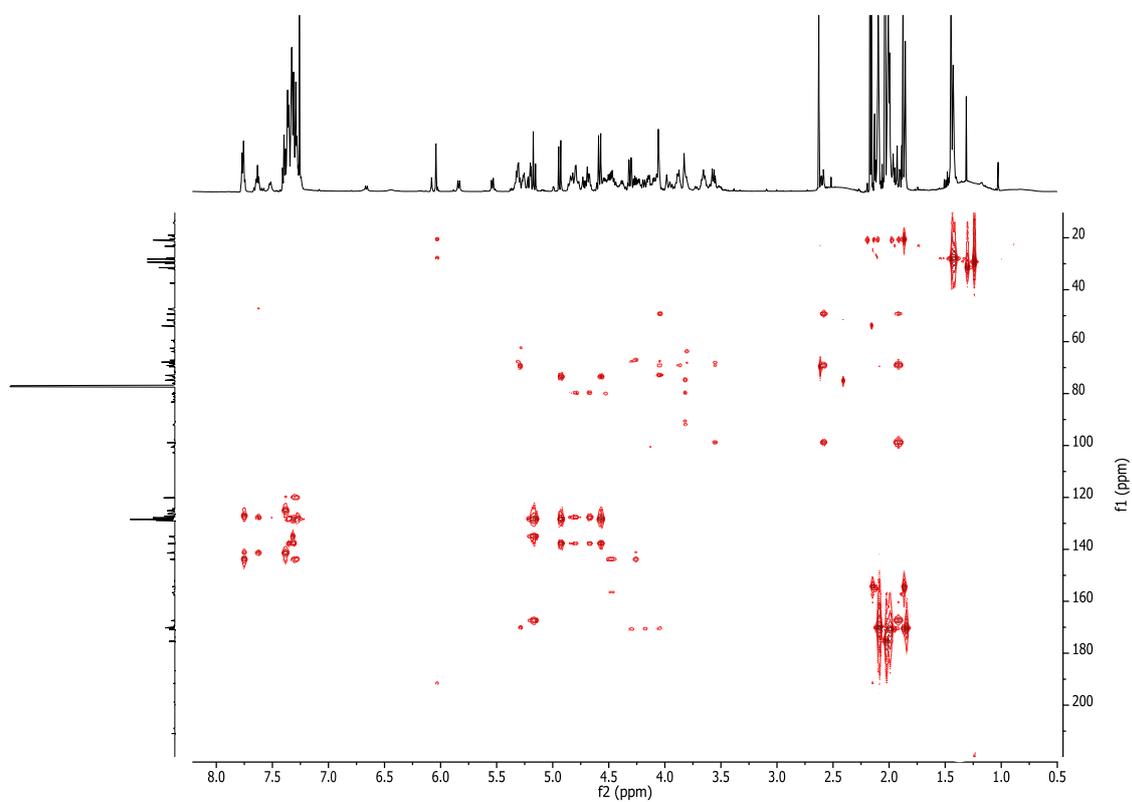
^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)



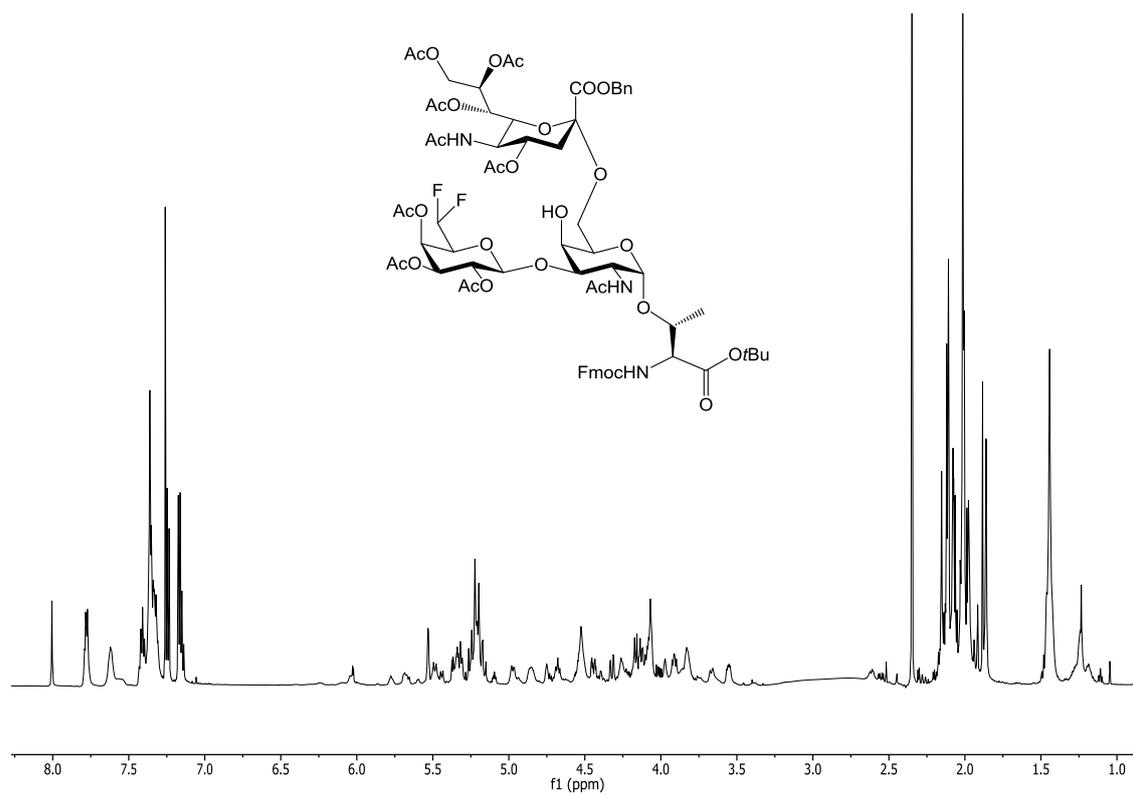
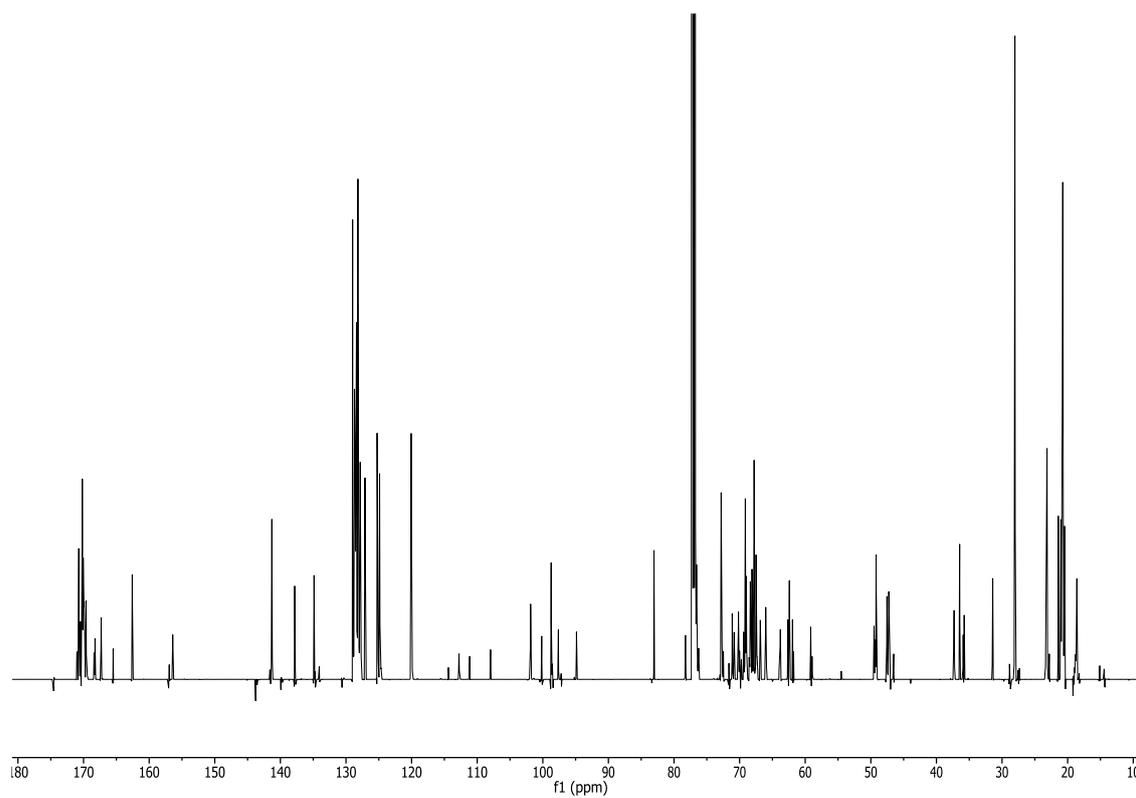
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3)

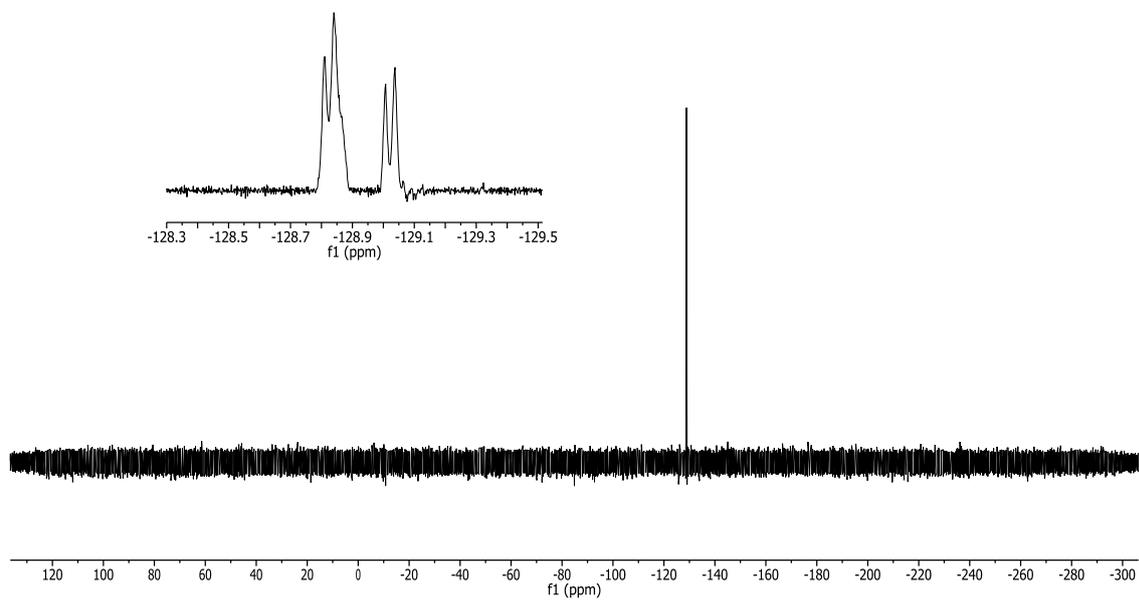


^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)

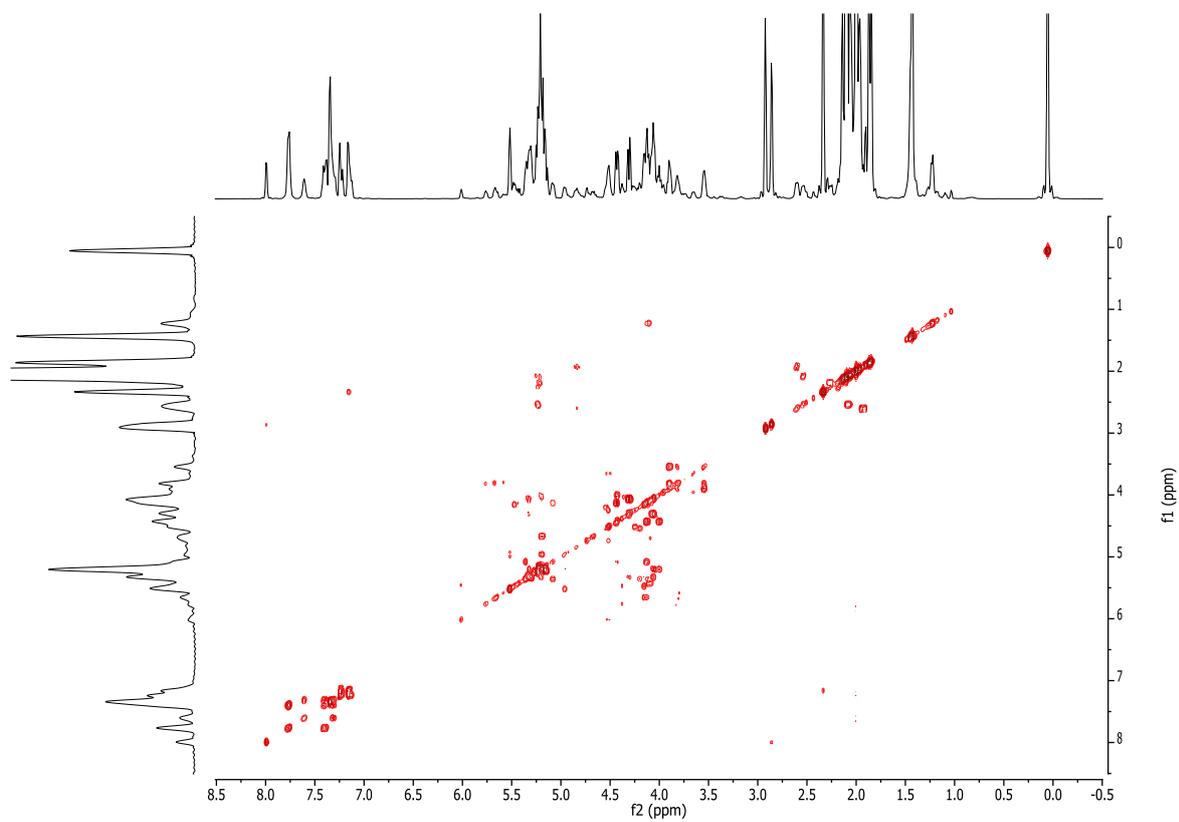


^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)

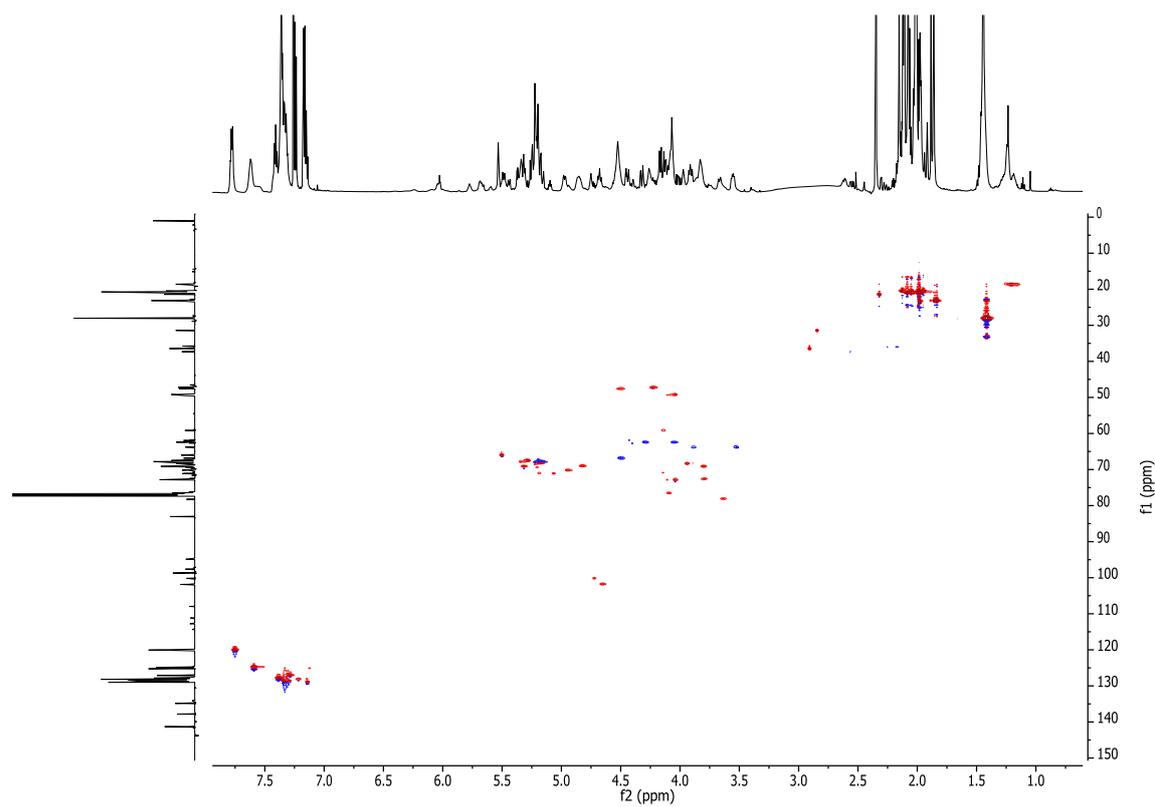
Fmoc-Thr-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-OfBu (133)*¹H-Spektrum (600 MHz, CDCl₃)**¹³C-Spektrum (150 MHz, CDCl₃)*



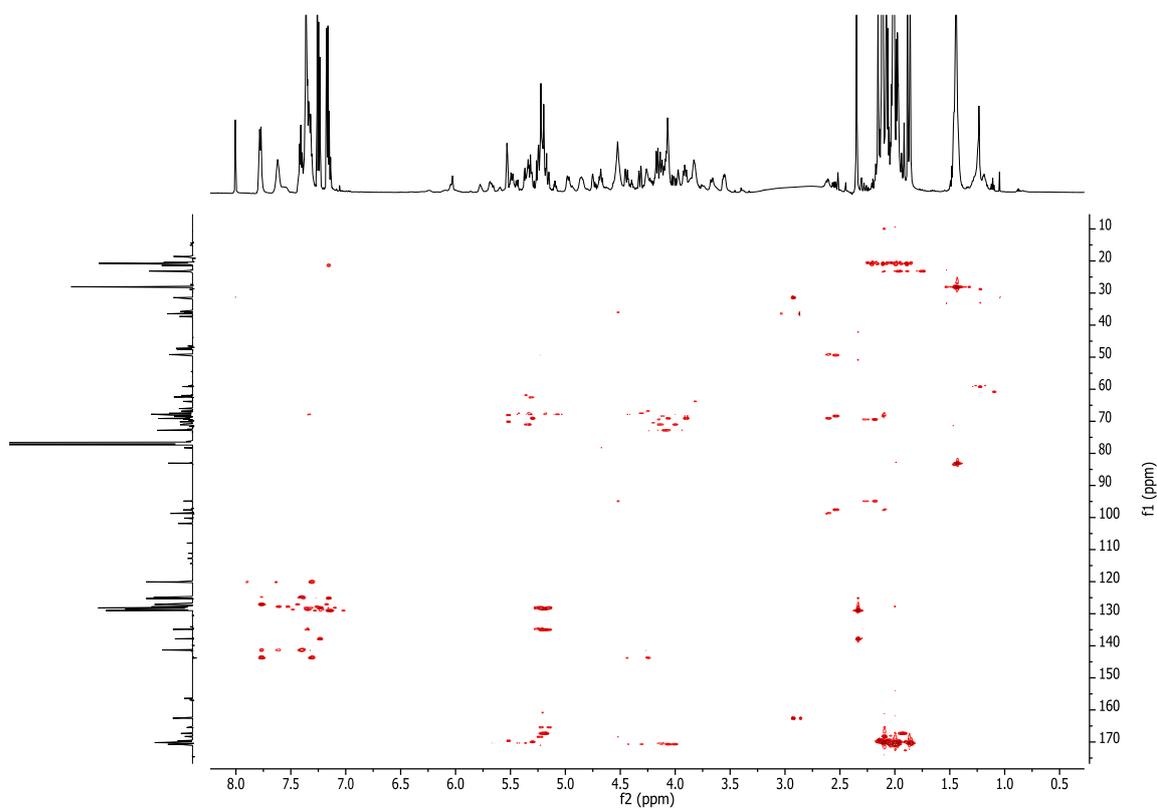
^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)



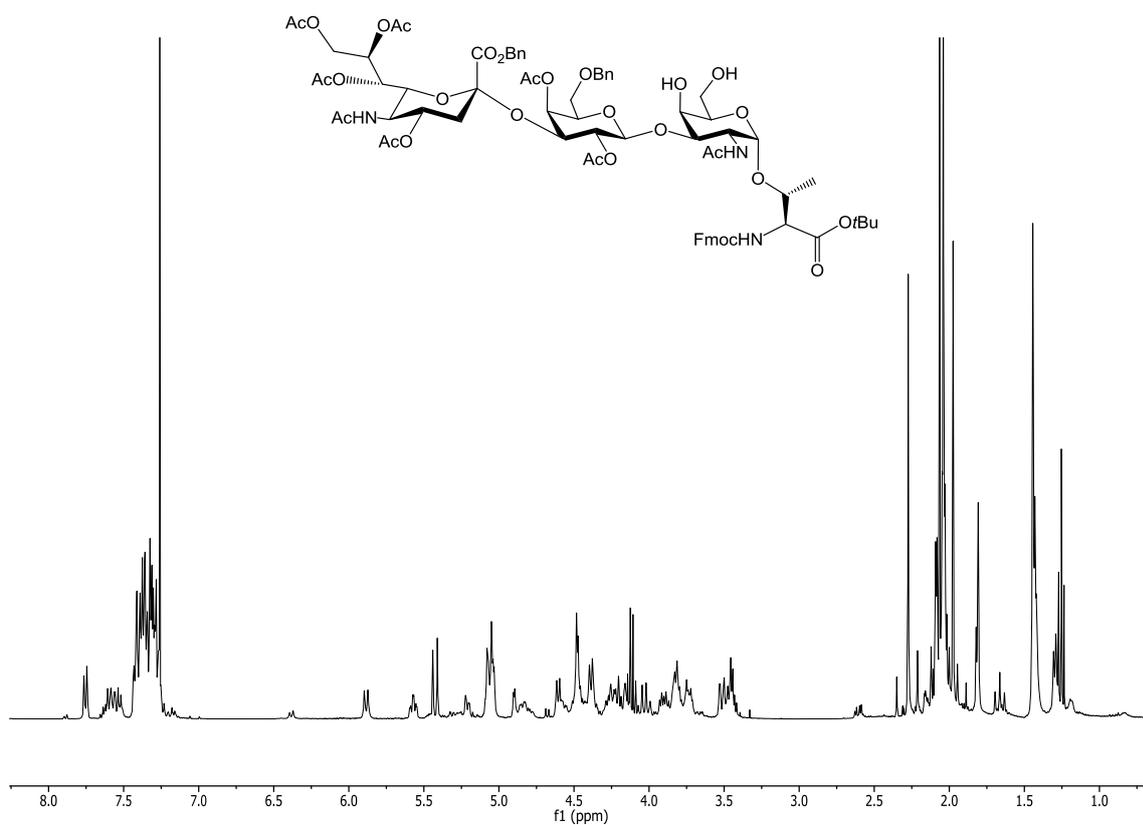
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3)



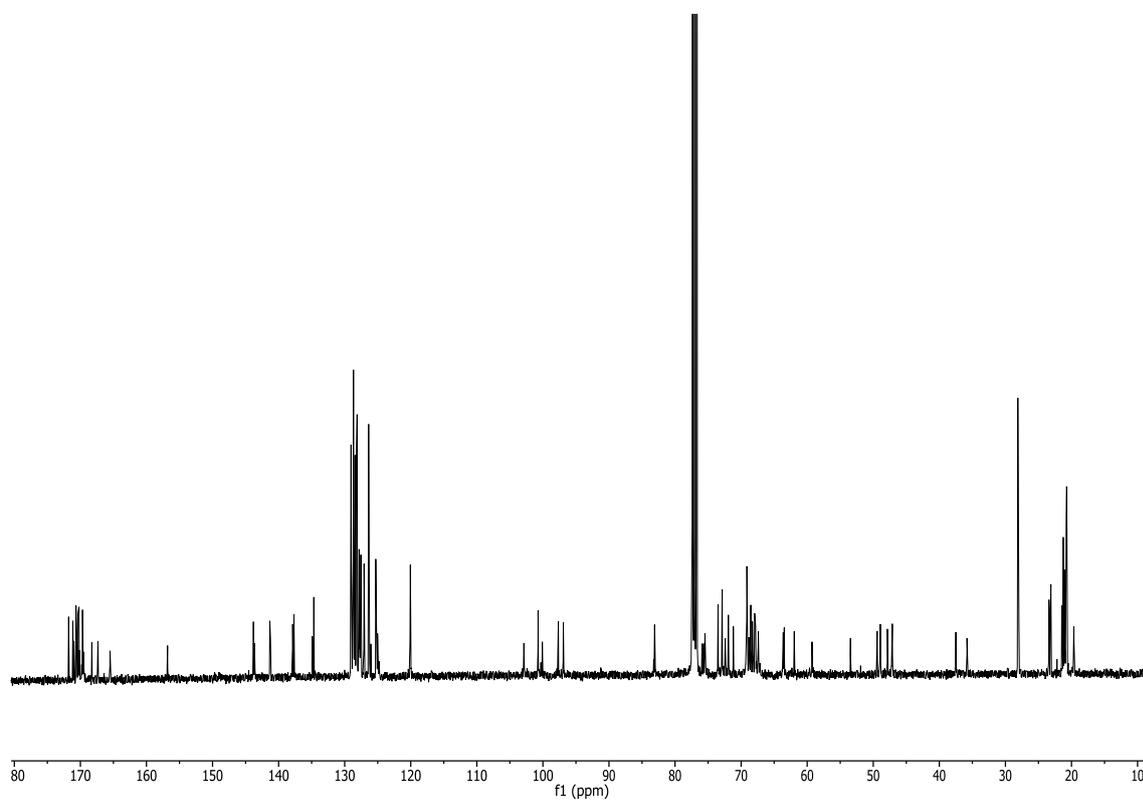
^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)



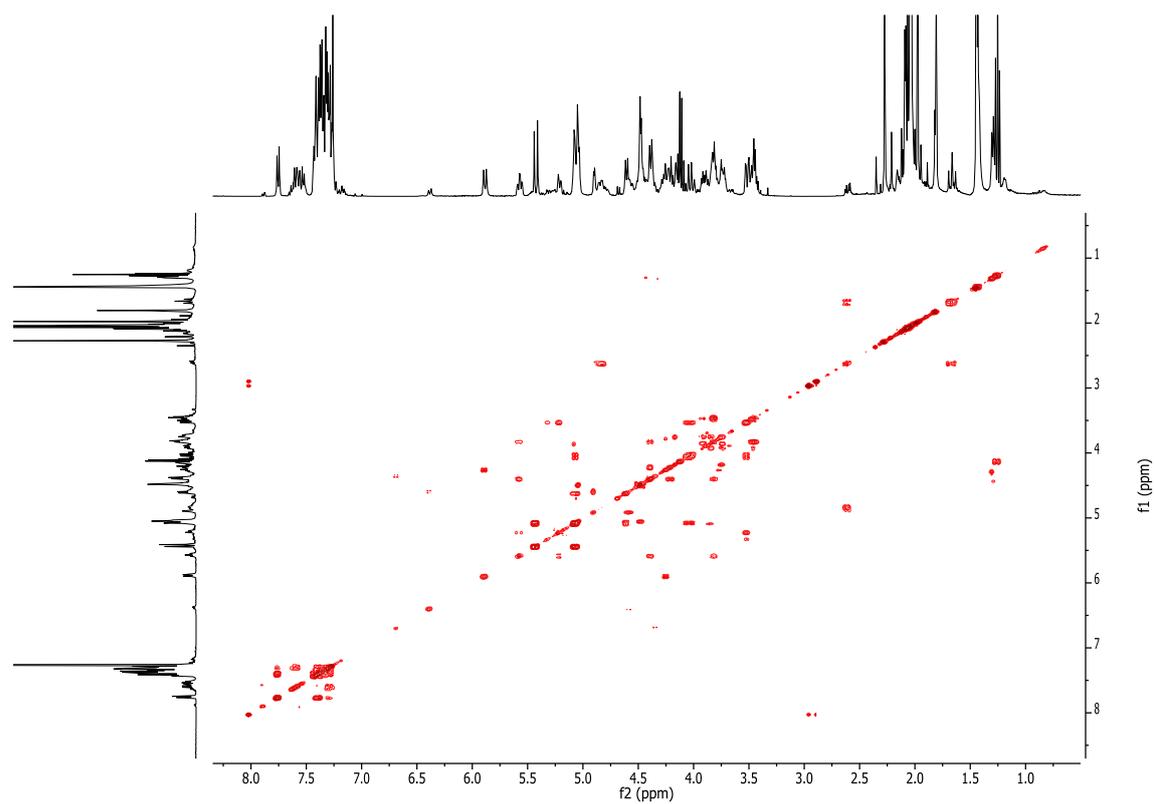
^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)

Fmoc-Thr-(β -Ac₂BnGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α -GalNAc)-OtBu (138)

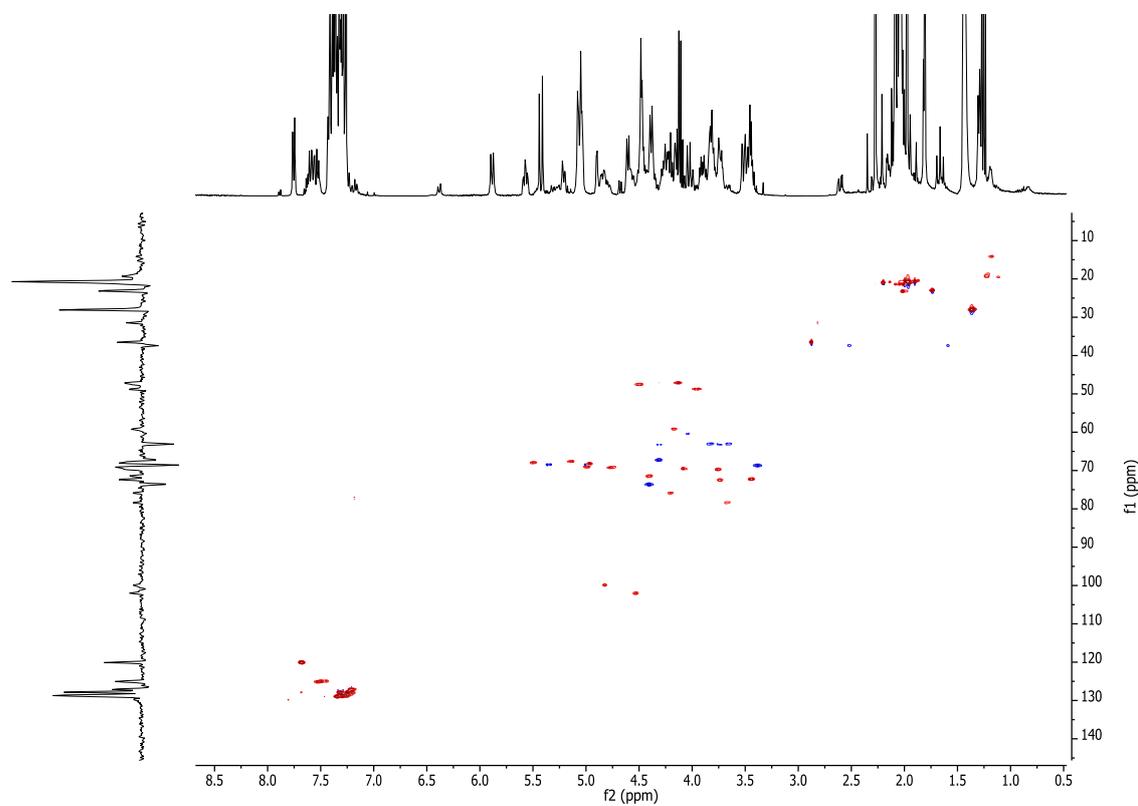
¹H-Spektrum (400 MHz, CDCl₃)



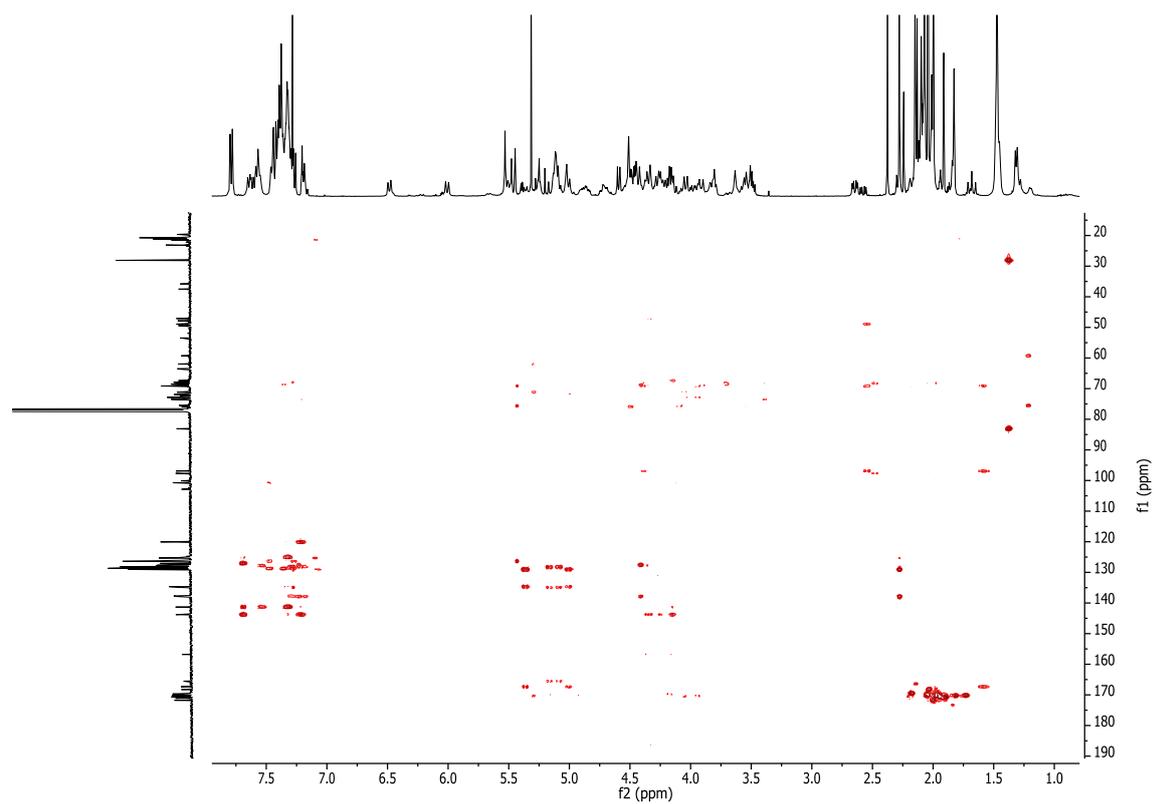
¹³C-Spektrum (100 MHz, CDCl₃)



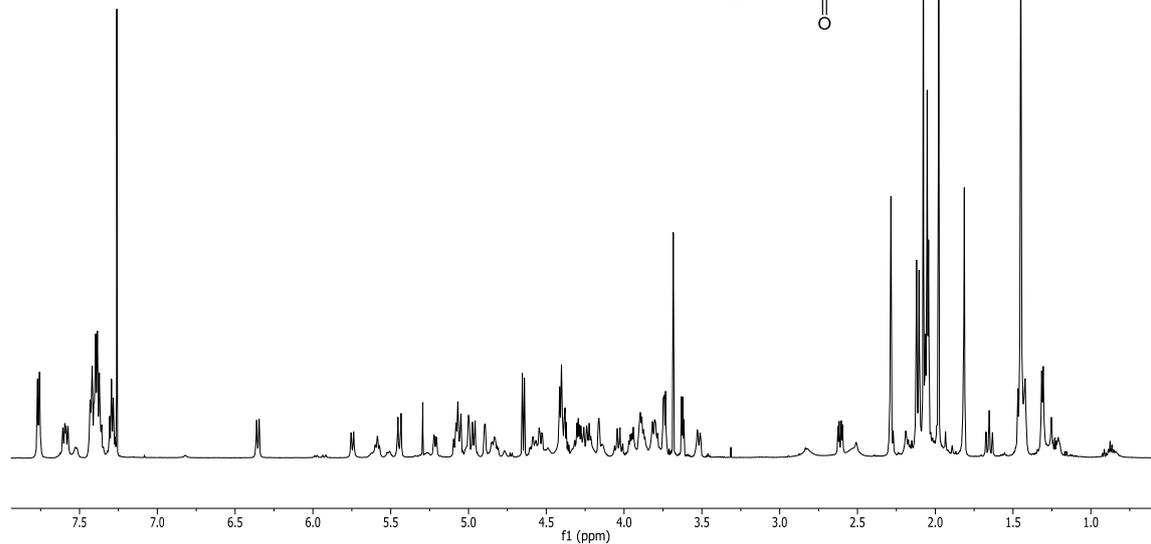
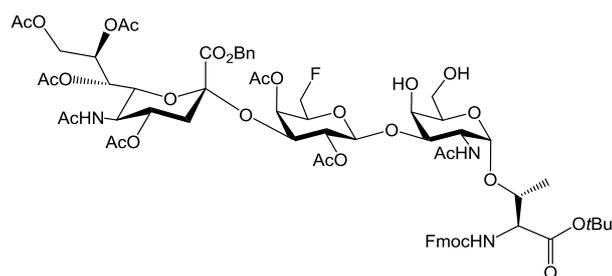
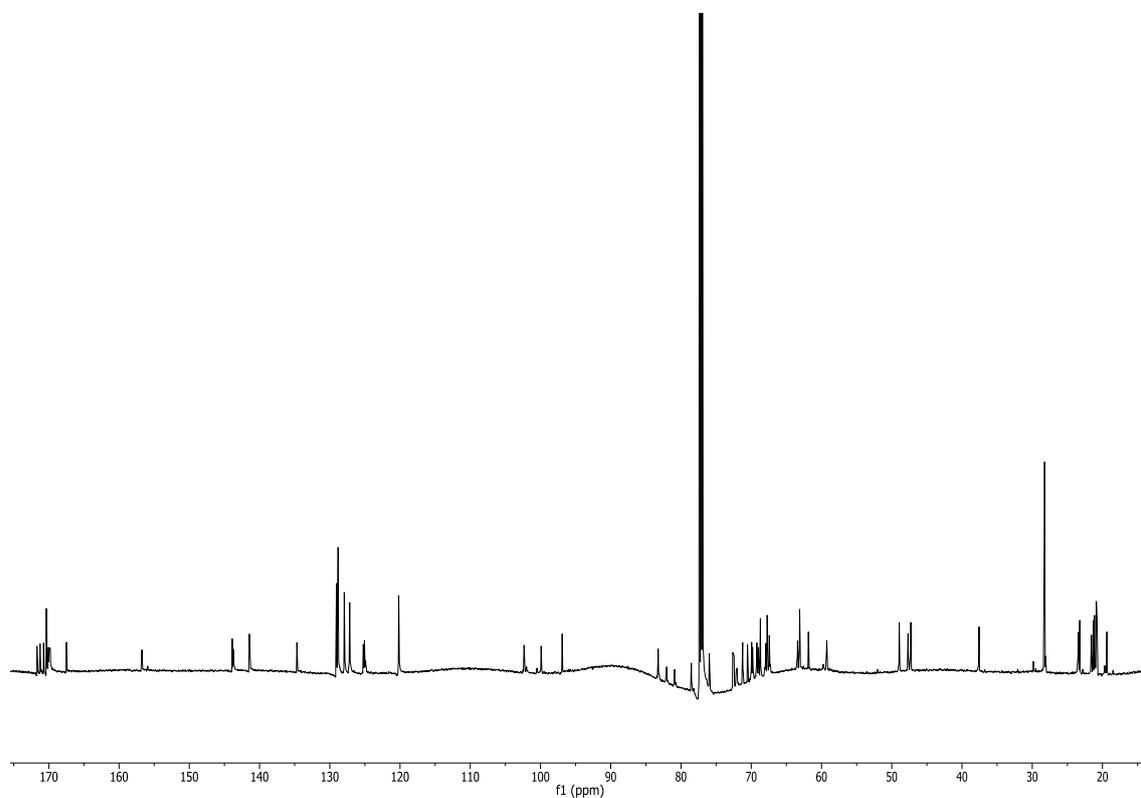
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (400 MHz, CDCl_3)

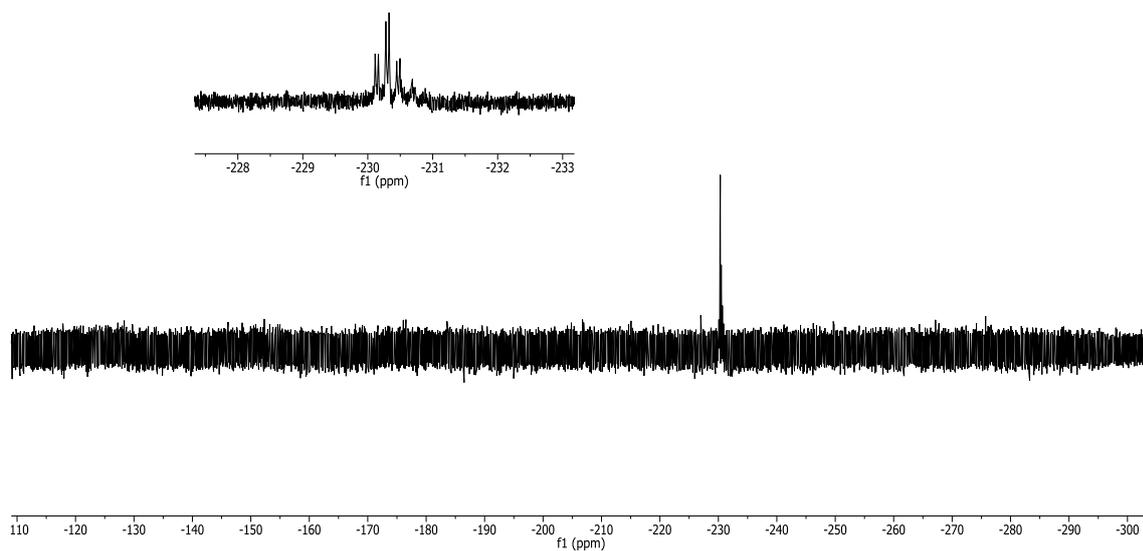


^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (100 MHz, CDCl_3)

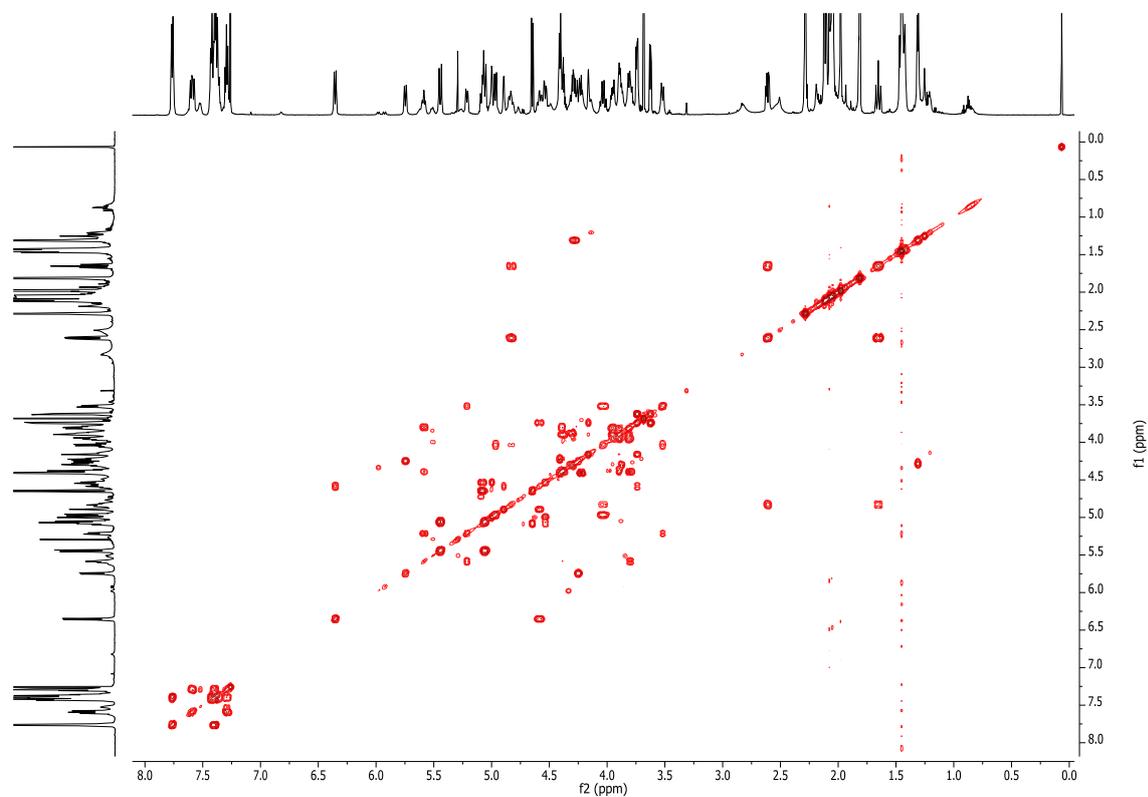


^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (100 MHz, CDCl_3)

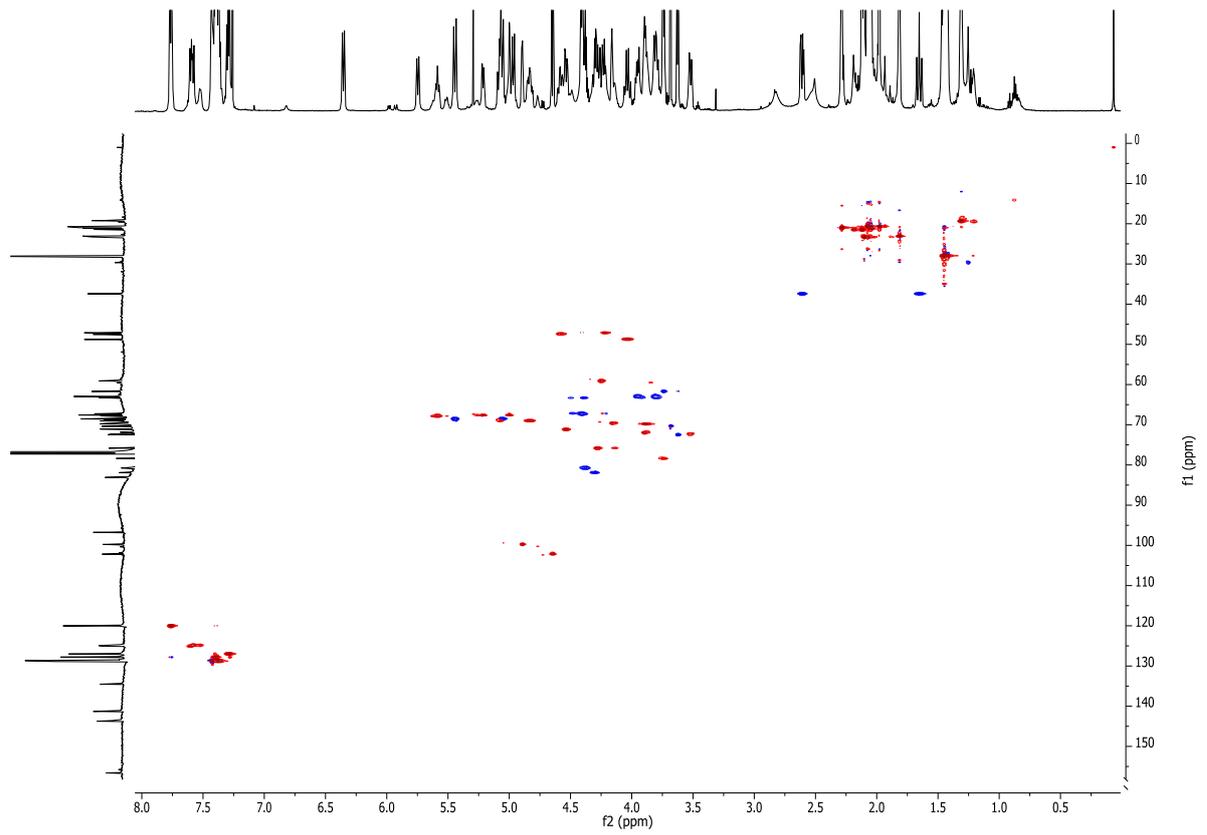
Fmoc-Thr-(β -Ac₂6FGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]- α -GalNAc)-OfBu (144)**¹H-Spektrum (600 MHz, CDCl₃)****¹³C-Spektrum (150 MHz, CDCl₃)**



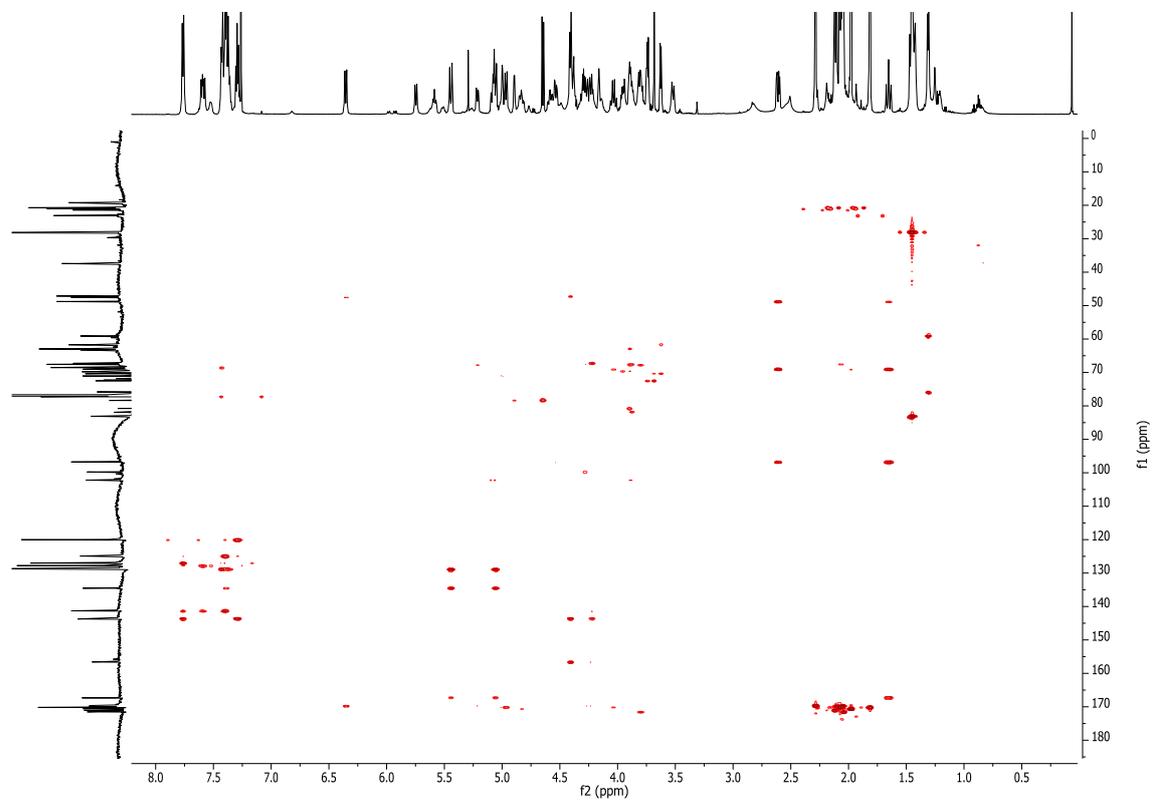
^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)



^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, CDCl_3)

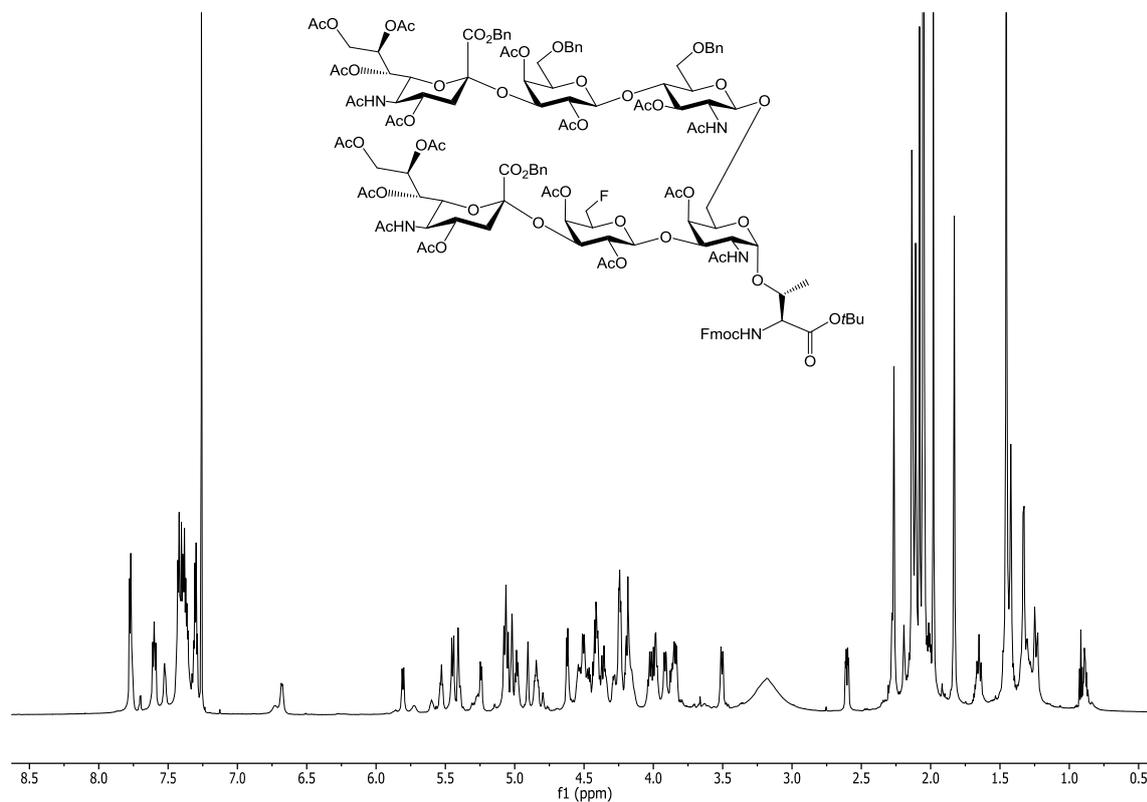


^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)

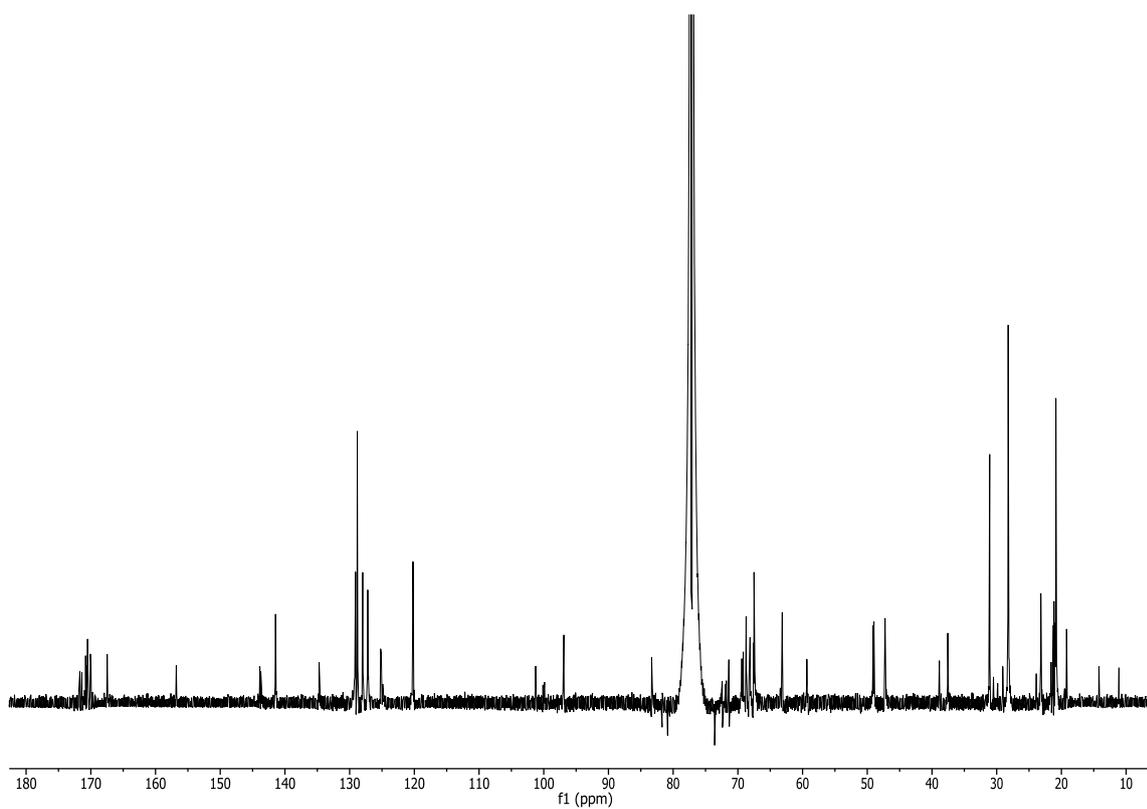


^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (150 MHz, CDCl_3)

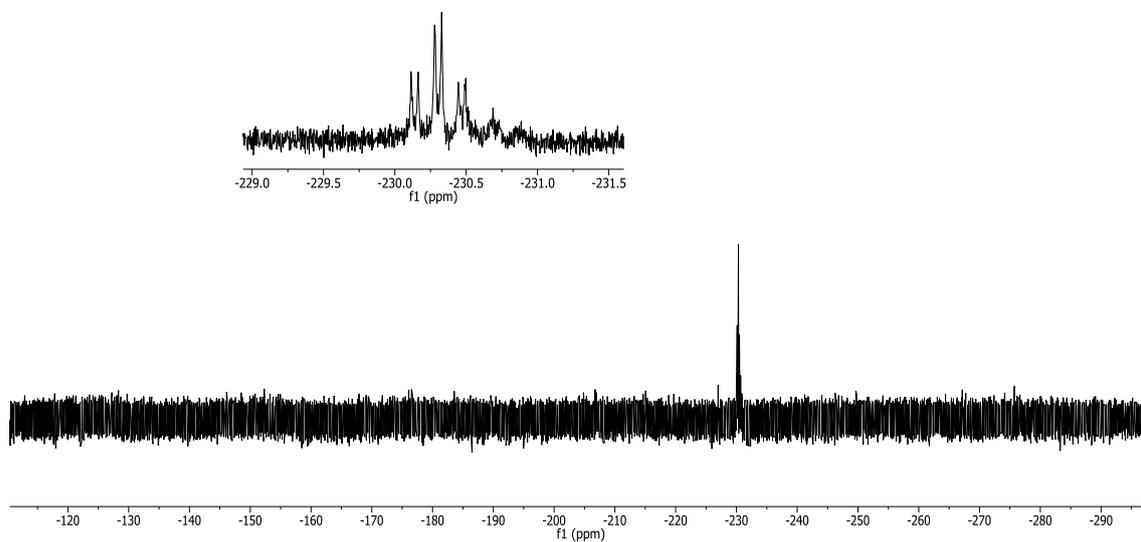
Fmoc-Thr-[α -6-(β -4-(β -Ac₂BnGal[α -2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNAc)-3-(β -Ac₂6FGal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]-AcGalNAc]-OfBu (148)



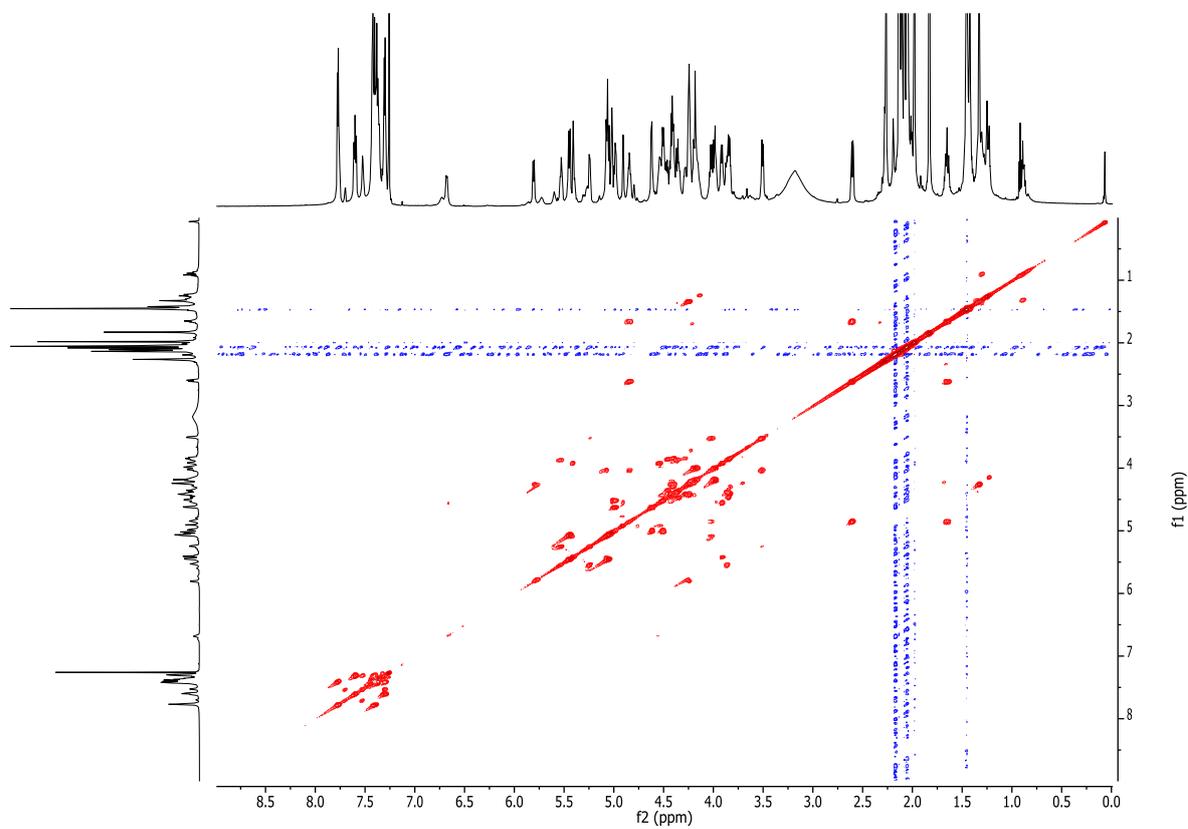
¹H-Spektrum (800 MHz, CDCl₃)



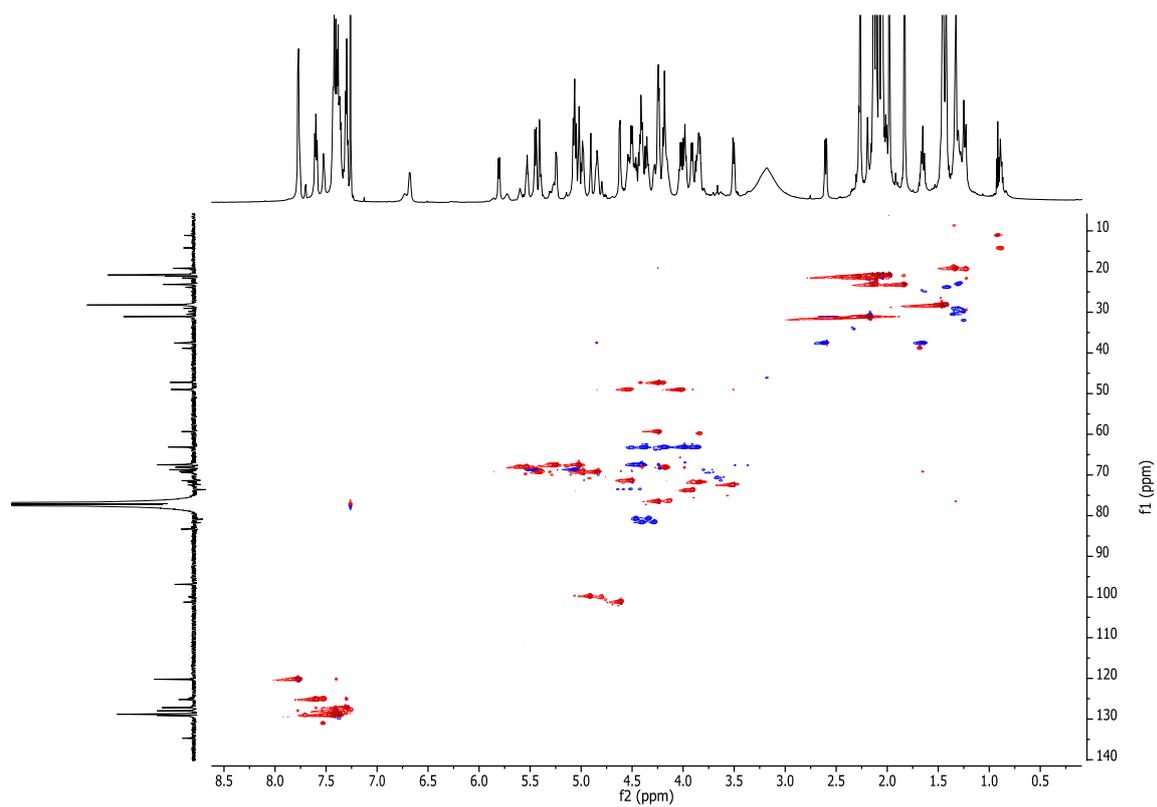
¹³C-Spektrum (200 MHz, CDCl₃)



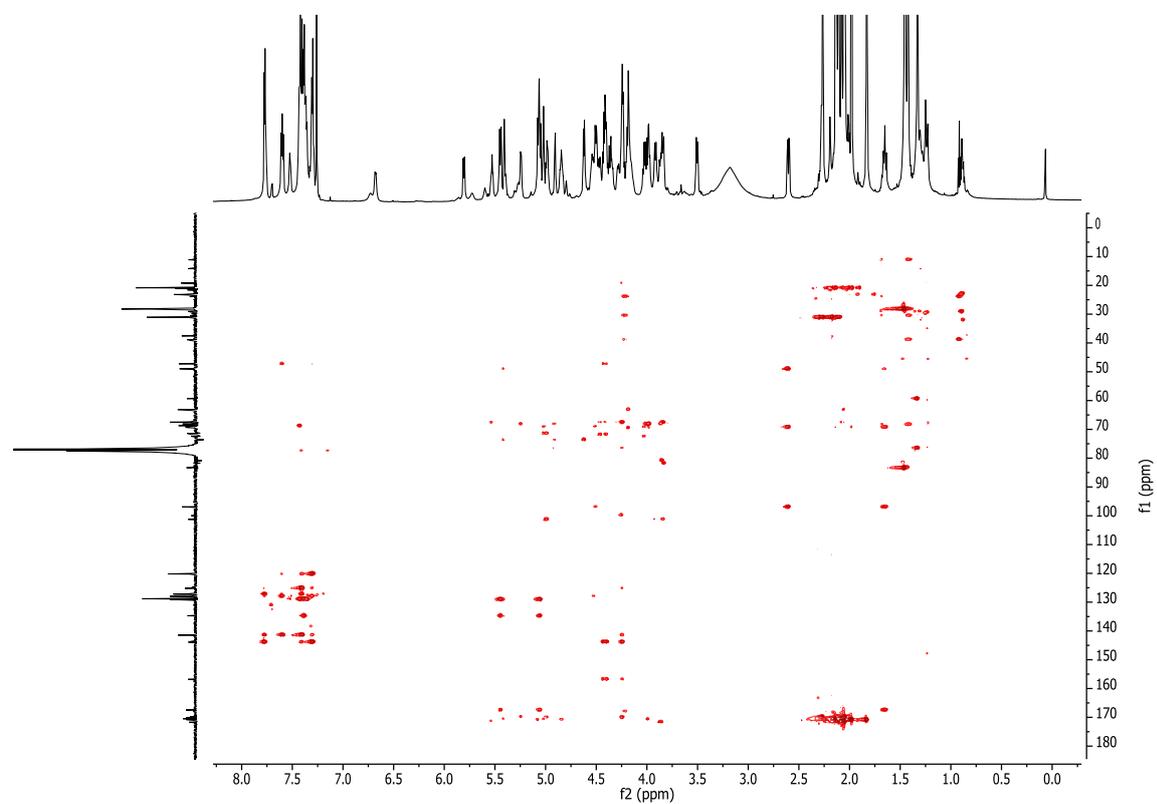
^{19}F -Spektrum (376 MHz, CDCl_3)



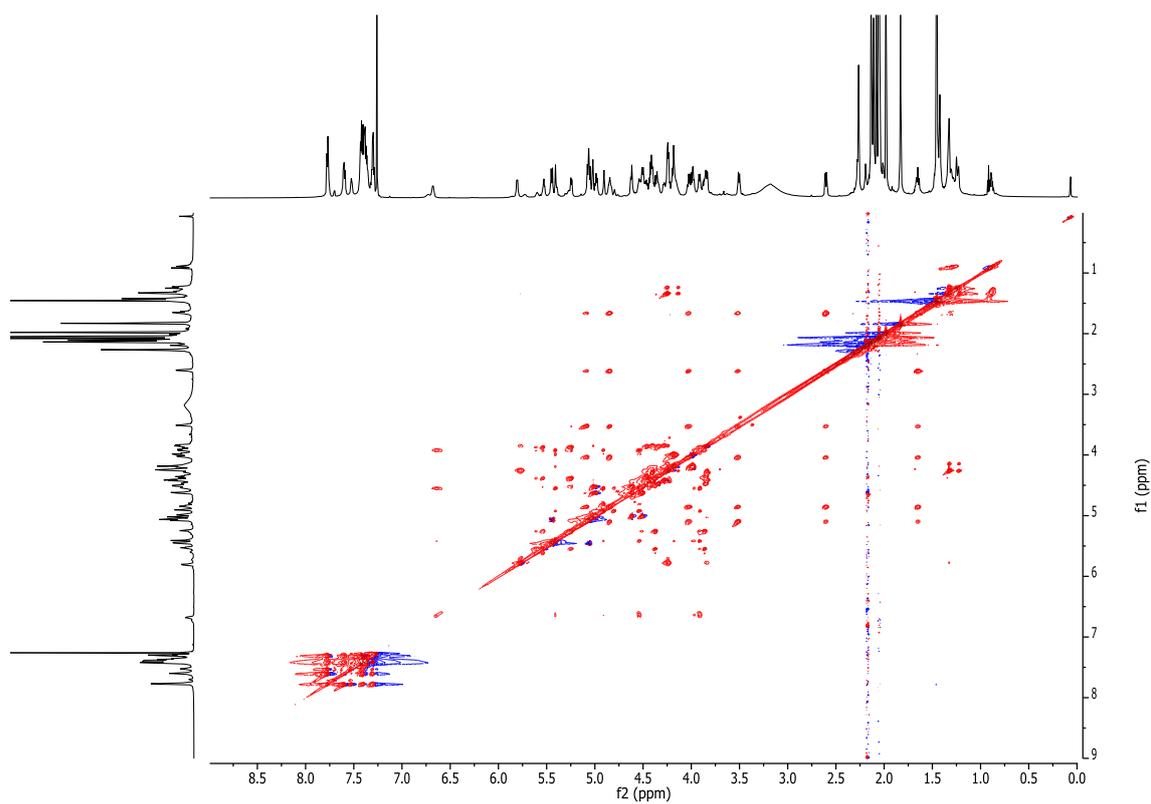
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (800 MHz, CDCl_3)



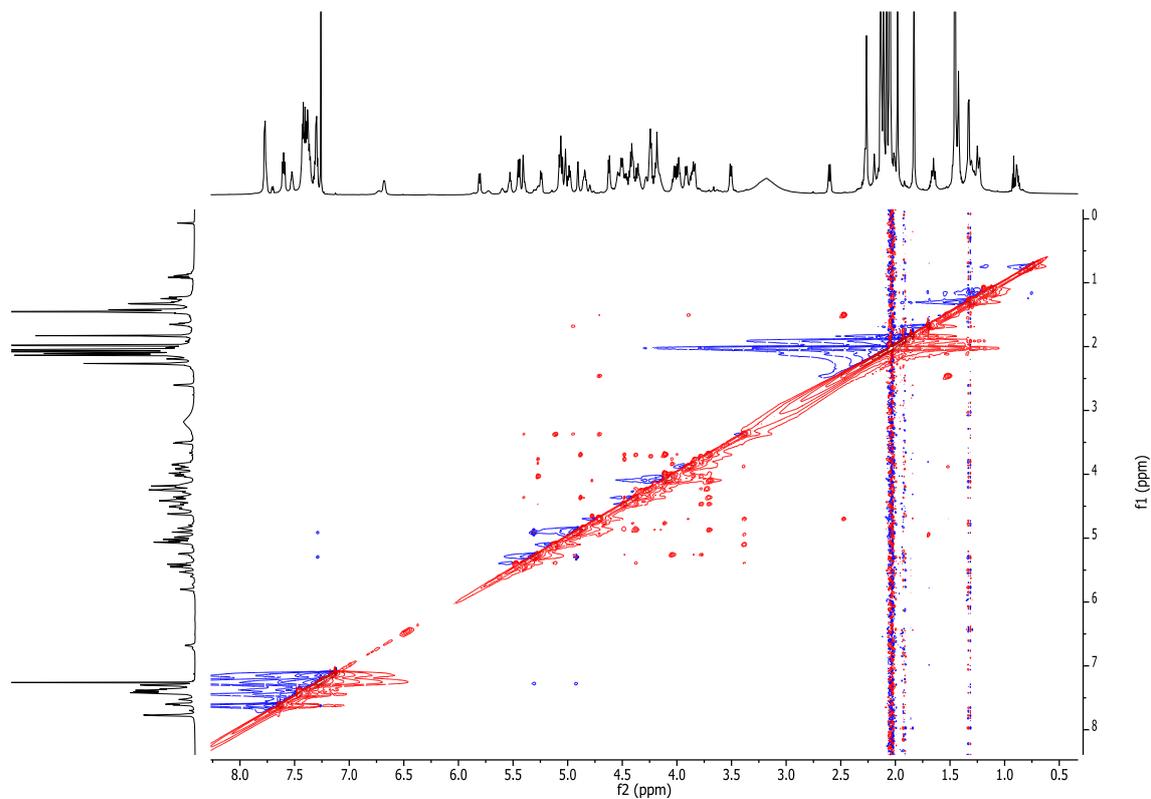
^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (200 MHz, CDCl_3)



^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (200 MHz, CDCl_3)

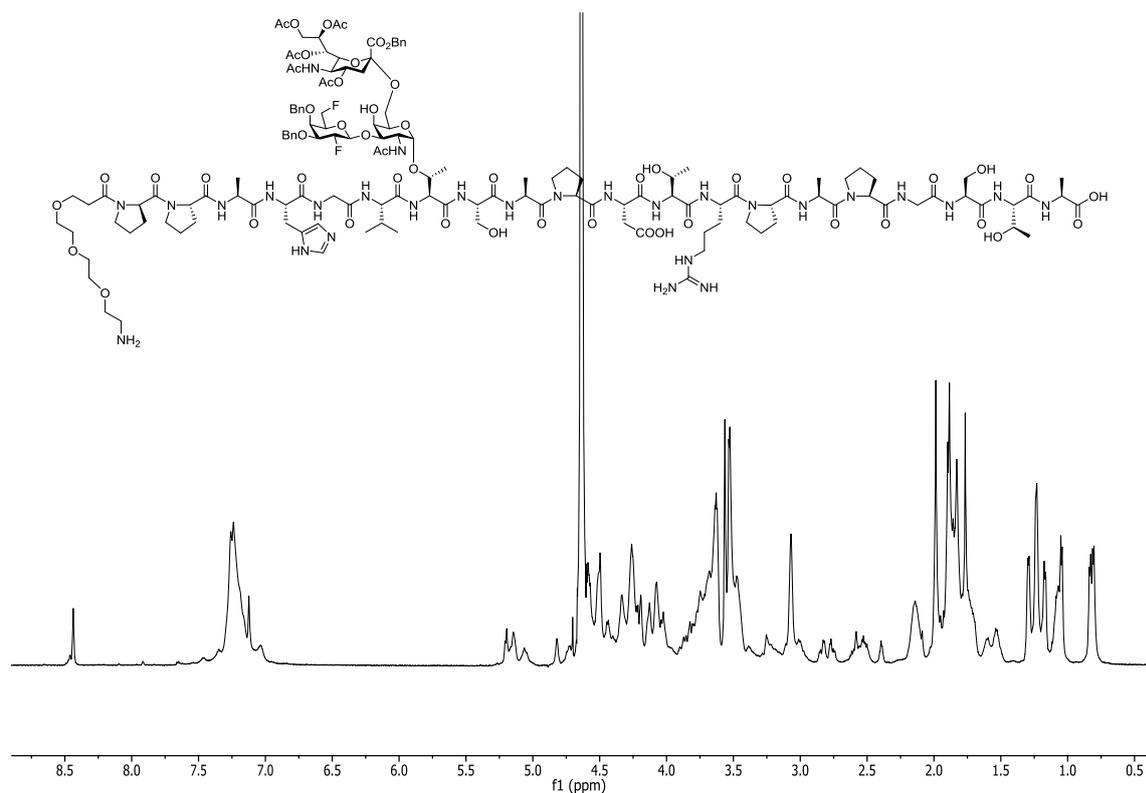


¹H-¹H-TOCSY-Spektrum (800 MHz, CDCl₃)

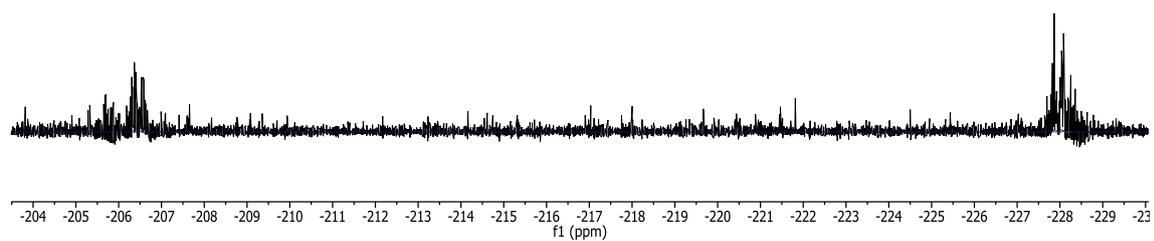


¹H-¹H-NOESY-Spektrum (800 MHz, CDCl₃)

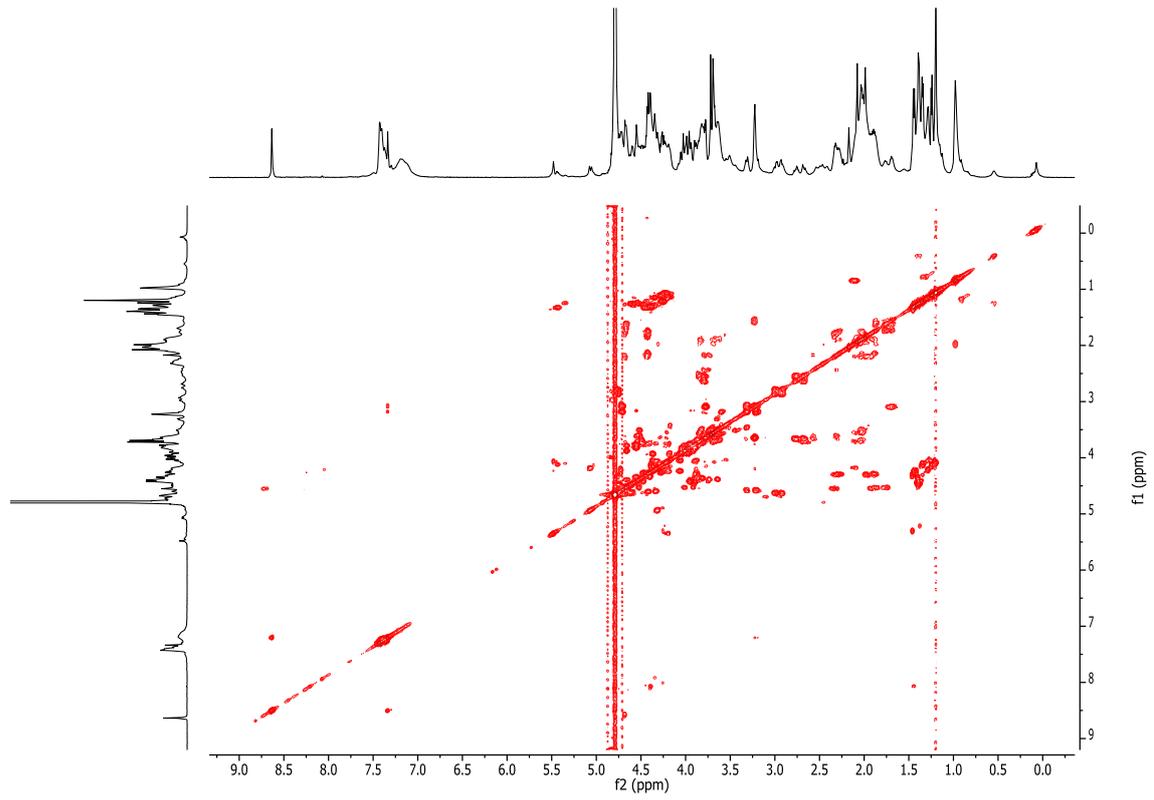
Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(β -Bn₂2,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄Sia-CO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala (162)



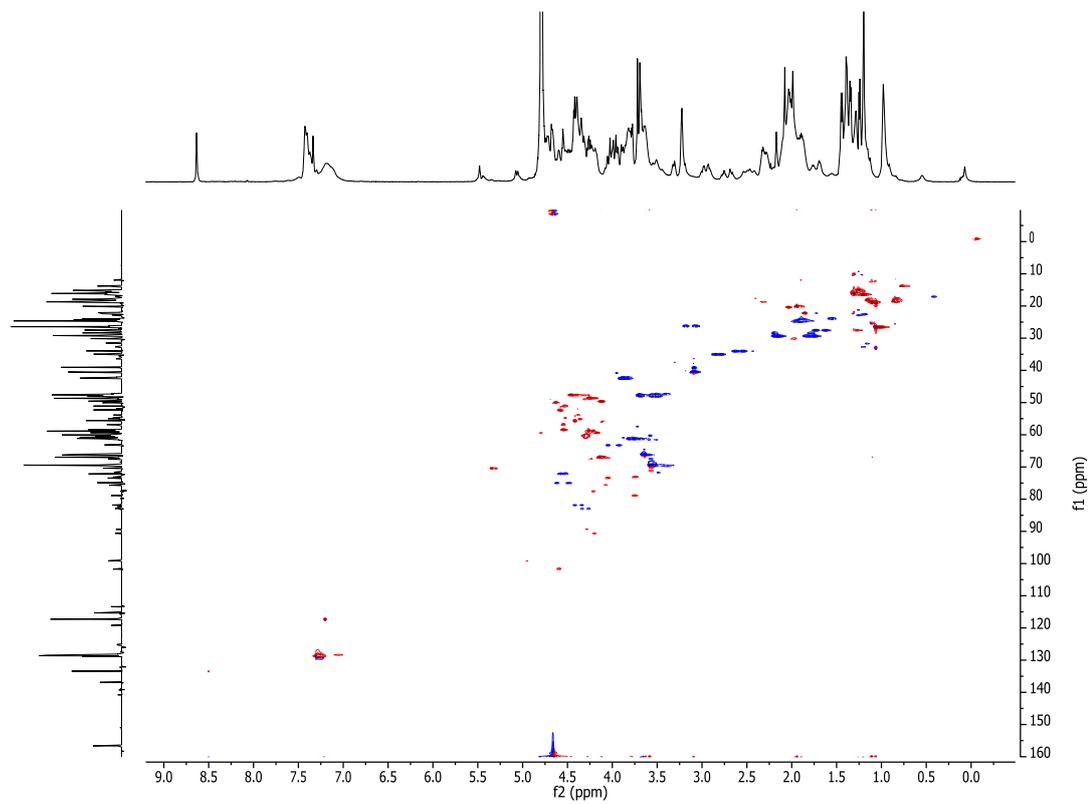
¹H-Spektrum (600 MHz, D₂O)



¹⁹F-Spektrum (376 MHz, D₂O)

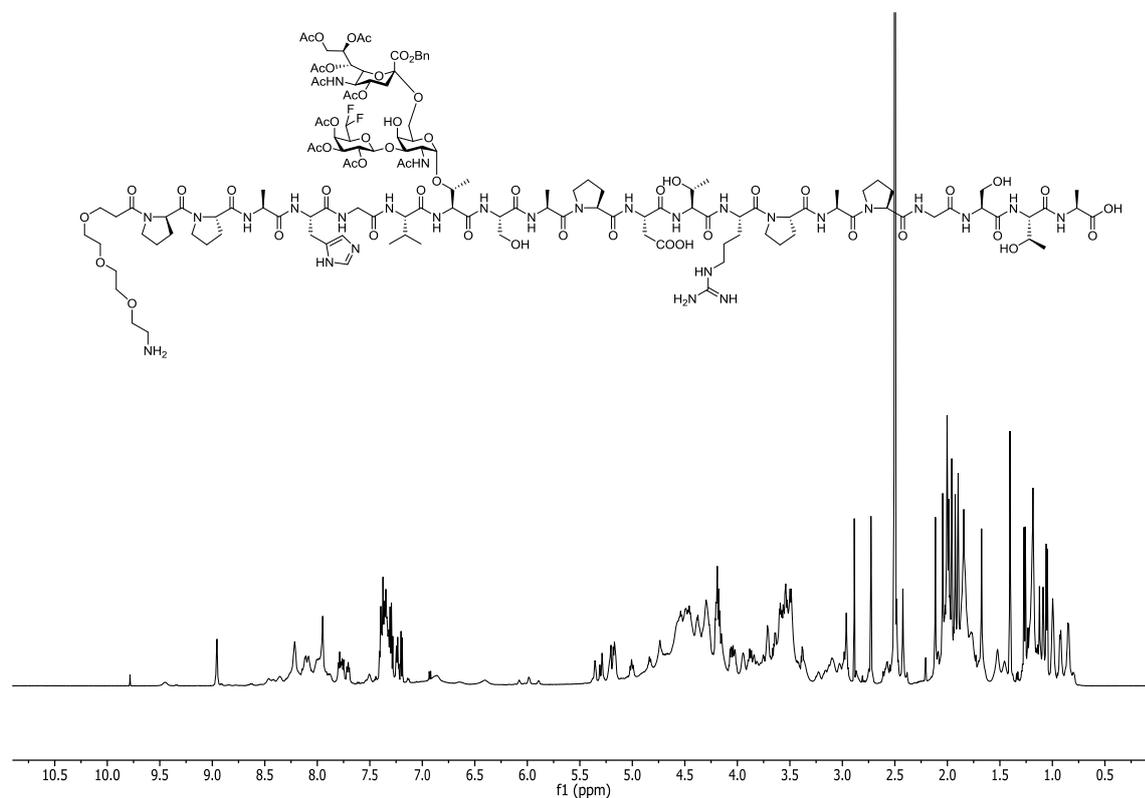


^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, D_2O)

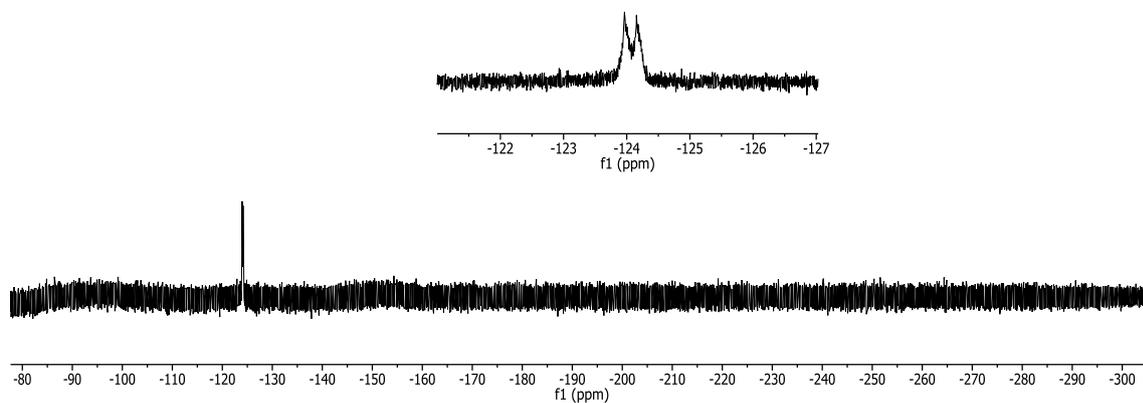


^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (150 MHz, D_2O)

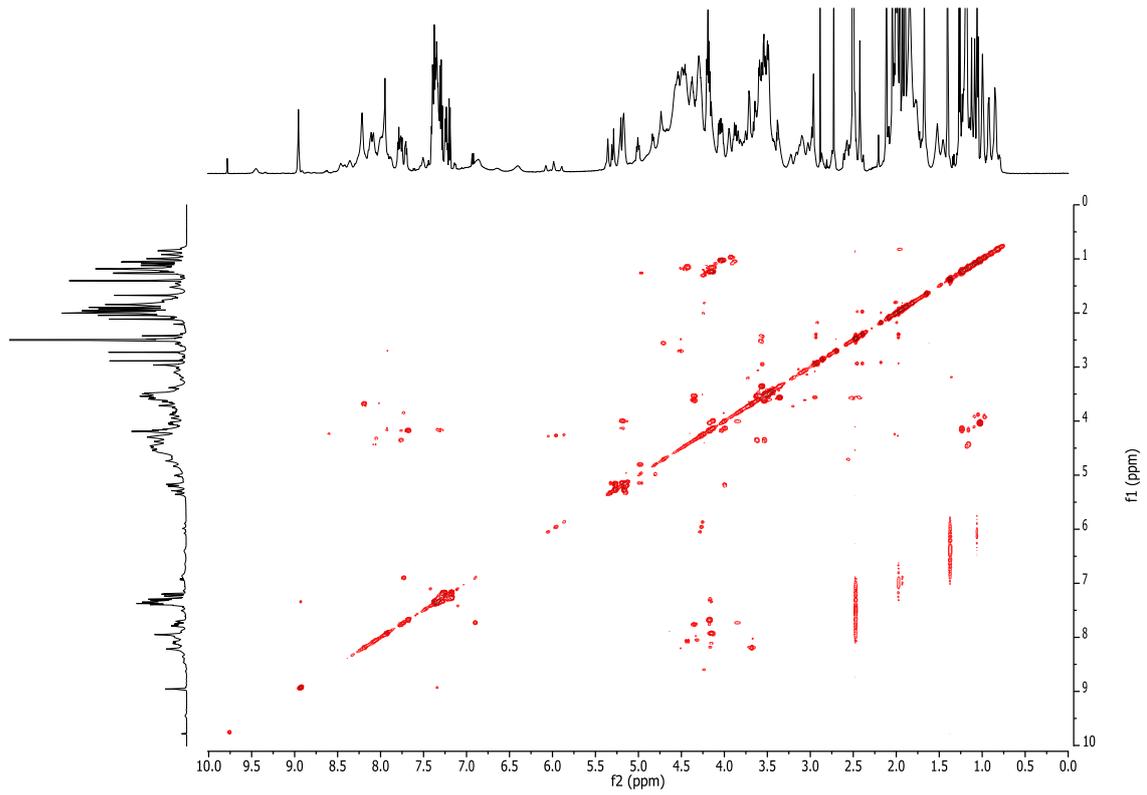
Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(β -Ac₃6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄Sia-CO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala (163)



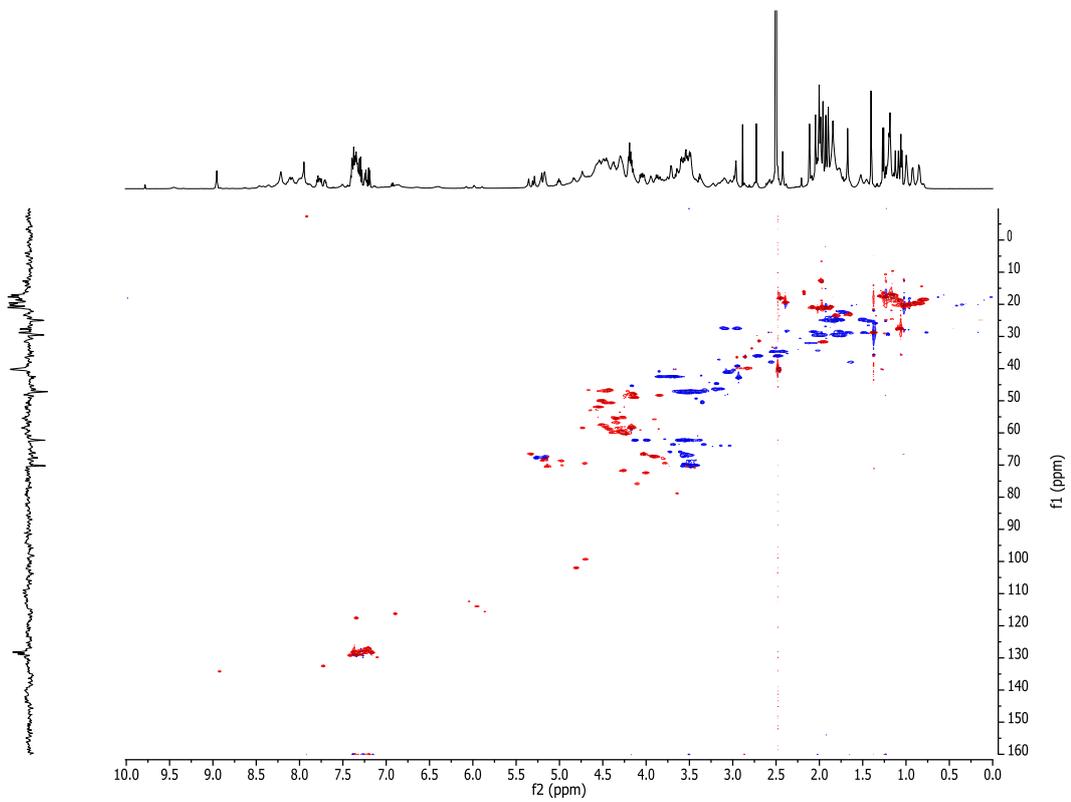
¹H-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆)



¹⁹F-Spektrum (376 MHz, DMSO-d₆)

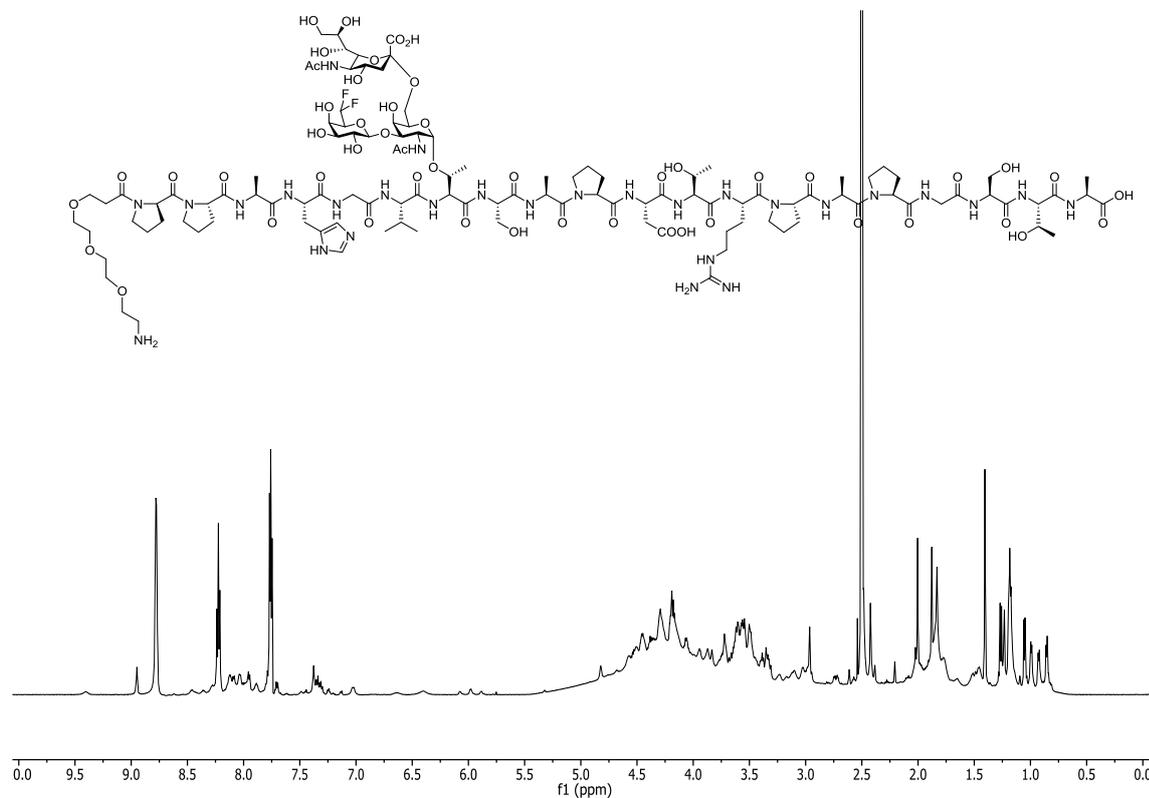


^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, DMSO- d_6)

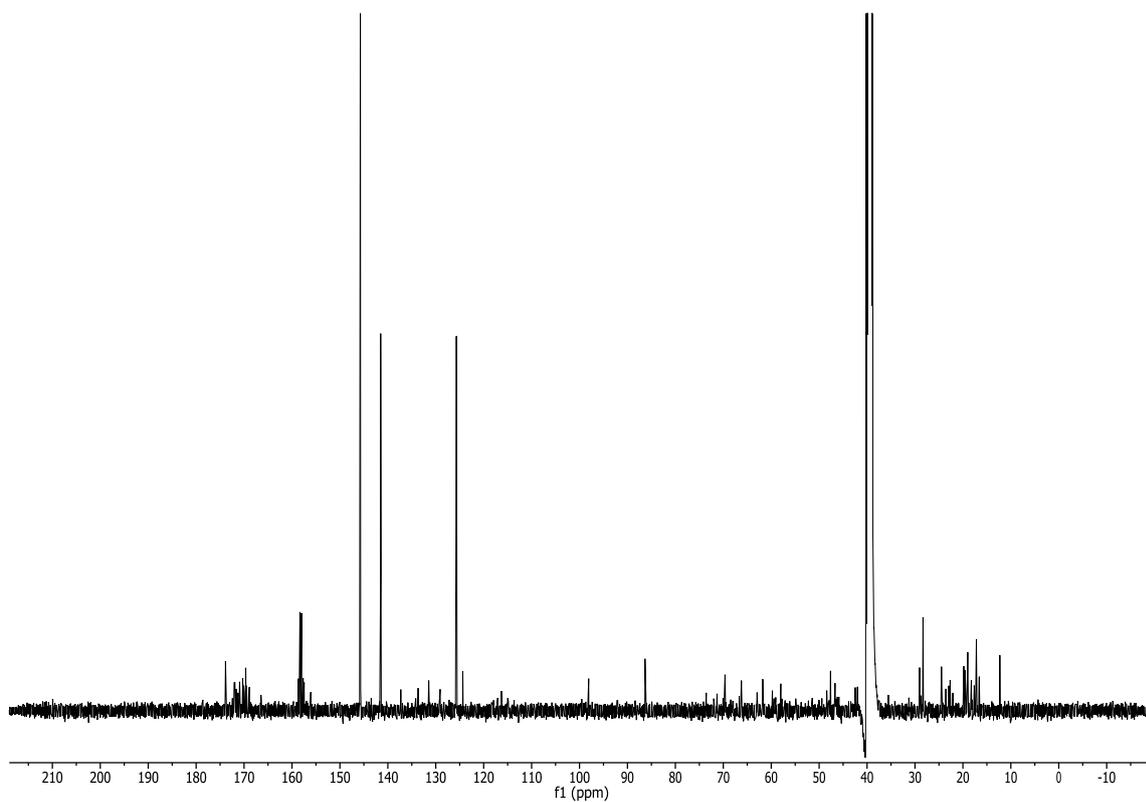


^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (150 MHz, DMSO- d_6)

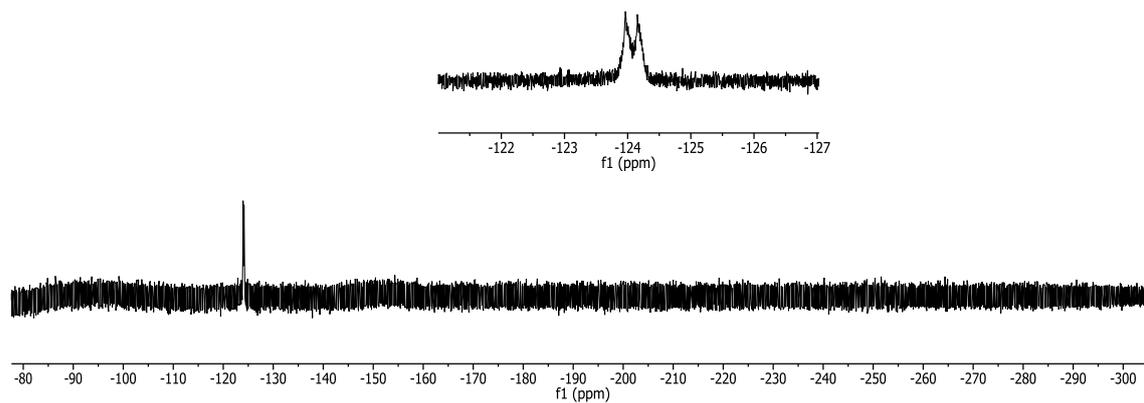
Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(β -6,6F₂Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]- α -GalNAc)-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala (164)



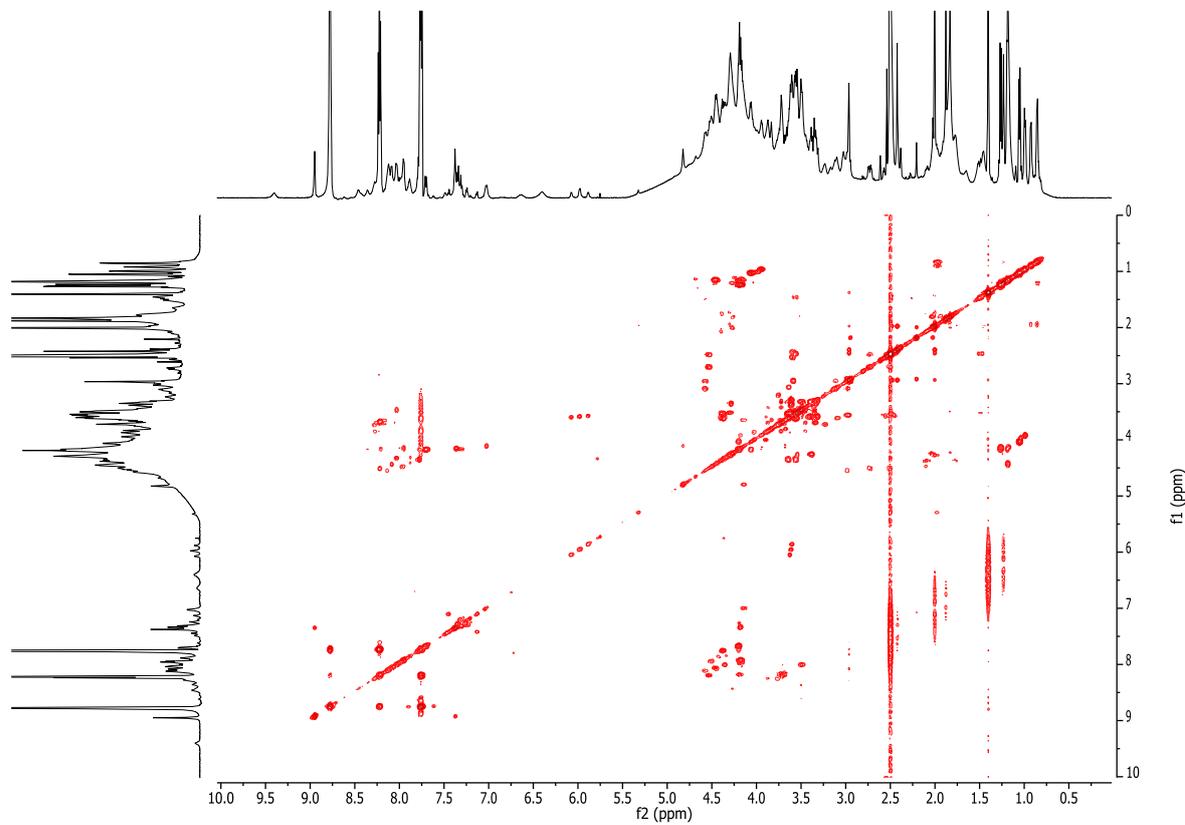
¹H-Spektrum (600 MHz, DMSO-d₆)



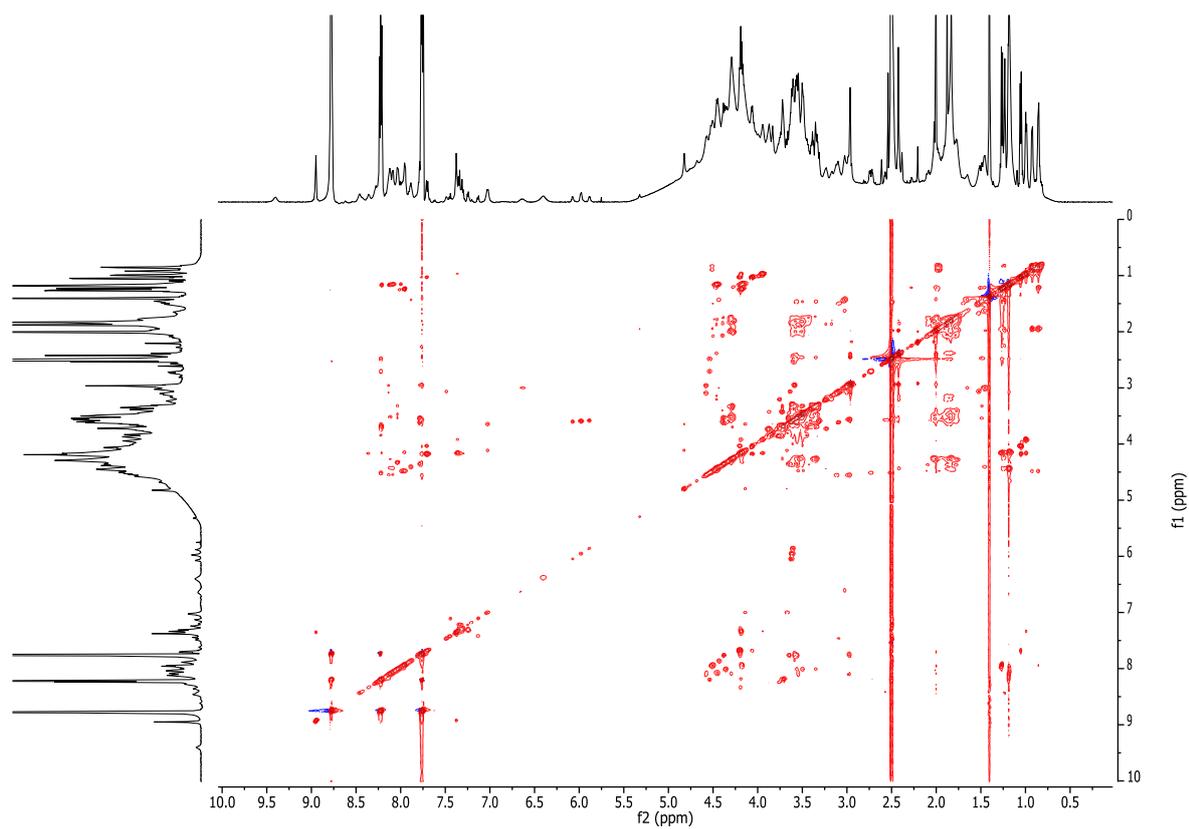
¹³C-Spektrum (150 MHz, DMSO-d₆)



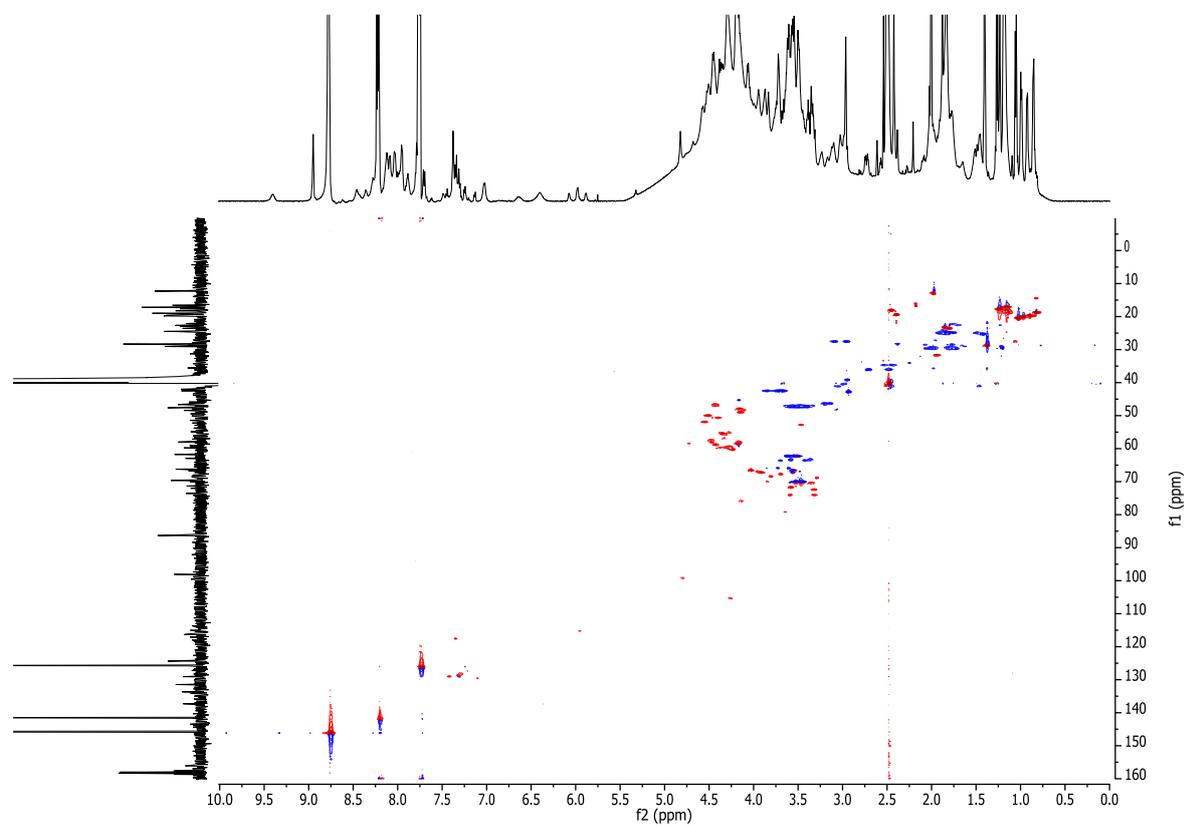
^{19}F -Spektrum (376 MHz, DMSO-d_6)



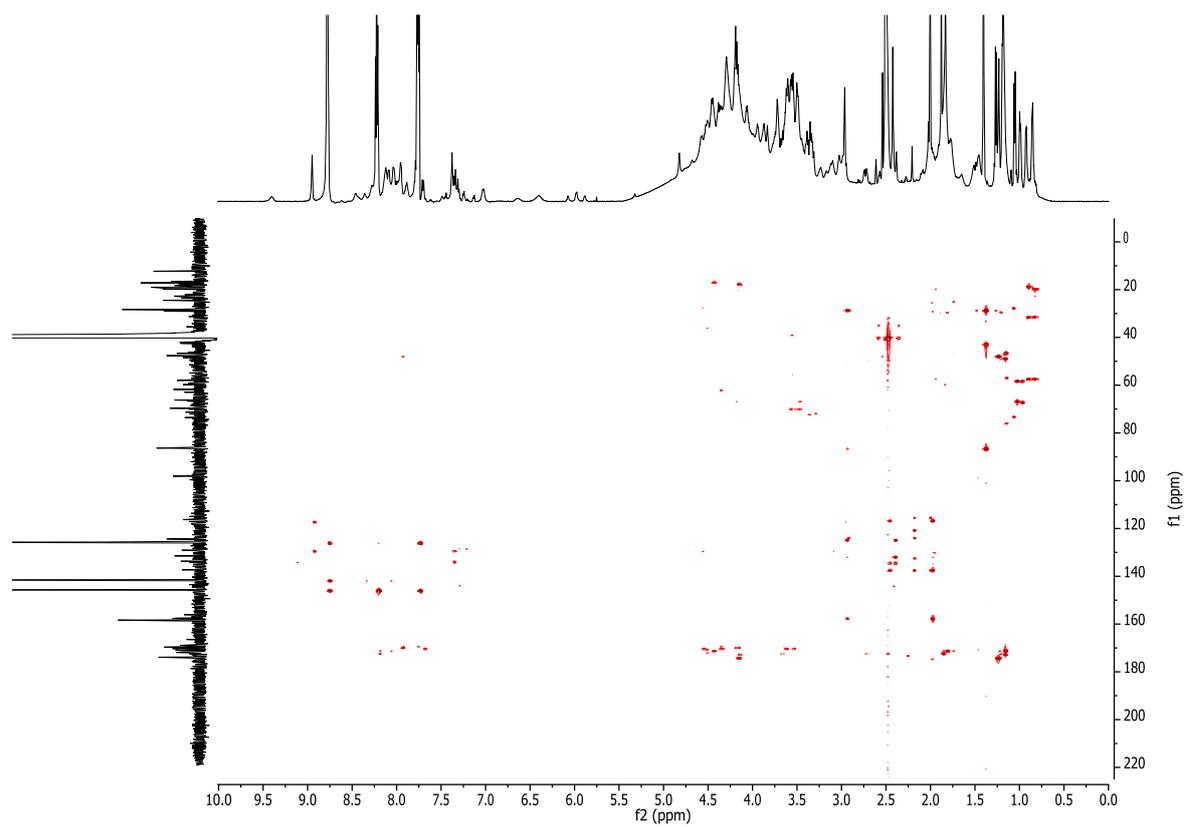
^1H - ^1H -COSY-Spektrum (600 MHz, DMSO-d_6)



^1H - ^1H -TOCSY-Spektrum (600 MHz, DMSO- d_6)



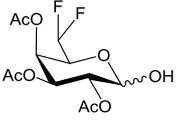
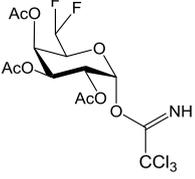
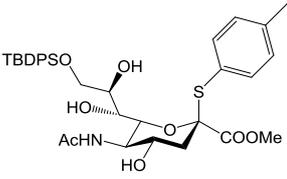
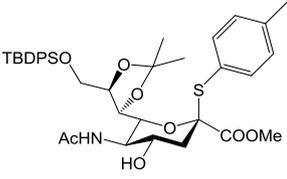
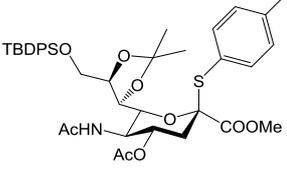
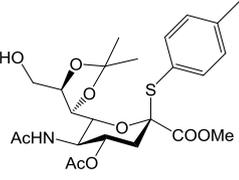
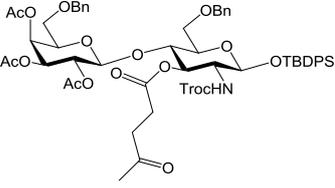
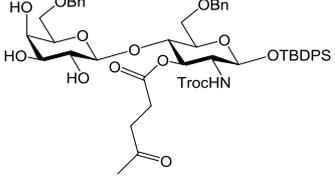
^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum (150 MHz, DMSO- d_6)



^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrum (150 MHz, DMSO- d_6)

7.2 Übersicht über erstmalig synthetisierte Verbindungen

Struktur	Verbindung	Seite
	β-3Lev-4,6Bzn-GlcNTroc-OTBDPS (8)	108
	β-3Lev-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS (9)	109
	β-3Lev-GlcNTroc-OTBDPS (10)	110
	β-3Lev-6TBS-GlcNTroc-OTBDPS (11)	111
	6BnAc₂Gal (23)	119
	α/β-6BnAc₂2FGal-OH (24)	120
	α-6BnAc₂2FGal-OC(NH)CCl₃ (25)	120
	α/β-Ac₂2,6F₂Gal-OH (33)	127
	α-Ac₂2,6F₂Gal-OC(NH)CCl₃ (34)	127

Struktur	Verbindung	Seite
	α/β -Ac ₃ 6F ₂ Gal-OH (42)	135
	α -Ac ₃ 6F ₂ Gal-OC(NH)CCl ₃ (43)	136
	β -9TBDPS-SiaCO ₂ Me-SPhMe (53)	143
	β -9TBDPS-7,8Isopropyl-SiaCO ₂ Me-SPhMe (54)	144
	β -9TBDPS-7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO ₂ Me-SPhMe (55)	145
	β -7,8Isopropyl-4Ac-SiaCO ₂ Me-SPhMe (56)	146
	β -4-(β -6BnAc ₃ Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (67)	149
	β -4-(β -6BnGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (68)	150

Struktur	Verbindung	Seite
	β-4-(β-6BnAc₂-2FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (69)	151
	β-4-(β-6Bn-2FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (73)	152
	β-4-(β-Ac₃6FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (70)	153
	β-4-(β-6FGal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (74)	155
	β-4-(β-Ac₂2,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (71)	156
	β-4-(β-2,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (75)	157
	β-4-(β-Ac₃6,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (72)	158

Struktur	Verbindung	Seite
	β-4-(β-6,6F₂Gal)-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (76)	159
	β-4-(β-6BnAc₃Gal)-3Lev-6TBSGlcNTroc-OTBDPS (77)	160
	β-4-(β-6BnAc₃Gal)-3Lev-GlcNTroc-OTBDPS (79)	161
	β-4-(β-Ac₃6FGal)-3Lev-6TBSGlcNTroc-OTBDPS (78)	162
	β-4-(β-Ac₃6FGal)-3Lev-GlcNTroc-OTBDPS (80)	163
	β-4-(β-BnGal[α-2,3-Ac₄Sia-CO₂Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (90)	164
	β-4-(β-Ac₂BnGal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS (91)	166

Struktur	Verbindung	Seite
	α/β -4-(β -Ac ₂ BnGal[α -2,3-Ac ₄ SiaCO ₂ Bn])-3Ac-6Bn-GlcNTroc-OH (92)	167
	α/β -4-(β -Ac ₂ BnGal[α -2,3-Ac ₄ SiaCO ₂ Bn])-3Ac-6Bn-GlcNTroc-OC(NH)CCl ₃ (93)	168
	β -4-(β -Bn ₂ FGal[α -2,3-Ac ₄ SiaCO ₂ Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (94)	170
	β -4-(β -6FGal[α -2,3-Ac ₄ SiaCO ₂ Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (95)	172
	β -4-(β -Ac ₂ 6FGal[α -2,3-Ac ₄ SiaCO ₂ Bn])-3Ac-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS (99)	173
	β -4-(β -6,6F ₂ Gal[α -2,3-Ac ₄ SiaCO ₂ Bn])-3Lev-6BnGlcNTroc-OTBDPS (97)	174
	β -4-(β -Ac ₂ 6,6F ₂ Gal[α -2,3-Ac ₄ SiaCO ₂ Bn])-3Ac-6Bn-GlcNTroc-OTBDPS (101)	176

Struktur	Verbindung	Seite
	α/β-4-(β-Ac₂6,6F₂Gal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6BnGlcNTroc-OH (102)	178
	α-4-(β-Ac₂6F₂Gal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3Ac-6Bn-GlcNTroc-OC(NH)CCl₃ (103)	179
	β-4-(β-2,6F₂Gal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-3-Lev-6-Bn-GlcNTroc-OTBDPS (96)	181
	Fmoc-Thr-(β-6,6F₂Gal-(1\rightarrow3)-α-4,6-Bzn-GalNAc)-OtBu (128)	213
	Fmoc-Thr-(β-Bn₃2FGal-(1\rightarrow3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]-α-GalNAc)-OH (130)	216
	Fmoc-Thr-(β-Bn₂6F₂Gal-(1\rightarrow3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]-α-GalNAc)-OtBu (131)	217

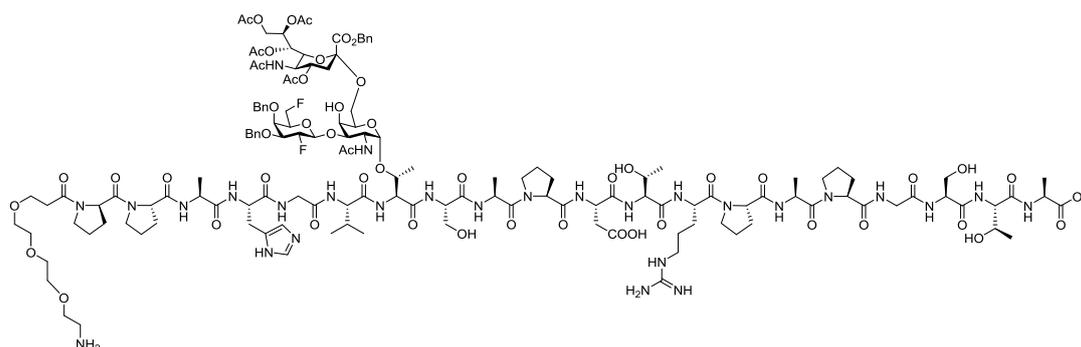
Struktur	Verbindung	Seite
	Fmoc-Thr-(β-Bn_{2,6}F₂Gal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]-α-GalNAc)-OH (132)	219
	Fmoc-Thr-(β-Ac_{3,6}F₂Gal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]-α-GalNAc)-OtBu (133)	221
	Fmoc-Thr-(β-Ac_{3,6}F₂Gal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,6)]-α-GalNAc)-OH (134)	223
	Fmoc-Thr-(β-Ac₂BnGal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)]-α-GalNAc)-OtBu (138)	228
	Fmoc-Thr-[α-6-(β-4-(β-Ac₂BnGal[α-2,3-Ac₄SiaCO₂Bn])-GlcNTroc)-3-(β-Ac_{2,6}FGal-(1→3)-[α-Ac₄SiaCO₂Bn-(2,3)])-αGalNAc]-OtBu (145)	230

Struktur	Verbindung	Seite
	<p>Fmoc-Thr-[α-4-(β-4-(β- Ac₂BnGal[α-2,3-Ac₄Sia- CO₂Bn])-GlcNTroc]-3-(β- Ac₂6FGal-(1→3))-α-Ac₄Sia- CO₂Bn-(2,3))]-αGalNAc]-OfBu (146)</p>	232
	<p>Fmoc-Thr-[α-6-(β-4-(β- Ac₂BnGal[α-2,3-Ac₄Sia- CO₂Bn])-GlcNAc]-3-(β- Ac₂6FGal-(1→3))-α-Ac₄- SiaCO₂Bn-(2,3))]-GalNAc]- OfBu (148)</p>	234
	<p>Amino-4,7,10-trioxadodecylamido-N-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3-O-[3,4,6-tri-O-benzyl-2-fluor-β-D-galactopyranosyl]-6-O-[benzyl(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-alanin (161)</p>	248

Struktur

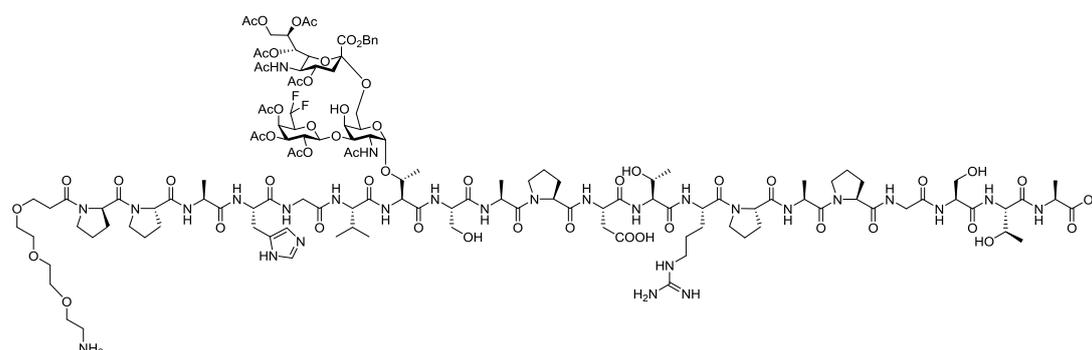
Verbindung

Seite



Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3-*O*-[3,4-di-*O*-benzyl-2,6-dideoxy-2,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (162)

250



Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-*N*-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6,6-difluor- β -D-galactopyranosyl]-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (163)

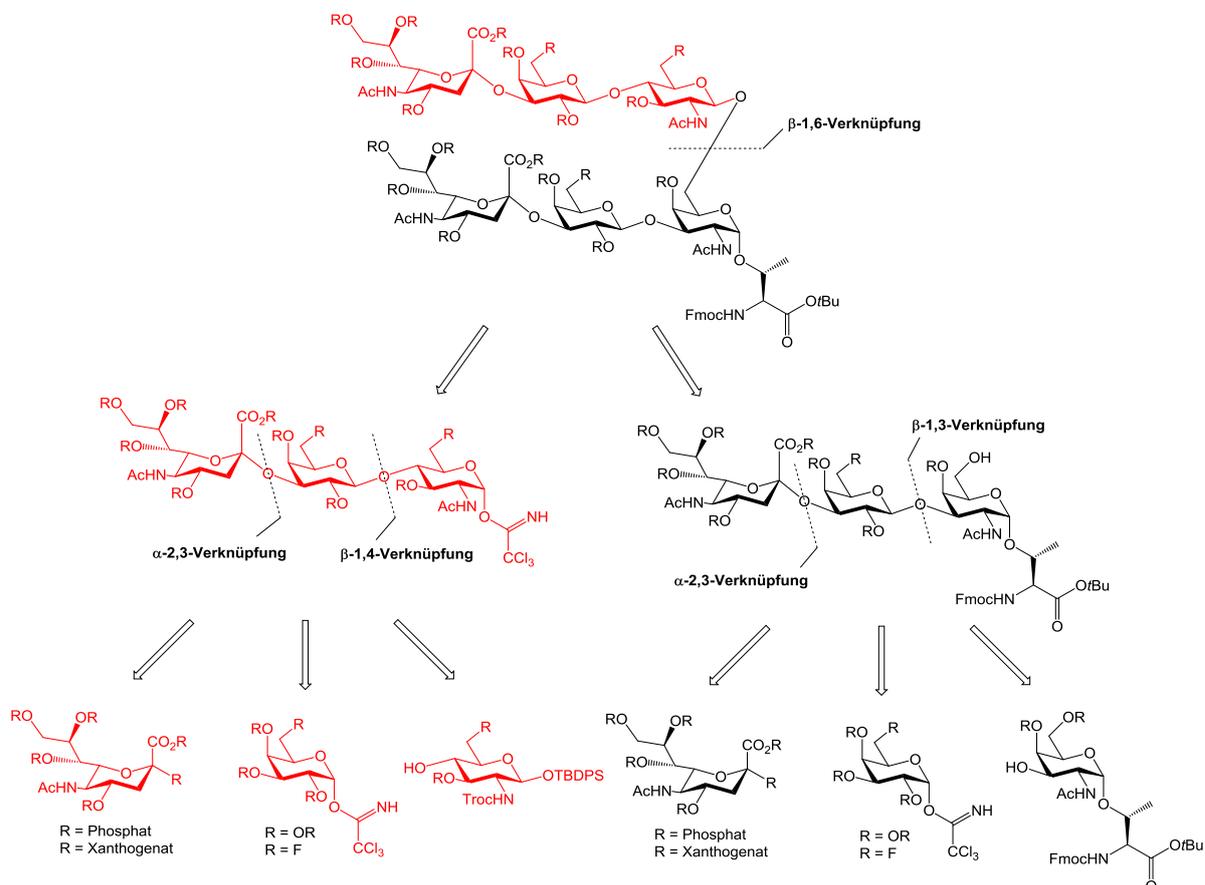
252

Struktur	Verbindung	Seite
	<p>Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-<i>N</i>-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-<i>O</i>-(2-acetamido-3-<i>O</i>-[6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl]-6-<i>O</i>-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alalin (164)</p>	254
	<p>1-(Amino-4,7,10-trioxadodecanylamido-<i>N</i>-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-<i>O</i>-(2-acetamido-3-<i>O</i>-[6-desoxy-6,6-difluor-β-D-galactopyranosyl]-6-<i>O</i>-[(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alalin)-2-ethoxy-3-cyclobuten-3,4-dion (166)</p>	256

7.3 Alternative Synthesevorschläge

Die nachfolgenden retrosynthetischen Betrachtungen sollen für zukünftige Arbeiten zwei alternative Zugänge zum komplexen Hexasaccharid-Epitop Sialophorin aufzeigen.

Die erste hier vorgestellte retrosynthetische Betrachtung schließt wie auch das in der vorliegenden Arbeit herangezogene Konzept eine finale β -1,6-Verknüpfung ein (Schema 7.1).

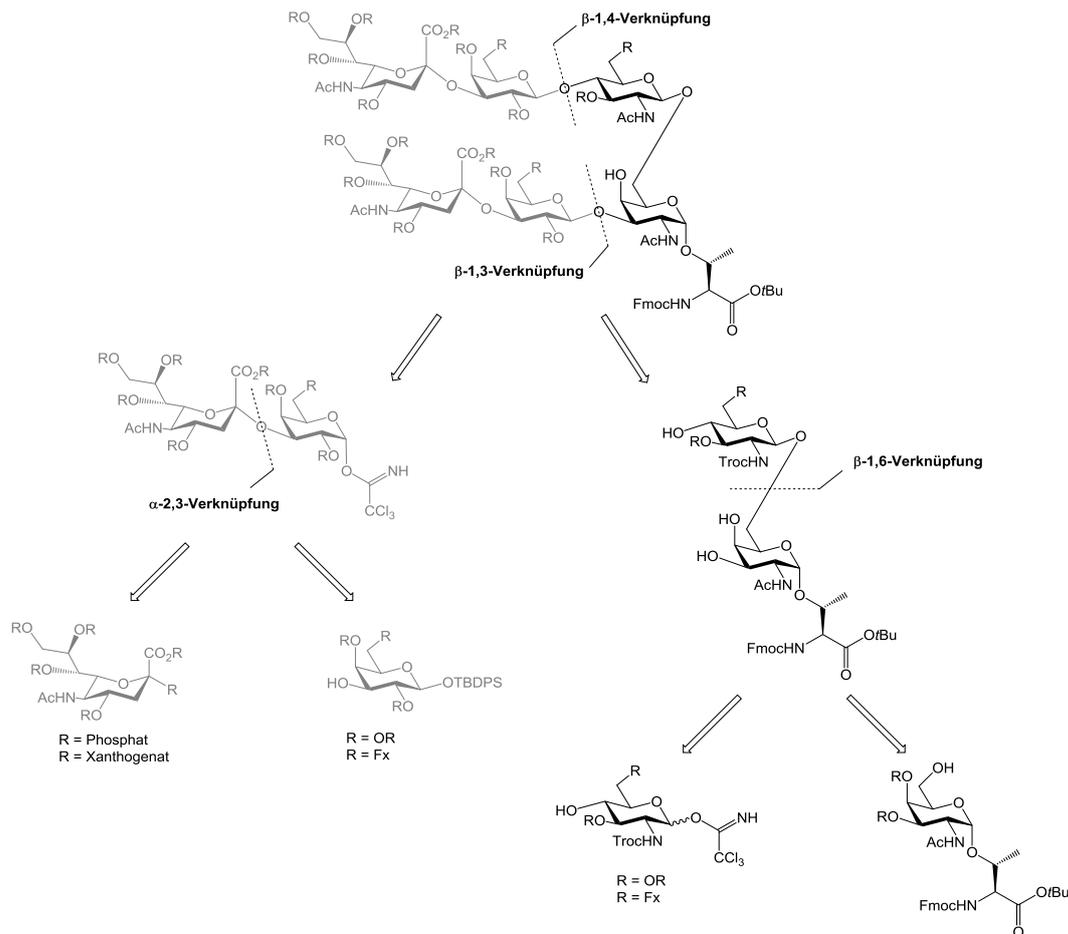


Schema 7. 1: Retrosynthetische Betrachtung eines modifizierten Zugangs zum Hexasaccharid-Epitop Sialophorin über eine finale Glycosylierung von zwei Trisaccharidbausteinen.

Der Aufbau der sialylierten Trisaccharid-Donoren kann über einen zentralen Glucosamin-Baustein bewerkstelligt werden, welcher zunächst eine Galactosylierung unter Darstellung der β -1,4-Verknüpfung vorsieht, wobei anschließend die Sialylierung unter Aufbau der (2,3)-sialylierten Bausteine erfolgt. Für die Synthese dieser Epitope können neben dem hier eingesetzten Sialinsäurexanthogenat unter Berücksichtigung der Reaktivität der vorliegenden Verbindungen auch Phosphatdonoren zum Einsatz kommen. Der limitierende Faktor im Aufbau sialylierten Oligosaccharide stellt ein zentrales Anliegen weiterführender Arbeiten dar. Die Synthese der Trisaccharid-Threonin-Konjugate kann in analoger Weise beschriftet werden, jedoch ist in dieser modifizierten Synthese der Aufbau eines T_N -Bausteins mit orthogonalen Schutzgruppen für die Hydroxylgruppen in der 3-, 4- und 6-Position erforderlich. Hierbei erfolgt zunächst der Aufbau der β -1,3-Verknüpfung zu den Disaccharid-Threonin-Konjugaten. Im weiteren Verlauf der Synthese wird die stereoselektive α -2,3-Verknüpfung zwischen der Neuraminsäure und dem Disaccharid-Baustein aufgebaut. Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg dieses Synthesekonzeptes ist im Folgenden die selektive Deblockierung der Hydroxylgruppe in der 6-Position des Galactosamins. Diese kann unter Umständen eine Acetalöffnung des

T_N -Bausteins zu einem früheren Zeitpunkt der Synthese erforderlich machen, da erste Versuche zur Acetalöffnung bzw. von Schutzgruppenmanipulation auf der Stufe der entsprechenden sialylierten Trisaccharid-Threonin-Konjugate im Rahmen dieser Arbeit nicht zum gewünschten Resultat führten. Zudem ist über ein angepasstes Schutzgruppenmuster dieses Bausteins nachzudenken um eine stereo- sowie regioselektive Glycosylierung dieser beiden Trisaccharid-Bausteine sicherzustellen.

Im Gegensatz hierzu soll die nachfolgende Synthesestrategie eine alternative Darstellung des Hexasaccharid-Epitops über einen zentralen β -1,6-verknüpften Akzeptorbaustein aufzeigen (Schema 7.2).



Schema 7. 2: Retrosynthetische Betrachtung eines modifizierten Zugangs zum Hexasaccharid-Epitop Sialophorin über die Glycosylierung von drei Disaccharidbausteinen.

Hierbei soll der Zugang zum Sialophorin-Epitop unter Verwendung von sialylierten Disacchariddonoren erfolgen, welche in den Glycosylierungen unter Aufbau der β -1,3- bzw. β -1,4-Verknüpfung eingesetzt werden sollen. Die Synthese sialylierter Disacchariddonoren kann wie zuvor angesprochen in gleicher Weise bewerkstelligt werden. Zunächst ist die Darstellung entsprechender Galactose-Akzeptorbausteine erforderlich, welche wiederum mit einem Neuraminsäurexanthogenat bzw. Phosphat umgesetzt werden. In diesem Fall wird wiederum auf Silylglycoside zurückgegriffen, da sich diese im Gegensatz zu Thio- bzw. Allylglycosiden im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit durchgeführten Sialylierungen bewährt haben. Die Darstellung des Akzeptorbausteins kann über ein Glucosamintrichloracetimidat mit dirigierender Carbamat-schutzgruppe und einem T_N -Baustein mit freier 6-Position erfolgen. In diesem Fall kann eine stereo- sowie

regioselektive β -1,6-Verknüpfung der beiden Monosaccharide sichergestellt werden. Die weitere Synthese zu den komplexeren Tetra- und Hexasaccharidbausteinen schließt nun die Umsetzung der sterisch anspruchsvollen sialylierten Disaccharidendonoren ein. Der Aufbau solcher Oligosaccharide sollte prinzipiell möglich sein, scheint jedoch wenig praktikabel, da zum einen der wertvolle Sialinsäurebaustein zu Beginn der Synthese eingesetzt werden muss und zum anderen diese an die unreaktiven sowie sterisch gehinderten sekundären Hydroxylgruppen der Glucosamin- bzw. Galactoseeinheit geknüpft werden müssen. Zur Kompensation dieser nachteiligen Effekte sollte durchaus die Verwendung reaktiverer Glycosyldonoren mit elektronenschiebenden Substituenten in Betracht gezogen werden. Zudem gilt es die Frage zu klären inwieweit eine simultane Einführung von beiden sialylierten Epitopen bewerkstelligt werden kann oder ob ein sukzessiver Aufbau der Epitope einen erfolgsversprechenderen Ansatz bietet. Es kann jedoch aufgrund fehlender Vergleiche mit der Literatur keine genaue Aussage über den Erfolg des hier postulierten Synthesekonzepts sowie das mögliche Auftreten von schwer zu charakterisierenden Produktgemischen erbracht werden. Als Vorteil dieses Synthesekonzepts ist der Aufbau der entsprechenden Bausteine über eine geringere Anzahl linearer Stufen zu sehen, welche möglicherweise die eingeschränkte Umsetzung der sialylierten Disaccharid-Donoren in den Glycosylierungsreaktionen kompensieren kann und weiterhin einen modularen Zugang zu einer Vielzahl von Derivaten ermöglicht.

Die beiden vorgestellten Synthesekonzepte konnten hierbei grundlegende Vor- sowie Nachteile im Aufbau der entsprechenden Oligosaccharide aufzeigen. Zum einen können aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit diverse Rückschlüsse über einen erfolgsversprechenden Zugang zu den komplexen Hexasaccharid-Bausteinen über die Synthese von zwei Trisaccharid-Fragmenten gelegt werden. Die Synthese eines modifizierten Galactosamin-Bausteins (T_N -Antigen) sollte prinzipiell leicht zu bewerkstelligen sein und sich zudem mit dem hier ausgearbeiteten Synthesekonzept unter Berücksichtigung eines angepassten Schutzgruppenmusters in Einklang bringen lassen. Zudem erfolgt der Aufbau der sterisch anspruchsvollen β -1,3- bzw. β -1,4-Verknüpfung zu einem frühen Zeitpunkt der Synthese und minimiert somit den Verlust wertvoller Oligosaccharid-Bausteine. Nachteilig wirkt sich auch in diesem Fall die eingeschränkte Reaktivität des verwendeten Neuraminsäurexanthogenats gegenüber den vorliegenden Disaccharid-Akzeptoren aus, welche stark limitierend für den Aufbau der entsprechenden sialylierten Epitope sind.

