

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

Herstellung und Charakterisierung
von artifiziellen Epitopen
des MUC1-(Glyco-)Peptids
unter Verwendung von
Aminosäuremimetika

Corinna Christine Jansen

aus

Bergisch Gladbach

2020

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 14. Februar 2020

.....
(Corinna Christine Jansen)

Dissertation eingereicht am: 14. Februar 2020

1. Gutachterin: Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder

2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Trapp

Mündliche Prüfung am: 29. Juli 2020

FÜR MEINE ELTERN

„There's a way to do it... find it! “

Thomas A. Edison

ABSTRACT

Obwohl es in den letzten Jahrzehnten bemerkenswerte Fortschritte bei der Behandlung von Tumorerkrankungen gab, zählen Tumorerkrankungen weiterhin zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Fortschritte auf dem Gebiet der Krebsimmuntherapie haben in den letzten Jahren zu einem verbesserten Verständnis der zellulären Mechanismen einer spezifischen Antitumor-Antwort und zu einem verstärkten Interesse an der Entwicklung einer aktiven Immuntherapie mit Hilfe von Antitumorvakzinen geführt. Als zentrale Zielstrukturen wurden beispielsweise Partialstrukturen der Oberflächenglycoproteine aus der Mucinfamilie genutzt. Deren tumorassoziierte Formen sind charakteristisch gekennzeichnet durch Überexpression und das Auftreten von spezifisch veränderten Kohlenhydratseitenketten sowie durch frei zugängliche Peptidsequenzen. Tumorimpfstoffe (Vakzine), die auf diesen charakteristischen Strukturmerkmalen basieren, haben das Ziel, eine starke und permanente Immunantwort selektiv gegen Tumorzellen zu induzieren. Dies ist jedoch aufgrund der geringen Immunogenität der Glycoproteinantigene und der Toleranz des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen von besonderer Schwierigkeit. Ferner sind die Vakzine, welche den natürlichen Glycopeptidstrukturen nachempfunden wurden, nicht vor proteolytischen und enzymatischem Abbau geschützt. Dies führt zwangsläufig zu einer schlechten Bioverfügbarkeit. Eine Möglichkeit die Immunogenität der tumorassoziierten Antigene zu erhöhen, beruht auf dem gezielten Einbau kleiner, struktureller Modifikationen mit Hilfe der chemischen Synthese.

Vor diesem Hintergrund befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Synthetisierung neuer Mimetika-Strukturen, die gezielt in die *tandem repeat* Sequenz des Mucins MUC1 eingesetzt werden, zur Herstellung neuartiger, artifizeller Epitope des MUC1-(Glyco-)Peptids. Hierbei wurden zum einen Vertreter einer neuen Klasse von MUC1-analogen Glycopeptidkonjugaten entwickelt. Die Struktur dieser Peptidmimetika (α -AA- und γ -AA-Glyco-Peptid-Bausteine) ist auf das *N*-Alkylierte-*N*-aminoethyl-Aminosäuren basierende Peptid zurückzuführen. Ferner wurden weitere gezielte chemische Modifikationen in das Peptidrückgrat der MUC1-Glycopeptidantigene eingeführt, wobei hierfür fluorierte Proline zum Einsatz kamen. Das Ziel dieser Epitop-Synthesen, bei denen wichtige immundominante Peptidsequenzen durch den strategischen Einbau der nicht-natürlichen Aminosäurebausteine metabolisch stabilisiert werden, bestand darin, dass diese Epitope als potentielle Kandidaten neuer Antitumorvakzine eingesetzt werden können.

In einem weiteren Projekt innerhalb dieser Forschungsarbeit, wurden die räumlichen Strukturen und die Stabilität ausgewählter artifizeller Epitope untersucht. Dies konnte durch NMR-Experimente und gezielter Abbaustudien erreicht werden. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse ebnet so den Weg für die Entwicklung neuer Klassen von vollsynthetischen Vakzinkandidaten.

ABSTRACT

Although there has been remarkable progress in the treatment of tumor diseases in recent decades, tumor diseases are still among the most frequent causes of death worldwide. Advances in cancer immunotherapy in recent years have led to an improved understanding of the cellular mechanisms of a specific antitumor response and to an increased interest in the development of active immunotherapy using antitumor vaccines. For example, partial structures of the surface glycoproteins of the mucin family were used as central target structures. Their tumor-associated forms are characterized by overexpression and the occurrence of specifically altered carbohydrate side chains as well as freely accessible peptide sequences. Tumor vaccines based on these characteristic structural features are designed to selectively induce a strong and permanent immune response against tumor cells. However, this is particularly difficult due to the low immunogenicity of glycoprotein antigens and the tolerance of the immune system to the body's own structures. Furthermore, the vaccines, which are modelled on the natural glycopeptide structures, are not protected against proteolytic and enzymatic degradation. This inevitably leads to poor bioavailability. One possibility to increase the immunogenicity of tumor-associated antigens is the targeted incorporation of small structural modifications with the aid of chemical synthesis.

Against this background, the research project focuses on the synthesis of new mimetic structures, which are selectively inserted into the tandem repeat sequence of the mucin MUC1, to prepare novel, artificial epitopes of the MUC1-(glyco-)peptide. On the one hand, representatives of a new class of MUC1-analog glycopeptide conjugate candidates were developed. The structure of these peptide mimetics (α -AA and γ -AA glycopeptide building blocks) is based on the *N*-alkylated-*N*-aminoethyl amino acid peptide. Further targeted chemical modifications were introduced into the peptide backbone of the MUC1 glycopeptide antigens using fluorinated proline. The aim of these epitop syntheses, in which important immunodominant peptide sequences are metabolically stabilized by the strategic incorporation of non-natural amino acid building blocks, was that these epitopes could be used as potential candidates for new antitumor vaccines.

In another project within this research project, the three-dimensional structures and stability of selected artificial epitopes were investigated. This was achieved by NMR experiments and specific degradation studies. The results obtained from these studies pave the way for the development of new classes of fully synthetic vaccine candidates.

DANKSAGUNG

Allen voran danke ich meiner Doktormutter Frau *Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder*, für Ihre freundliche Aufnahme in Ihren Arbeitskreis, die guten Arbeitsbedingungen, die vielfältige Unterstützung und Ihre unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Vielen Dank auch für die sehr interessante Themenstellung und den Freiraum, den Sie mir bei der Gestaltung meiner Dissertation gewährte. Darüber hinaus möchte ich mich auch für die Teilnahme an den vielen Symposien bedanken, bei denen ich meine Ergebnisse präsentieren durfte und neue Ideen sammeln konnte.

Herrn *Prof. Dr. Oliver Trapp* danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern meiner Prüfungskommission für Ihre Teilnahme an meiner Prüfung; namentlich Herr *Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff*, Frau *Dr. Stefanie Kellner*, Herr *Prof. Dr. Franz Bracher* und Herr *Prof. Dr. Thomas Carell*.

Auch bei der Analytik Abteilung in Haus F möchte ich mich bedanken, die mich vor allem, bei der Strukturaufklärung der Peptide unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderen Dank möchte ich *Ulla Hülsmann* aussprechen, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Als nächstes möchte ich mich ganz besonders bei meiner Laborkollegin im Prinzessinnen Labor *Amrei Deutsch* bedanken. Aus einer Kollegin ist eine sehr gute Freundin geworden. Vielen Dank für die vielen Teekränzchen, die hilfreichen und unterhaltsamen Gespräche und die vielen Tanzeinlagen im Labor.

Auch meinen vielen Studenten spreche ich meinen Dank aus. Dabei ist *Annabel Kitowski*, *Arlene Koch*, *Manuel Gailer* und *Heinrich Rudy* zu nennen. Die Arbeit mit euch war eine große Hilfe für mein Forschungsprojekt.

Für die Durchsicht meines Manuskripts und für die wertvollen Anmerkungen möchte ich ganz herzlich *Markus Daum* und *Elija Wiedemann* danken.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei meinen Freunden bedanken, mit denen ich in München eine wunderbare Zeit hatte. Hierbei zu nennen sind *Marc Steiner*, *Laura Sander*, *Christopher Weber*, *Kathrin Gärtner* und *Mareike Dellile*. Vielen Dank für die Ablenkung vom Chemie Alltag.

Für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich mich auch bei meinem Freund *Kai Welz* bedanken, der mich immer wieder motiviert hat die Arbeit zu einem Ende zu bringen.

Nicht zuletzt möchte ich mich natürlich auch bei meiner Familie insbesondere meinen Eltern und bei meinem Bruder bedanken, die stets an mich geglaubt haben und mich während meiner Zeit in München uneingeschränkt unterstütz und mir den nötigen Rückhalt gegeben haben. Danke *Johannes!* Danke *Mama!* Danke *Papa!*

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4R-Hyp	4-(<i>R</i>)-Hydroxyprolin
°C	Grad Celsius
α	Drehwert
Å	Angström
A	L-Alanin
Absol.	Absolutiert
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Ala	L-Alanin
Alloc	Allyloxycarbonyl
APC	<i>antigen presenting cell</i> (Antigen-präsentierenden Zellen)
Äquiv	Äquivalente
Arg	L-Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
<i>Boc</i>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Bzn	Benzyliden
c	Konzentration
¹ Hex	Cyclohexan
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CPP	<i>cell penetration pepetid</i>
CPS	<i>capsular polysaccharide</i> (Kapselpolysaccharidstrukturen)
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
δ	chemische Verschiebung
D	L-Asparaginsäure
d	Tag/Tage
DAST	(Diethylamino)schwefeltrifluorid
DC	dendritischen Zellen oder Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DDA	Dimethyldioctadecyl-ammoniumbromid
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-ethyl

dest.	destilliert
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	<i>Epithelial Membrane Antigen</i>
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
F-AS	Fluorierte Aminosäuren
<i>Fmoc</i>	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl
<i>Fmoc-OSu</i>	<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimidylcarbonat
G	L-Glycin
g	Gramm
Gal	D-Galactose
α -GalCer	α -Galactosylceramid
GalNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose
ges.	gesättigt
Gew.-%	Gewichtsprozent
Gln	L-Glutamin
Glu	L-Glutaminsäure
Gly	L-Glycin
H	L-Histidin
h	Stunde
HATU	<i>N</i> -[(dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]-pyridin-1-ylmethylene]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphate- <i>N</i> -oxid
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
His	L-Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMFG	<i>Human Milk Fat Globule</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPG	hyperverzweigtes Polyglycerol
HPV	Humane Papillomaviren
HR-ESI-MS	<i>High resolution-electrospray ionization-mass spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
Ile	L-Isoleucin
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> (Schlitzschnecken-Hämocyanin)
konz.	konzentriert
XVI	

λ	Wellenlänge
Leu	L-Leucin
Lit.	Literaturangabe
Lys	L-Lysin
M	Molar
MALP2	Makrophagen-aktivierende Lipopeptid 2
MDM2	Murine double minute 2
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MMT	Monomethoxytrityl
mol	Mol
MPLA	Monophosphoryl-Lipid A
MS	Molsieb, Massenspektrometrie
MUC1-C	carboxylterminale Domäne
MUC1-N	aminoterminal Domäne
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMM	4-Methylmorpholin
NMP	Methylpyrrolidon
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
Nvoc	6-Nitroveratryloxycarbonyl
Oxyma	Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat
P	L-Prolin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEM	<i>Polymorphic Epithelial Mucin</i>
Ph	Phenyl
Poly(HPMA)	Poly(<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)methylacrylamid)
ppm	<i>parts per million</i>
Pro	L-Prolin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat
quant.	quantitativ
R	L-Arginin
R_f	Retentionsfaktor
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosynkinasen
S	L-Serin
SAM	S-Adenosylmethionin
SAR	<i>structure-activity-relationship</i> (Struktur-Wirkungsbeziehung)
Ser	L-Serin

SG	Schutzgruppe
Smp	Schmelzpunkt
SPPS	<i>Solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
T	L-Threonin
TAA	<i>Tumor associated antigen</i> (tumorassoziierte Antigene)
TACA	<i>Tumor associated carbohydrate antigen</i> (Tumorassoziierte Kohlenhydrat Antigene)
TBTU	<i>N</i> -[(1H-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-tetrafluoroborat- <i>N</i> -oxid
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	L-Threonin
TLR	Toll-like Rezeptor
TOCSY	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TTox	Tetanus-Toxoid
Tyr	L-Tyrosin
V	L-Valin
Val	L-Valin
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Methodenentwicklung in der Krebsimmuntherapie	1
1.1.1	MUC1 ein besonderes Glycoprotein.....	2
1.1.2	Tumorassoziiertes MUC1 – eine vielversprechende Targetstruktur.....	3
1.1.3	Moderne Entwicklungen von Impfstoffen auf Basis von MUC1	7
1.2	Antigenanaloga für die Krebsimmuntherapie – Mimetika.....	18
1.2.1	<i>N</i> -Alkylierte- <i>N</i> -aminoethyl-Aminosäuren	20
1.2.2	Fluorierte Aminosäuren – Fluor-Prolin	23
2	ZIELSETZUNG	33
3	ALLGEMEINER TEIL.....	35
3.1	Design von synthetischen Peptiden aus der <i>Tandem Repeat</i> -Sequenz des Mucin 1	35
3.1.1	(Glyco-)Peptidfestphasensynthese	37
3.1.2	Allgemeines Protokoll der mikrowellenunterstützten (Glyco-)Peptidfestphasen-synthese... ..	45
3.2	Synthese der Festphasenbausteine	49
3.2.1.	Synthese der Glycosylaminosäurebausteine.....	49
3.2.2	Synthese der fluorierten Prolinbausteine.....	66
3.2.3	Synthese des Spaceraminosäurebausteins	68
3.3	Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus der <i>Tandem Repeat</i> -Domäne des epithelialen Mucins MUC1	71
3.3.1	Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus der <i>Tandem Repeat</i> -Domäne des epithelialen Mucins MUC1, zum Einsatz als Vakzin-Vorstufe.....	72
3.3.2	Synthese von Peptiden aus der <i>Tandem Repeat</i> -Domäne des epithelialen Mucins MUC1 unter Einsatz von Fluorprolin für die Verwendung in Abbaustudien	78
3.3.3	Synthese von Glycopeptiden aus der <i>Tandem Repeat</i> -Domäne des epithelialen Mucins MUC1, unter Verwendung des α -AA-T _N -Mimetikum-Bausteins.....	82
3.4	Stabilitätstest mittels Abbaustudien	93
3.4.1	Aufnahme von Kalibrationskurven	93
3.4.3	Abbaustudien.....	94
4	ZUSAMMENFASSUNG	105
5	EXPERIMENTELLER TEIL	115

5.1	Allgemeine Arbeitsweisen.....	115
5.1.1	Verwendete Apparaturen und Messgeräte.....	115
5.1.2	Chromatographische Methoden	117
5.1.3	Chemikalien.....	117
5.2	Synthesevorschriften T-Antigen Festphasenbaustein	119
5.3	Synthesevorschriften des α -AA-T-Mimetikum Festphasenbausteins	137
5.4	Synthesevorschriften der F-Prolin Festphasenbausteine	145
5.5	Synthesevorschriften des Triethylenglycolspacer.....	155
5.6	Synthesevorschriften der Peptide zum Einsatz als Vakzin-Vorstufe	159
5.7	Synthesevorschriften der Peptide für Abbaustudien.....	191
5.8	Synthesevorschriften der Peptide unter Verwendung des α -AA-TN-Mimetikum-Bausteins	215
5.9	HPLC-Daten der Kalibrationsmessungen und Abbaustudien.....	229
5.9.1	Generelle Durchführung zur Erstellung der Kalibrationsgeraden	229
5.9.2	Generelle Durchführung zum enzymatischen Abbau mit Protinase K auf Eupergit [®] C	234
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	241
7	ANHANG.....	I
7.1	Spektroskopischer Anang	III

THEORETISCHER TEIL

1 EINLEITUNG

1.1 Methodenentwicklung in der Krebsimmuntherapie

Während der letzten Jahrzehnte gab es bemerkenswerte Fortschritte bei zielgerichteten Therapien in der Onkologie. Die Therapieansätze beruhen hierbei typischerweise auf der Modulation eines veränderten Signalübertragungsweges in der Tumorzelle. Trotz aller Fortschritte bleibt Krebs jedoch weiterhin eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen weltweit. Krebs stellt eine der komplexesten Erkrankungen dar und ist in Deutschland mit ca. 25% nach den Herz-Kreislaufkrankungen, die ca. 42% der Todesfälle hervorrufen, die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Erfreulicherweise sinkt die Sterblichkeit dieser beiden Krankheitsgruppen. Dieser Trend trägt jedoch zum Anstieg der Lebenserwartung bei. Ein Grund für die Krebsneuerkrankungen stellen die zunehmend hohen Lebenserwartungen und die steigende Belastung des Menschen durch Umwelteinflüsse, sowie Angewohnheiten wie Rauchen, Bewegungsmangel und ungesunder Ernährung dar. Laut Statistiken hat zwischen 2006 und 2016 die absolute Zahl der Krebsneuerkrankungen bei Männern um 2%, bei Frauen um 5% zugenommen.^[1] Ein Grund des Anstiegs ist auch hier der demographische Wandel und der damit verbundene Umbau der Alterszusammensetzung der Bevölkerung, hin zu deutlich mehr älteren Menschen. Die demographischen Veränderungen in Industrieländern, wie in Deutschland lassen deutlich höhere Krebserkrankungszahlen auch in Zukunft erwarten. So nehmen die Bevölkerungszahlen insgesamt ab, wobei die Zahl der älteren Menschen steigt, während der Anteil junger Menschen in der Bevölkerung zurückgeht. Durch die sinkenden Bevölkerungszahlen steigt in Abhängigkeit dazu die Krebslast der Bevölkerung stark an. Eine ältere Gesellschaft führt sogar nach prognostizierten Berechnungen zu mindestens 23% Krebsneuerkrankungen zwischen den Jahren 2015 und 2030.^[1] In den folgenden Jahren wird somit die Erforschung effizienter und personalisierter Therapieansätze an Bedeutung gewinnen, da Erfolge der zielgerichteten Therapien auf Grund von Tumorresistenzen derzeit häufig nur kurz anhalten. Dies erfordert somit neue onkologische Behandlungsformen, um langfristige Erfolgsaussichten für Patienten zu ermöglichen.

Ein Wandel in der Krebstherapie ausgehend von relativ unspezifischen Behandlungen wie Chemotherapie, Bestrahlung und chirurgischen Eingriffen führte in der Vergangenheit immer mehr zu personalisierten und zielgerichteten Behandlungen.^[2] Zwar ist die chirurgische Resektion sowie die Strahlentherapie oft erfolgreich in der Entfernung von Primärtumoren, jedoch kommt es häufig zur erneuten Tumorbildung aufgrund von Resttumorzellen und/oder Metastasen. Daher reicht eine solche Therapie oft allein nicht aus und steht somit häufig in Verbindung mit einer sich anschließenden Chemotherapie. Problematisch hierbei ist der Umstand, dass sich nicht nur schnell teilende Tumorzellen mittels der Zytostatika, sondern auch gesunde Zellen mitzerstört werden.^[3] Außerdem gehen mit der klassischen Chemotherapie oft Nebenwirkungen wie Myelosuppression, Magen-Darm-Syndrome und Haarausfall einher. Eine schonende Alternative dazu ist erstrebenswert.

Hierzu stellt die Krebsimmuntherapie eine alternative Behandlung dar. Hierbei wird versucht das körpereigene Immunsystem zur Krebsbekämpfung zu nutzen. Die Krebsimmuntherapie wird heute in zwei Formen angewendet; der prophylaktischen und der therapeutischen Form. In der prophylaktischen

Anwendung werden Vakzine beispielsweise erfolgreich gegen viral verursachte Tumore verabreicht, um die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen aufgrund chronischer Hepatitis B-Infektionen^[4] oder Gebärmutterhalskrebs durch humane Papillomaviren (HPV)^[5] zu vermeiden. Die therapeutische Anwendung dagegen scheiterte lange Jahre an dem fehlenden Verständnis der Immunantwort.

Da in den letzten Jahren viele Forschungsergebnisse im Bereich der molekularen Mechanismen des Tumorwachstums, der Metastasierung und der immunologischen Erkennung von Neoplasien erzielt wurde, ist es nunmehr möglich geworden, auf dieser Basis neue zielgerichtete Behandlungsverfahren („*target therapies*“) zu ermöglichen. So weisen die neuen Wirkstoffe eine hohe Spezifität für Tumore auf, sodass es bei derartiger Therapie möglich ist, Krebszellen selektiv zu zerstören während normales/gesundes Gewebe nur minimal angegriffen wird. Dabei zeigten sich bereits in Studien, dass es bei dieser Art von Behandlung zu einer Verbesserung der Lebensqualität und der Verträglichkeit sowie eine geringere Wahrscheinlichkeit der Remissionsrate aufgrund der gedächtnisgebundenen Immunantwort kommt.^[6]

Um eine gezielte Bekämpfung von Krebs zu gewährleisten, ist es wichtig die Identifikation von Krebsgenen und die tumorabhängigen Signalwege zu erkennen, welche für das Tumorwachstum und das Überleben wichtig sind, und die biologischen Abläufe dieser Zellen zu verstehen. Aufgrund der Komplexität von Krebserkrankungen ist es zweckdienlich bestimmte Merkmale und Eigenschaften ausfindig zu machen, die den meisten Tumorarten gemein sind und sich vor allem von normalen Zellen unterscheiden.

Neuere immunmodulatorische Behandlungen wie beispielsweise „*checkpoint inhibitors*“ haben gezeigt, dass viele Arten von menschlichem Krebs endogene Immunantworten auslösen. Diese Erkenntnis soll dazu genutzt werden, um eine körpereigene Tumorabstoßung bewirken zu können.^[7] Leider reagieren die meisten Krebspatienten nur unvollständig oder überhaupt nicht auf eine solche Immunmodulation. Dies spiegelt das Fehlen einer brauchbaren endogenen Immunantwort wider.^[8, 9] Bei derartigen therapieresistenten Krebsarten müssen zusätzliche Strategien zur Anwendung kommen, wie beispielsweise die Impfung gegen Tumorantigene, um eine erhöhte Immunreaktion erreichen zu können.^[10] MUC1 stellt hierbei ein sehr attraktives Antigen dar, da es bei den meisten menschlichen Krebsarten eine hohe Expressionsrate aufweist.^[11, 12]

1.1.1 MUC1 ein besonderes Glycoprotein

MUC1 auch bekannt unter PEM (*Polymorphic Epithelial Mucin*), Episialin, DUPAN-2, DF3, HMFG (*Human Milk Fat Globule*), EMA (*Epithelial Membrane Antigen*) sowie CD227 stellt ein wichtiges membrangebundenes Mucin dar.^[13] Isoliert wurde MUC1 bereits aus einer Vielzahl an Gewebeproben einschließlich Mamma-Epithelzellen,^[14, 15] Eierstockzellen^[16] und Pankreaszellen.^[17] MUC1 liegt in diesen Geweben im Kernprotein stets identisch vor, jedoch ist die Zuckerstruktur der verschiedenen Gewebe stark variabel. So schwankt das Molekulargewicht von 250 bis 500 kDa in der Brustdrüse^[18] bis zu 1000 kDa in der Bauchspeicheldrüse.^[19]

MUC1 ist auf der apikalen Membran der Epithelzellen lokalisiert.^[20] Das MUC1-Gen codiert für ein transmembranassoziertes Protein, welches durch Autoproteolyse in zwei verschiedene Domänen, die N-terminale sowie die C-terminale Untereinheit, aufgespalten wird.^[21-25] Die aminoternale Domäne (MUC1-N), welche circa zwei Drittel des Kernproteins ausmacht, enthält eine hochkonservierte *Tandem Repeat-2*

Sequenz aus 20 Aminosäuren, welche stark *O*-glycosyliert vorliegt.^[26, 27] Diese *Tandem Repeat*-Sequenz ist reich an Prolin, Threonin und Serin, wobei diese drei Aminosäuren einen Anteil von bis zu über 60% der Aminosäuren ausmachen. Der hohen Grad an *O*-Glycosylierungen innerhalb der *Tandem Repeat*-Sequenz variiert leicht, wobei die Oligosacharidketten meist bis zu 50% des Gewichts des Peptids ausmachen. Häufig tritt während der Zellteilung Rekombination auf, wodurch die endgültige Anzahl an *Tandem Repeat*-Sequenzen der einzelnen Mucine sehr variabel ist.^[28] Sie werden als VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) bezeichnet und können von 25 bis zu 125 Wiederholungen aufweisen. Die carboxylterminale Untereinheit (MUC1-C) ist aus drei Domänen zusammengesetzt, der 58 Aminosäure-langen extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne aus 28 Aminosäuren und zuletzt der intrazellulären Domäne im Zytoplasma aus 72 Aminosäuren.^[26]

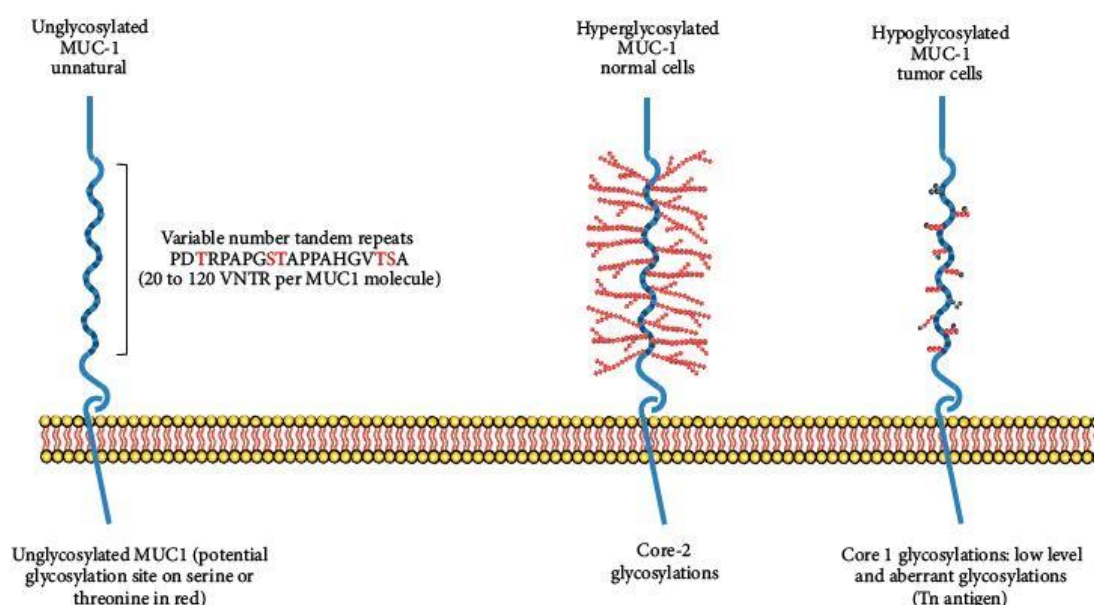


Abbildung 1.1: Molekularer Aufbau des MUC1-Glycoprotein; unglycosyliert (links), in einer gesunden Zelle (mittig) und in einer Tumorzelle (rechts).^[29]

Zusammen mit der MUC1-N-Unterdomeäne formt die transmembrangebundene MUC1-C-Unterdomeäne einen nicht-kovalent gebundenen Komplex, sodass die aminoternale Domäne mit der Zelloberfläche verankert ist (Abbildung 1.1). Mit der vollen *O*-Glycan-Einheit in der Membran verankert, liegt das MUC1 meist in seiner getreckten stabförmigen Konformation vor und weist aufgrund seines Glycanmusters eine Größe bis zu 500 nm auf.^[30, 31] Dieser Komplex kann jedoch aufgebrochen werden, sodass die MUC1-N-Einheit von der Zelloberfläche freigesetzt wird, dabei dient die MUC1-C Domäne wahrscheinlich im Anschluss als Rezeptor welcher in verschiedenen Signalwegen beteiligt ist, wie etwa dem Tumorwachstum.^[32]

1.1.2 Tumorassoziiertes MUC1 – eine vielversprechende Targetstruktur

Viele Epithelzellen bilden zusammen eine Zellschicht aus. Aufgrund ihrer Polarität formen sie eine klare Struktur, welche die apikale Seite von der basalen Seite trennt. Epithelzellen sind auf der Oberfläche von Organen wie den Atemwegen, des Gastrointestinal Trakts oder des Lumens vorzufinden. Mucine wie das

MUC1 liegen in gesunden Zellen sezerniert oder transmembranegebunden auf der apikalen Seite vor. Verliert die Epithelzelle jedoch ihre Polarität aufgrund von Stress, liegen diese Mucine nicht nur auf der apikalen Seite vor, sondern sind über die ganze Zelle verteilt und treten daher mit Zelloberflächenproteine in Kontakt, die unter normalen Bedingungen nur auf der basalen Membran vorliegen.^[33] Aus diesem Grund kommt es bei Krebszellen vor, das Mucine mit Rezeptortyrosynkinasen (RTK), welche in normalen Zellen nur auf der basalen Seite vorkommen, interagieren. Der Verlust der Polarität kann in den Epithelzellen ein Reparaturmechanismus auslösen, der die Polarität wiederherstellen kann. Bei Krebszellen ist dieser Vorgang jedoch nicht mehr möglich und die Polarität geht irreversibel verloren.^[33] Ausgelöst durch die Zellveränderung und des Verlusts von Polarität ist MUC1 hoch exprimiert auf der gesamten Oberfläche von verschiedenen Krebszellen vorzufinden (Abbildung 1.2).^[20]

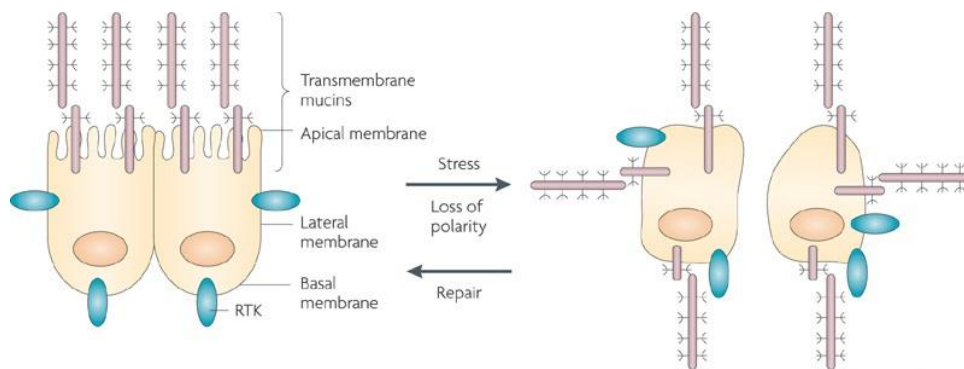


Abbildung 1.2: Verlust der Polarität von Epithelzellen aufgrund von Stress.^[24]

Neben dem Verlust der Polarität in Krebszellen verändert sich auch das Glycosylierungsmuster der MUC1-*N-Tandem-Repeat*-Domäne im Vergleich zu normalen Zellen, was aus einer veränderten Expression von Glycosyltransferasen resultiert (Abbildung 1.1).^[34] Das veränderte Glycosylierungsmuster von MUC1 tritt bei unzähligen Tumorarten auf, sodass die MUC1-Überexpression eine der häufigsten zellulären Veränderungen innerhalb von menschlichen Krebserkrankungen darstellt.^[24] Ferner hat sich gezeigt, dass ein verändertes Glycosylierungsmuster von MUC1 eine Rolle innerhalb der Immunabwehr von Tumoren spielt.^[35]

Wie wichtig ein korrektes Glycosylierungsmuster ist, zeigen verschiedenen Autoimmun- und Infektionskrankheiten sowie Krebs. Das veränderte Glycosylierungsmuster wurde sogar als Auslöser dieser Krankheiten identifiziert. Glycane welche typischerweise in Krebszellen vorkommen sind in vielen grundlegenden Prozessen involviert, wie beispielsweise Entzündungen, Immunüberwachung, Zell-Zell-Adhäsion,^[36-38] Zell-Matrix Interaktionen,^[36] Inter- sowie Intrazellulären Signalprozessen^[39-42] und Zellulären Stoffwechsel.^[43-45]

Die Verbindung zwischen der Veränderung der Glycosylierungen und der Tumorbildung wurde bereits vor siebzig Jahren durch *Ladenson et al.* und *Hakomori et al.* aufgezeigt.^[46, 47] Durch die Bereitstellung von neuen Technologien unter Zuhilfenahme von monoklonalen Antikörpern konnte diese These bestätigt werden. Im Zuge dieser Untersuchungen deckte man erstmalig tumorspezifische Antikörper gegen Kohlenhydrat epitope auf.^[48, 49] Außerdem wurde aufgeklärt, dass Krebszellen spezifische Glycosyl-Epitope

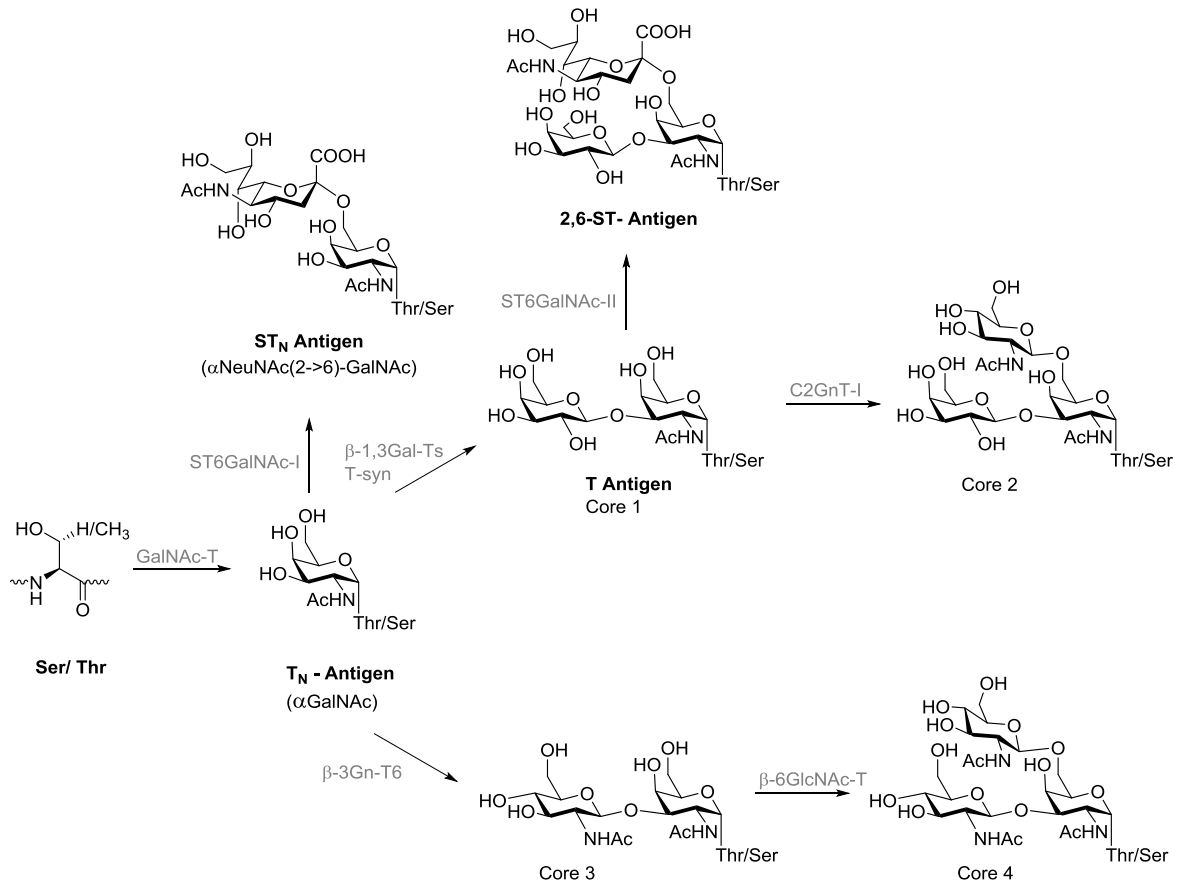
aufweisen, so genannte tumorassoziierte Antigene (TAA's). Diese TAA's können sowohl für die Immuntherapie als auch als diagnostische Marker herangezogen werden, da sie tumorspezifisch sind.

Verschiedene Faktoren während des Glycosylierungsprozess führen zu einem veränderten Glycosylierungsmuster auf Krebszellen. Laut Forschungen von *Hakomori* und *Kannagi* sind vor allem zwei Mechanismen für das Auftreten von TAA's verantwortlich.^[43, 50] Ein erster Grund stellt die unvollständige/blockierte Synthese dar, welche zur Ausbildung von verkürzten Glycanstrukturen führt. Der andere Grund sind die auftretenden Neosynthesen.^[51, 52] Die unvollständige Synthese tritt vor allem in den frühen Stadien des Tumorwachstums auf. Dabei werden einzelne oder mehrere Glycosyltransferasen blockiert, sodass es zu einer unvollständigen Synthese von komplexen Glycanstrukturen kommt. In späteren Stadien des Tumorwachstums tritt dagegen die Neosynthese vermehrt auf, welche für die Terminierung von Kohlenhydraten verantwortlich ist.^[53] Die Neosynthese beschreibt dabei die Synthese von tumorassoziierten Kohlenhydrat Antigenen (TACA), welche nur auf Krebszellen zu finden sind. Diese wird durch die vermehrte Expression von spezifischen Genen beeinflusst. Das einfachste TACA ist das sialylierte T_N-Antigen (ST_N), welches nahezu auf allen Krebszellen vorkommt; kaum jedoch auf normalen Zellen (Schema 1.1). Das tumorassoziierte MUC1 ist wegen seiner Überexpression und seinem veränderten Glycosylierungsmuster auf fast allen Arten von epithelialen Tumorzellen ein attraktives Zielmolekül für eine Krebsimmuntherapie.^[54]

Wie bereits erwähnt ist die *Tandem Repeat*-Domäne innerhalb des Peptidrückgrats des Mucin MUC1 ein wichtiges Strukturmerkmal. Diese Domäne weist eine unbestimmte Anzahl an sich wiederholenden Einheiten auf. Sie wird wegen ihrer Vielzahl an Prolin, Threonin und Serin auch PTS-Domäne genannt.^[55-57] Innerhalb dieser zentralen Domäne sind aufgrund der hohen Anzahl von Serin und Threonin wie zu erwarten meist *O*-glycosidische Bindung vorzufinden.^[58] Demnach variiert die Anzahl der *O*-Glycosylierungen in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungseinheiten der PTS-Domäne.^[58] *O*-Glycane werden mittels Enzymen wie Glycosyltransferasen und Sulfotransferasen (eine Familie der UDP-GalNAc Enzyme (Polypeptid-GalNAc-Transferasen (GalNAc-Ts)) im Golgi-Apparat durch eine Reihe von katalysierten Reaktionen aufgebaut, man spricht hier von einer post-posttranslational Modifizierung.^[59-63] Dabei wird der erste Zuckerbaustein entweder *O*-glycosidisch an die Aminosäuren Serin oder Threonin, oder *N*-glycosidisch an Asparagin des Peptidrückgrat gebunden.^[61, 63, 64] Die Biosynthese der Mucin typischen *O*-Glycane beginnt stets mit dem Kernfragment 2-Acetamido-2-deoxy-D-galactose (GalNAc).^[63-66] Dieser Kern wird auch als T_N-Antigen bezeichnet. Die Verlängerung der Monosacchariden zu Disacchariden oder Polysacchariden erfolgt im Anschluss enzymatisch. Ausgehend vom Kernstrukturelement T_N-Antigen wird dieses in normalen Zellen mittels diverser gewebespezifischer Glycosyltransferasen durch verschiedene Saccharide (*O*-Mannose, *O*-Fucose, *O*-Galactose und/oder β -*N*-Acetylglucosamin) enzymatisch verlängert oder durch Sialinsäure beziehungsweise Fucose terminiert, was zu sogenannten Mucin-Typ-Glycosiden führt (Schema 1.1).^[65, 67, 68]

Derzeitig sind acht Core-Strukturen ausgehend vom T_N-Antigen bekannt, welche auch in dem folgenden Schema 1.1 aufgezeigt sind. Die Core 1 Struktur, auch bekannt unter Thomsen-Friedenreich-Antigen kurz T-Antigen, wird mit Hilfe der T-Synthase (Core-1-Synthase) katalytisch über eine β -1,3-Verknüpfung von Galactose ans T_N-Antigen zu einem Disaccharid aufgebaut. Neben der Erweiterung des T_N-Antigens zum T-Antigen kann dieses auch durch eine Verknüpfung mit *N*-Acetylglucosamin zum Disaccharid Core 3

aufgebaut werden. Beide Disaccharide können außerdem durch eine weitere Verknüpfung von *N*-Acetylglucosamin zu den Trisacchariden Core 2 und Core 4 erweitert werden. Vermittelt wird diese Reaktion durch das Enzym β -1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase.^[69] Welche Core Struktur auf den Mucinen vorliegt ist abhängig von der relativen Aktivität der Glycosyltransferasen. Endständig werden die Oligosaccharide durch Sialylierung, Fucosylierung oder Sulfatisierung glycosyliert.



Schema 1.1: Biosynthese der Glycanstrukturen in normalen Zellen.

Das Glycanprofil von tumorassoziiertem MUC1 ist gegenüber dem von MUC1 auf normalen Zellen charakteristisch verändert. Das gilt besonders für die extrazelluläre Domäne, die aus einer variablen Zahl von Wiederholungseinheiten der Sequenz PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA besteht, die wiederum fünf potenzielle *O*-Glycosylierungsstellen (T7, S8, T12, S18 und T19) enthält.^[70-73] Wegen der Herunterregulierung einer Glucosaminyltransferase und der gleichzeitigen Überexpression von Sialyltransferasen finden sich auf MUC1 von Tumorzellen oft kurze, vorzeitig sialylierte Saccharidseitenketten.^[24, 74-78] Solche tumorassoziierten Kohlenhydrate sind das Thomsen-Friedenreich-Antigen (T-Antigen), seine Vorstufe (T_N-Antigen) und deren sialylierte Derivate ST_N oder 2,6-ST.^[79, 80] Komplexere Glycanstrukturen können nicht mehr aufgebaut werden, da die notwendigen Enzyme inaktiviert sind.

Während T-Antigene auf gesunden Zell-Membranen durch lange Kohlenhydratketten oder durch negativ geladene Sialinsäuren abgeschirmt sind, liegen die T-Antigene im tumorassoziierten MUC1 frei (Abbildung 1.1).^[81-85] Durch die verkürzte Glycan-Struktur und den dadurch entstandenen tumorselektiven Strukturmotiven (β -turn), werden zudem mit RPAPGS, PPAHGVT und PDTRP als immunodominante Domänen minimal Peptidpitope für das Immunsystem zugänglich.^[86-88] Das tumorselektive Strukturmotiv

wird erreicht durch das veränderte Glycosylierungsmuster, welches wiederum zur Wechselwirkung der Saccharide mit dem Peptid-Rückgrat führt, was eine Unterbrechung der α -Helix bedingt und zur Ausbildung von β -turns führt. Diese Konformationsänderungen werden durch stereoelektronische Effekte wie den *exo-anomeren Effekt*, als auch durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen der N-H-Bindung der N-Acetyl-Gruppe des GalNAc-Bausteins und der Carbonylgruppe, der benachbarten Aminosäure verursacht.^[89] Auch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Carbonylgruppe der glycosylierten Threonin- oder Serin-Seitenkette trägt zur Konformationsänderung bei.^[90, 91] So bilden die tumor-assoziierten T_N- und T-Antigene β -Typ-III'- und β -Typ-II-turns aus.^[91]

1.1.3 Moderne Entwicklungen von Impfstoffen auf Basis von MUC1

Die Funktion des Immunsystems, ein hoch spezifisches und anpassungsfähiges System, liegt vor allem in der Erkennung von Veränderungen von Proteinen, Glycoproteinen sowie der Zellstrukturen. Man unterscheidet zwischen der angeborenen und der spezifische oder adaptiven Immunantwort. Die angeborene Immunantwort erfolgt bereits innerhalb weniger Minuten nach der Infektion; diese ist jedoch unspezifisch. Sie wird durch Granulozyten und durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie etwa dendritische Zellen (DC) und Makrophagen, sowie Cytokine und Chemokine vermittelt. Die angeborene Immunantwort ist durch die Erbinformation lebenslang festgelegt.^[92, 93]

Die adaptive Immunantwort, früher auch „erworbenes Immunsystem“ genannt, wirkt im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort erst nach einigen Tagen bis hin zu einigen Wochen. Sie ist im Vergleich dazu jedoch antigenspezifisch und langanhaltender aufgrund der ausgebildeten Gedächtniszellen.^[92] Neben antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen, sind vor allem die T- und B-Lymphozyten wesentliche Elemente der adaptiven Immunität. Nach einer erfolgreichen Immunabwehr bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten. Diese ermöglichen es bei erneutem Kontakt mit dem identischen oder einem ähnlichen Krankheitserreger binnen kurzer Zeit eine angemessene Abwehrreaktion zu ermöglichen.

Das Immunsystem ist theoretisch in der Lage, auf bzw. gegen nahezu jedes Makromolekül mit Hilfe eines entsprechenden Stimulus spezifisch zu reagieren. Dies ist für die Entwicklung neuartiger Vakzine maßgeblich. Geeignete Zielstrukturen, gegen die eine körpereigene Immunantwort hervorgerufen werden soll, sind in der Regel Zelloberflächenstrukturen. Hierbei ist es völlig unerheblich, ob es sich um pathogene Organismen, wie beispielsweise Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten oder aber um körpereigene entartete Zellen wie im Krebsfall handelt. Eine wichtige Voraussetzung ist jedoch, dass sich die Zelloberflächenzielstruktur, auch bekannt als antigene Determinante oder sogenanntes B-Zell-Epitop, der invasiven oder malignen Zelle klar und definiert von gesunden Zellverbänden des Wirtsorganismus unterscheidet.^[94]

Um die adaptive Immunantwort nun innerhalb der Entwicklung von spezifischen Antitumor-Vakzinen ausnutzen zu können, wurden folgende drei Kriterien entwickelt, die unbedingt erfüllt werden sollten:

1. Die induzierte Immunantwort sollte stärker sein, als die Toleranz gegenüber solchen Antigenen wie Glycolipide und Glycoproteine, die auf normalen Zellen vorkommen.^[95-98]
2. Das präsentierte Antigen muss tumorspezifisch, stark überexprimiert und sich von der Struktur der normalen Zellen deutlich unterscheiden.^[99, 100]

3. Die Immunantwort muss hochselektiv sein, damit es nicht zu einer Autoimmunantwort gegenüber den normalen Zellen kommt.^[101-103]

Das Mucin MUC1 bedient die letzten zwei Kriterien und ist eins der vielversprechendsten Target Strukturen in der Entwicklung von Immuntherapien gegen Krebs.^[24, 104-106] So wurde das Mucin MUC1 2009 vom *National Cancer Institute of the USA* zum zweitwichtigsten Tumorantigen erklärt.^[104] Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, resultiert das veränderte Glycosylierungsmuster des tumorassoziierte MUC1 aus der *down*-Regulierung der Glucosamintransferase GnT2 und der *up*-Regulierung der Sialyltransferase, sodass vermehrt die Kohlenhydratstrukturen wie T_N- oder ST_N-Antigen vorzufinden sind.^[107-110] Aufgrund des veränderten Glycosylierungsmuster, liegt der Vorteil der Mucin glycobasierten Vakzine in der zielgerichteten Krebstherapie. Hierbei wird das Glycosylierungsmuster von normalen/gesunden Zellen immunologisch nicht angegriffen.

Problematisch ist jedoch die Tatsache, dass die MUC1 TACA nur schwach immunogen sind und nur eine T-Zell unabhängige Immunantwort hervorrufen.^[111, 112] Die T-Zell vermittelte Immunantwort ist jedoch von entscheidender Bedeutung in der Krebsimmuntherapie.^[113] Des Weiteren werden die meisten TACA von dem Immunsystem toleriert.^[114] Obwohl der genaue Mechanismus der Immuntoleranz nicht vollständig verstanden wird, wird davon ausgegangen, dass eine niedrige Expression von TACA mit ähnlicher Struktur zu normalen Antigenen auf normalem Gewebe oder während eines bestimmten Entwicklungsstadium, zumindest teilweise dafür verantwortlich sind.^[115, 116] So sind viele TACA weniger tumorspezifisch sondern vielmehr übermäßig auf Krebszellen exprimiert; sie werden als sogenannte „Selbstantigene“ erkannt. Es ist daher schwierig geeignete Vakzine auf der Basis von TACA zu entwickeln. Hierzu ist es notwendig die Immuntoleranz zu brechen. Dies wird erreicht durch eine Steigerung der Immunogenität des jeweiligen Antigens.

Hier setzt die moderne Immuntherapie an, die eine Steigerung der Immunantwort gegenüber der TACA ermöglichen kann. Das Ziel ist es dabei, Vakzine zu designen, die sowohl IgG Antikörper als auch CTLs (cytotoxische T-Lymphozyten) gegen tumorassoziierte MUC1 hervorrufen, um so die Tumorzellen mit Hilfe des Immunsystems zu isolieren. Um die Produktion von körpereigenen Antikörpern gegen TACA zu stimulieren müssen T-Helfer-Lymphozyten zusammen mit B-Lymphozyten aktiviert werden. Die geringe intrinsische Immunogenität von isolierten Polysacchridstrukturen kann durch die kovalente Konjugation an sogenannte immunogene Trägerproteine (*Carrierproteine*) enorm gesteigert werden und stellt die Grundlage der sogenannten Konjugatimpfstoffen, dar;^[117, 118] dies wurde schon 1931 von *Avery* und *Goebel* erkannt.^[119] Hierbei werden TACA kovalent an Carrierproteine gebunden.^[112, 120, 121]

Mit der Zeit haben sich folgende Carrierproteine als besonders sinnvoll erwiesen: Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin/BSA*), das Schlitzschnecken-Hämocyanin (*keyhole limpet cyanin/KLH*) oder das Tetanus-Toxoid (*TTox*), um nur einige zu nennen. Solche Vakzinkandidaten sind in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu erzeugen, das speziell gegen das Kohlenhydratantigen gerichtet ist, da die T-Zell-abhängige Immunantwort durch das immunogene T-Helfer-Epitop erzeugt wird.^[92, 122] Wenn die Glycoproteine erkannt werden und anschließend durch Antigen-präsentierende Zellen gezeigt werden, kommt es zu einer starken T-Zell Immunantwort, welche wiederum zu der Freisetzung von Cytokinen führt, welche die Antikörperantwort erhöhen. Diese Antikörper sind dann nicht nur gegen das Protein gerichtet,

sondern auch gegen die weniger immunogenen TACA und können somit zu der Produktion von IgG oder andere Klassen von Antikörpern führen.^[122]

Erstmals verwendeten *Livingston* und *Danishefsky* das KLH als Carrierprotein, welches sie über einen Spacer mit einem Kohlenhydratepitop verknüpften (Abbildung 1.3).^[123] Ein solcher Impfstoffvertreter ist beispielsweise das ST_N-KLH Vakzin, auch bekannt unter Theratope[®], welches in der Klinischen Phase III bei Brustkrebs Patienten mit Metastasierungen verwendet worden ist. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort induziert werden konnte.^[124-126] Jedoch wurde die klinische Phase III nach zehn Jahren abgebrochen, da dieses Vakzin nicht genügend effizient gegenüber Krebszellen war.^[127-131] Nebenbei konnte gezeigt werden, dass auch der Spacer/Linker einen Einfluss auf die immunologischen Eigenschaften des Vazins haben kann. Hierbei wurde nachgewiesen, dass auch der Spacer Antikörper hervorrufen oder die Immunantwort des eigentlichen Antigens unterdrücken kann.^[132-136] Daher ist auch die Entwicklung des immunologisch inaktiven Linker bei der Entwicklung neuartiger Vakzine von großer Bedeutung. Immunologisch inaktive und nicht-kovalente Linker werden als eine vielversprechende Strategie zur Herstellung von TACA-basierten Krebsimpfstoffen angesehen.

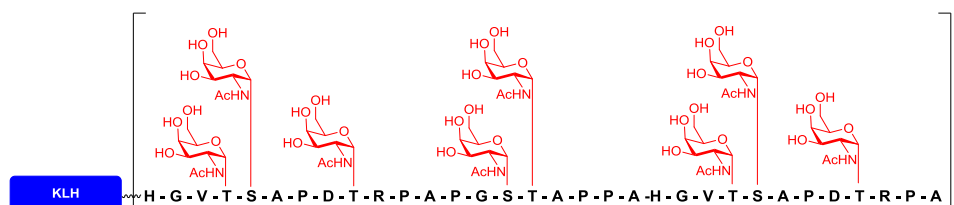


Abbildung 1.3: Vakzin nach *Livingston* und *Danishefsky*.^[123]

Auf der Basis des Vakzinkandidaten von *Livingston* und *Danishefsky* (Abbildung 1.3) wurden zahlreiche weitere Impfstoffe entwickelt. Hierbei wurde stets das MUC1-Glycopeptid, welches eine beliebige Anzahl an TACA aufweist, an verschiedene Carrierproteine konjugiert.

In diesem Zusammenhang entwickelte *Cai et al.* einen Impfstoff auf MUC1-Basis, wobei dieses T- oder T_N-Antigene aufweist. Das Glycopeptid ist wiederum mit BSA als Carrierprotein konjugiert. Eine Verstärkung der anti-MUC1-Immunantwort konnte hierbei festgestellt werden.^[137] Dieselbe Gruppe entwickelte später Impfstoffe, bei denen das MUC1 ST_N- oder 2,6-ST_N-Antigene aufweist, wobei BSA wieder als Carrierprotein genutzt wurde. Mit diesem Impfstoff immunisierte man BALB/c-Mäuse. Überraschenderweise wurde eine starke IgG-Antwort gemessen, die in der Lage war, an MCF-7-Tumorzellen zu binden. Dies war besonders überraschend, da man zu diesem Zeitpunkt in vergleichbaren Studien mit dem BSA-Impfstoff, der MUC1-ST_N enthielt, nur eine geringe Immunogenität nachweisen konnte.^[76, 138] In einer Weiterentwicklung synthetisierte *Cai et al.* MUC1-Glycopeptide, die entweder an BSA oder an drei verschiedene T-Helferzell-Epitope von TTox konjugiert waren, und immunisierte Mäuse mit diesem Konjugat in Pufferlösung oder mit dem Freud'schen Adjuvans.^[139] Unerwarteterweise wurden stärkere Immunantworten, insbesondere im Hinblick auf tumorbindende Antikörper und die Aktivierung der komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC), bei den Impfstoffe in der Pufferlösung vorgefunden, als bei denen im Freud'schen Adjuvans. Dies ist von besonderem Interesse, da das Freud'sche Adjuvans wegen schwerer Nebenwirkungen als ungeeignet für den Menschen gilt.^[140]

Eine ähnliche Strategie bezüglich der Konjugation an BSA verfolgte *Hoffmann-Röder et al.*, wobei der Schwerpunkt der Weiterentwicklung darin lag, erstmalig fluorierte Zuckerbausteine einzusetzen. Synthetisiert wurde ein MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugat-Impfstoff mit einem 3'-Fluor-TF-Antigen. Hierbei wurden anti-MUC1-Maus-Antikörper mit spezifischer Bindung an das TF-Antigen erstmalig generierte.^[141]

In diesem Zusammenhang wurde der Impfstoff durch die Gruppe um *Hoffmann-Röder et al.* weiterentwickelt, wobei der Ansatz von TF-Antigen-Mimetika-Strukturen weiter verfolgt wurde.^[142, 143] Hierbei tauschten sie OH-Gruppen durch einen bzw. zwei Fluorsubstituenten in den Positionen 6 und 6' der Pyranose-Ringe aus (Abbildung 1.4). Die TF-Mimetika erzeugten hierbei eine vergleichsweise starke Immunreaktion. Die 4'-Fluor-TF-MUC1-TT_{ox}/BSA-Konjugatimpfstoffe führten auch zur Bildung von IgG-Antikörpern, die an MUC1-Epitope auf MCF-7-Krebszellen banden.^[143]

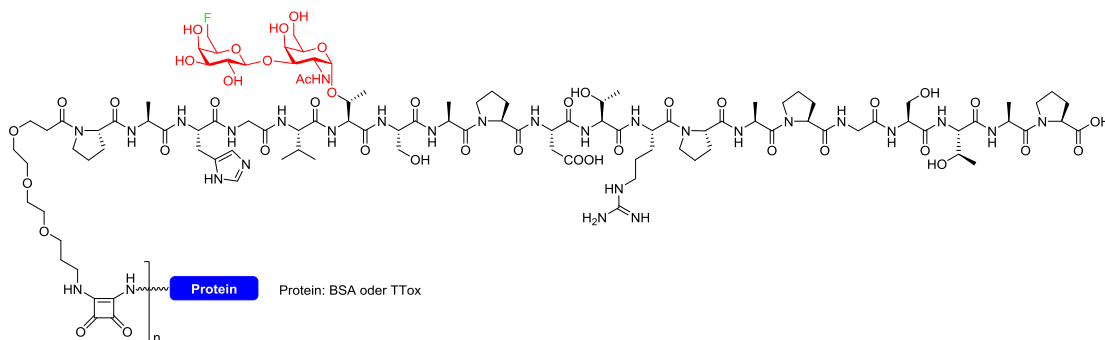


Abbildung 1.4: Fluorierte MUC1-Glycopeptidvakzine nach *Hoffmann-Röder et al.*^[143]

Das Tetanus-Toxoid als immunogener Träger ist in der Vergangenheit gerade bei der Verwendung als menschlicher Impfstoffbestandteil sehr populär geworden, da es eine stark erhöhte Immunogenität mit sich bringt. 2009 wurde es erstmalig durch *Kaiser et al.* in einem MUC1 basiertes Glycopeptid-Vakzin verwendet, welches durch ein sialyliertes T_N-MUC1-Glycopeptid-Antigen konjugiert an ein Tetanus-Toxoid aufgebaut war. Diese Art von Vakzine induzierten eine sehr starke, toleranzbrechende und vor allem selektive Immunantwort gegenüber Mäusen.^[144]

Auch in jüngerer Zeit wurde auf diesem Gebiet weitere Ergebnisse erzielt; beispielsweise durch *Palitzsch et al.*^[145] Hierbei wurde ein synthetischer Krebsimpfstoffkandidat, bestehend aus einem MUC1-Glycopeptid und einem B-Zell-Epitop, eingesetzt, um die Toleranz des Immunsystems zu brechen (Abbildung 1.5). Die Glycopeptide wurden mit Tetanus-Toxoid als immunstimulierenden Träger kombiniert. Auch hier konnten IgG und IgM Antikörper nachgewiesen werden. In den Studien konnten auch monoklonalen Antikörper aus einer immunisierten Maus isoliert werden, die eine starke Bindung an die MUC1-exprimierenden Krebszelllinien T47D und MCF-7 und eine moderate Bindung an die Pankreaskarzinom-Zelllinie PANC1 zeigte, ohne Bindung an nicht-krebsartige menschliche Brust-Epithelzellen.

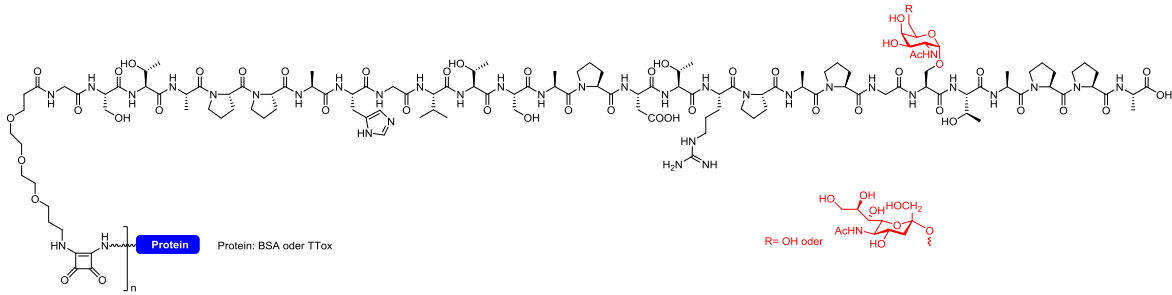


Abbildung 1.5: MUC1-Glycopeptid-Vakzine nach *Palitzsch et al.*^[145]

Einen modifizierten Ansatz wählte die Gruppe um *Ragupathi et al.* Sie nutzten das KLH als Carrierprotein, da es wie auch das BSA oder das TTox eine starke Immunantwort erzeugt. Anstelle des MUC1-Peptids als B-Zell-Epitop bauten sie ein Glycokonjugat-Impfstoff auf. Hierbei synthetisierten sie multivalente, unimolekulare Impfstoffe, welche auf Brust- und Prostatakrebs abzielen (Abbildung 1.6). Immunologische Daten zeigten hierbei, dass sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper in der Lage sind, an MCF-7-Brustkrebszelllinien zu binden, die diese multivalenten Antigene exprimieren.^[146, 147]

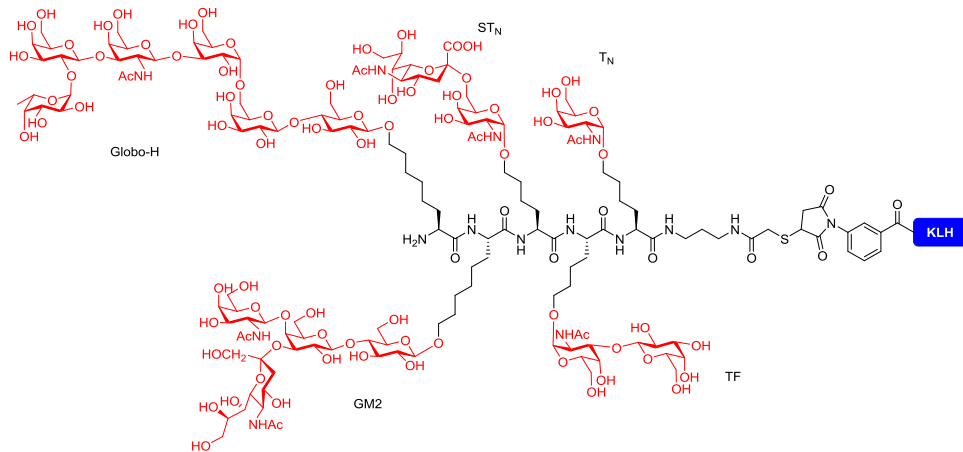


Abbildung 1.6: Multivalentes Vakzin mit fünf Glycokonjugaten nach *Ragupathi et al.*^[146, 147]

Ein Nachteil der Impfstoffe, die sich eines Carrierprotein wie BSA, TTox oder KLH bedienen, liegt jedoch darin, dass das zusätzliche Fremdträgerprotein, welches an MUC1 bzw. an das B-Zell-Epitop gebunden ist, selbst hoch immunogen ist. Dieses kann eine sehr starke B-Zell-Reaktion hervorrufen und dabei die Antikörperreaktion gegen das eigentliche Kohlenhydratepitop unterdrücken.^[123, 132, 133, 148, 149]

Alternativ zu der Konjugation an Carrierproteine kann die immunologische Aktivität der B-Zell-Epitope auch durch Konjugation mit potenten immunstimulierenden Adjuvantien wie Monophosphoryl-Lipid A (MPLA) oder α -Galactosylceramid (α -GalCer) verstärkt werden, wodurch peptidfreie Impfstoffkandidaten entstehen (Abbildung 1.7).^[150] Hierbei handelt es sich im Gegensatz zu den zuletzt beschriebenen Impfstoffen, die an Carrierproteinen gebunden sind, um niedermolekulare Medikamente, die strukturell vollständig charakterisiert werden können. Ferner kann die Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR (*structure-activity-relationship*)) zuverlässiger untersucht werden, was das Zulassungsverfahren derartiger Impfstoffe deutlich verkürzen kann. Man unterscheidet hierbei zwischen Zwei-, Drei- oder Mehrkomponenten-Impfstoff in Abhängigkeit des Aufbaus.

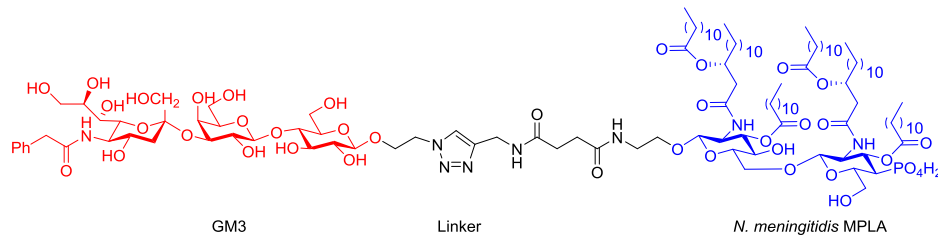


Abbildung 1.7: Vakzinprototyp auf Basis von MPLA nach Wang *et al.*^[150]

In der Vergangenheit wurde der Zugang zu einer Reihe von vollsynthetischen, antigenen, peptidfreien Impfstoffkandidaten auf der Basis von TACAs und MUC1 ermöglicht. Beispielsweise synthetisierte Yin *et al.* einen synthetischen Krebsimpfstoffkandidaten mit zwei Komponenten, der sich aus ST_N und α-GalCer durch kovalente Konjugation zusammensetzt. α-GalCer wirkt hierbei als eingebautes Adjuvans (Abbildung 1.8). Es konnte nachgewiesen werden, dass ST_N-α-GalCer eine starke anti-ST_N-IgG-Antikörperantwort induzierte.^[151] Analog dazu synthetisierten Seeberger und Kollegen einen vollsynthetischen Zweikomponenten T_N-α-GalCer Konjugat-Impfstoffkandidaten.^[152] Hierbei konnten nachgewiesen werden, dass das liposomal formulierte T_N-α-GalCer in Mäusen eine starke T-Zell-abhängige Immunität mit hochaffinen IgG erzeugte.

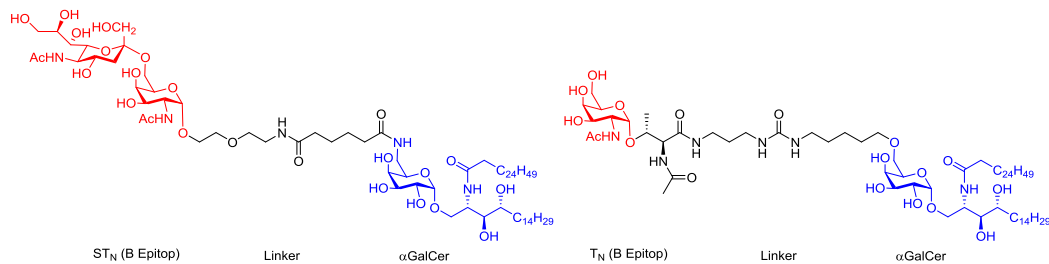


Abbildung 1.8: Chemische Struktur eines vollsynthetischen Vakzinkandidaten: ST_N-GalCer und T_N-GalCer.^[151, 152]

In der Vergangenheit verwendete man für die Glycokonjugat-Impfstoff-Synthese häufig Polysaccharide, die jedoch nur schwer zugänglich waren, da die meisten Formulierungen aus Kapselpolysaccharidstrukturen (*capsular polysaccharide/CPS*) hergestellt wurden, die wiederum aus Bakterienkulturen extrahiert werden mussten.^[92, 153] Dieser Prozess beinhaltet mehrere Reinigungsschritte und eine ständige Qualitätskontrolle, da die isolierten Polysaccharide aufgrund ihrer Biosynthese strukturelle Heterogenität aufweisen und oft mit toxischen Verunreinigungen wie Zellwandpolysacchariden coisoliert werden.^[154] Ferner können auf diesem Weg nicht beliebig große Mengen von Antigenen zur Verfügung gestellt werden, was sich in den Produktionskosten und der Verfügbarkeit dieses Impfstoffs zeigt. Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt der Glycokonjugat-Impfstoffentwicklung in der Erforschung neuer Synthesestrategien der Zuckerbausteine, um diese in großen Mengen verfügbar zu machen. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden daher mehrere neue Oligosaccharid-Synthesestrategien entwickelt, darunter Festphasen-, chemoselektive und chemoenzymatische Methoden, die große Mengen an reinen und homogenen Epitopen ermöglichen.^[151, 155] Derartige Synthesen stellen einen technologischen Meilenstein in der Synthese von TACA-basierten Krebsimpfstoffen dar.

Vollsynthetische Zweikomponenten-MUC1-Glycopeptid-Krebsimpfstoffe wurden durch Konjugation von MUC1-VNTR einschließlich verschiedener TACAs entweder an verschiedene T-Helfer-Epitop-Peptide,

Ovalbumin oder verschiedene TLR-Agonisten synthetisiert. So wurde durch *Westerlind et al.* ein Vakzin synthetisiert, welches auch eine humorale Immunantwort induzierte. Aufgebaut ist dieses Vakzin durch ein Tumor-Assoziiertes MUC1-Glycopeptid, in Analogie zu *Kaiser et al.*, welches allerdings an ein immunstimulierendes T-Zell Epitop aus Ovalbumin verknüpft wurde (Abbildung 1.9).^[156] Hierbei konnte eine hochspezifische Immunantwort in Mäusen induziert werden.



Abbildung 1.9: Vollsynthetisches Zweikomponenten-MUC1-Glycopeptid-Vakzin nach *Westerlind et al.*, bestehend aus einem Tumorassoziierten MUC1-Antigen (rot/schwarz) und dem T-Zell-Epitop OVA₃₂₃₋₃₃₉ (blau).^[156]

Auch *Cai et al.* synthetisierten einen multivalenten Impfstoff, der tetravalentes MUC1-VNTR Sialyl-T_N Antigen enthält, das mit dem TLR-2 Liganden, ein Pam3CysSK4 Lipopeptid, durch Klickreaktionen konjugiert wurde (Abbildung 1.10). Diese Impfstoffe lösten bei Mäusen Immunantworten aus, ohne dass ein externes Adjuvans verwendet wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mehr als 90% der MCF-7-Krebszellen bei der Inkubation mit Mäuserum, dem der tetravalente Impfstoff verabreicht wurde, im Vergleich zu Seren anderer bi- oder trivalenter MUC1-Sialyl-T_N-Antigen-Impfstoffe getötet wurden. Demnach konnte ein signifikanter Cluster-Effekt dieses Vakzins gezeigt werden.^[157]

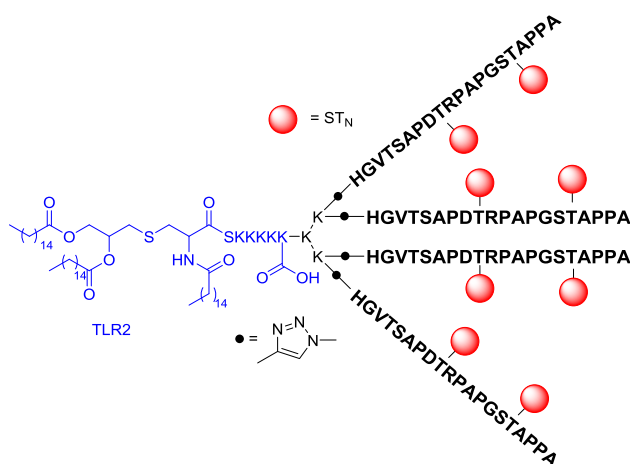


Abbildung 1.10: Schematische Struktur eines Vakzins bestehend aus einem TLR2-Liganden (Pam3Cys-Lipopeptid) welcher an tumorassoziierte MUC1-Glycopeptidantigene geklickt wurde.^[157]

Geraci et al. hingegen benutzten Calixarene als Basis, das den TLR2-Liganden enthält, um einen selbstadjuvanten Multikomponenten-Impfstoff durch Konjugation mit mehreren Einheiten der PDTRP MUC1-Sequenz aufzubauen (Abbildung 1.11).^[158] Die PDTRP MUC1-Sequenzen dienen dabei als B-Zell-Epitope, wobei sie jedoch selbst keine Zuckerbausteine enthielten. Impfstoffe, die das PDTRP-Epitop enthalten, produzierten mehr anti-MUC1-IgG-Antikörper im Vergleich zu Impfstoffen ohne das PDTRP-Epitop. Diese anti-MUC1-Antikörper waren in der Lage, MUC1 exprimierende MCF-7-Tumorzellen zu erkennen.

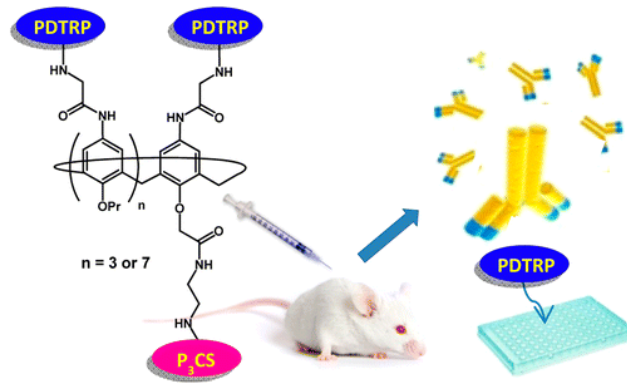


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung zweier selbstadjuvierender Krebsimpfstoff-Kandidaten, die aus mehreren Einheiten der immunodominanten B-Zell-Epitop-PDTRP MUC1-Kernsequenz bestehen, die an Calixaren konjugiert wurden.^[158]

Einen anderen Ansatz verfolgten *McDonald et al.* Sie verwendeten das Makrophagen-aktivierende Lipopeptid 2 (MALP2) als Immunadjuvans und einen TLR2/6-Agonisten bei der Synthese eines selbstadjuvantierenden MUC1-MALP2-Konjugatimpfstoffs (Abbildung 1.12).^[159] Die Aktivierung der TLR2/6-Rezeptoren führt zur Produktion mehrerer Cytokine und Chemokine. MALP2, als Stimulator von B-Zellen, induziert eine spezifische Antikörperantwort ohne Hilfe eines exogenen T-Helferzell-Epitops.^[160] Hohe Titer von IgG1, IgG2b, IgG3 und IgM wurden jedoch ohne eine messbare CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellantwort erzeugt.^[159]

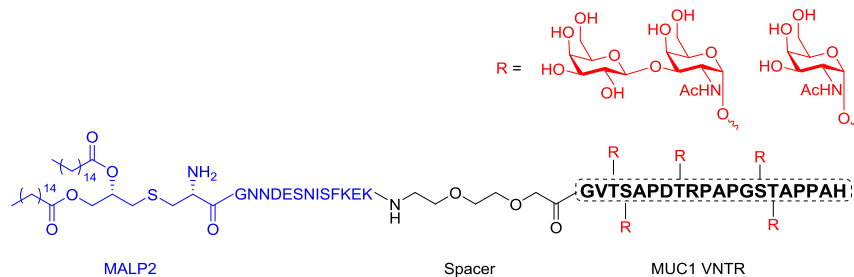


Abbildung 1.12: Struktur des MALP2-enthaltenden Zweikomponenten Vakzins.^[159]

Studien haben gezeigt, dass MPLA, TLR4 und Dimethyldioctadecyl-ammoniumbromid (DDA) aktiviert und damit die Antigenaufnahme und -präsentation erhöht. In diesem Zusammenhang wurde herausgefunden, dass gerade die Kombination von DDA/MPLA die Antigenaufnahme, die Präsentation an T-Zellen und die Stimulation der dendritischen Zellen (DC) durch TLRs deutlich verbessert.^[161-164]

Neben den Zweikomponenten-MUC1-Glycopeptid-Krebsimpfstoffen wurde auch der Zugang zu Dreikomponenten-MUC1-Glycopeptid-Krebsimpfstoffen ermöglicht. Dieses besteht aus einem MUC1-Glycopeptid (B-Zell-Epitop) bzw. einer MUC1-VNTR mit verschiedenen TACAs, einem T-Helferzell-Epitop sowie verschiedenen TLR-Agonisten als Adjuvantien, beispielsweise einem TLR2- oder TLR9-Agonist, welches eine verbesserte Immunantwort aufweist. Ein Vorteil dieser Dreikomponenten Vakzine ist die Tatsache, dass sie im Aufbau sehr einfach sind und keine zusätzlichen Peptide oder Proteine aufweisen, die wiederum Antigen sein können und zu Immunsuppressionen führen können. So lösen diese Vakzine relevante angeborene, zelluläre und humorale Immunantworten auf, die eindeutig auf das Vakzin zurückzuführen sind.

Beispielsweise haben *Lakshminarayanan et al.* einen Dreikomponenten-Impfstoff synthetisiert, der das glycosylierte MUC1-Peptid, ein T-Helferzellen-Epitop-Peptid aus dem Poliovirus und den TLR-2-Agonisten Pam3CysSK4 enthält (Abbildung 1.13). Hierbei konnte sowohl humorale als auch zelluläre Immunität hervorgerufen werden.^[165] In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass ein Impfstoff, dem nur das T_N-Antigen fehlt (α -D-GalNAc), im Vergleich zu dem T_N-haltigen Impfstoff nicht genügend Antikörper produziert, um eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität zu induzieren. Dies unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit der Glycosylierung, damit Antikörper die Tumorzellen erkennen und somit die Lyse einleiten können. Außerdem konnte dieser Impfstoff effektiv CD8+ T-Zellen aktivieren, die sowohl glycosylierte als auch nicht-glycosylierte Strukturen erkannten, während CD8+ T-Zellen, die nach der Immunisierung mit dem nicht-glycosylierten Impfstoff erhalten wurden, nur die nicht-glycosylierte Struktur erkannten.

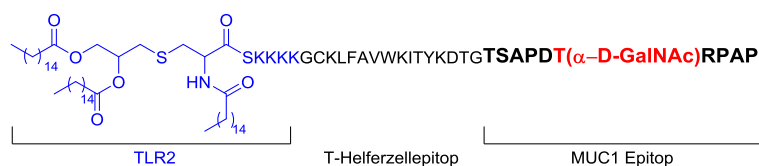


Abbildung 1.13: Dreikomponenten Vakzinkandidat nach *Lakshminarayanan et al.*^[165]

Eine andere Gruppe um *Thompson et al.* verwendete Sialyl-T_N-Antigen in einem liposomalen MUC1-Glycopeptid-Impfstoff zusammen mit dem aus dem Poliovirus gewonnenen T-Helferzell-Epitop und Pam3CysSK4.^[166] Auch dieser Impfstoff erzeugte sowohl humorale als auch zelluläre Immunität gegen ST_N-MUC1 und tumorassoziiertem MUC1.

Ein anderes Beispiel des Dreikomponenten-Impfstoffs sind solche Vakzine, bei denen Goldnanopartikel (AuNP) als Träger dienen. Derartige Impfstoffe wurden beispielsweise durch *Cai et al.* synthetisiert. Verwendet wurden Goldnanopartikel (AuNP) als Träger für einen Dreikomponenten-Impfstoff, der das MUC1-Glycopeptid mit CD4+ T-Zell-Peptidepitopen (P-30) enthält, das aus TTox gewonnen wurde (Abbildung 1.14).^[167] Dieser synthetische Dreikomponenten-Impfstoff zeigte vielversprechende Antikörpertiter, meist IgG1, IgG2a und IgG2b, im Vergleich zu einer Zweikomponenten-Impfstoffformulierung (MUC1-P30) ohne AuNP, die hauptsächlich IgG1 und etwas IgM generierte, obwohl letzterer Impfstoff eine zehnfach höhere Antigenkonzentration aufwies. Dies wurde dahingehend interpretiert, dass die Präsentation des Antigens durch MHC im Falle des AuNP-haltigen Impfstoffs und dieser erhöhten Antikörperproduktion wirksamer war. Auch die Bindung der Antikörper an die Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigte, dass die Antikörper Krebszellen erkennen konnten.

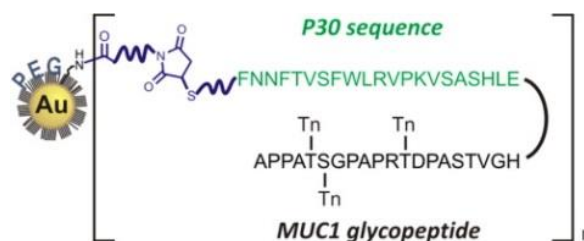


Abbildung 1.14: Dreikomponenten-Vakzin, welches an Goldnanopartikel gebunden ist.^[167]

Einen wieder anderen Ansatz verfolgten *Nuhn et al.* Sie untersuchten Antitumorimpfstoffe, die das wasserlösliche mehrwertige Trägerpolymer Poly(*N*-(2-Hydroxypropyl)methylacrylamid) (Poly(HPMA))

enthielten (Abbildung 1.15). Das Polymer hat den Vorteil, dass es selber nicht immunogen und auch nicht toxisch ist. Aus diesem Grund eignet es sich sehr gut als makromolekularer Träger für niedermolekulare Substanzen. Es wird insbesondere als Krebs-Chemotherapeutika verwendet, da es sich vorzugsweise über den sogenannten passiven Targeting-Prozess (EPR-Effekt) im Tumorgewebe anreichert. Besonders vorteilhaft an den Vakzinen war, dass Poly(HPMA) es ermöglicht zusätzliche Strukturen zu binden und bei der Aggregation zu helfen, wodurch eine bessere Interaktion mit dem Immunsystem gewährleistet wurde.^[168] Der synthetischer Impfstoff enthielt das MUC1-Glycopeptid und das T-Helferzell-Epitop P2, das mit dem P(HPMA)-Polymer konjugiert war. Antiseren von immunisierten Mäusen zeigten IgG-Antikörper, meist IgG1 und IgG2a, die auf MHC-restringierte T-Zell-Hilfe hindeuteten. Hierbei zeigten die Antikörper eine bemerkenswerte Bindung an die Tumorzelle MCF-7.

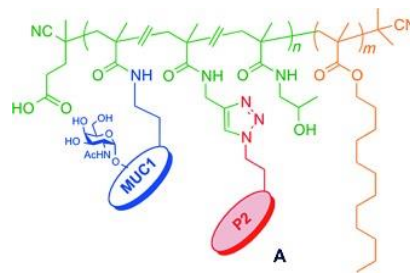


Abbildung 1.15: Das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid und das Tetanus-Toxoid T-Zell-Epitop P2 wurden durch orthogonale Ligationstechniken an wasserlösliche Poly(N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid)-Träger gebunden.^[168]

Anstelle von HPMA verwendeten *Glaffig et al.* das hyperverzweigte Polymer „*hyperbranched Polyglycerol*“ (HPG) (Abbildung 1.16). HPG ist, wie der Name schon sagt, ein hyperverzweigtes Polymer mit etwa 50-65% dendrimere Struktur. Aufgrund seiner linearen Synthese, seiner kugelförmigen Beschaffenheit, seiner Vielseitigkeit in Bezug auf die Funktionalisierung und seiner hervorragenden Biokompatibilitätsprofile stellt HPG eine vielversprechende Klasse von Materialien dar, die sich für zahlreiche Anwendungen in der Medizin eignen. Insbesondere hat HPG den Vorteil, dass es eine sehr minimale Polymerakkumulation in vitalen Organen nach intravenöser Injektion zeigt, im Vergleich zu anderen Polymeren, die für verschiedene biomedizinische Anwendungen weit verbreitet sind. HPG wird von Mäusen und Ratten gut vertragen und hat sich bisher als nicht immunogen erwiesen. HPG ist wie auch das HPMA wasserlöslich, wobei es jedoch im Gegensatz zu HPMA nichtlinear aufgebaut ist und eine dendrimerähnliche Struktur aufweist, die es ihm erlaubt, an mehrere Antigene zu binden und die Verschränkung des gebundenen Antigens zu verhindern.^[169] In diesem Fall führte eine höhere Valenz und mehr Glycosylierung zu besseren Anti-Tumor-Antikörper-Reaktionen.

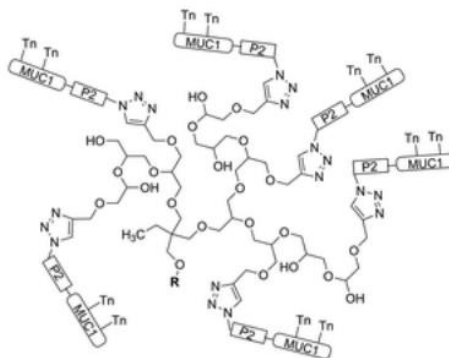


Abbildung 1.16: Erhöhte Immunreaktion durch den Einsatz eines hyperverzweigten Polymers.^[169]

Auch Vierkomponenten Impfstoffe wurden in der Vergangenheit durch verschiedene Gruppen untersucht; beispielsweise von *Palitzsch et al.* Das Vakzin wurde dabei so konzipiert, dass es drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen enthält, wobei eine ausreichende Aktivierung der T-Helferzellen gewährleistet wurde (Abbildung 1.17).^[170] Die Antikörpertiter zeigten, dass der Impfstoff, obwohl er kein externes immunstimulierendes Adjuvans enthielt, achtmal mehr MUC1-spezifische Antikörper, meist IgG1 und einige IgM, produzierte als Zweikomponenten-Impfstoffe mit nur einem T-Helferzell-Epitop. Die mit dem Vierkomponenten-Impfstoff erzeugten Antiseren zeigten auch eine stärkere Bindung an die MUC1-exprimierende Brustkrebszelllinie T47D im Vergleich zu den mit Zweikomponenten-Impfstoffen induzierten Antiseren.

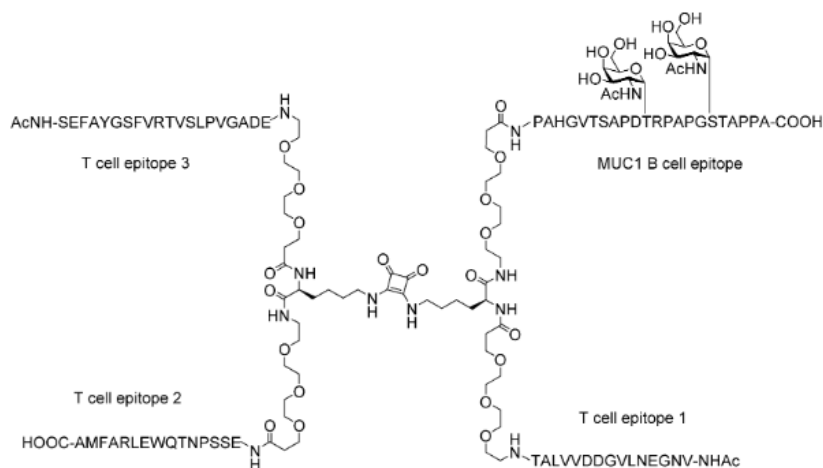


Abbildung 1.17: Vierkomponentenimpfstoffkandidat nach *Palitzsch et al.*^[170]

1.2 Antigenanaloga für die Krebsimmuntherapie – Mimetika

Wie bereits erwähnt, sind Peptide in der Neurologie, Endokrinologie und Hämatologie von besonderem Interesse. Die pharmazeutische Industrie stellt bereits seit Jahrzehnten Medikamente auf Basis von Peptiden, Proteinen oder Antikörpern her, wobei diese Medikamente nahezu 10% der Einnahmen der pharmazeutischen Industrie ausmachen. Problematisch bei der Entwicklung neuer Medikamente dieser Art ist jedoch, der proteolytische und enzymatische Abbau und die damit einhergehende schlechte generelle und orale Bioverfügbarkeit, der problematische Transport durch Zellmembranen (Hydrophilie), und das unselektive Bindungsverhalten an Rezeptoren. Eine medikamentöse Verwendung ist damit stark eingeschränkt. Insbesondere die physiochemischen Eigenschaften der Peptide wie die Wasserlöslichkeit, die Lipophilie, die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die chemische und metabolische Stabilität und die rasche Ausscheidung durch Leber und Niere, schränken die Entwicklung neuartiger Medikamente stark ein.^[171]

Trotz der Entwicklung neuartiger Krebsvakzine in der Krebsimmuntherapie, versagen die meisten Vakzine, welche auf natürlicher Basis von TACA synthetisiert worden sind, an einer mangelnden T-Zellvermittelten Immunantwort (vgl. Kapitel 1.1.3). Einer der Hauptgründe hierfür ist, dass die natürlichen Zuckerbausteine sehr empfindlich gegenüber endogenen Glycosidasen sind, die die TACA durch enzymatischen Abbau abbauen und sie *in vivo* weniger bioverfügbar machen. Daher wurde die strukturelle Modifikation verschiedener TACAs als ein Ansatz zur Verbesserung der Immunogenität von tumorassoziierten Antigenen gesehen. Statt des nativen tumorassoziierten Kohlenhydratantigens haben verschiedene Gruppen verschiedene Mimetika oder Analoga dieser Antigene verwendet. Die Herausforderung der Veränderung der Kohlenhydratstruktur ist nicht trivial, da Mimetikastrukturen entweder eine geringe Stabilität oder eine hohe synthetische Komplexität aufweisen.

Beispielsweise tauschten *Richichi et al.* native T_N-Antigene gegen vier geclusterten T_N-Antigen-Mimetika aus, um die Stabilität gegenüber Glycosidasen zu verbessern. Das Mimetikum rief starke IgM- und IgG-Reaktionen hervor, vorwiegend IgG2a und IgG1, die native T_N-Antigene erkennen konnten (Abbildung 1.18).^[172]

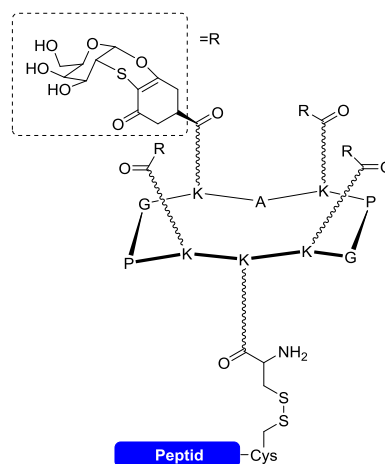


Abbildung 1.18: Geclustertes T_N-Mimetika nach *Richichi et al.*^[172]

Auch die Gruppe um *Hoffmann-Röder et al.* verfolgte den Ansatz der Mimetika-Strukturen, wobei sie den Schwerpunkt auf fluoridierte Kohlenhydrate legte (Abbildung 1.19). Hierzu stellte sie TF-Antigen-Mimetika her (vgl. Kapitel 1.1.3).^[142, 143] *Yang et al.* verfolgten einen ähnlichen Ansatz, wobei sie stattdessen ST_N-Analoge synthetisierten, bei denen die *N*-Acetamidreste fluoridiert wurden. Hierbei konnten sie zeigen, dass einige der fluorhaltigen ST_N-Analoge innerhalb von Impfstudien höhere Immunogenitäten auslösten, nachgewiesen durch erhöhte anti-ST_N-IgG-Titer. Ferner konnte ein verbessertes anti-ST_N IgG/IgM-Verhältnis im Mausmodell nachgewiesen werden. Die erzeugten Antiseren waren zudem in der Lage native ST_N-Antigen-exprimierende Tumorzellen zu erkennen und zu binden (Abbildung 1.19).^[173, 174]

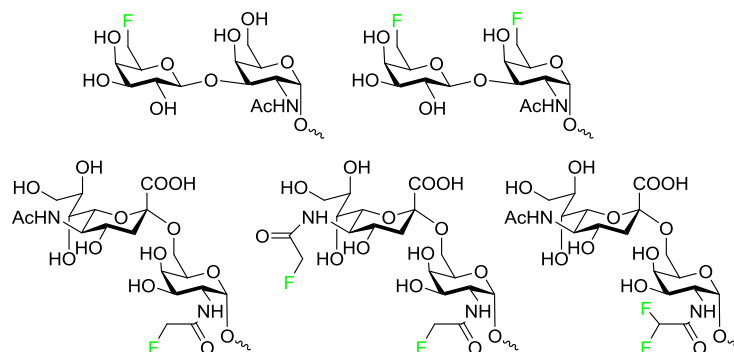


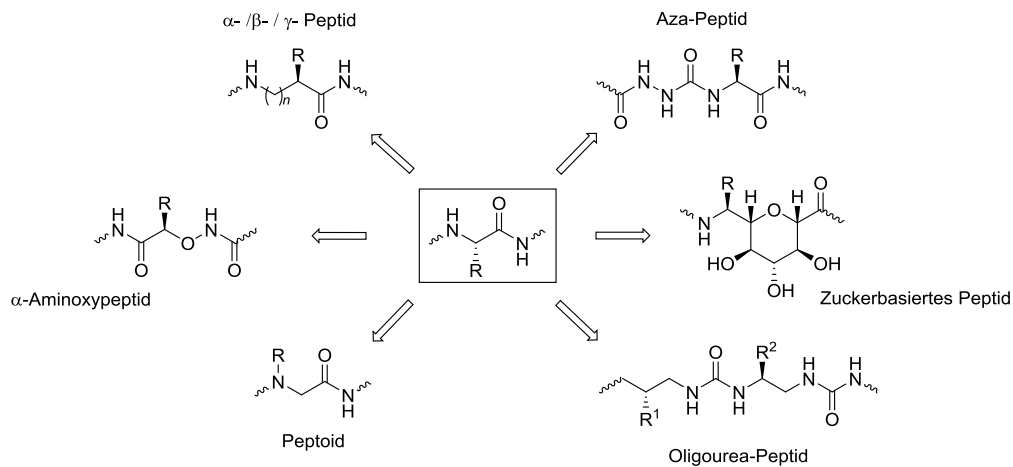
Abbildung 1.19: Erhöhung der intrinsischen Immunogenität durch strategische Fluorierung nach *Hoffmann-Röder et al.* und *Yang et al.*^[142, 143, 173, 174]

Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von Carba- oder Iminozucker. Hierbei wird der Ringsauerstoff durch einen Kohlenstoffatom bzw. durch ein Stickstoffatom ausgetauscht. Auch in diesem Zusammenhang konnten Bindungen an den universellen SM3-Antikörper nachgewiesen werden. Auf diese vollsynthetischen Impfstoffe wird an dieser Stelle jedoch nicht näher eingegangen, wobei bezüglich der Carba-^[175] bzw. Iminozucker^[176] auf die entsprechende Literatur verwiesen wird. Alternativ dazu kann auch die α -O-glykosidischen Bindung durch α -C-glykosidische Bindungen ersetzt werden. Diesen Ansatz verfolgten in jüngster Zeit *Navo et al.*^[177]

Der Austausch der Kohlenhydrat-Antigene gegen Mimetika stellt nur einen Ansatz der derzeitigen Forschung dar. Da hier gezeigt werden konnte, dass die unnatürlichen TACA-Analoga sogar immunogener sein können als ihre nativen Strukturen, ist es denkbar, dass auch unnatürliche Aminosäuren im Peptidrückgrat ähnliche positive Effekte nach sich ziehen. Dies bietet vor allem den Vorteil, dass viele Aminosäuremimetika bereits kommerziell erhältlich sind, was die Synthese neuartiger Impfstoffe erheblich verkürzen bzw. kostengünstiger gestalten kann.

Peptidmimetika-Bausteine sind den natürlichen Aminosäuren nachempfunden und weisen meist nur kleine Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung auf. In einem Peptid eingebaut, imitieren diese die natürliche Primär- und Sekundärstruktur ihrer Vorbilder und dienen daher als Pharmakophore. Durch den Einbau von Mimetika kann eine erhöhte metabolische Stabilität und somit auch eine höhere Bioverfügbarkeit erreicht werden.^[178, 179] Mögliche Mimetika-Strukturen sind beispielsweise α -Aminoxy-Peptide,^[180] Azapeptide,^[181, 182] β -Peptide,^[183-185] γ - und δ -Peptide,^[186] α -Zucker-basierte Peptide,^[187-189] Peptide^[190] und Oligourepeptide;^[191, 192] vergleiche hierzu auch folgendes Schema 1.2. Andere Mimetikastrukturen können erreicht werden durch den Austausch einzelner Atome. Beispielsweise kann Wasserstoff durch Fluor

ausgetauscht werden. Dieser Austausch ist besonders geeignet, da sich diese Atome nur geringfügig in ihren *van der Waals* Radien unterscheiden (vgl. Kapitel 1.2.2).



Schema 1.2: Häufig verwendete Peptidmimetika.

Anwendung in der Krebsimmuntherapie fanden beispielsweise β -Aminosäuren. Das von *Hoffmann-Röder* hergestellte β^3 -Homo-Threonin-Konjugat des T_N-Antigens weist aufgrund der Verwendung einer β -Aminosäure im Vergleich zum natürlichen Antigen eine höhere chemische und metabolische Stabilität auf.^[193]

1.2.1 N-Alkylierte-N-aminoethyl-Aminosäuren

Eine interessante Peptidmimetikastruktur ist das auf *N*-alkylierten-*N*-Aminoethyl-Aminosäuren basierende Peptid. So genannte AA-Peptide wurden ursprünglich von chiralen Peptidnukleinsäuren (PNA's) abgeleitet.^[194, 195] Hierbei führt unter anderem der Einbau dieser AA-Peptidmimetika zur Erstellung neuer Bibliotheken für Inhibitoren von Proteasen und Phosphatasen.^[196]

Die von *Cai et al.*^[197] entwickelten AA-Peptide wurden in der Synthese neuer cyclischer und acyclischer Lipo- γ -AA-Peptide verwendet.^[198, 199] Diese Lipo- γ -AA-Peptide weisen eine hohe antimikrobielle Aktivität gegenüber multiresistenten gram-positiven und -negativen Bakterien, als auch im Falle der cyclischen Lipo- γ -AA-Peptide, gegenüber Biofilmen auf.^[198, 199] Daneben wurden AA-Peptide auch in der Krebstherapie angewendet. Durch neue γ -AA-Peptidmimetika wurde die Interaktion von *murine double minute 2 Protein* (MDM2) und der Transaktivierungs-Domäne von p53 gestört und somit das Zellwachstum von Tumorzellen unterbunden. Dies war möglich, da die Überexpression von MDM2 in Tumorzellen die Aktivierung des p53 verhindert und zu unkontrolliertem Zellwachstum führt.

Des Weiteren konnte durch Abbaustudien mittels Proteinasen von γ -AA-Mimetika von Chymotrypsin und Thermolysin gezeigt werden, dass AA-Peptide eine erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischer Hydrolyse besitzen.^[200]

Eine weitere Anwendung in der Krebstherapie finden AA-Peptide als Kontrastmittel. Hierbei wurden radioaktiv markierte, auf dem γ -AA-Peptid basierende RGD (Arg-Gly-Asp)-Mimetika als Tracer für die PET (Positron Emissions-Tomographie) verwendet (Abbildung 1.20). Erstaunlicherweise erzielten die

Mimetikastrukturen, trotz verkürzter linearer Sequenz im Vergleich zu ihren natürlichen Strukturen eine vergleichbare Bindungsaffinität zum Integrin $\alpha_v\beta_3$. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Strukturen weniger Anfälligkeit gegenüber enzymatischem Abbau und eine höhere *in vivo*-Stabilität aufwiesen.^[201]

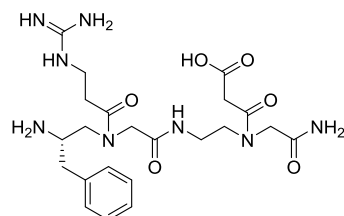


Abbildung 1.20: γ -AA-Peptid basierendes RGD(Arg-Gly-Asp)-Mimetika.^[201]

Ein weiteres Mimetikum konnten *Cai et al.* vom Transkriptionsaktivator (Tat)-Protein des Typ 1 HI-Virus ableiten (Abbildung 1.21). Das Mimetikum bindet wie das Tat-Protein an RNA und schleust diese in die Zelle, ist jedoch weniger toxisch als das Tat-Protein und zudem sehr stabil gegenüber enzymatischem Abbau. Dadurch wird dieses γ -AA-Peptid-Tat-Mimetikum zu einem interessanten „*cell penetration peptide*“ (CPP), um Medikamente in die Zelle einzuschleusen.^[202]

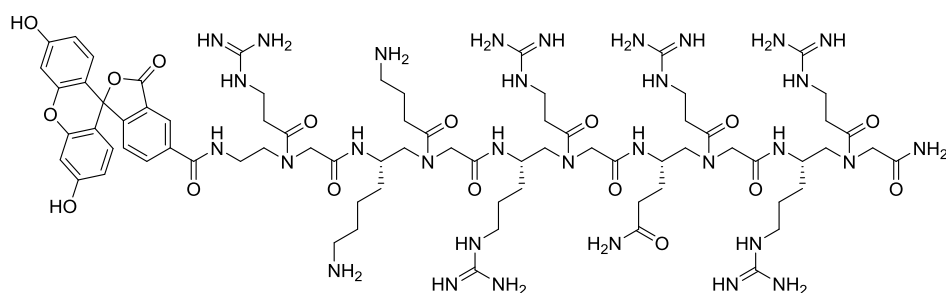


Abbildung 1.21: Mit Fluoreszin markiertes γ -AA-Peptid-Tat-Mimetikum.^[202]

AA-Peptide besitzen bei gleicher Kettenlänge die gleiche Anzahl an Seitenketten und funktionellen Gruppen wie natürliche Peptide, jedoch alternieren sekundäre und tertiäre Amide im Peptidrückgrat. Des Weiteren entspricht nur eine Seitenkette zweier aneinanderhängender Aminosäuren der natürlichen Seitenkette, während die andere Seitenkette aus dem Rest einer Carbonsäure hervorgeht und an das tertiäre Amid geknüpft ist. Durch das tertiäre Amid besitzt das Peptidrückgrat eine viel höhere Flexibilität und jede tertiäre Amidbindung kann in einer *cis*- oder *trans*-Konformation vorliegen, was prinzipiell zu einer Veränderung der Struktur und der daraus resultierenden funktionellen Eigenschaften führen kann. Außerdem verändern sich durch die Einführung tertiärer Amidbindungen die H-Brückenbindungseigenschaften des Peptids. Die relativen Abstände und Positionen der Seitenketten bleiben jedoch erhalten. Durch die Position der natürlichen Seitenketten lassen sich zwei unterschiedliche Formen des AA-Peptides unterscheiden. Das α -AA-Peptid besitzt die natürliche Seitenkette in α -Position und die γ -Form in γ -Position (Abbildung 1.22).^[197, 200]

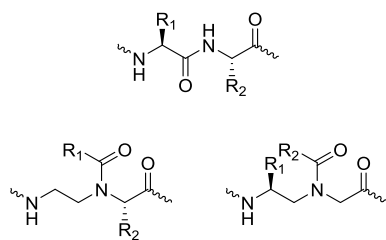
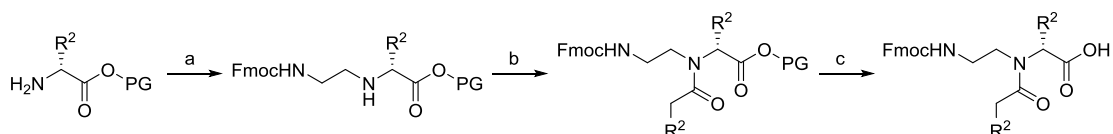


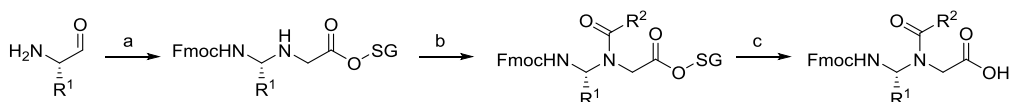
Abbildung 1.22: Ausschnitt aus der Struktur eines natürlichen α -Peptids (oben) und des korrespondierenden α -AA-Peptids (links) als auch des γ -AA-Peptids (rechts).

Die Synthese der α -AA-Peptid-Bausteine funktioniert in drei wesentlichen Schritten (Schema 1.3). Die Carbonsäure des α -AA-Peptids der Aminosäure wird zuerst als *tert*-Butylester oder Benzylester geschützt. In einer reduktiven Aminierung mit *Fmoc*-Aminoethylaldehyd bildet sich das sekundäre Amin, welches im nächsten Schritt mit gängigen Peptidkopplungsreagenzien wie ByPOP, DIC/HOBt oder HBTU/HOBt alkyliert wird. Durch Spaltung der Estergruppe, beispielsweise durch Hydrierung des Benzylesters oder Entschützung des *tert*-Butylesters, wird der Festphasenbaustein für die Peptidsynthese erhalten.^[197]



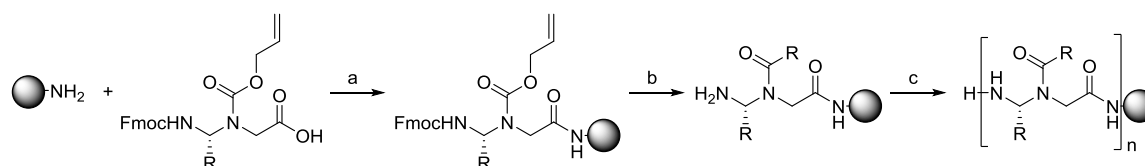
Schema 1.3: Synthese des α -AA-Bausteins: Reaktionsbedingungen: a) *Fmoc*-Aminoethyl-aldehyd, NaBH_3CN ; b) $\text{R}^1\text{CH}_2\text{COOH}$, HBTU/HOBt, 6 d; c) Pd/C, H_2 für Benzylester; 80% TFA/Anisol für *tert*-Butylester.^[197]

Die Synthese des γ -AA-Peptids geht von einem *Fmoc*-Aminoaldehyd aus, welcher mit Glycin-*tert*-Butylester oder -Benzylester in einer reduktiven Aminierung umgesetzt wird. Es folgt eine Alkylierung unter Bildung des tertiären Amids. Nach Abspaltung des Esters wird der Festphasenbaustein des γ -AA-Peptids erhalten (Schema 1.4).^[200]



Schema 1.4: Synthese des γ -AA-Bausteins: a) Glycin-*Ot*Bu/Glycin-*OBn*, NaBH_3CN ; b) $\text{R}^1\text{CH}_2\text{COOH}$, HBTU/HOBt, 6 d. c) Pd/C, H_2 für Benzylester; 80% TFA/Anisol für *tert*-Butylester.^[200]

Über eine *N*-Alloc-Vorstufe des γ -AA-Peptid-Bausteins können weitere Peptidomimetika erhalten werden. Dadurch sind in einer Festphasensynthese, ausgehend von der *N*-Alloc-Vorstufe, durch Umsetzung mit Sulfonylchloriden, Isocyanaten und Chlorformiaten weitere Klassen zugänglich (Schema 1.5).^[203] Somit stellt der AA-Peptidbaustein ein vielseitiges Mimetikum da, mit dem leicht weitere Verbindungsklassen entwickelt werden und genutzt werden können.



Schema 1.5: Festphasensynthese der Rückgratsequenzen der Peptidomimetika mit verschiedenen Funktionalitäten: a) DIC/HOBt, DMF; b) 1. Pd(PPh₃)₄, Me₂NH · BH₃, CH₂Cl₂; 2. RCOOH, DIC/HOBt, DMF oder RCOCl, DIPEA, CH₂Cl₂; 3. 20% Piperidin/DMF.^[203]

1.2.2 Fluorierte Aminosäuren – Fluor-Prolin

Natürlich fluorierte Aminosäuren kommen in der Natur nur äußerst selten vor.^[204] So sind bis heute lediglich fünf fluorhaltige Metabolite/Stoffwechselprodukte von geschätzten 130.000 strukturell charakterisierten Naturprodukten identifiziert worden (Abbildung 1.23).^[205-208] Im Kontrast dazu, sind bereits über 4000 chlorierte, bromierte und iodierte Naturprodukte isoliert worden.^[209]

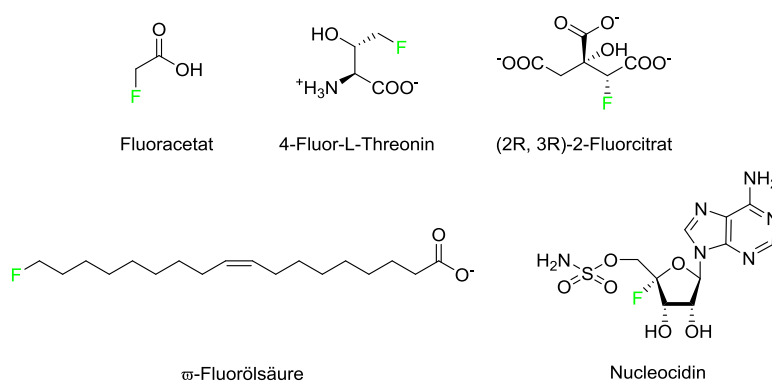


Abbildung 1.23: Natürlich vorkommende fluororganische Verbindungen.

Der Mangel an fluorhaltigen Metaboliten in der Natur lässt sich auf verschiedene Gründe zurückführen. Zum einen ist die Bioverfügbarkeit von Fluorid gegenüber Chlorid und Bromid deutlich geringer.^[208] Zum anderen weist Fluorid die höchste Hydratationswärme auf (~ 120 kcal/mol), sodass ein potentiell Enzym eine zuverlässige Desolvatisierungsstrategie entwickeln muss.

Eine der ersten identifizierten und charakterisierten Biosynthesen für fluorhaltige Aminosäure war die der Fluoraminosäure (2*S*,3*S*)-4-Fluorthreonin im Bakterium *Streptomyces cattaleya*.^[205, 210, 211] Das Fluoridanion wird hierbei in einer Schlüsselreaktion mit Hilfe des Enzyms Fluorinase auf das elektrophile 5' Kohlenstoff der S-Adenosylmethionin (SAM) übertragen (Abbildung 1.24). Aus dem so entstandenen 5-Fluoradenosin wird im Anschluss über eine Reihe von Reaktionen das 4-Fluorthreonin sowie Fluoracetat dargestellt. Das Fluoracetat stellt dabei ein Toxin dar.

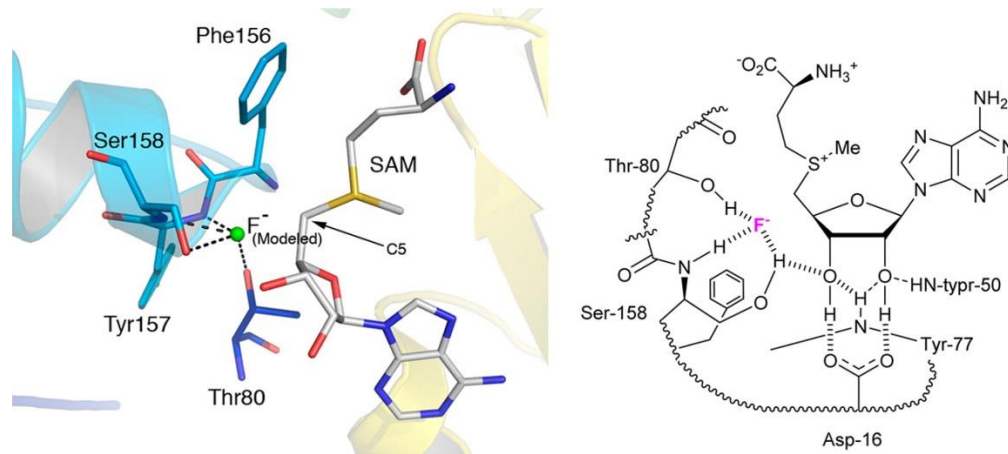
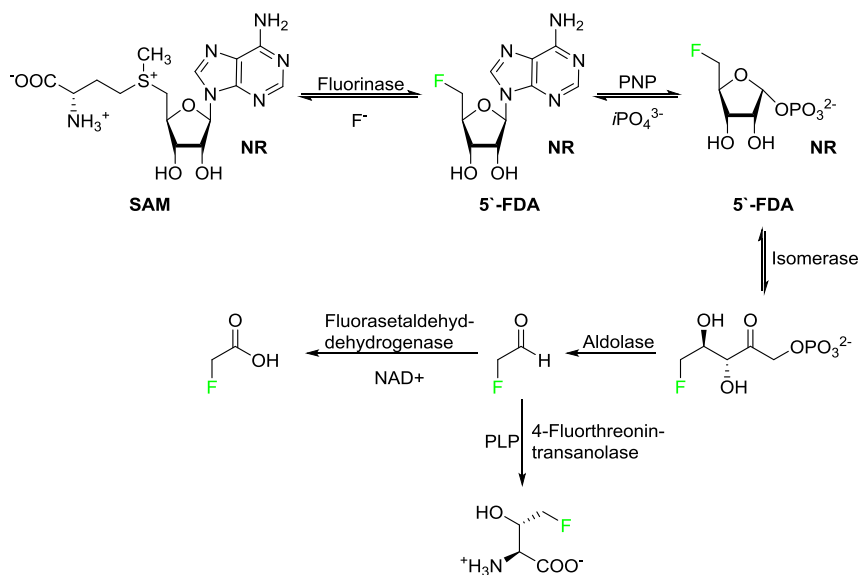


Abbildung 1.24: Zwei Darstellungen des Fluoridions/SAM Komplexes.^[208]

Die Schwierigkeit innerhalb dieser enzymatischen Reaktion liegt in der Erzeugung des Fluoridanions und der potentiellen Möglichkeit mit Wasser reagieren zu können. So weist das Enzym für diese Reaktion eine Bindungstasche auf, sodass das Ion desolvatisiert vorliegt.



Schema 1.6: Biosynthese von Fluorthreonin.

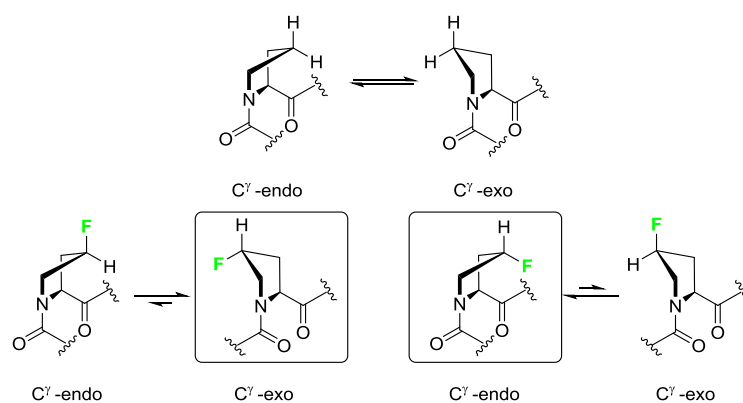
Fluorthreonin wurde bereits mehrfach synthetisch zugänglich gemacht.^[212-214] Hierbei lag eine Schwierigkeit darin die richtige Konformation zu erreichen.

Aufgrund seiner natürlichen Eigenschaften spielt Fluor eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der Konformation von Molekülen. Die sterischen Effekte sind eher geringfügig aufgrund des ähnlichen *van der Waals* Radius von 1.47 Å zu Wasserstoff mit einem Radius von 1.20 Å.^[215-217] Dagegen sorgt die hohe Elektronegativität (3.98 nach Pauling; im Vergleich zu Wasserstoff 2.20, Sauerstoff 3.44 und Kohlenstoff 2.55) für eine stark polarisierte C-F Bindung, welche einen starken Dipolmoment und ein tief liegendes C-F σ^* Orbital aufweist. In aliphatischen Systemen kommt es aufgrund dieser Effekte zu einer bevorzugten Ausrichtung des Fluors. Dieser Effekt wird auch als *gauche Effekt* bezeichnet. Er eröffnet neue Möglichkeiten in der Entwicklung neuer Medikamente.^[218-220]

Fluorhaltige Verbindungen sind gerade in der medizinischen Forschung sehr beliebt, sodass eine enorme Anzahl an fluorhaltigen Verbindungen bereits zur Verfügung steht. In der Medizinalchemie haben etwa 20% aller zugelassenen Pharmazeutika mindestens ein Fluoratom, mit steigender Tendenz bis zu 30%, da sich zahlreiche fluorierte Verbindungen in klinischen Studien der Phase II-III befinden.^[221-224] Dabei bewirkt die Einführung von Fluoratomen eine Veränderung der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften. Hierbei hat sich gezeigt, dass die fluorierten Verbindungen häufig eine bessere Bioaktivität aufweisen als ihre nicht fluorierten Analoga. Fluorierte Aminosäuren und größere Moleküle finden eine weitverbreitete Anwendung wie beispielsweise biologische Isotopenindikatoren, mechanische Sonden und enzymatische Inhibitoren sowie in medizinischen Anwendungen wie beispielsweise der Steuerung des Blutdrucks, Allergien und des Tumorwachstums.^[225] Fluorierte Aminosäuren (F-AS) dagegen werden vor allem als Bestandteil von modifizierten Peptiden oder Proteinen verwendet.^[226-228]

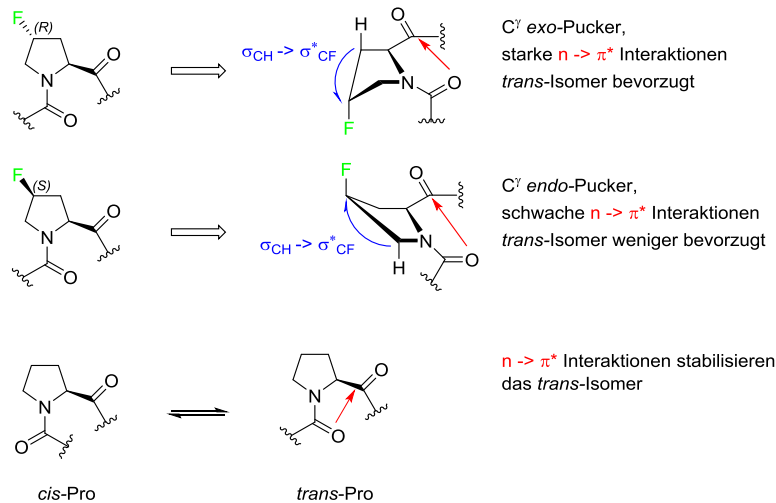
Eine besonders interessante fluorierte Aminosäure stellt das 4-Fluorprolin dar. Diese fluorierte Aminosäure wurde in den letzten Jahren vor allem in Verbindung mit Collagen, das Hauptstrukturprotein des Bindegewebes, in zahlreichen Forschungen untersucht.^[229, 230] Dabei wurde 4-Fluorprolin als Analoga des 4-(*R*)-Hydroxyprolin (4R-Hyp) eingesetzt, um die thermischen Stabilität von Collagen zu untersuchen.^[231-241] Innerhalb dieser Studien wurde das vorherrschende Paradigma überholt, dass die verbesserte Stabilität durch Wasserstoffbrückenbindungen ausgehend von Hydroxyprolin vermittelt wird.^[237, 242] Diese Hypothese wurde durch synthetische Kollagentripelhelices mit Fluorprolin wiederlegt.

Innerhalb dieser Untersuchungen konnte belegt werden, dass die Fluorproline in Abhängigkeit ihrer *cis* bzw. *trans* Fluorierung in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. So liegt das 4-(*R*)-Fluorprolin im C^{γ} -*exo* Pucker vor, wobei das 4-(*S*)-Fluorprolin bevorzugt den C^{γ} -*endo* Pucker bildet (Schema 1.7).



Schema 1.7: Bevorzugte Konformationen der 4-Fluorprolin im Vergleich zum natürlichen Prolin.

Dieser Effekt ist zurückzuführen auf eine günstige *gauche* Wechselwirkung zwischen dem Fluor und der *N*-C=O Bindung welche zusätzliche Auswirkung auf die Konformation der Amidbindung hat.^[229, 236, 243-245] Innerhalb des C^{γ} -*exo* Pucker wird das freie Elektronenpaar des Amid C=O in das π^* -Orbital des Estercarbonyls übertragen ($n \rightarrow \pi^*$ Übertragung). Dies stabilisiert die *trans*-(*Z*)-Konformation der Amidbindung gegenüber der *cis*-(*E*)-Amidbindung, welche in der C^{γ} -*endo* Form vorliegt. Ferner wird dieser Effekt durch eine $\sigma_{CH} \rightarrow \sigma_{CF}^*$ Hyperkonjugationswechselwirkung unterstützt. Diese Effekte (Schema 1.8) wurden durch NMR-Untersuchungen aufgeklärt und mit zahlreichen Kristallstrukturanalysen bestätigt.^[246, 247]



Schema 1.8: Auftretende Effekte durch die Monofluorierung von Prolin, die das Prolin in eine bevorzugte Konformation zwingen.

Jüngere Studien haben gezeigt, dass diese Effekte auch innerhalb des monofluorierte 3-Fluorprolin und des difluorierte 3,4-Difluorprolin auftritt.^[248, 249] So liegt das 3-(*R*)-Fluorprolin im C^γ -*exo* Pucker vor, wobei das 3-(*S*)-Fluorprolin bevorzugt den C^γ -*endo*-Pucker bildet. Die Fluorierung an C4 oder C3 bewirkt demnach eine Stabilisierung der C4-*endo*/C4-*exo*-Pucker, ähnlich wie die Hydroxylierung, nach dem gleichnamigen *gauche*-Effekt. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Pucker-Strukturen ist in der folgenden Abbildung 1.25 gezeigt.

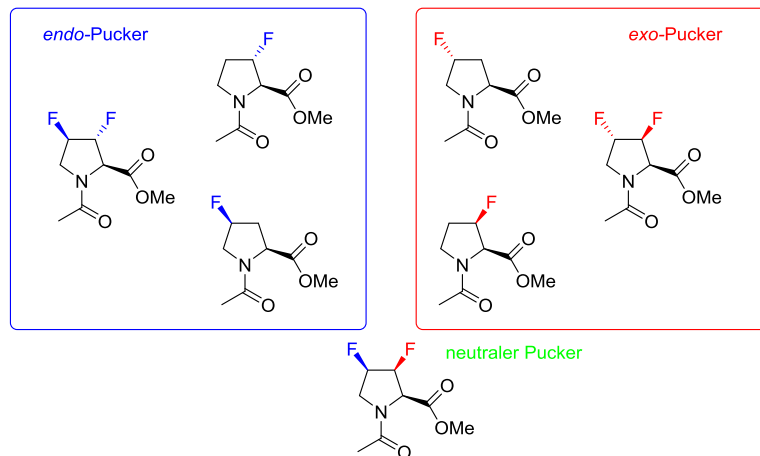


Abbildung 1.25: Übersicht der bevorzugten Konformationen der mono- bzw. difluorierten Proline.

Die Tatsache, dass die fluorierten Proline in einer bevorzugten Konformation auftreten, wurde in der Vergangenheit in der medizinischen Forschung vermehrt ausgenutzt, was das breite Interesse an der Fluorierung als Strategie zur Feinabstimmung der konformativen und physikochemischen Eigenschaften von biologisch aktiven kleinen Molekülen und Peptiden widerspiegelt.^[250-255] Hierbei wird zum einen ausgenutzt, dass die fünfgliedrige Prolin-Ringkonformation entweder zu einem C^γ -*exo*- oder einem C^γ -*endo*-Pucker verzerrt wird. Neben der Puckerbildung beeinflusst die Fluorierung auch das *cis/trans*-Verhältnis der Xaa-Pro-Peptidbindung relativ zu Prolin in einer lösungsmittelabhängigen Weise.^[256] Der induktive Effekt von Fluor sorgt dabei dafür, dass die Fähigkeit des Stickstoff *lone pair* nur noch vermindert mit der Amidcarbonylgruppe konjugieren kann. Damit wird der Doppelbindungscharakter der Amidbindung

reduziert. Als Folge wird die Rotationsenergiebarriere verringert und eine beschleunigte *cis/trans*-Isomerisierung kann beobachtet werden.^[243, 257]

Beispiele aus der medizinischen Forschung zeigen, dass der gezielte Einbau von Fluorprolin gegenüber den natürlichen bzw. unsubstituierten Prolinen zu einer erhöhten metabolischen Stabilität führen kann. Hierbei stabilisiert der Einbau von 4(*S*)- oder 4(*R*)-Fluorprolin in Inhibitoren von Fibroblasten-Aktivierungsprotein (FAP)(26) und Thrombin(27) einen einzelnen konformativen Pucker des Pyrrolidinrings (der *C4-endo*-Pucker im Falle des FAP-Inhibitors und der *C4-exo*-Pucker für den Thrombin-Inhibitor) (Abbildung 1.26).^[258, 259]

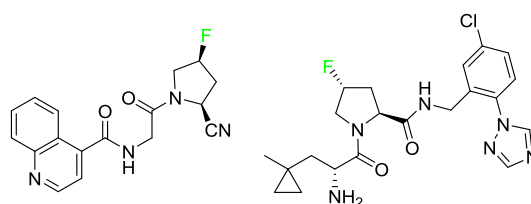


Abbildung 1.26: Fluorprolin in der medizinischen Forschung; FAP Inhibitor (links) und Thrombin-Inhibitor (rechts).

Die Gruppe um *Hoffmann-Röder et al.* verfolgte den Ansatz Fluor-Prolin, aufgrund seiner besonderen Struktureigenschaften und der Tatsache, dass das MUC1 eine erhöhte Anzahl an Prolin im Peptidrückgrat aufweist, in das Rückgrat des MUC1-Peptids als unnatürliche Aminosäure einzubauen.^[260] Hierbei lag der Fokus der Forschung stets in der Entwicklung von artifiziellen Epitopen auf der Basis von MUC1-Fragmenten. Einen eingehenden Einblick in diese Forschung stellt die vorliegende Dissertation dar.

Einen anderen Anwendungsbereich für fluoridierte Prolin innerhalb der MUC1-Peptidsequenz verfolgten *Somovilla et al.* Sie verwendeten Fluorprolin innerhalb von MUC1-Antigen als effizienten Nachweis von krebsassoziierten Anti-MUC1-Antikörpern von Patienten mit Prostatakrebs.^[261] Innerhalb dieser Bindungsassays konnten sie Affinitätsverbesserungen gegenüber den natürlichen (Glyco-)Peptiden nachweisen. Demnach liegt der Schwerpunkt dieser Forschung weniger auf der Entwicklung neuer Krebsimpfstoffkandidaten, sondern viel mehr als neuartiger Diagnostikmarker für verschiedene Krebsarten.

Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich bei Patienten mit Brust- und Bauchspeicheldrüsenkrebs bereits im Frühstadium zirkulierende Anti-MUC1-Antikörper im Serum befinden.^[262-267] Diese Antikörper können, allerdings nur sehr begrenzt, das Wachstum und die Verbreitung des Tumors verhindern (vgl. Kapitel 1.1.2). Dennoch gelten diese Antikörper derzeit als aussichtsreiche Diagnostikmarker. Folglich wurden Anstrengungen unternommen, um MUC1-basierte Antigene als diagnostische Werkzeuge für den Nachweis von Anti-MUC1-Antikörpern in Humanserum zu entwickeln. Leider ist ein kommerzieller Assay für die Krebsfrüherkennung, der auf dem Nachweis von anti-MUC1-Antikörpern in Humanserum basiert, bisher nicht verfügbar. *Wang et al.* berichteten in diesem Zusammenhang über signifikante Fortschritte in Richtung dieses Ziels, indem sie einen Assay beschrieben, der auf einem rekombinanten MUC1-Protein basiert, das sechs MUC1 *Tandem Repeat*-Sequenz enthält und wirksam Anti-MUC1-Antikörper im Serum von Patienten nachweisen kann.^[268] In jüngerer Zeit wurde eine Chimäre entwickelt, die sowohl MUC1 als auch den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER2) enthält, dessen Überexpression mit einer Malignität bei Brustkrebs in Verbindung gebracht wird, um Antikörper gegen MUC1 oder HER2 in

Humanserum nachzuweisen.^[269] Die beschriebenen Diagnostik-Assays beruhen jedoch auf einem Antikörpernachweis, der auf unmodifizierte natürlich vorkommende Antigene beruht.

In der Weiterentwicklung durch *Somovilla et al.* wurde sowohl das monofluorierte 4-(*S*)-Fluorprolin als auch das difluorierte 4,4-Difluorprolin in eine MUC1-Sequenz, bestehend aus 21-Aminosäuren, eingebaut. Die ausgewählte Sequenz ist dabei eine der insgesamt drei immundominanten Domänen, die auch in der Syntheseentwicklung von Vakzinen als besonders aussichtsreich angesehen wird (vgl. Kapitel 1.1.2 und 1.1.3).^[270] In Röntgenstrukturanalysen des kurzen Peptids mit der natürlichen Sequenz APDT(α -GalNAc)RP im Komplex mit dem SM3 Antikörper, der ein therapeutischer Antikörper zur Behandlung von Krebs ist, konnte nachgewiesen werden, dass der nicht-terminale Pro-Rest eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung des Antikörper/Antigen-Komplexes darstellt, der gegen aromatische Einheiten von Trp91L, Trp96L und Tyr32L gestapelt ist (Abbildung 1.27).^[271] Ein Austausch des nicht-terminalen Prolinrests des Antigens durch ein nicht-natürliches Prolinderivat, wie (4*S*)-4-Fluoro-L-Prolin und 4,4-Difluoro-L-Prolin führte zu einer nachweislichen Erhöhung der Antigen-Antikörper-Affinität aufgrund der Verstärkung der CH/ π -Bindungen, indem die Polarisierung der interagierenden CH-Einheiten durch die elektronegativen Fluoratome an spezifische Positionen des Prolin-Gerüsts erhöht wurden (Abbildung 1.27). Die Verbindungen zeigen eine deutliche Steigerung der Bindungsaffinität gegen zwei anti-MUC1-Antikörper gegenüber den natürlichen Antigenen. Innerhalb dieser Arbeit konnte anhand von Kristallstrukturen zusätzlich nachgewiesen werden, dass sich die Struktur der unnatürlichen Peptide im Vergleich zu den natürlichen Peptiden gebunden an den SM3 Antikörper nicht unterscheiden. Diese Tatsache ist völlig unerwartet, da bis dato von der *endo*-/*exo*-Pucker Strukturveränderung ausgegangen wurde (s.o.).

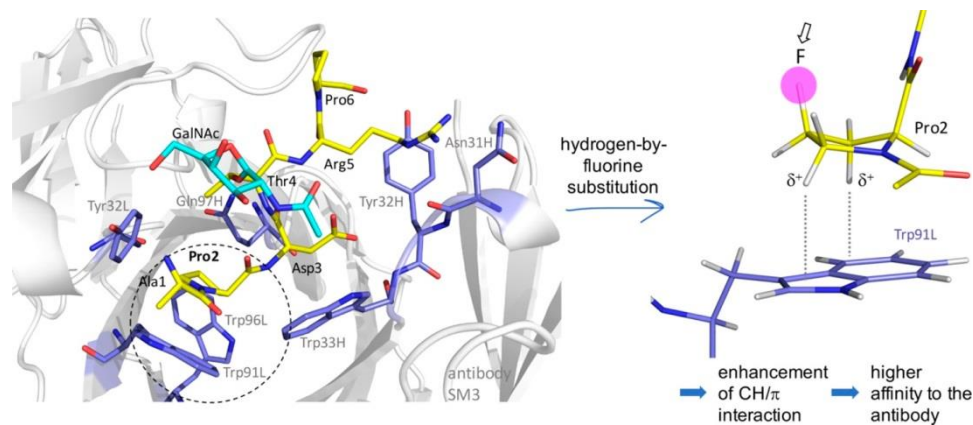
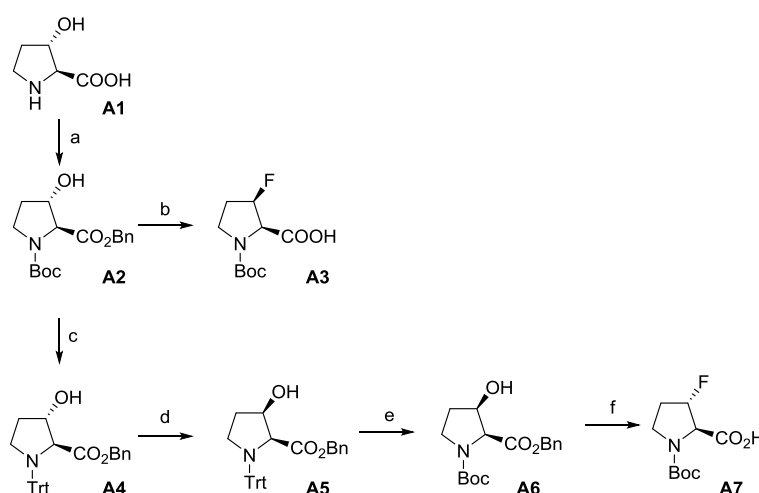


Abbildung 1.27: Röntgenstrukturanalysen des Peptids mit der Sequenz APDT(α -GalNAc)RP im Komplex mit dem SM3 Antikörper.^[261]

Im Folgenden soll erläutert werden, wie die verschiedenen fluorierten Proline synthetisch zugänglich gemacht werden, um beispielsweise in der Festphasensynthese eingesetzt werden zu können.

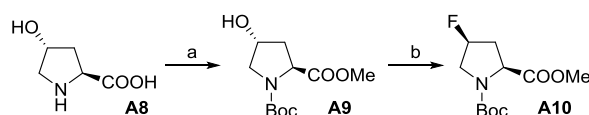
Die beiden monofluorierten (3*R*)- (**A3**) und (3*S*)-3-Fluorproline (**A7**) werden beide ausgehend von (3*S*)-Hydroxyprolin (**A1**) synthetisiert, da das (3*S*)-3-Hydroxyprolin (**A1**) als Startmaterial günstiger ist als das 3*R*-Isomer, wird dieses für beide Fluorprolineisomere eingesetzt, da die Isomere durch eine Oxidation und eine anschließende selektive Reduktion ineinander überführt werden können. In einem ersten Schritt wird die Aminogruppe des Hydroxyprolin **A1** mit der Boc-Schutzgruppe versehen, während die Carboxylgruppe in den entsprechenden Benzylester umgewandelt wird, zum Erhalt des geschützten Hydroxyprolins **A2**. Dieses

Hydroxyprolin **A2** kann nun entweder mit dem Fluorierungsmittel DAST fluoriert werden und durch Hydrolyse von der Benzylschutzgruppe befreit werden, um den fluorierten *Boc*-Festphasenbaustein **A3** zu erhalten, oder die *Boc*-Schutzgruppe wird in einem weiteren Schritt durch die *N*-Trt-Gruppe ausgetauscht. Die zuletzt genannte Alternative bietet die Möglichkeit in weiteren Schritten das gewünschte (3*S*)-F-Prolin **A7** zu erhalten. Die *N*-Trt-Gruppe bietet dabei den Vorteil, dass das Hydroxyprolin **A4** unter Umkehrung der Konfiguration der Hydroxylgruppen in einem anschließenden Syntheseschritt in das Hydroxyprolin **A5** überführt werden kann. Dies geschieht nach der *Mitsunobu*-Reaktion mittels Triphenylphosphin und Diethylazodicarboxylat. Vor der Fluorierung wird die *N*-Trt-Schutzgruppe durch die *N*-*Boc*-Schutzgruppe ausgetauscht zum Erhalt des *Boc*-geschützten Hydroxyprolinerivat **A6**. In einem finalen Schritt wird wieder mit DAST fluoriert und das Prolin wird anschließend durch Hydrolyse von der Benzyl-Schutzgruppe befreit (Schema 1.9).^[272]



Schema 1.9: Synthese von monofluoriertem 3-F-Prolin, welches als *Boc*-geschützter Festphasenbaustein Verwendung findet; (a) 1. Boc_2O , 2. BnBr ; (b) 1. DAST, 2. H_2 , Pd/C ; (c) 1. TFA, 2. TrtCl ; (d) 1. PPH_3 , DEAD, 2. KOH ; (e) 1. HCOOH , 2. Boc_2O , (f) 1. DAST, 2. H_2 , Pd/C .^[272]

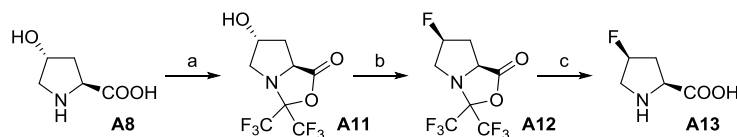
Für den Zugang der 4-(*R*)- und 4-(*S*)-Fluorproline werden in der Literatur mehrere Synthesestrategien verfolgt. Beispielsweise beschreiben *Kim et al.* einen synthetischen Ansatz ausgehend von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin (**A8**).^[273] In einem ersten Schritt wird das Prolin **A8** unter *Fisher*-Veresterungsbedingungen in den entsprechenden Methylester umgewandelt, um anschließend die Aminogruppe mit der *Boc*-Schutzgruppe zu schützen, um den *N*-*Boc*-Prolin-Methylester **A9** zu erhalten. In einem finalen Schritt wird das geschützte Hydroxyprolin mit DAST fluoriert, um das (2*S*,4*S*)-4-Fluorprolinerivat **A10** zu erhalten (Schema 1.10). Um das (2*S*,4*R*)-4-Fluorproline zu erhalten wird die Synthese analog durchgeführt, wobei als Startmaterial das teurere *cis*-4-Hydroxy-L-prolin verwendet wird.



Schema 1.10: Synthese des (2*S*,4*S*)-4-Fluorprolinerivats (**A10**) ausgehend von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin (**A8**): (a) 1. HCl , MeOH , 2. Boc_2O ; (b) DAST.^[273]

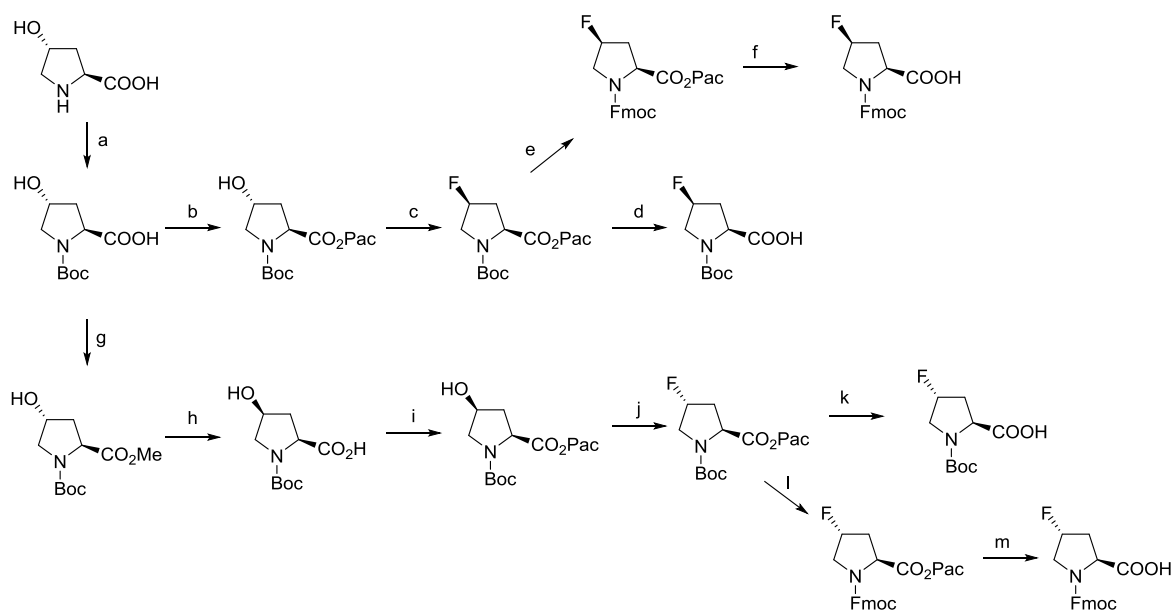
Alternativ zu dieser Synthese berichten *Hamacher et al.* über einen weiteren Ansatz, wobei das ungeschützte (2*S*,4*S*)- bzw. das (2*S*,4*R*)-4-Fluorprolin (**A13**) erhalten wird.^[274] Diese Synthese verwendet als Startmaterial

ebenfalls das *trans*- (**A8**) bzw. das *cis*-4-Hydroxy-1-Prolin, wobei die Behandlung des (2*S*,4*R*)- oder (2*S*,4*S*)-Isomers von Hydroxyprolin mit HFA zur Umwandlung in die entsprechenden 1,3-Oxazolidinone **A11** führte. Dieses Zwischenprodukt **A11** kann in einem weiteren Schritt mit DAST zur fluorierten Verbindungen **A12** mit umgekehrter Konfiguration umgesetzt werden. Die anschließende Hydrolyse der fluorierten Oxazolidinone liefert im Anschluss die gewünschten 4-Fluorproline **A13**.



Schema 1.11: Synthese des ungeschützten (2*S*,4*S*)-4-Fluorprolins (**A13**) nach Hamacher *et al.*; (a) (F₃C)₂CO, DMSO; (b) DAST; (c) *i*-PrOH, H₂O.^[274]

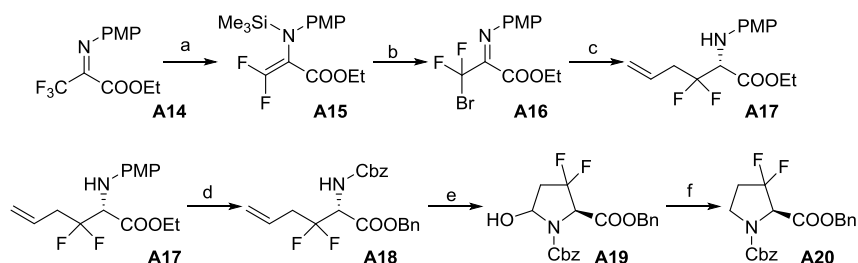
Einen ähnliche Synthesestrategie verfolgten Doi *et al.*, wobei sie einen Zugang zu den für die Festphasensynthese geeigneten *N*-Boc- und *N*-Fmoc-4-Fluorproline beschreiben. Der Syntheseweg ist allerdings mit seinen vielen Syntheseschritten deutlich aufwendiger als die zuvor beschriebenen Strategien (Schema 1.12).^[240]



Schema 1.12: Synthese des *N*-Boc- und *N*-Fmoc-4-Fluorprolin: (a) (Boc)₂O; (b) 1. Cs₂CO₃, 2. Pac-Br; (c) Xtal-Fluor[®] CH₂Cl₂; (d) Zn/AcOH; (e) 1. TFA/CH₂Cl₂ 2. NMM, *Fmoc*-OSu (f) Zn/AcOH; (g) CH₂N₂; (h) 1. DEAD, Ph₃P, HCO₂H, 2. NaOH; (i) 1. Cs₂CO₃, 2. Pac-Br (j) Xtal-Fluor[®] THF; (k) Zn/AcOH; (l) 1. TFA/CH₂Cl₂ 2. NMM, *Fmoc*-OSu (m) Zn/AcOH.^[240]

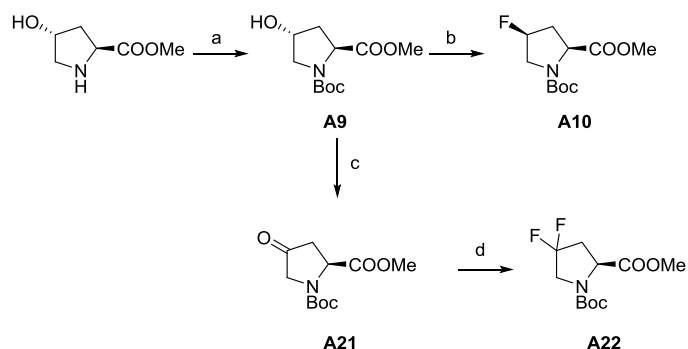
Der Zugang des entsprechenden difluorierten Prolins an der Position 3 ist deutlich aufwendiger als das monofluorierte Derivat. Als Ausgangsmaterial wird in diesem Zusammenhang auch nicht mehr das Hydroxyprolin verwendet. Einen möglichen synthetischen Zugang zu 3,3-Difluorproline beschreibt beispielsweise Suzuki *et al.*^[275] In einem ersten Syntheseschritt wird der leicht zugängliche (*R*)-Trifluormethyliminoester **A14** defluoriert mittels Mg(0), um das Difluorenamin **A15** zu erhalten. Dieses wird in einem folgenden Schritt zum Bromdifluormethyliminoester **A16** bromiert. Die asymmetrische Hydrierung mit Pd(OCOCF₃)₂ und (*R*)-BINAP und der sich anschließenden Allylierung mit Allyltributylstannan führt zum gewünschten Alken **A17**. In einem Folgeschritt werden die Schutzgruppen des Alkens verändert, um

den *N*-Cbz-geschützten Benzylester **A18** zu erhalten, der die Voraussetzung für eine Ozonolyse zur Gewinnung von Dibenzyl-(2*R*)-3,3-Difluor-5-hydroxypyrrolidin-1,2-dicarboxylat (**A19**) ist. In einem letzten Schritt wird das (*R*)-3,3-difluorpyrrolidine-1,2-dicarboxylat (**A20**) erzeugt durch Eliminierung des sekundären Alkohols mit Dichlortriphenylphosphoran und anschließender Hydrierung des resultierenden Alkens mit dem Wilkinson-Katalysator (Schema 1.13).



Schema 1.13: Synthese des 3,3-Difluorprolins (**A20**): (a) Mg , TMSCl ; (b) NBS ; (c) 1. $\text{Pd}(\text{OCOCF}_3)_2$, R-BINAP , H_2 , 2. AIBN , Allyltributylstannan (d) 1. CHTD , BnOH , 2. CAN , 3. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 4. CbzCl ; (e) O_3 , Me_2S ; (f) 1. $\text{PPH}_3 \cdot \text{Cl}_2$, 2. H_2 , $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$.^[275]

Einen leicht zugänglichen Syntheseweg zu 4,4-Difluorprolin **A22** beschreibt *Demange et al.*, die auch bereits über das monofluorierte Prolin **A10** ausgehend von *trans*-Hydroxyprolin berichteten.^[276] Hierbei wird die Oxidation von Hydroxyprolin **A9** dazu ausgenutzt um ein 4-Oxo-Prolin **A21** herstellen zu können, um es in einem weiteren Schritt mit DAST zu fluorieren (Schema 1.14).



Schema 1.14: Synthese des 4,4-Difluorprolins **A22** ausgehend von *trans*-Hydroxyprolin: (a) Boc_2O , $\text{NEt}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, RT ; (b) $\text{DAST}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$; (c) $\text{PDC}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ RT 3 \AA Molekularsieb; (d) $\text{DAST}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$.^[276]

2 ZIELSETZUNG

Wie bereits eingangs erläutert stellen Vakzine auf der Basis der *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1 einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Immuntherapie von Krebserkrankungen dar, wobei die Impfstoffe auf mucinartige Glycopeptide zurückgeführt werden können. Diese Zielstruktur erfüllt die zwingende Voraussetzung, dass diese einer tumorspezifischen Oberflächenstruktur entspricht, wobei sich die Oberflächenstrukturen der gesunden Zellen eindeutig von denen der malignen Zellen unterscheiden. MUC1 ist auf Tumorzellen stark überexprimiert und weist zudem ein unterschiedliches Glycosylierungsmuster auf (vgl. Kapitel 1.1.2). Da es jedoch aufgrund der biologischen Mikroheterogenität nicht möglich ist, die tumorassoziierten Antigene aus natürlichen Quellen zu isolieren, müssen entsprechende (Glyco-)Peptide synthetisch zugänglich gemacht werden. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezielt der Einbau von Fluorsubstituenten in das Kohlenhydratepitop fokussiert, um eine erhöhte Stabilität des Zuckers erreichen zu können. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Ansatz verlassen werden, um nunmehr das Peptidrückgrat zu verändern und hierdurch mögliche Peptid-Vakzine hinsichtlich der Stabilität zu verbessern. Als Grundlage hierfür diente die *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1, bestehend aus 20 Aminosäuren (Abbildung 2.1).

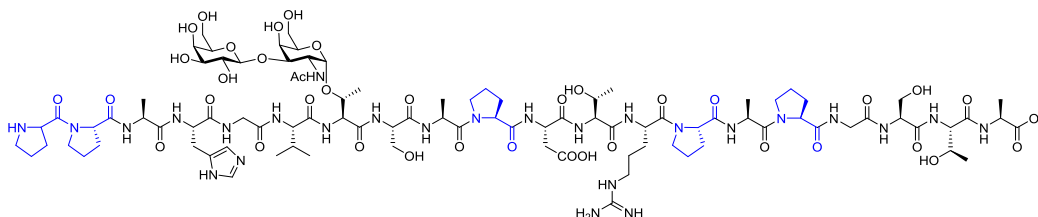


Abbildung 2.1: MUC1-(20)-Glyco-Peptid aus der *Tandem Repeat*-Sequenz.

Da die Peptidsequenz reich an Prolin ist, sollte diese natürliche Aminosäure durch ein fluoriertes Prolin ersetzt werden. Hierdurch sollte das Peptidrückgrat gezielt verändert werden, da insbesondere die Aminosäure Prolin zu den Struktur-gebenden Aminosäuren zählt. Ferner ist bekannt, dass der Einbau von fluorierten Aminosäuren dem Peptid eine erhöhte Stabilität geben kann (vgl. Kapitel 1.2.2).

In diesem Zusammenhang sollten zunächst die Festphasenbausteine *cis*- und *trans*-4-Fluor-L-prolin (Abbildung 2.2) in großen Mengen hergestellt werden.

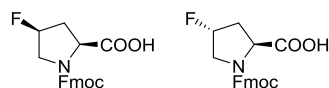


Abbildung 2.2: Festphasenbaustein *cis*- und *trans*-4-Fluor-L-prolin.

Ferner sollte das Peptidrückgrat durch so genannte α -AA- und γ -AA-Glyco-Peptid-Bausteine verändert werden, wobei hierbei zunächst der synthetische Zugang dieser Bausteine im Vordergrund stand. Bei dem α -AA-Mimetikum-Baustein (H_2N -Mim-Ser(T_N)-Gly-COOH) konnte auf die Arbeiten von *F. Karch* zurückgegriffen werden. Die Bausteine sind in der folgenden Abbildung 2.3 dargestellt.

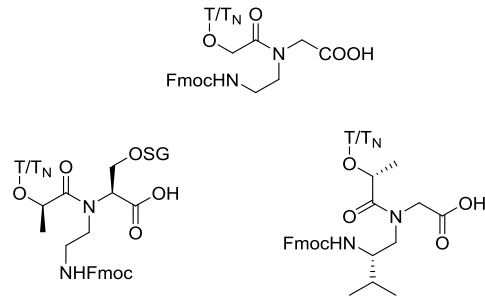


Abbildung 2.3: α -AA- und γ -AA-Peptid-Festphasenbausteine.

Die Peptide, welche die oben genannten Bausteine enthalten, sollten mittels mikrowellenunterstützter Festphasenpeptidsynthese hergestellt werden. Sämtliche Peptide sollten anschließend hinsichtlich ihrer räumlichen Struktur und ihrer Stabilität hin untersucht werden. Wobei die räumliche Struktur anhand von durchgeführten NMR-Experimenten untersucht werden sollte, wohingegen die Stabilität der Peptide mit Hilfe von Abbaustudien getestet werden sollte. Außerdem sollten auch geeignete Epitope in ELISA-Experimenten hinsichtlich der Antikörperbindung bzw. der immunologischen Evaluierung getestet werden. Diese Ergebnisse sollten stets mit der natürlichen Sequenz verglichen werden, sodass auch die natürlichen Zuckerbausteine synthetisch zugänglich gemacht werden müssen (Abbildung 2.4).

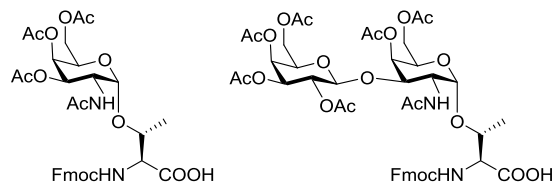


Abbildung 2.4: Natürlicher T- bzw. T_N -Festphasenbaustein.

3 ALLGEMEINER TEIL

3.1 Design von synthetischen Peptiden aus der *Tandem Repeat-Sequenz des Mucin 1*

Die Möglichkeit gegenüber Tumorzellen eine aktive Immunisierung durchzuführen stellt einen Meilenstein in der Krebstherapie dar. Dafür ist die Entwicklung von Vakzinen, welche eine starke und selektiv gegen Krebs gerichtete Immunantwort auslösen können in der aktuellen Forschung von besonderem Interesse. Vakzine auf der Basis des krebsassoziierten Glycoproteins MUC1, welches auf der Oberfläche von Epithelzellen lokalisiert ist, haben sich als sehr erfolgsversprechende Kandidaten herausgestellt. Für die Tumorimmuntherapie stellt das MUC1 vor allem aufgrund der bis zu 100fach häufigeren Expression auf Krebszellen im Vergleich zu gesunden Normalzellen ein geeignetes Target dar. Zum anderen weist MUC1 in Krebszellen ein verändertes Glycosylierungsmuster auf, sodass das Immunsystem die veränderten Glycopeptidstrukturen selektiv adressieren kann.^[14, 103, 105, 277-279]

Da sowohl die Isolation als auch die Aufreinigung von homogenen Glycopeptiden in ausreichenden Mengen, aufgrund der natürlich vorkommenden Heterogenität der Peptide, aus natürlichen Quellen mit den aktuellen Techniken nahezu unmöglich ist, bietet die chemische Synthese einen geeigneten Weg, deren Verfügbarkeit sicher zu stellen.^[280-283] Mit Hilfe der Glycopeptidsynthese ist es möglich, homogene und vollkommen reine und somit definierte tumor-assoziierte Glycopeptide sowohl für die biologische als auch medizinische Forschung bereit zu stellen. Neben der Bereitstellung bieten synthetisch hergestellte Glycopeptide zudem die Möglichkeit Effekte, wie beispielsweise die zugrundeliegende Faltungsprozesse oder die spezifische Glycosylierungsmuster der resultierenden Peptide, sowie deren Funktion zu untersuchen. In der Krebsimmuntherapie wurden bereits Impfstudien mit reinen tumorassoziierten Antigen (TAA) Präparationen, auf der Basis von MUC1 durchgeführt, die gezielt eine T-Zellen-Aktivierung nachweisen konnten.^[142] Auch in ersten klinischen Studien konnten für diese Vakzine, die mit Mammakarzinomen assoziiert sind, immunogene Wirkungen nachgewiesen werden.^[284, 285]

Nachteilig ist jedoch, dass die natürlichen (Glyco-)Peptide eine unzureichende Immunogenität aufweisen um eine starke Immunantwort hervorzurufen. Zur Durchbrechung der Toleranzschwelle ist die Konjugation an entsprechende Carrierproteine notwendig. Mögliche Carrierproteine sind beispielsweise das Rinderserumalbumin oder das Tetanus-Toxoid. Es konnte jedoch in Versuchen gezeigt werden, dass die Konjugation mit Rinderserumalbumin nur mäßige Immunreaktionen und Antikörper vom IgM-Typ induzieren.^[286, 287] Im Gegensatz dazu, wurden starke und selektive Immunreaktionen vom IgG-Typ in transgenen Mäusen beobachtet, welche mit vollsynthetischen Konjugaten aus tumorassoziierten Glycopeptiden und T-Zell-Epitopen vom Ovalbumin immunisiert wurden.^[288, 289] Daneben wurden auch außerordentlich starke Immunreaktionen bei der Verwendung von synthetischen Impfstoffen auf der Basis von Sialyl-T_N-Saccharid-Seitenketten beobachtet, wobei das Peptid an Tetanus als Trägerprotein gebunden wurde.^[290] Tetanus-Toxid-basierende MUC1-Glycopeptidimpfstoffe haben dabei den besonderen Vorteil, dass sie auch für die humorale Impfung genutzt werden können.

Jedoch unterliegen solche natürlichen (Glyco-)Peptide einem metabolischen Abbau gegenüber entsprechenden Glycosidasen und Proteasen und sind somit nur begrenzt für eine aktive Immunisierung geeignet. Eine vielversprechende Lösung bietet hierbei der Einbau entsprechender Peptidmimetika oder rückgratmodifizierter Aminosäuren in die *Tandem Repeat*-Sequenz. Hierdurch soll die Stabilität der synthetisierten Antitumorvakzine und deren Bioverfügbarkeit erhöht werden. Die bessere Bioverfügbarkeit der tumorassoziierten Epitope sollte zudem gegenüber dem Immunsystem eine effektivere Immunantwort zulassen und den Einsatz geringerer Mengen dieser synthetisch aufwendig herzustellenden Vakzine erlauben.

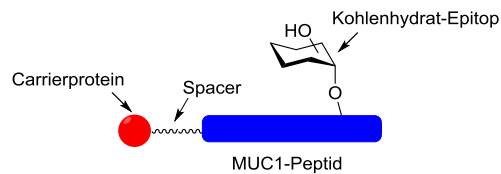
Im Arbeitskreis um *Hoffmann-Röder* konnte bereits gezeigt werden, dass ein Einsatz von fluoridierten T-Antigen-Mimetika sowohl zu einer IgG-induzierte Immunantwort führt, als auch eine erhöhte Stabilität vom Zuckermimetikum ausgeht.^[291] Wie bereits eingangs erwähnt kann neben den Zucker-Mimetika Strukturen auch das Peptidrückgrat modifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit stehen die rückgratmodifizierten Aminosäuren wie das fluoridierte Prolin im Vordergrund der Betrachtung. Prolin bietet als strukturgebende Aminosäure ein geeignetes Target für die Modifizierung von Vakzinen. Außerdem ist die *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1 reich an Prolin, sodass durch den Einbau von Prolin-Mimetika die Konformation der Peptide gezielt an verschiedenen Positionen beeinflusst werden kann. Außerdem ist eine erhöhte Stabilität durch den Einbau von fluoridierten Prolinen bereits an Kollagen gezeigt worden (vgl. Kapitel 1.2.2).

Als ein Ziel dieser Arbeit sollte vor allem der Einfluss des Einbaus von fluoridierten Prolinen auf die Stabilität hin und die strukturelle Änderungen untersucht werden. So ist es erstrebenswert ein Vakzin auf der Grundlage von artifiziellen Epitopen des MUC1-(Glyco-)Peptids zu synthetisieren, welches stabiler gegen enzymatischen Abbau ist, ohne jedoch die immunologische Wirksamkeit zu verlieren. Solche Vakzine eignen sich vor allem in Langzeitbehandlungen, da die Immunogenität durch die erhöhte Stabilität zusätzlich erhöht ist. Demnach sollten in dieser Arbeit Peptide synthetisiert werden, welche Verwendung in der Krebsimmuntherapie haben können.

Der Aufbau solcher vollsynthetischen Peptide, die innerhalb von Vakzinen zum Einsatz kommen können, lässt sich folgendermaßen beschreiben: Eine Partialstruktur des MUC1-Peptids (B-Zell-Epitop) ist mit einem Spacer, der als Abstandhalter dient, verbunden. An den Spacer kann ein geeignetes Trägerprotein (T-Zell-Epitop) gebunden werden (Abbildung 3.1).

Innerhalb eines Projekts dieser Arbeit sollten sowohl Glycopeptide als auch solche Peptide ohne Kohlenhydrat-Epitope synthetisiert werden. Bei der Synthese sollte die natürliche Aminosäuren Prolin gegen die unnatürliche Aminosäuren 4-F-Prolin ausgetauscht werden. Durch diesen Austausch sollte die Stabilität der Peptide erhöht werden, ohne große strukturelle Änderungen hervorzurufen.



P - P - A - H - G - V - T - S - A - P - D - T - R - P - A - P - G - S - T - A
1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20

Abbildung 3.1: Vollsynthetisches Glycopeptid-Vakzin mit der ausgewählten Peptidsequenz aus der *Tandem Repeat*-Region des MUC1.

Daneben sollten auch solche Peptide synthetisiert werden, welche Vorläufer dieser Vakzine darstellen. Diese bestehen lediglich aus der *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1, also ohne den Spacer. Auch hierbei sollte die unnatürliche Aminosäure 4-F-Prolin in die Sequenz eingebaut werden. Ziel der Synthese dieser Peptide war es den Einfluss von unnatürlichen Aminosäuren auf das Peptidrückgrat hin zu untersuchen. Außerdem sollten diese Peptide auf ihre metabolische Stabilität hin untersucht werden.

Zuletzt sollten auch solche Glycopeptide synthetisiert werden, welche statt einem natürlichen Kohlenhydratepitop ein Kohlenhydratmimetikum besitzen. Diese Peptide sollten sowohl mit, als auch ohne Spacer synthetisiert werden. Für eine Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie ist es stets von Vorteil zunächst ein Peptid ohne Spacer zu synthetisieren.

Alle benötigten Peptide werden über Festphasenpeptidsynthese dargestellt.

3.1.1 (Glyco-)Peptidfestphasensynthese

3.1.1.1 Historischer Abriss

Seit der Entwicklung der ersten Festphasenpeptidsynthese (SPPS) durch *Merrifield* im Jahr 1963^[292] hat es in den letzten 50 Jahren zahlreiche Anstrengungen zur Verbesserung dieser Synthesen gegeben. Neben der Optimierung der Reaktionsbedingungen und der damit verbundenen Entwicklung von neuen Harzen und Linkern sowie Kupplungsreagenzien stand auch die Aufreinigung der Peptide im Mittelpunkt der Forschung.

In einer ersten Veröffentlichung zum Thema beschreibt *Merrifield* die Synthese eines Tetrapeptids. Die Synthese war ohne Zweifel erfolgreich, jedoch waren die gewählten Kupplungs- und Entschützungsbedingungen nur für kleine Peptide geeignet. Zudem gab es Probleme in der Aufreinigung. Die Situation verbesserte sich jedoch schon nach einem Jahr. So veröffentlichte *Merrifield* 1964 eine Weiterentwicklung seiner Methode, in dem er die *Boc*-Schutzgruppenchemie einführte, welche noch heute zur Anwendung kommt.^[293] Hierbei ist die Schutzgruppe sehr viel säurelabiler als die zuvor verwendete Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe.

Bei dieser Synthesestrategie wird die erste Aminosäure während der Synthese mit dem C-terminus an ein Harz gebunden, welches aus einem Polymer besteht. Um eine mögliche Aggregation zu verhindern, befindet sich außerdem ein zusätzlicher Linker zwischen Harz und dem wachsenden Peptid. Der Vorteil dieser Synthese an fester Phase liegt in der Reinigung durch einfaches Waschen des Harzes (Bradykinin) nach jedem Syntheseschritt. Diese Veränderung löste nicht nur das Problem, dass nur kürzere Peptidsynthesen

möglich waren, sondern brachte auch eine massive zeitliche Beschleunigung der Synthese mit sich. So konnten Peptide erstmalig binnen weniger Tage hergestellt werden.

Alternativ zur ursprünglichen *Merrifield*-Synthese entwickelte sich zehn Jahre nach ihrem Durchbruch eine weitere Technik^[294, 295] die durch *Carpino*^[296] im Jahr 1972 veröffentlicht wurde. Diese Technik beruht auf der basenlabilen *N*-terminalen Schutzgruppe *Fmoc*. Eine Weiterentwicklung dieser Methode liegt darin, dass die Abspaltprodukte, die bei der *Fmoc*-Entschützung auftreten, photometrisch detektiert werden können, wodurch eine Verfolgung des Synthesefortschritts ermöglicht wird.

Die Einführung der *Fmoc*-Strategie und die damit verbundene spektrometrische Verfolgung der Synthese machte es möglich, dass die Synthese nun vollautomatisch ablaufen konnte. Die Tatsache, dass mit dem Abspaltprodukt die Peptidsynthese verfolgt werden konnte, ermöglichte die Entwicklung von „*continuous flow*“ Methoden und den Aufbau erster vollautomatischer Peptidsynthesizer mit analytischer Überwachung.^[297-300] In den letzten Jahren wurden diese Peptidsynthesizer weiterentwickelt, sodass im Jahre 1992 ein weiterer Durchbruch durch die Zuhilfenahme von Mikrowellen gelang.^[301] Durch diese Meilensteine der Entwicklung der Peptidsynthese ist es nun möglich sehr effizient eine Vielzahl an Peptiden zu synthetisieren.

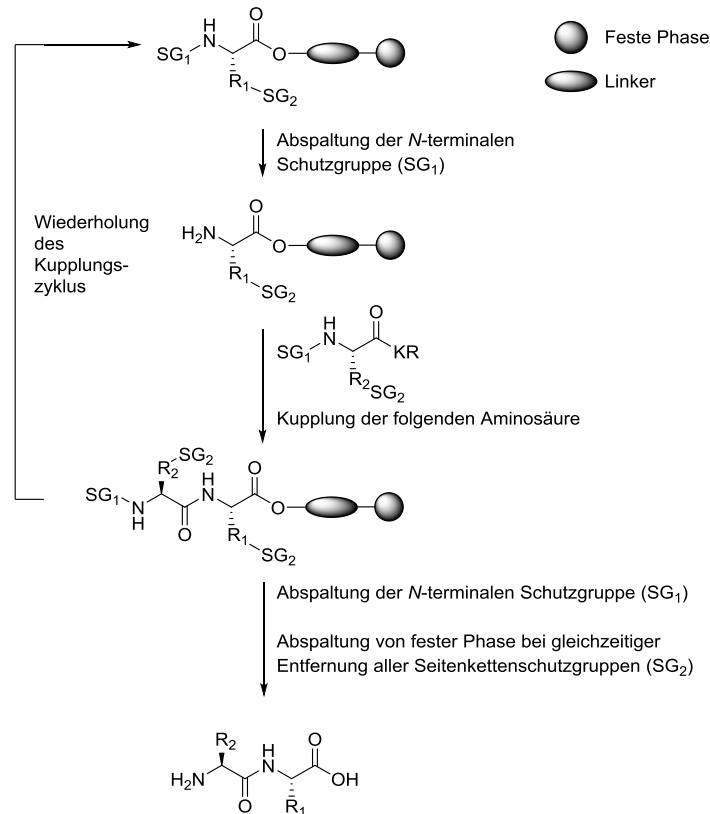
Aufgrund der Effizienz und der milden Reaktionsbedingungen im Vergleich zu der klassischen *Merrifield*-Methode findet die mikrowellenunterstützte *Fmoc*-Strategie für die Synthese der (Glyco-)Peptide in dieser Arbeit Anwendung.

3.1.1.2 Allgemeine Erläuterung der Festphasensynthese

Das allgemeine Prinzip einer Festphasensynthese besteht aus lediglich zwei Schritten, die sich stets wiederholen (Schema 3.1). Zum einen aus der Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe und zum anderen aus der Kupplung einer weiteren Aminosäure. Zudem findet die Peptidfestphasensynthese in nur einem Reaktionsgefäß statt, welcher nach jedem Schritt gereinigt werden kann und so eine Abtrennung von nicht umgesetzten Reagenzien sowie angefallenen Nebenprodukten ermöglicht.

Die erste Aminosäure ist mit ihrer *C*-terminalen Carboxylgruppen an einem Harz über einen Linker gebunden und trägt an ihrer *N*-terminalen Aminogruppe, wie alle anderen Aminosäuren auch, eine temporäre Schutzgruppe (SG₁: *Boc* bzw. *Fmoc*). Alle Aminosäuren, welche in ihren Seitenketten (R₁, R₂) funktionelle Gruppen tragen, werden zudem mit entsprechenden, den Reaktionsbedingungen kompatiblen, Schutzgruppen (SG₂) versehen, um eine Reaktion der Seitenkettenfunktionalitäten zu unterbinden. Dabei dient die *N*^α-Schutzgruppe als temporäre Schutzgruppe, welche nach jedem erfolgreichen Kupplungsschritt entfernt werden kann. Im Gegensatz hierzu soll die Seitenkettenschutzgruppe permanent an die Aminosäure gebunden sein, um ungewollte Nebenreaktionen zu vermeiden. Nachdem die erste *N*-terminal geschützte Aminosäure über einen Linker ans Harz gebunden ist, erfolgt der erste Schritt bei dem die *N*-terminale Schutzgruppe (SG₁) entfernt wird, um im folgenden Schritt mit der zu kuppelnden Aminosäure eine Amid-Bindung aufzubauen. Dabei wird die neue Aminosäure stets im Überschuss zur Reaktion gebracht um möglichst quantitative Umsätze zu generieren. Die Verknüpfung erfolgt durch die Aktivierung der Carboxylgruppe unter Ausbildung eines Aktivesters sowie durch die Reaktion mit einem Kupplungsreagenz (KR). Überschüssige Reagenzien werden im Anschluss durch Waschen des Harzes entfernt. Diese beiden

Schritte können im Anschluss beliebig oft wiederholt werden bis das Peptid in der gewünschten Länge vorliegt. Der abschließende Schritt der Synthese stellt die Entfernung der *N*-terminalen Schutzgruppe dar, bevor die Abspaltung des Peptids von der festen Phase unter gleichzeitiger Deblockierung aller Seitenkettenschutzgruppen erfolgt.^[292]



Schema 3.1: Schematische Darstellung der Festphasenpeptidsynthese; KR: Carboxyaktivierende Gruppe; $R_{1,2}$: Aminosäuresidekette; SG_1 : *N*-terminale temporäre Schutzgruppe; SG_2 : Seitenkettenschutzgruppe.

Das Rohpeptid wird im Anschluss mit Standardmethoden wie beispielsweise der Chromatographie gereinigt. Vor allem die starke Entwicklung der Verbesserung der Trennung von ähnlichen Produkten, war eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der SPPS in Bezug auf die nachfolgende Analyse und die Reinigung.^[302] Heutzutage ist es mit Hilfe von hochwertiger Massenspektrometrie (MS) mit weichen Ionisierungstechniken wie MALDI-TOF und ESI möglich, schnell eine eindeutige Identifizierung des Peptids und aller Nebenprodukte zu erstellen.^[303]

3.1.1.3 Synthesebedingungen der SPPS

Bei der Wahl der Synthesebedingungen der Peptidsynthese müssen zunächst fünf wichtige Kriterien berücksichtigt werden.

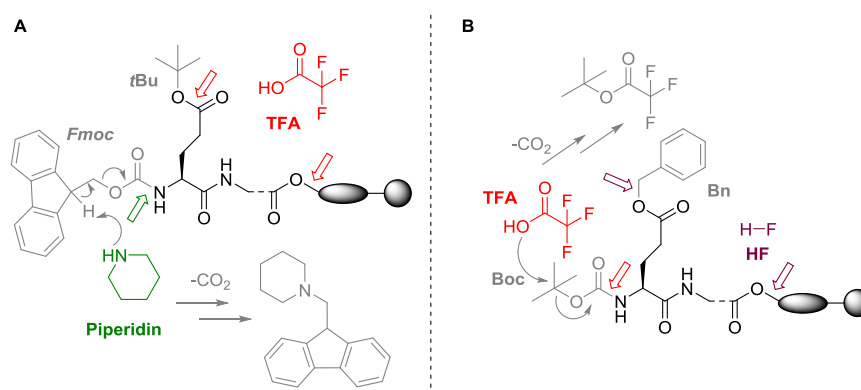
1. Wahl der temporären *N*^α-Schutzgruppe
2. Wahl der Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren
3. Wahl des Harzes
4. Wahl des Linkers
5. Wahl der Kupplungsbedingungen

Vor- und Nachteile dieser sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Für die Peptidfestphasensynthese haben sich vor allem zwei wichtige N^α -Schutzgruppen etabliert: *Boc*^[304] sowie *Fmoc*.^[305] Die im ersten SPPS-Verfahren von *Merrifield* angewandte Schutzgruppe war die *Boc*-Gruppe als temporäre Schutzgruppe für die Aminofunktion und Bn (Benzyl) oder vergleichbare Schutzgruppen für die Seitenketten der trifunktionellen Aminosäuren. Die *N-Boc*-Schutzgruppe wird unter Behandlung mit 20 bis 50%iger TFA (Trifluoressigsäure) entschützt, während die Seitenkettenschutzgruppen und die Abspaltung von der festen Phase unter härteren Bedingungen in den meisten Fällen mit Fluorwasserstoffsäure, erfolgt.^[306] So basiert die *Boc*/Bn –Schutzgruppenstrategie auf der abgestuften Säurelabilität der permanenten und der temporären Schutzgruppen.

Während die *Boc*-Schutzgruppe vor allem in den Anfängen der SPPS verwendet wurde, eröffnete die Einführung der *Fmoc*-Strategie^[305] neue Wege und vor allem ein viel variables Synthesekonzept. Verglichen mit der *Boc*-Schutzgruppen-Strategie ist die Verwendung der *Fmoc*-Schutzgruppen-Strategie deutlich milder und durch die Wahl von orthogonalen Schutzgruppen deutlich flexibler. So wird die basenlabile *Fmoc*-Schutzgruppe N^α -terminal eingesetzt, wobei die Seitenkettenschutzgruppen sowie der Linker säurelabil sind.^[307-309] In der Regel werden *tert*-Butyl- und Trityl-Schutzgruppen für die Seitenkettenfunktionen in Kombination mit säurelabilen Estern als Anker eingesetzt, deren Spaltung durch Behandlung mit variablen Konzentrationen an TFA erfolgt. Die *Fmoc*-Abspaltung erfolgt basisch unter Verwendung von Piperidin.

Heutzutage werden beide Schutzgruppenstrategien zur Synthese von Peptiden in der automatisierten Synthese verwendet (Schema 3.2). Dennoch bietet die *Fmoc*-/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie den großen Vorteil der Orthogonalität. Dies ermöglicht die selektive Entfernung der Schutzgruppen unter Verwendung von vollständig unterschiedlichen chemischen Bedingungen und eine damit verbundene deutlich mildere Gesamtreaktion.^[295, 310] Ein weiterer Vorteil der *Fmoc*-Strategie ist die Tatsache, dass keine speziellen Reaktionsgefäße notwendig sind. Diese sind dagegen in der *Boc*-Strategie zwingend notwendig, da die Behandlung mit korrosivem und giftigem HF erfolgt. Zudem führt die sich wiederholende Behandlung der *Boc*-Schutzgruppe mit TFA oft zu säurekatalysierten Nebenreaktionen.^[311]



Schema 3.2: *Fmoc* und *Boc* Schutzgruppenstrategie in SPPS. (A) Die *Fmoc*-Gruppe wird durch die Behandlung mit Piperidin in einer β -Eliminierung gespalten, während die *t*Bu-Gruppe mit TFA abgelöst wird. (B) Die säurelabilen Schutzgruppen *Boc* und Bn werden unter Zuhilfenahme von TFA und HF unter Säurehydrolyse gespalten.

Aufgrund der 50 jährigen Geschichte der SPPS hat sich eine Vielzahl an Seitenkettenschutzgruppen entwickelt. Proteinogene Aminosäuren enthalten verschiedene funktionelle Gruppen (Amino, Carboxyl,

Hydroxy, Thio, Pyrrolidinyl, Imidazolyl, Guanidinyll, Amido- und Indolyl), die während der Peptidsynthese geschützt werden müssen, um Nebenreaktionen und die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern. In der folgenden Abbildung 3.2 sind gängige orthogonale Schutzgruppen abgebildet, die in der *Fmoc/tBu*-Peptidfestphasensynthese eingesetzt werden und unter Behandlung mit hochkonzentrierter TFA abgespalten werden.

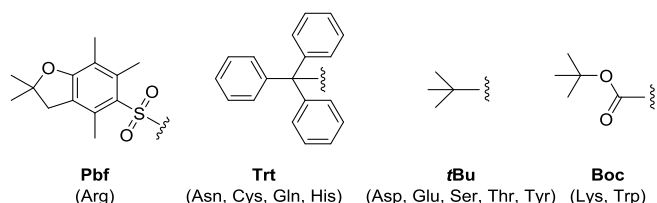


Abbildung 3.2: Gängige Seitenkettenschutzgruppen in der *Fmoc/tBu* Strategie. Pbf: 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl; Trt: Trityl; *tBu*: *tert*-Butyl; Boc: *tert*-Butyloxycarbonyl. Keine Seitenkettenschutzgruppen benötigen die Aminosäuren Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro und Val.

Zusätzlich zu den gängigen vier Schutzgruppen, gibt es weitere Schutzgruppen, die unter spezifischen Bedingungen wie Hydrazin (Dde),^[312] sehr gering konzentrierten Säuren (MMT),^[313] Palladium-katalysiert (Alloc)^[314] oder UV-Licht gespalten (Nvoc)^[315] werden.

Neben der Wahl der Seitenkettenschutzgruppen spielt auch die Wahl des festen Trägers eine große Rolle in der Festphasensynthese. So muss die feste Phase eine Reihe von Anforderungen erfüllen; sie muss in allen verwendeten Lösungsmitteln unlöslich, chemisch und physikalisch resistent und zudem auch mechanisch stabil sein um die Filtration zu gewährleisten. Daneben muss das Harz eine geringe Vernetzung aufweisen, um eine gute Zugänglichkeit zu erreichen. Weiterhin muss das Harz auch eine hohe Quellfähigkeit besitzen. So gewährleisten hoch quellfähige Träger eine hohe Rate an Massentransfer. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, sobald sperrige Reagenzien zum Einsatz kommen. Kleinere Harzkügelchen können im Vergleich zu ihrer ursprünglichen Größe in organischen Lösungsmitteln ihr Volumen sechsfach vergrößern.

Zusätzlich zu diesen Eigenschaften muss das Polymer auch eine funktionelle Gruppe aufweisen, die die Kopplung an den Linker ermöglicht.^[292, 316, 317] Am häufigsten kommen folgende drei Harze in der SPPS zum Einsatz: traditionelle Polystyrol-basierte (PS) Polymere,^[292] Polyethylenglycol-funktionalisierte PS (PEG-PS) (wie beispielsweise TentaGel)^[318, 319] und reine PEG-basierte Harze wie PEGA-Harz^[320] und ChemMatrix (Abbildung 3.3).^[321]

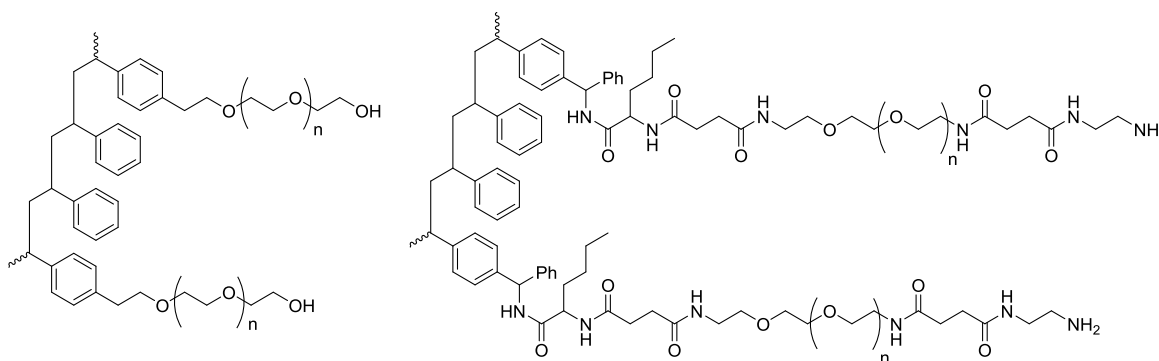


Abbildung 3.3: Häufig genutzte Harze in der Festphasensynthese. Tenta-Gel (links) und PEG-PS (rechts).

Neben der Wahl des Harzes stellt die Wahl der Ankergruppen, welche die reversible Verbindung zwischen dem polymeren Träger und dem wachsenden Peptid darstellt, einen entscheidenden Schritt in der Gestaltung von Festphasenpeptidsynthesen dar. So bestimmt der Linker die Beladung des Harzes, die Distanz zwischen Harz und Peptid, die chemischen Bedingungen für die Kupplungen und Entschützungen während der Peptidsynthese sowie die C-terminale Funktionalität des synthetischen Peptids. In den meisten Fällen werden Säure- oder Amidlinker genutzt. In der *Fmoc/tBu*-Schutzgruppenstrategie werden bevorzugt säurelabile Linker wie Wang-,^[322] HMPA-,^[323] Rink-^[324] oder PAL-Linker^[325] verwendet (Abbildung 3.4). Diese lassen eine milde Abspaltung von Peptid und Linker zu ohne die glycosidischen Bindungen zu beeinflussen.

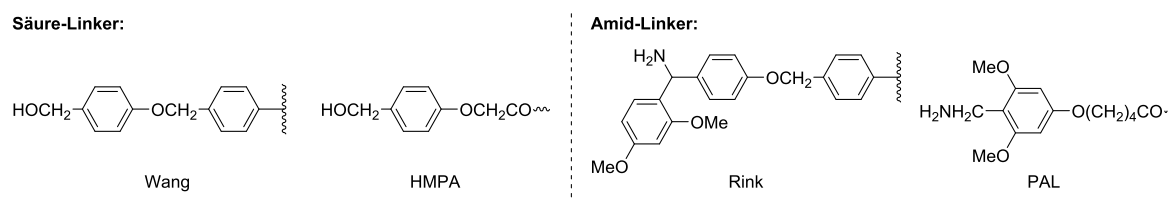


Abbildung 3.4: Bevorzugte Linker in der Festphasensynthese. Die Abspaltung erfolgt durch die Behandlung mit 95%iger TFA.

Um eine Peptidbindung während der SPPS zu knüpfen ist zunächst die Aktivierung der freien Carboxylgruppe notwendig. Gängige Kupplungsreagenzien auf der Basis von Carbodiimiden wie DCC^[292] und DIC^[326, 327] kommen dabei zum Einsatz. Der Nachteil dieser effektiven Aktivatoren ist jedoch das Auftreten von Racemisierungen, welche mit Aktivierungsreagenzien wie HOBt nicht auftreten.^[328] Heutzutage ist eine große Auswahl an Kupplungsreagenzien im Einsatz (Abbildung 3.5). Neben den bereits genannten Carbodiimiden (DCC und DIC) und den klassischen Hilfsnucleophilen (HOBt, HOAt^[329]) werden auch Uronium-Reagenzien (HATU,^[329] TBTU,^[330] HBtU) oder Phosphoniumsalze (PyBOP^[331]) verwendet. Im Jahr 2009 wurde Oxyma, als Alternative zur etablierten HOBt-vermittelten Aktivierung, als neuartiges Additiv eingeführt.^[332, 333] Oxyma stellt eine gute Alternative zum HOBt dar, da von dieser Verbindung im Vergleich zu HOBt kein explosives Potential ausgeht. Daneben wurde COMU im gleichen Jahr als sicheres und wirksames Oxyma-basiertes Uroniumsalz eingeführt.^[334]

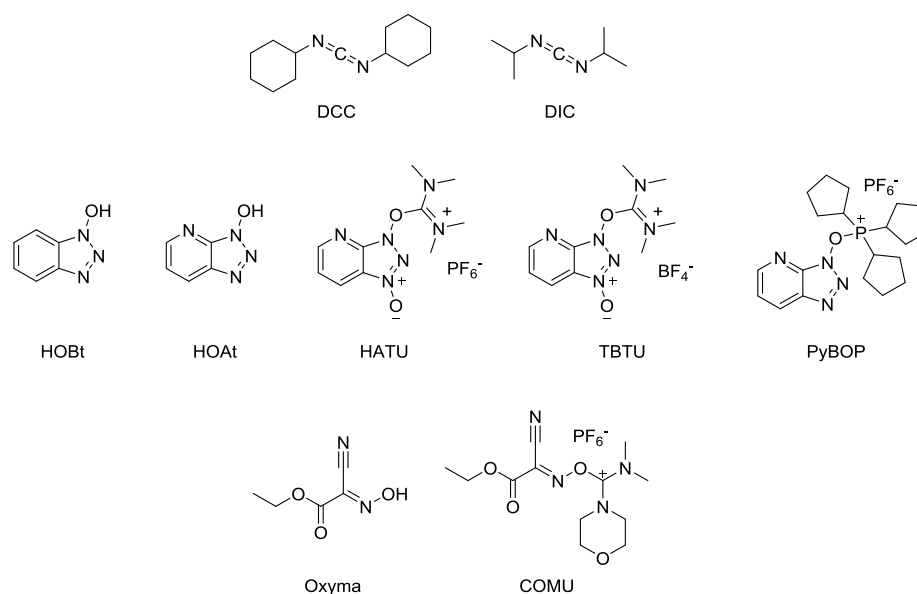
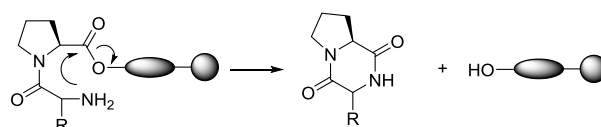


Abbildung 3.5: Gängige Kupplungsreagenzien in der SPPS.

Anspruchsvolle und vor allem große Peptide sind nur schlecht mit herkömmlicher SPPS herzustellen. Hierbei kommt es häufig zu Verunreinigungen, vorzeitigem Syntheseabbruch und schließlich zu geringen Ausbeuten aufgrund von inter- und intramolekularen Aggregationen sowie sterischen Hinderungen. Eine Abhilfe schafft die mikrowellenunterstützte, vollautomatisierte Peptidsynthese, die viele Vorteile gegenüber der herkömmlichen Methode mit sich bringt.^[301] Zum einen kommt die Mikrowellenstrahlung sowohl für die Kupplung als auch die Entschützungs Schritte zum Einsatz, was eine Beschleunigung des Zyklus ermöglicht. Zum anderen sind die Kupplungen meist effektiver, was mit einer Erhöhung der Reinheit der Rohpeptide sowie in der Ausbeute einhergeht. Außerdem wird durch die automatisierte Synthese der Lösungsmittelabfall im Vergleich zur konventionellen Methode deutlich reduziert.^[335]

3.1.1.4 Probleme der SPPS

Trotz der Optimierung der Schutzgruppen, des Linkers und des Harzes kann es zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen. Bei der Synthese von Peptiden, welche beispielsweise C-terminal mit Prolin oder N-alkylierten Aminosäuren beginnen, kann es auf der Stufe des Dipeptids unter Cyclisierung leicht zur Bildung von Diketopiperazinen kommen (Schema 3.3). Eingeschränkt werden kann diese Nebenreaktion mit sterisch anspruchsvollen Linkern (z.B. Trityl-Harze).



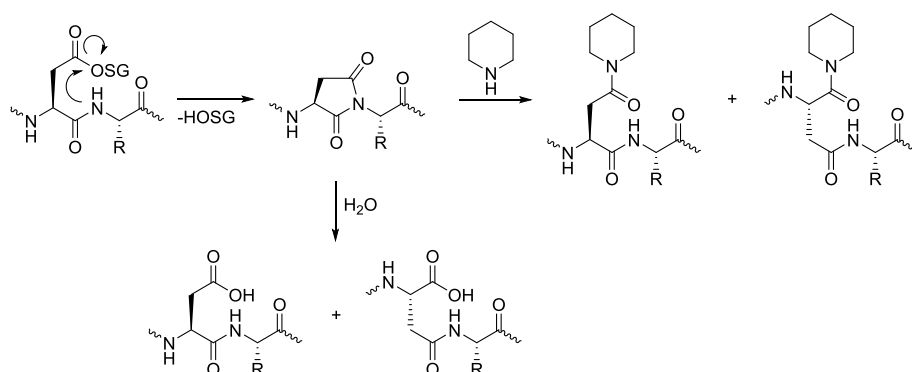
Schema 3.3: Diketopiperazinbildung unter vorzeitigem Peptidsyntheseabbruch.

Zusätzlich kann es während der Peptidsynthese zur unerwünschten Ausbildung von Sekundärstrukturen oder zur Aggregation des Peptids mit anderen Peptiden oder mit dem Harz selbst kommen. Beim Auftreten solcher Aggregationen, die schon ab der fünften Aminosäure auftreten können, ist das wachsende Peptid nicht mehr vollständig im Lösungsmittel gelöst und die Reaktionsgeschwindigkeit wird aufgrund dessen herabgesetzt. Zu beobachten ist dieses Phänomen durch die geringeren Kupplungsausbeuten, was zum Abfall

der UV-Extinktion des *Fmoc*-Abspaltprotokolls führt. Abhilfe hier kann die Wahl der Seitenkettenschutzgruppen oder die Einführung von reversiblen Oxyzolidinen (Pseudoproline) schaffen, jedoch verspricht auch die Mikrowellenunterstützung während der Synthese eine Aggregation weitestgehend zu verhindern bzw. eine bestehende Aggregation aufzulösen.^[336-339]

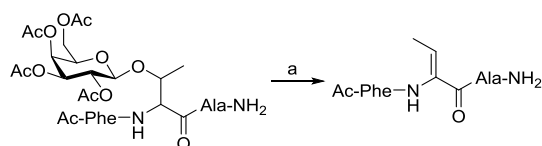
Ein weiteres Problem bei der Peptidsynthese kann die unerwünschten Racemisierungen der Aminosäuren während der Bildung der Amidbindung sein, da bei der Bildung die Carboxylgruppe aktiviert wird, wodurch die Acidität des α -Protons stark erhöht wird. Durch die Verwendung von Uroniumsalzen in Kombination mit dem entsprechenden Additiv kann diese Nebenreaktion jedoch weitestgehend unterdrückt werden.

Eine weitaus häufigere Nebenreaktion stellt die Bildung von Aspartimiden und die damit verbundene Umlagerungsreaktion dar. Diese Nebenreaktion ist sequenzabhängig und wird durch sperrige *tert*-Butylschutzgruppen für Asparaginsäure oder den Zusatz von HOBt weitestgehend verhindert.^[308, 340, 341] Bei dieser Nebenreaktion können die Seitenketten der Aminosäuren Asparagin oder Asparaginsäure ein fünfgliedriges cyclisches Imid ausbilden. Während der Deblockierung durch Piperidin kann es im Anschluss zu einer Ringöffnung kommen und die entsprechenden unerwünschten α - und β -Piperidine können gebildet werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit der Hydrolyse des Aspartimids nach Abspaltung des Peptids von der festen Phase und der damit verbundenen Ausbildung der α - und β -Aspartyl-Peptide (Schema 3.4).



Schema 3.4: Unerwünschte Aspartimidbildung bei der SPPS.

Ein weiteres Problem welches im Anschluss an die Peptidsynthese auftreten kann, ist die β -Eliminierung des *O*-Glycans. Bei der Synthese von Glycopeptiden, werden die Hydroxylgruppen des Saccharids mit Schutzgruppen wie Acetyl oder Benzoyl geschützt. Diese werden, nachdem das Peptid von der festen Phase abgespalten worden ist, unter basischen Bedingungen entfernt. Hierbei kann es schon unter Verwendung von Natriummethanolat-Lösung in Methanol (0.12 M) zu einer α -Protonen induzierten β -Eliminierung des Kohlenhydrats kommen (Schema 3.5).^[342] Abhilfe hierfür schafft Morpholin oder Piperidin, beide Basen sind nicht basisch genug um die β -Eliminierung einzuleiten.



Schema 3.5: β -Eliminierung des *O*-Glycans unter basischen Bedingungen. Reaktionsbedingungen: a) NaOMe (0.12 M).

3.1.2 Allgemeines Protokoll der mikrowellenunterstützten (Glyco-)Peptidfestphasen-synthese

Im Rahmen dieser Arbeit wird die *Fmoc*-*t*Bu-Schutzgruppenstrategie für alle Peptide und Glycopeptide angewendet. Die Synthesen wurden dabei mikrowellenunterstützt unter Verwendung eines *Liberty 1TM Peptidsynthesizer* (CEM Corporation, Matthews, NC), zusammen mit dem Modul *DiscoverTM* (CEM Corporation, Matthews, NC) durchgeführt. Als polymerer Träger diente ein *Fmoc*-Ala-Wang-Harz LL (*low load*). Die niedrige Beladung wurde verwendet, um eine Aggregation der Peptide während der Synthese auszuschließen. Bezogen auf die Beladung des Harzes wurde stets eine Ansatzgröße von 0.1 mmol verwendet. Versuche größere Ansätze durchzuführen scheiterten meist an der Aggregation der Peptide sowie der zunehmenden Verstopfung des *Merrifield*-Reaktors durch das Harz. In der folgenden Abbildung 3.6 sind die verwendeten Aminosäurebausteine mit ihren Seitenkettenschutzgruppen (grau) abgebildet.

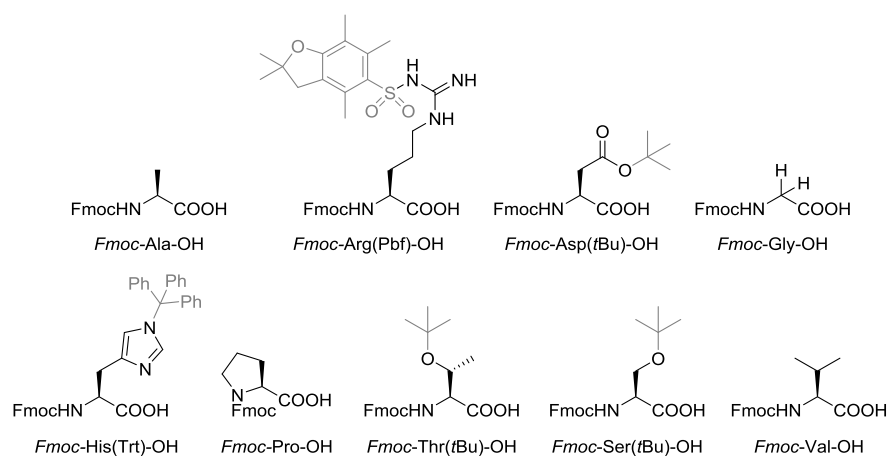
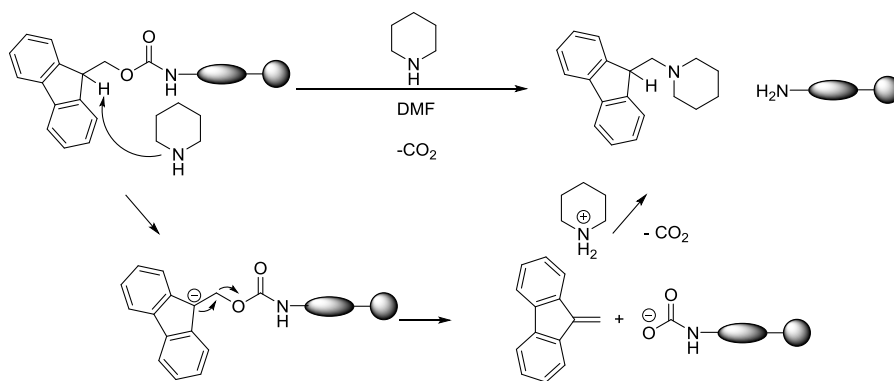


Abbildung 3.6: *Fmoc*-geschützte Aminosäuren mit den verwendeten Seitenkettenschutzgruppen (grau), die im Rahmen dieser Arbeit in der mikrowellenunterstützten Festphasensynthese eingesetzt werden.

Die Hydroxyl- sowie die Carboxylgruppen der Aminosäuren Asparaginsäure, Threonin und Serin werden als *tert*-Butyl-Ester beziehungsweise Ether geschützt. Das freie Amid, des Imidazol-Rings des Histidins wird mit einer Trityl-Schutzgruppe versehen. Dagegen wird Arginin durch 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) geschützt. Alle Seitenkettenschutzgruppen werden zusammen mit dem Harz nach der Synthese des Peptids unter Behandlung mit TFA in sehr guten Ausbeuten abgespalten.

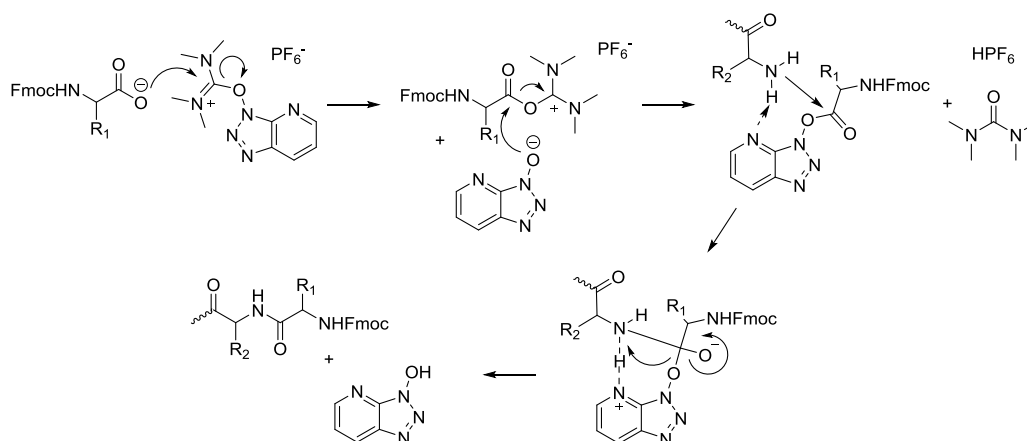
Die Peptidfestphasensynthese besteht aus zwei Schritten, die sich für jede Aminosäure, die ans wachsende Peptid gebunden werden soll, wiederholen. Beginnend mit der *Fmoc*-Abspaltung folgt im Anschluss die Kupplung der folgenden Aminosäure. Beide Schritte werden für das jeweilige Peptid stets optimiert um somit die besten Ausbeuten zu erzielen.

Ein erster Schritt im Syntheseyklus der Peptidfestphasensynthese besteht in der Abspaltung der *Fmoc*-Schutzgruppe der temporären Aminosäure (Schema 3.6). Diese erfolgt durch die Behandlung einer 20%igen Lösung aus Piperidin in NMP.^[343, 344] Die Abspaltung erfolgt dabei nach einem E1_{CB}-Mechanismus, bei dem zunächst das azide Proton am C9 durch Piperidin abgespalten wird und nach Eliminierung von Kohlenstoffdioxid das Dibenzofulven sowie das freie *N*-terminale Amin entstehen. Dibenzofulven reagiert mit dem als Base eingesetzten Piperidin weiter zu einem Addukt, welches als UV-aktive Substanz dazu genutzt wird den Verlauf der Entschützung zu verfolgen.^[345]



Schema 3.6: Mechanismus der *Fmoc*-Schutzgruppenabspaltung mit Hilfe von Piperidin.

Der zweite Schritt, die Aminosäurekupplung, erfolgt unter Zusatz der Kupplungsreagenzien HBTU^[330, 346, 347] und HOBT^[328] in DMF sowie der Hilfsbase Diisopropylethylamin (DIPEA) in NMP (Schema 3.7). Die käuflich erhältlichen Aminosäuren werden stets in einem Überschuss eingesetzt. Im Unterschied zu den Standardamino­säuren erfolgt sowohl die Aktivierung der Glycosylamino­säure als auch die der unnatürlichen Aminosäuren mit den reaktiveren Reagenzien HATU^[347] und HOAt^[329] und *N*-Methylmorpholin (NMM).^[348]



Schema 3.7: Mechanismus der Bildung des Aktivesters mit HATU/HOAt und der Aufbau der Amidbindung.

Mechanistisch betrachtet erfolgt die Aktivierung mit den Kupplungsreagenzien HBTU/HOBT analog (Schema 3.7). Beim Einsatz von HBTU und HOBT kann es durch den fehlenden Ringstickstoff in Position 7 zu keiner Koordination des angreifenden Amins und daher auch zu keinem siebengliedrigen Übergangszustand kommen. Aus diesem Grund sind diese Kupplungsreagenzien im Vergleich zu HATU und HOAt auch weniger reaktiv.^[329] In der Regel reicht es aus, dass der Kupplungsschritt einmal durchgeführt wird.

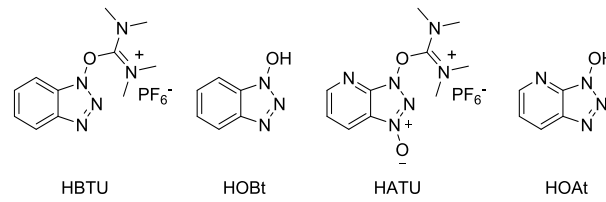


Abbildung 3.7: Zur Peptidsynthese eingesetzte Kupplungsreagenzien.

Beim Einbau von synthetisch hergestellten Aminosäuren wie Fluorprolin sowie der Glycosylaminosäuren werden die folgenden Aminosäuren stets doppelt gekuppelt. Ein Grund hierfür liegt in der sterische Hinderung des Einbaus des sterisch anspruchsvollen Zuckerbausteins, welcher den Einbau der folgenden Aminosäure erschwert. Ein weiterer Grund liegt im Aufbau der fluorierten Aminosäure, welche aufgrund des elektronenziehenden Charakters des Fluors, Elektronen aus der Amidbindung ziehen und so die folgende Kupplung elektronisch erschweren. Durch die Wiederholung wird die Wahrscheinlichkeit einer quantitativen Kupplung erhöht.

Nach der letzten *N*-terminalen *Fmoc*-Abspaltung wird das Peptid in einen *Merrifield*-Reaktor überführt und unter Rühren und der Behandlung mit TFA vom Harz und den Seitenkettenschutzgruppen befreit.

3.2 Synthese der Festphasenbausteine

Der Zielsetzung entsprechend werden für den Aufbau der (Glyco-)Peptide die einzelnen Festphasenbausteine benötigt. Diese werden einzeln in mehrstufigen Synthesen als *Fmoc*-Bausteine hergestellt, sodass diese mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese zu den entsprechenden Konjugaten aufgebaut werden können. Im Einzelnen wurden drei Glycosylaminosäurebausteine (vgl. Kapitel 3.2.1) sowie zwei fluorierte Prolinderivate (vgl. Kapitel 3.2.2) als auch eine Spaceraminosäure (vgl. Kapitel 3.2.3) dargestellt.

3.2.1. Synthese der Glycosylaminosäurebausteine

Ein entscheidender Schritt in der Synthese von Glycopeptiden stellt die Einführung des Zuckeraminosäurebausteins dar. Hierfür gibt es derzeit zwei verschiedene Strategien, welche in unterschiedlichen Bereichen zum Einsatz kommen. Einerseits kann der Zucker enzymatisch auf das fertige Peptidrückgrat konjugiert werden oder andererseits innerhalb der Peptidsynthese als glycosylierte Aminosäure ins wachsende Peptid an bestimmte Stellen eingebaut werden. Der enzymatische Ansatz empfindet dabei die natürliche Glycosylierung nach. Jedoch kommt es bei dieser Methode oft zu unerwünschten Nebenprodukten. Ein Nachteil liegt in der Realisierung der korrekten Stereoselektivität, wie auch der gezielten Glycosylierung an bestimmten Aminosäuren und der nachträglichen Aufreinigung der gewünschten Peptide. Als Produkt werden in einer solchen enzymatischen Glycosylierung meist viele verschiedene Peptide mit unterschiedlichem Glycosylierungsmuster erhalten. Da in dieser Arbeit klar definierte Peptidstrukturen synthetisiert werden sollten, wurde der schrittweise Aufbau des Peptidrückgrats mit zuvor synthetisierten glycosylierten Aminosäuren bevorzugt und durchgeführt. Dazu wurden zunächst glycosylierte Aminosäuren synthetisch hergestellt, die im Anschluss in der Festphasensynthese eingesetzt werden konnten. In der folgenden Abbildung 3.8 sind die in dieser Arbeit synthetisierten Glycosylaminosäuren abgebildet.

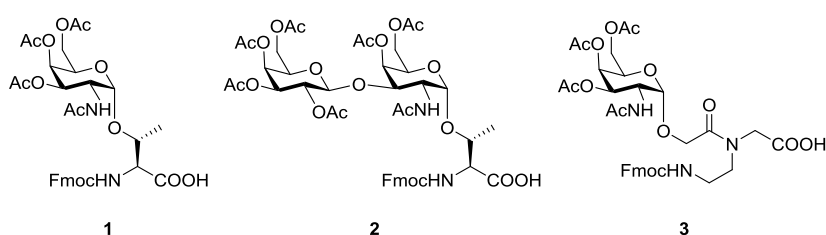


Abbildung 3.8: Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten glycosylierten Antigene.

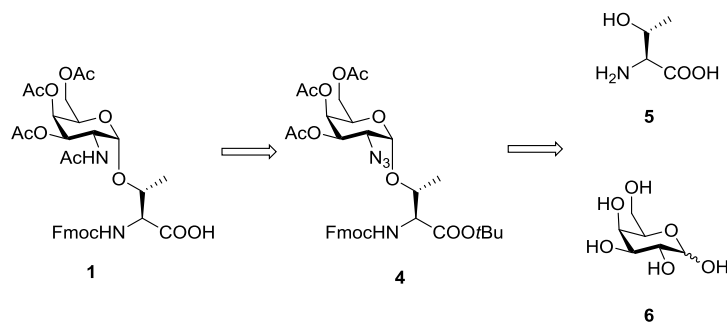
Bei den Glycosylaminosäuren handelt es sich um die beiden natürlich vorkommenden T_N - und T-Antigene **1** und **2**. Außerdem wurde ein α -AA-Mimetikum **3** auf der Basis eines T_N -Antigens dargestellt.

3.2.1.1 Synthese des T_N sowie des T-Antigen-Bausteins

Der erste chemische Zugang zur Synthese des T_N -Antigens, einer Vorstufe des T-Antigens, wurden von *Osawa* im Jahr 1977 vorgestellt.^[349] Dabei handelt es sich allerdings um ein Serin-Derivat, welches als Tosylat geschützt wurde. In den folgenden Jahren wurde der Zugang zum T-Antigen durch zahlreiche verbesserte Synthesen vereinfacht. Insbesondere die Synthesen von *Lemieux*,^[350] *Paulsen* und *Hölck* sind hier

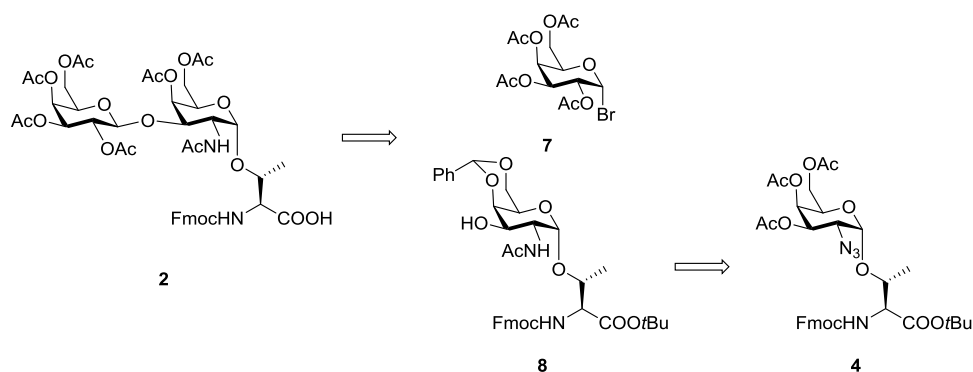
herauszustellen.^[351] Dabei konnte der synthetisierte Baustein erstmals vollständig deblockiert werden. Eine spätere Entwicklung erfuhr die Synthese des T-Antigens durch die Veränderung des Schutzgruppenmusters. So wurde durch *Paulsen* und *Schultz* die *Fmoc*-Schutzgruppenstrategie verwendet, sodass der Baustein erstmalig als Festphasenpeptidbaustein eingesetzt werden konnte.^[352] Eine letzte Neuerung erfuhr die Synthese vor sieben Jahren durch eine Azidochlorierung nach *Sewald*.^[353] Hierbei konnte die Synthese um einen Schritt verkürzt werden. Da es sich sowohl bei dem T_N- als auch dem T-Antigen um derartig wichtige Strukturen innerhalb der Glycopeptidsynthese handelt, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Neuerungen in der Synthese folgen werden.

Wie schon oben genannt erfolgte die Synthese des *N-Fmoc*-geschützten T-Antigen-Threonin-Konjugates **2** nach einer literaturbekannten Schutzgruppenstrategie.^[137, 354] Verschiedene Zwischenstufen dieser Synthese wurden in weiterführenden Synthesen zum Aufbau der Mimetika Strukturen (vgl. Kapitel: 3.2.1.2 und 3.2.1.3) verwendet. In einem Schlüsselschritt wurde ein orthogonal geschütztes Threonin-Derivat **10** als Glycosylakzeptor sowie ein acetylgeschütztes Galactosylazidochlorid **15** beziehungsweise -bromid **14** als Glycosyldonor in einer Glycosylierung gemäß der *Königs-Knorr* Methode verknüpft (Schema 3.17).^[353, 355]



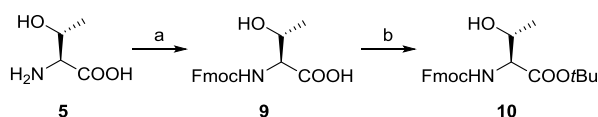
Schema 3.8: Retrospektivische Betrachtung der T_N-Antigen-Synthese ausgehend von D-(+)-Galactose **6** und L-Threonin **5**.

Die erhaltene Glycosylaminosäure **4** kann sowohl in zwei weiteren Stufen nach selektiver C-terminaler Deblockierung zum Festphasenpeptidbaustein **1** umgesetzt werden (Schema 3.18), als auch in drei weiteren Stufen erneut in einen Glycosylakzeptor **8** überführt werden, der mit dem Glycosylbromid **7** nach einer Methode von *Helferich*^[356, 357] zum Disaccharid **18** verknüpft wird (Schema 3.20). Das dabei resultierende T-Antigen-Derivat **18** wurde in die entsprechende peracetylierte Verbindung **19** umgewandelt und konnte nach selektiver C-terminaler Deblockierung direkt in der Festphasensynthese eingesetzt werden.



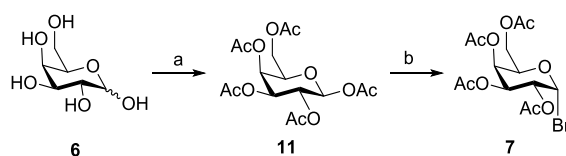
Schema 3.9: Retrospektivische Betrachtung der T-Antigen-Synthese ausgehend von einer Vorstufe des T_N-Antigen **4**.

Der orthogonal geschützte Threoninbaustein **10** wurde ausgehend von L-Threonin (**5**), an der Aminofunktion im ersten Schritt mit der basenlabilen *Fmoc*-Schutzgruppe durch Umsetzung mit *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimidylcarbonat (*Fmoc*-OSu) in ausgezeichneten Ausbeuten blockiert (Schema 3.10).^[358, 359] Eine Darstellung mit *Fmoc*-Chlorid ist nicht geeignet, da es hierbei zu einer Dipeptidbildung kommen kann.^[355] Im Folgenden wurde die Carboxylgruppe des *N*-*Fmoc*-L-Thr-OH **9** mit *tert*-Butanol in einer Kupfer(I)-chlorid katalysierten Veresterung unter Aktivierung mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei 0 °C zum Aminosäureester *N*-*Fmoc*-L-Thr-*O*tBu **10** verestert.^[360, 361] Damit der Ester selektiv erhalten werden konnte, musste zunächst die Aktivierung des DCC aktivierten Elektrophils (*t*BuOH) durch eine ausreichend lange Reaktionszeit sichergestellt werden, bevor nach Zugabe von **9** die Umsetzung zum Produkt **10** erfolgte. Ist die Aktivierungsphase zu kurz beziehungsweise die sich anschließende Reaktionszeit zu lang, werden zunehmend zweifach alkylierte Produkte beobachtet.



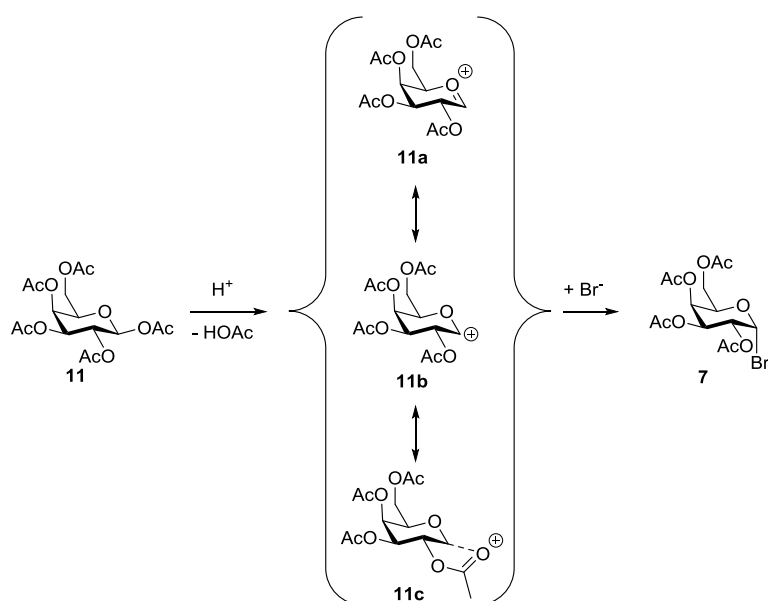
Schema 3.10: Darstellung des orthogonal geschützten Threoninbausteins **10**. Reaktionsbedingungen: (a) *Fmoc*-OSu, NaHCO₃, Aceton/Wasser (1:1), RT, 15 h, 90%; (b) *t*BuOH, DCC, CuCl, CH₂Cl₂, RT, 3.5 h, 66%.^[358-361]

Als Galactosaminyl-Donor für die Glycosylierung nach *Königs-Knorr* dient das 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylchlorid (**15**) sowie das -bromid (**14**), welches ausgehend von D-(+)-Galactose (**6**) hergestellt wurde. Im ersten Schritt wurde mit Essigsäureanhydrid (Ac₂O) in Anwesenheit von Natriumacetat in befriedigenden Ausbeuten von 54%, nach einer Additions-Eliminierungs-Reaktion, peracetyliert.^[362, 363] Die Acetylschutzgruppe stellt eine bevorzugte Schutzgruppe in der Kohlenhydratchemie dar. Der Vorteil dieser Schutzgruppe ist die schnelle Einführung, auch in großem Maßstab, sowie die leichte Esterspaltung im Basischen nach *Zemplén*.^[364] Das acetylierte Galactosederivat **11** wurde als β -Anomer erhalten. Dieses wurde im nächsten Schritt selektiv in Bromwasserstoff (33%ig), welcher in Eisessig gelöst ist, zum α -anomeren Bromid **7** in ausgezeichneten Ausbeuten umgesetzt.^[362, 365]



Schema 3.11: Darstellung des Bromids **7** ausgehend von D-(+)-Galactose (**6**). Reaktionsbedingungen: (a) Ac_2O , NaOAc , $80\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, 54%; (b) 33%ige HBr in AcOH , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 2 h, 94%.^[362, 363, 365]

Die Bromierung selektiv zum α -Bromid **7** verläuft über einen zweistufigen Mechanismus, bei dem als Zwischenstufe ein Oxocarbeniumion gebildet wird. Dieses wird aufgrund des Nachbargruppeneffekts der Acetylschutzgruppe am benachbarten **C2** und des polaren Lösungsmittels Essigsäureanhydrid stabilisiert.



Schema 3.12: Bildung des α -Galactosylbromids (**7**) über ein Oxocarbeniumion (**11a**, **11b** und **11c**).

In der Regel nehmen Substituenten bei cyclischen, sesselförmigen Verbindungen die thermodynamisch günstigere äquatoriale Position ein, da diese auch sterisch oft weniger gehindert ist. Der Angriff des Bromids erfolgt in diesem Fall entgegen dieser Erwartung jedoch axial und das α -konfigurierte Substitutionsprodukt wurde in 94%iger Ausbeute gebildet. Die Bildung erfolgt aufgrund des *anomeren Effekts* (Abbildung 3.9). Dieser Effekt lässt sich nach *Lemieux* erstens über die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Dipolmomenten und zweitens über die symmetrie-erlaubte Orbital-Überlappung erklären.

Die nichtbindenden Elektronenpaare des Ringsauerstoffs, sowie der elektronegativen Substituent am anomeren Zentrum führen zu einer Polarisierung der Bindungen und somit zur Ausbildung von Dipolmomenten. Im Fall der β -Konfiguration des Br -Substituenten kommt es zu einer Aufsummierung zwischen parallel angeordneten Dipolen, was energetisch ungünstiger ist. Steht der Br -Substituent hingegen axial tritt eine günstige Aufhebung der partiellen Dipolmomente ein, die die Bildung der axial bromierten Acetylgalactose **7a** begünstigt.

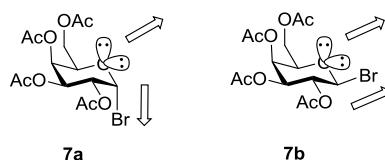


Abbildung 3.9: Beteiligung der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen am anomeren Effekt.

Eine weitere Erklärung für die bevorzugte Bildung des α -Anomers sind stereoelektronische Effekte der wechselwirkenden Molekülorbitale. Dabei kann ein axialständiges nichtbindendes p-Orbital p^n des Ringsauerstoffs eines α -Anomers durch antiperiplanare Anordnung mit dem antibindenden Orbital σ^* der C-Br-Bindung wechselwirken und so eine Hyperkonjugation $p^n \rightarrow \sigma^*$ herbeiführen. Dies ist im Fall des β -Anomers geometrisch nicht möglich, wie in der folgenden Abbildung 3.10 gezeigt wird.

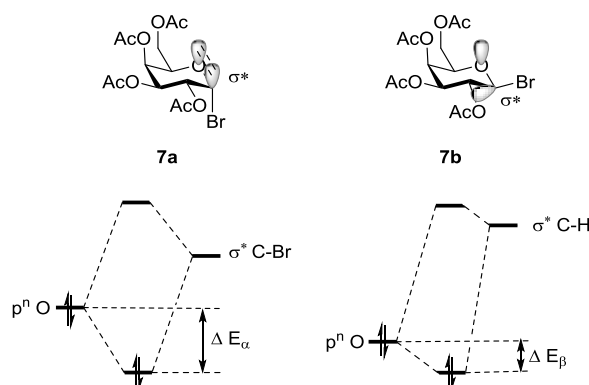
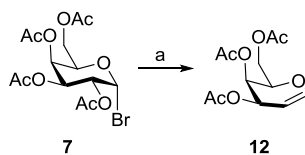


Abbildung 3.10: Stereoelektronische Effekte zur Erklärung des anomeren Effekts.

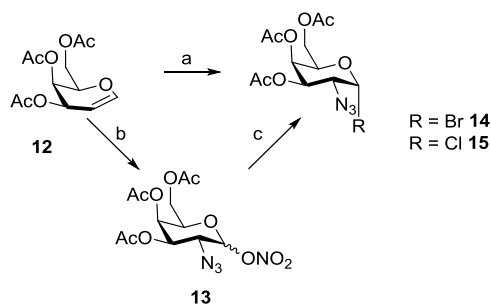
Die nachfolgende reduktive Eliminierung mit *N*-Methylimidazol (NMI) und aktiviertem Zinkpulver in Ethylacetat führte zum Galactal **12** in 63%iger Ausbeute.^[362] Dabei kommt es zu einer oxidativen Zink-Insertion in die Kohlenstoff-Brom-Bindung und anschließend zu einer β -Eliminierung. Das *N*-Methylimidazol fungiert als Lewis-Säure und begünstigt durch Koordination des Zink-Atoms und der daraus resultierenden Erhöhung des carboanionischen Charakters der Organo-Zink-Spezies die Eliminierung.



Schema 3.13: Darstellung des Galactals **12** ausgehend von Bromid **7**. Reaktionsbedingungen: (a) Zn, NMI, EtOAc, 80 °C, 2 h, 63%.^[362]

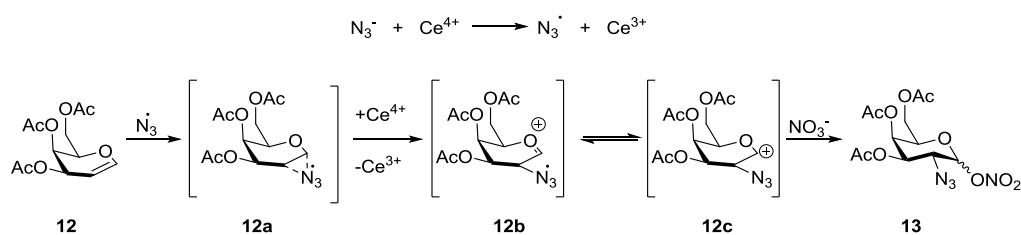
Um eine biologisch aktive Glycosylaminosäure zu erhalten muss der Galactosaminbaustein α -glycosidisch mit der Aminosäure Threonin verknüpft werden. Synthetisch betrachtet, ist es daher notwendig die Acetamidfunktion so zu maskieren, dass eine α -selektive Glycosylierung durchgeführt werden kann. Im Gegensatz zur Acetamidfunktion, die einen β -dirigierenden Nachbargruppeneffekt ausübt, ist dies mit einer Azidgruppe möglich. Diese ist ausgehend vom Galactal **12** in einem Schritt einführbar. Ein Vorteil dieser Schutzgruppe ist die Tatsache, dass sie nicht nachbargruppenaktiv ist und eine Umwandlung in das gewünschte *N*-Acetylamid leicht zugänglich macht. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt um eine Azidfunktion einzuführen. Dabei handelt es sich zum einen um eine *one-pot*

Azidochlorierung nach *Sewald*^[353] und zum anderen um eine zweistufige Azidobromierung über eine Azidonitratisierung nach *Lemieux*.^[366]



Schema 3.14: Synthese des Glycosyldonors **14** und **15** nach *Lemieux* und *Sewald*. Reaktionsbedingungen: (a) NaN_3 , Fe(III)Cl_3 , H_2O_2 , MeCN , $-30\text{ }^\circ\text{C}$, 2 d, 74% ; (b) $(\text{NH}_4)_2\text{Ce(NO}_3)_6$, NaN_3 , MeCN , $-30\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow -5\text{ }^\circ\text{C}$, 3 d, 47% ; (c) LiBr , MeCN , RT, 20 h, 66% .^[353, 366]

Zunächst soll die Azidonitratisierung, die über lange Jahre eine etablierte Methode zur Einführung einer Azidfunktion darstellte, erläutert werden. Hierbei wurde das Galactal **12** in Acetonitril mit Cer-(IV)-ammoniumnitrat und Natriumazid umgesetzt, wobei Azidonitrat **13** als Anomerengemisch in schlechter Ausbeute von 47% erhalten wurde. Die Reaktion erfolgte dabei jeweils unter der regioselektiven Einführung des Azides und des Nitrates. Mechanistisch verläuft die Azidonitratisierung vermutlich über radikalische Zwischenstufen. Initiiert wird die Reaktion durch die Reduktion von Ce^{4+} zu Ce^{3+} und die Oxidation des Azid-Anions zum Radikal. Dieses koordiniert elektrophil von der Unterseite des Zuckers an die Doppelbindung des Galactals **12**, wobei ein cyclisches Radikal erhalten wird. Ein hypothetischer Angriff des Radikals von der Oberseite ist nicht begünstigt, da es im Übergangszustand zu einer 1,3-diaxialen Wechselwirkung mit der axialen 4-Acetylgruppe käme. Die radikalische Zwischenstufe wird anschließend durch ein weiteres Ce^{4+} erneut oxidiert und führt unter Ringöffnung zur Bildung eines stabilisierten Oxocarbeniumions. Durch einen nukleophilen Angriff eines Nitrations wird schließlich das Anomerengemisch des Azidonitrates **13** erhalten.

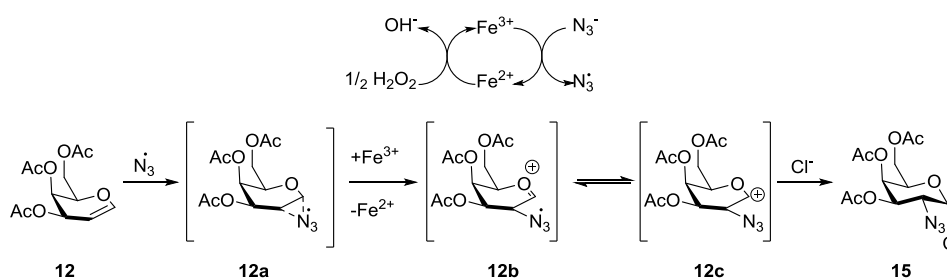


Schema 3.15: Mechanismus der Azidonitratisierung von Galactal **12** zum Azidonitrat **13**.

Zur Darstellung des Galactosyldonors wurde das Azidonitrat **13** in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit Lithiumbromid in absolutem Acetonitril zum gewünschten Azidobromid **14** umgesetzt. Das gewünschte α -Azidobromid **14** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in 66%iger Ausbeute isoliert werden und als Donor in der Glycosylierungsreaktion fungieren. Auch diese Substitution erfolgt bevorzugt axial aufgrund des *anomeren Effektes*, sodass es zur selektiven Bildung des α -Anomers kommt.

Eine modernere Möglichkeit die Azidogruppe einzuführen bietet die Synthese des Azidochlorids **15** nach *Sewald*.^[353] Dabei handelt es sich um eine *One-Pot* Reaktion, bei der mit Natriumazid, Eisen(III)-Chlorid und

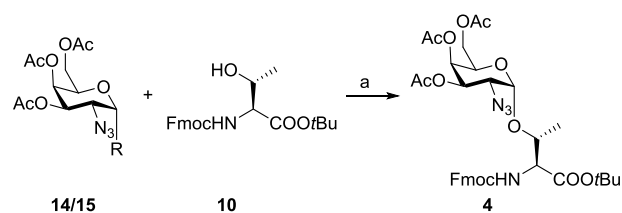
33%igem Wasserstoffperoxid das Azidochlorid **15** in 74% Ausbeute erhalten wurde. Mechanistisch betrachtet wird zunächst durch die Reduktion mit Fe(III)-Chlorid ein Azid-Radikal *in situ* erzeugt, welches an der C2-Position des Galactals angreift. Das SOMO an der C1-Position wird durch die Wechselwirkung mit dem freien Elektronenpaar und der elektronenziehenden Eigenschaften des Sauerstoffs stabilisiert, was die hohe Regioselektivität der Reaktion erklärt. Ein hypothetischer Angriff des Radikals von der Oberseite ist nicht begünstigt, da es im Übergangszustand zu einer 1,3-diaxialen Wechselwirkung mit der axialen Acetylgruppe an C4 kommt. Das bei der Oxidation des Azidanions entstandene Fe(II)-Ion wird durch Zugabe von Wasserstoffperoxid wieder in ein Fe(III)-Ion überführt. Im nächsten Schritt wird durch eine weitere Oxidation mit einem Fe(III)-Ion ein Oxocarbeniumion unter Ringöffnung gebildet, welches über seine mesomere Grenzstrukturen stabilisiert wird. Der *anomere Effekt* begünstigt im nächsten Schritt auch hier die Chlorierung an C1 in axialer Stellung. Des Weiteren wird die Reaktion bei tiefen Temperaturen durchgeführt, sodass die Stereoselektivität zusätzlich erhöht wird. Ein Nachteil dieser Reaktion stellt die anschließende chromatographische Reinigung dar, da das erhaltene Produkt oftmals hydrolysierte.



Schema 3.16: Mechanismus der Azidochlorierung des Galactals **12** zum Azidochlorid **15**.

Die neuere Methode über das Azidochlorid **15** stellt eine gute Alternative zum altbekannten Azidobromid **14** da. Der Vorteil dieser Methode liegt nicht nur in der besseren Ausbeute von 74% zu 31% (über zwei Stufen) und der damit verbundenen Kosten sondern viel mehr im zeitlichen Aufwand.

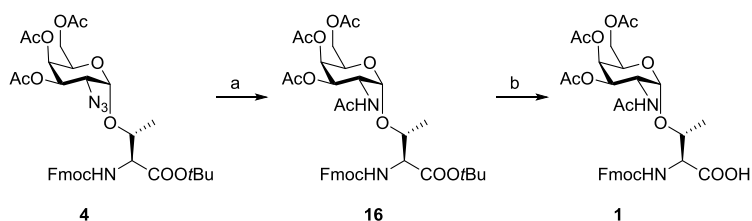
Die sich anschließende Glycosylierung erfolgte nach der von *Paulsen* und *Hölck* entwickelten Variante der *Königs-Knorr-Glycosylierung*.^[351, 353, 360, 367] Dabei wurde als Galactosaminyldonor sowohl das Azidochlorid **15**, als auch das Azidobromid **14** herangezogen. Bei der Reaktion wurde der Donor **14/15** und der Akzeptor **10** mit Silberperchlorat und Silbercarbonat in einem Gemisch aus Toluol und Dichlormethan umgesetzt, wobei es bevorzugt zur Bildung des α -verknüpften Bausteins **4** kommt. Dies ist möglich aufgrund des nicht nachbargruppenaktiven Azidosubstituenten und des *anomeren Effekts*. Kleinere Mengen an β -verknüpftem Produkt lassen sich säulenchromatographisch gut abtrennen. Die verwendeten Silberverbindungen agieren sowohl als Promotor als sowie als Base. Um das Wasser in dieser Reaktion vollständig zu entfernen, wurde der Reaktion zusätzlich Molsieb (4 Å) zugesetzt.



Schema 3.17: Königs-Knorr-Glycosylierung nach Paulsen und Hölk. Reaktionsbedingungen: (a) Ag_2CO_3 , AgClO_4 , absol. CH_2Cl_2 , Toluol (1:1), $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3 d, $\text{R}=\text{Br}$ 62%; $\text{R}=\text{Cl}$ 60%.^[137, 353]

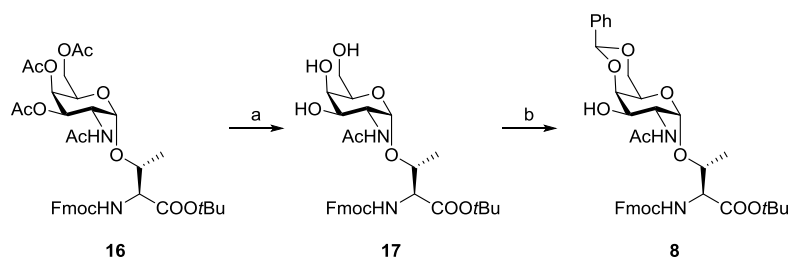
Die Reduktion und nachfolgende Acetylierung der Azidofunktion von **4** zur Acetamidoglycosylaminosäure **16** wurde im nächsten Schritt durch Zink in einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (3:2:1) durchgeführt.^[368, 369] Dabei wurde das *in situ* gebildete Amin sofort durch Essigsäureanhydrid in das Acetamid in 83% Ausbeute überführt.

Verbindung **16** stellt einen wichtigen Grundbaustein der tumorassoziierten Kohlenhydratantigene dar. Im Folgenden kann dieser Baustein nach acidolytischer Deblockierung der Carboxylfunktion in der Festphasensynthese als T_N -Antigen **1** eingesetzt werden^[370] oder durch Deacetylierung^[367] als Akzeptorbaustein **17** für den Aufbau komplexer Kohlenhydratantigene wie des T-Antigen **2** dienen. Zur Spaltung des *tert*-Butylesters wurde **16** mit Trifluoressigsäure und Anisol als Kationenfänger in quantitativer Ausbeute zur freien Säure umgesetzt.



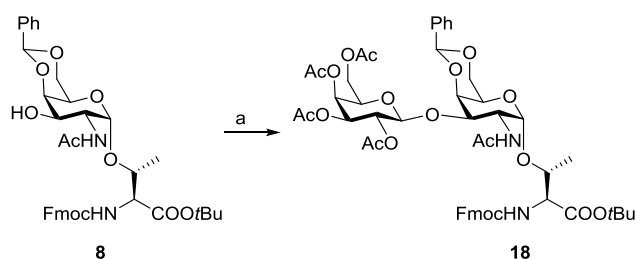
Schema 3.18: Synthese des Festphasenbausteins **1**. Reaktionsbedingungen: (a) Zn , THF, Ac_2O , AcOH, RT, 20 h, 83%; (b) TFA, Anisol (10:1), CH_2Cl_2 , 4 h, RT, quant.^[137, 370]

Um den T-Antigen-Baustein **2** für die Festphasensynthese ausgehend von dem T_N -Antigen-Threonin-Konjugat **16** herzustellen, wurde im ersten Schritt eine Umesterung nach Zemplén^[371] durchgeführt. Hierbei werden die Acetylschutzgruppen selektiv in Gegenwart der ebenfalls basenlabilen *Fmoc*-Schutzgruppe mittels katalytischen Mengen an Natriummethanolat in Methanol bei einem pH-Wert von 8.5 in 3-, 4- und 6-Position verseift.^[367, 372] Bei dieser Reaktion wurde versucht durch eine sorgfältige Einstellung des pH-Werts eine mögliche β -Eliminierung zu verhindern. Da es jedoch vorkommen kann, dass die *Fmoc*-Schutzgruppe teilweise abgespalten wird, wurde direkt im Anschluss durch Zugabe von *Fmoc*-OSu in Acetonitril diese wieder eingeführt. Um aus dem T_N -Antigen-Threonin-Konjugat **16** selektiv das Disaccharid **18** aufbauen zu können, wurden die 4- und 6-Hydroxylfunktionen des Galactosaminbausteins durch ein Benzylidenacetal geschützt.^[370] Die Umsetzung erfolgte mit Benzaldehyddimethylacetal in Acetonitril in Gegenwart katalytischer Mengen an *p*-Toluolsulfonsäure, wobei der Galactosylakzeptor **8** in 84% Ausbeute erhalten wurde. Die Reaktion wurde bei 200 mbar und $40\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, damit das entstehende Methanol aus der Reaktion entzogen wird und somit das Gleichgewicht zum gewünschten Produkt verschoben wurde.



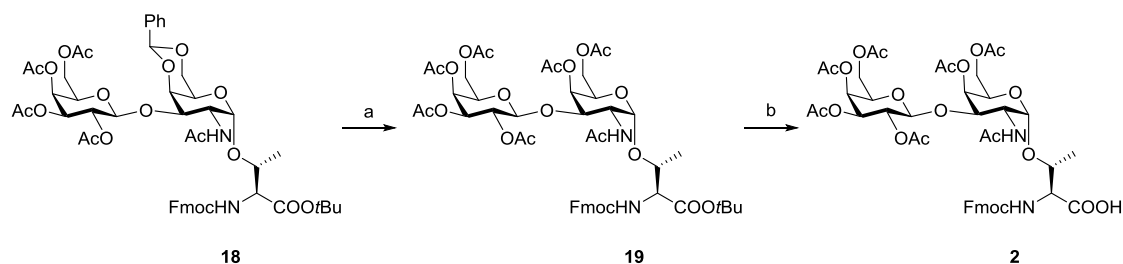
Schema 3.19: Synthese des Galactosylakzeptors **8** ausgehend von der T_N-Antigen Vorstufe **16**. Reaktionsbedingungen: (a) NaOMe, MeOH, 12 h, RT, 98%; (b) Benzaldehyddimethylacetal, p-TSA, MeCN, 40 °C, 200 mbar, 3.5 h 84%.^[76, 367, 370]

Als nächstes erfolgte der zweite Schlüsselschritt der Synthese des T-Antigen-Bausteins **2**, die Glycosylierung zum Disaccharid **18**. Zur selektiven Glycosylierung der 3-Hydroxylgruppe des Akzeptors **8**, wurde auf das Galactosylbromid **7** als Glycosyldonor zurückgegriffen, welches bereits für die Synthese des T_N-Antigens hergestellt wurde. Die Synthese erfolgte nach einer Methode von *Helferich*,^[356, 357] unter milden Bedingungen mit Quecksilber(II)cyanid als Promotor.^[137, 361, 373] Die Acetylenschutzgruppe in der 2-Position stellt aufgrund des Nachbargruppeneffekts die gewünschte β -Selektivität sicher. Das bei der Kondensation entstehende Wasserstoffbromid wird als Quecksilber(II)-Bromid gebunden.



Schema 3.20: Glycosylierung zum Disaccharid **18** nach einer Methode von *Helferich*.^[356, 357] Reaktionsbedingungen: (a) **7**, Hg(CN)₂, MeNO₂, CH₂Cl₂ (3:2), RT, 1 d, 69%.^[137, 143]

Um den fertigen Festphasenbaustein **2** zu erhalten waren im Folgenden eine Umschüttung sowie die Abspaltung der *tert*-Butylgruppe notwendig. Die Reihenfolge kann dabei frei gewählt werden. In dieser Arbeit wurde jedoch bevorzugt die Umschüttung vor der *tert*-Butylentschüttung durchgeführt.^[137] In umgekehrter Reihenfolge wurde oft ein Auftreten des Hydrolyseprodukt beobachtet, sodass dieser Weg nicht mehr eingeschlagen wurde. Für die Entschüttung des Benzylidenacetals wurde der Baustein in 80%iger Essigsäure bei 80 °C für 4 h erhitzt, ohne Verlust der *tert*-Butylgruppe.^[137] Im Folgenden wurden die freien Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid erneut geschützt, sodass der vollständig geschützte *Fmoc*-T-Antigen-Baustein **19** erhalten werden konnte. In einer sich anschließenden Abspaltung in einem Gemisch aus TFA und Anisol (10:1) wurde der *Fmoc*-funktionalisierte T-Antigen Baustein **2** erhalten und konnte im Folgenden direkt in der Festphasensynthese eingesetzt werden.



Schema 3.21: Synthese des T-Antigen **2** ausgehend vom Disaccharid **18**. Reaktionsbedingungen (a) 1) AcOH (80%ig), 4 h, 80 °C; 2) Pyridin/Ac₂O (2:1), 18 h, RT, 80% (b) TFA, Anisol (10:1), CH₂Cl₂, 4 h, RT, quant.^[137, 143, 370, 374]

3.2.1.2 Synthese des α -AA- T_N -Mimetikum-Bausteins (H_2N -Mim-Ser(T_N)-Gly-COOH)

Da die Bioverfügbarkeit von Medikamenten auf Peptidbasis aufgrund des proteolytischen wie enzymatischen Abbaus nur sehr gering ist, werden gerade für pharmazeutische Produkte Peptidmimetika verwendet. Diese sind aufgrund ihrer Struktur oft sehr ähnlich zu ihren natürlichen Aminosäuren, bieten aber den Vorteil, dass sie nicht oder nur sehr schwer abgebaut werden können. Eine interessante Mimetikumstruktur ist die von chiralen PNAs abgeleitete und von *Cai* weiterentwickelte so genannte AA-Peptid-Struktur.^[197, 200] In dieser Arbeit sollten erstmalig Antigenmimetika auf der Basis von AA-Peptiden mit Sacchariden verknüpft werden und im Anschluss in ein Peptid eingebaut werden. Abhängig von der Position der am Rückgrat befindlichen Seitenketten können zwei verschiedene Klassen von AA-Peptiden, zum einen die α -AA-Peptide und zum anderen die γ -AA-Peptide, unterschieden werden (Abbildung 3.11).

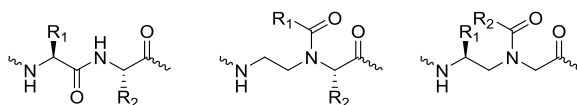
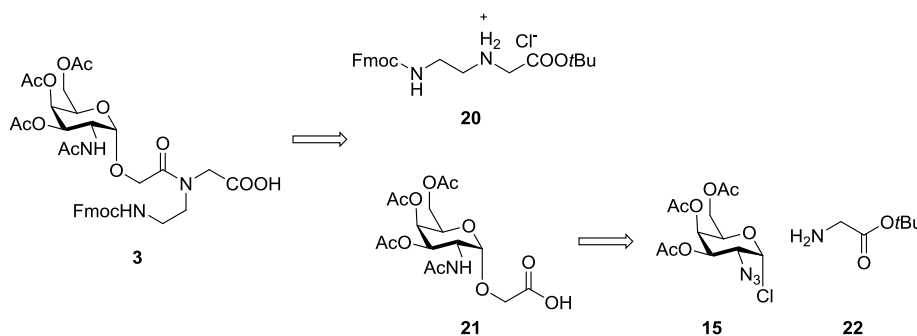


Abbildung 3.11: Ausschnitt aus der Struktur eines natürlichen α -Peptids (links) und des korrespondierenden α -AA-Peptids (mittig) als auch des γ -AA-Peptids (rechts).

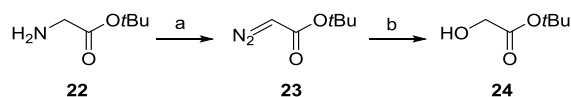
Bei dem hier synthetisierten Mimetikum handelt es sich um ein so genanntes α -AA-Peptid. Dieses setzt sich aus *N*-Acetylierten-*N*-aminoethylaminosäureeinheiten zusammen. AA-Peptide werden synthetisch stets als Dipeptideinheit aufgebaut. In diesem Fall handelt es sich formal um ein H_2N -MimSer(T_N)-Gly-COOH α -AA-Mimetikum, bei dem die Serinseitenkette sowie das Carbonyl am Stickstoff gebunden sind. Dieser Baustein sollte wie auch die vorherigen glycosylierten Aminosäuren in ein Peptid eingebaut werden und auf seine strukturellen Merkmale untersucht werden. Der Einbau erfolgte an den Positionen sieben und acht und ersetzte an dieser Stelle die Aminosäuren Threonin und Serin. Die Arbeiten an diesem Baustein dienen auch als vorläufige Synthesestrategie für komplexere Strukturen, welche innerhalb einer betreuten Masterarbeit durch *Gailer* durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 3.3.1.3).



Schema 3.22: Synthese des T_N-Mimetikum 3 ausgehend von Glycin-*tert*-butylester 22, Azidochlorid 15 und dem Hydrochlorid 20.

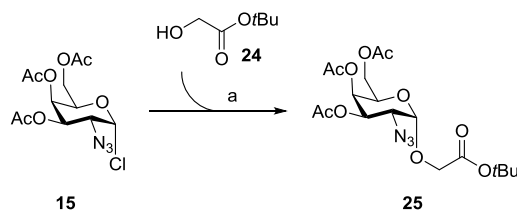
Die Ausarbeitung der Synthesestrategie des T_N-Mimetikum 3 erfolgte zusammen mit *Karch* in Anlehnung an die bereits literaturbekannten Synthese des T-Antigen, ausgehend vom Azidochlorid 15, welches bereits in der Synthese zum T_N-Antigen 1 dargestellt wurde (vgl. Kapitel 3.2.1.1). Das T_N-Mimetikum 3 wurde in dieser Arbeit erstmalig über sieben Stufen aus Azidochlorid 15, Glycin-*tert*-butylester 22 und dem Hydrochlorid 21 dargestellt sowie anschließend in ein Peptid eingebaut.

Zunächst wurde Glycin-*tert*-butylester 22 nach einer Vorschrift von *Müller* und *Huber-Emden* in einer Diazotierung in 2-Hydroxyessigsäure-*tert*-butylester 24 überführt.^[375] Die Umsetzung erfolgte mit Natriumnitrit in saurer Lösung zur Diazoverbindung 23. Die anschließende Hydrolyse in schwach saurer Lösung erbrachte das gewünschte Produkt 24 in 76%iger Ausbeute. Die Umsetzung der Aminogruppe des Edukts zu der Diazoverbindung 23, beruht auf der Entstehung eines reaktiven Nitrosium-Ions durch die Reaktion des Nitrit-Ions der konzentrierten Schwefelsäure. Durch den folgenden nukleophilen Angriff der Aminogruppe und anschließender Wasserabspaltung, wird die diazotierte Zwischenstufe 23 erhalten, welche direkt weiter umgesetzt wird. Bei der Aufarbeitung von Verbindung 24 ist zu beachten, dass aufgrund des niedrigen Siedepunktes eine Trocknung am Hochvakuum nicht möglich ist.



Schema 3.23: Umsetzung von Glycin-*tert*-butylester (22) zu Hydroxyessigsäure-*tert*-butylester (24). Reaktionsbedingungen: a) NaNO₂, H₂SO₄ (konz.), H₂O, CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h; b) H₂SO₄ (0.5 M), RT, 24 h, 67% über 2 Stufen.^[375]

Im Anschluss folgte der Schlüsselschritt, in Anlehnung an die *Königs-Knorr*-Glycosylierung analog zur Glycosylierung nach der von *Paulsen* und *Hölck*,^[351] mit Silbercarbonat und Silberperchlorat unter Bildung des α -Produkts 25. Die verwendeten Silbersalze dienen bei dieser Reaktion als Promotoren, welche durch Bildung von Silberchlorid den Austritt des Chloridions begünstigen und die Entstehung des Oxycarbeniumions als Zwischenstufe fördern. Anschließend erfolgt der nukleophile Angriff der Hydroxygruppe am Anomeren Zentrum und nach Protonenabspaltung die Bildung von 25 in 49%iger Ausbeute. Die niedrigen Temperaturen, sowie die lange Reaktionszeit führen zu der Entstehung des thermodynamisch begünstigten α -Anomers. Diese Konformation ist vor allem durch den bereits zuvor beschriebenen *anomeren Effekt* stabilisiert.



Schema 3.24: Königs-Knorr-Glycosylierung des Azidochlorids **15** und des Hydroxyessigsäure-*tert*-butylester (**24**) analog der Glycosylierungsbedingungen nach *Paulsen* und *Hölk*. Reaktionsbedingungen: a) Ag_2CO_3 , AgClO_4 , absol. Toluol/ CH_2Cl_2 1:1, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3 d, 49%.

Die folgende Reduktion mit Zink und der sich anschließenden Acetylierung erbrachte das Produkt **26** in 84% Ausbeute. Trotz säulenchromatographischer Reinigung ist es kaum möglich das α - und β -Anomer gut voneinander zu trennen. Sowohl das α -, als auch das β -Anomer können in den aufgenommenen NMR-Spektren unterschieden werden, da sich die Kopplungskonstanten der benachbarten Wasserstoffatome an **C1** und **C2** je nach bestehender räumlicher Anordnung unterscheiden (Abbildung 3.12). Diese Beziehung zwischen der Kopplungskonstanten und dem Diederwinkel wurde 1963 von *M. Karplus* beschrieben.^[376]

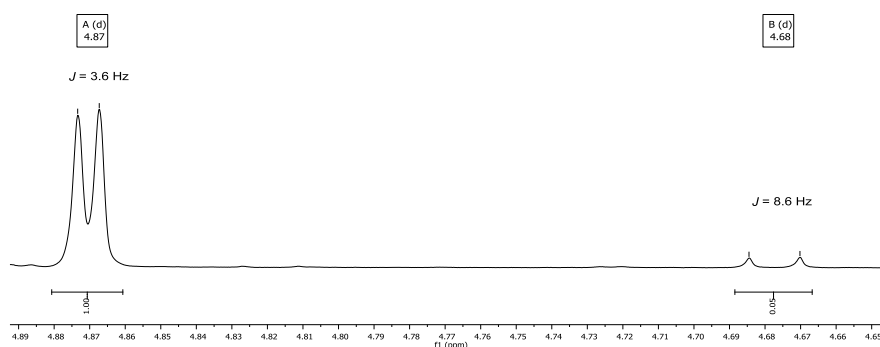


Abbildung 3.12: ^1H -NMR Ausschnitt von Verbindung **26** (links: **H1** der α -glycosylierten Verbindung; rechts: **H1** der β -glycosylierten Verbindung)

So ergibt sich bei der NMR-Analyse für das α -Anomer eine Kopplungskonstante $J_{\text{H1}/\text{H2}} = 3.6\text{ Hz}$, für das β -Anomer eine wesentlich größere Konstante $J_{\text{H1}^*/\text{H2}^*} = 8.6\text{ Hz}$. Dies resultiert daraus, dass bei der auftretende Diederwinkel zwischen den benachbarten Wasserstoffatomen an den Kohlenstoffatomen **C1** und **C2** in der α -Konformation kleiner ist als in der β -Form und nach der Karplus-Beziehung eine kleinere Kopplungskonstante verursacht (Abbildung 3.13).

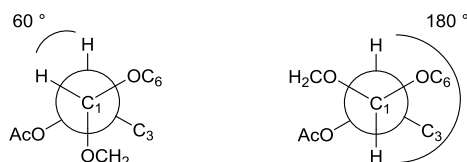
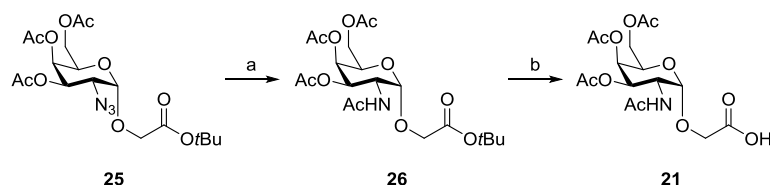


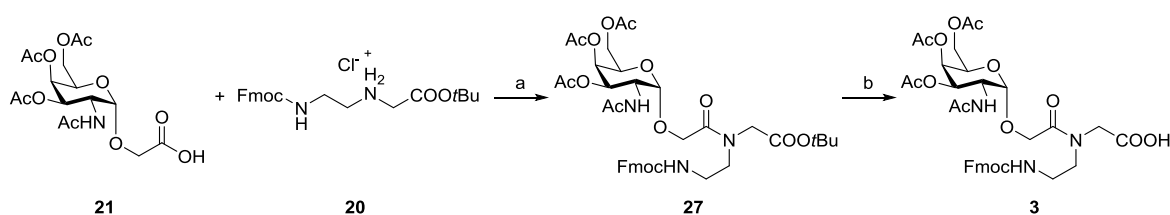
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Diederwinkel des α -Anomers (links) und des β -Anomers (rechts) von Verbindung **26**.

Für die im Anschluss folgende Kupplung mit Hydrochlorid **20** wurde der *tert*-Butylester unter sauren Bedingungen gespalten. Die freie Säure **21** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und direkt weiter umgesetzt.



Schema 3.25: Reduktion und anschließende Entschützung der Verbindung **25**. Reaktionsbedingungen: a) Zn^* , THF/Eisessig/ Ac_2O , RT, 24 h, 84%; b) TFA/Anisol 10:1, RT, 15 min, quant.

Zur Kupplung von Hydrochlorid **20** mit der freien Säure **21** wurden die Kupplungsreagenzien HATU und HOAt verwendet. Das *tert*-Butylgeschützte- T_N -Mimetikum **21** konnte in sehr guten Ausbeuten von 81% isoliert werden. Um **21** direkt in der Festphasensynthese verwenden zu können wurde der *tert*-Butylester unter sauren Bedingungen gespalten, wobei das T_N -Mimetikum **3** in quantitativen Ausbeuten erhalten werden konnte.



Schema 3.26: Kupplung zum Dipeptid **27** und anschließender Entschützung zum Festphasenbaustein **3**. Reaktionsbedingungen: a) HATU, HOAt, Pyridin, RT, 3 d, 81%; b) TFA/Anisol 10:1, RT, 15 min, quant.

Da sich das T_N -Mimetikum in Lösung um verschiedene Bindungen frei drehen kann, wurden in den NMR-Experimenten mehrere Konformere beobachtet (Abbildung 3.14).

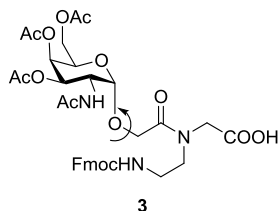


Abbildung 3.14: Die freie Drehung des Zuckers um das Mimetikumpeptidrückgrats führt zu einer Aufspaltung der Kohlenstoff- sowie der Wasserstoff-Signale im NMR-Experiment.

Deutlich wurde dies durch einen doppelten Signalsatz des $\text{C}1$ -Kohlenstoff-Atoms sowie des $\text{H}1$ -Wasserstoffatoms, wobei die beiden Kopplungskonstanten des $\text{H}1$ identisch waren. Die gleichen Kopplungskonstanten sind in dem Fall nicht verwunderlich, da es sich bei diesem beobachteten Phänomen um eine Drehung innerhalb des Moleküls handelt und nicht wie bereits weiter oben dargestellt um eine unterschiedliche α/β -Verknüpfung. Es handelt sich ferner um Rotamere und nicht um Konformere.

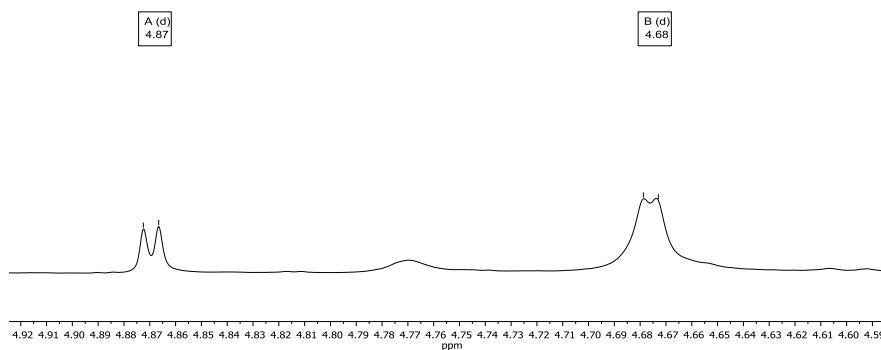
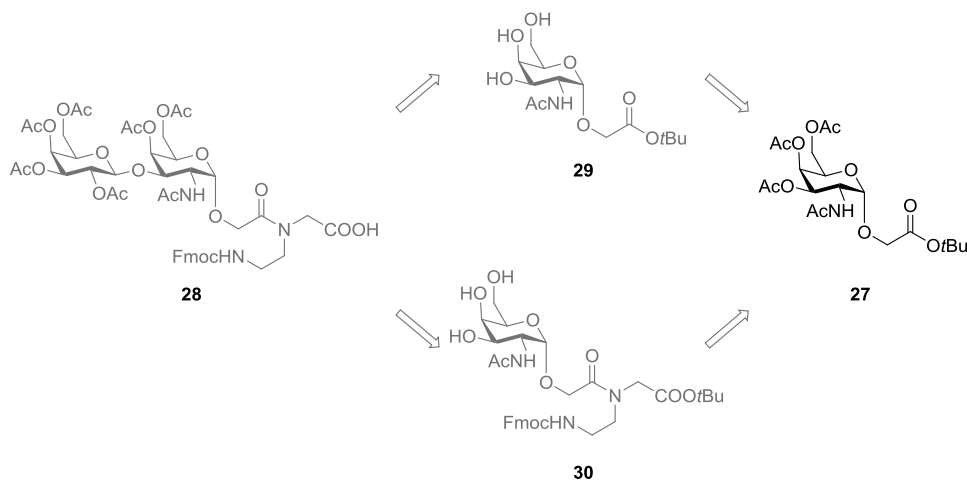


Abbildung 3.15: ^1H -NMR Ausschnitt des $H1$ -Wasserstoffatoms von Verbindung **3**.

Anhand des ^1H -NMR-Spektrums (Abbildung 3.15) konnte auch das Verhältnis der beiden Rotamere zueinander festgestellt werden. Das Verhältnis lag hier bei 3.5 zu 1 und beruht auf dem Integralverhältnis der beiden $H1$ -Signale. Dieses Phänomen der Drehung wurde zuvor auch bei der entsprechenden T_N -Verbindung beobachtet. Auch hier wurde ein doppelter Signalsatz in den NMR-Spektren vorgefunden.

Neben dem T_N -Mimetikum sollte der Vollständigkeit halber auch das komplexere T-Mimetikum **28** als Disaccharid aufgebaut werden. Zum Aufbau des Disaccharids wurden gleichzeitig zwei verschiedene Strategien verfolgt, welche analog zum T-Antigen **2** erfolgen sollten (vgl. Kapitel 3.2.1.1). Die zwei Synthesestrategien unterscheiden sich in der Einführung des Rückgrats. Alle Versuche hierzu scheiterten jedoch an der Stabilität der Verbindungen **29** und **30**.



Schema 3.27: Geplante Synthesestrategie zum T-Mimetikum Baustein **28** ausgehend von **27**.

Sowohl Verbindung **29** als auch Verbindung **30** weisen azide Protonen auf, welche leicht abgespalten werden können. So kommt es bei der Verseifung bei Verbindung **29** zur Abspaltung des Serin Rückgrats und bei Verbindung **30** zur Ausbildung eines Fünfrings. Beide unerwünschte Nebenreaktionen konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht unterbunden werden, sodass eine neue Synthesestrategie mit anderen Schutzgruppen zum Aufbau des T-Mimetikum's in Zukunft verfolgt werden muss.

3.2.1.3 Synthese des α -AA und γ -T_N-Mimetikum-Bausteins (H₂N-Mim-Thr(T_N)-Ser-COOH)

Wie bereits im vorherigen Kapitel erläutert, kam es bei der Synthese des Disaccharids vermehrt zu Nebenreaktionen, sodass von dem Plan ein H₂N-Ser(T)-Gly-COOH α -AA-T-Mimetikum-Baustein aufzubauen abgesehen wurde. Im Folgenden wurde das Ziel verfolgt, ein glycosyliertes Mimetikum aufzubauen, welches nicht nur chemisch sehr ähnlich zu den Aminosäuren ist, gegen welche dieses in der MUC1 *Tandem Repeat*-Sequenz substituiert werden sollten, sondern welches chemisch identisch ist. So wurde nicht nur das Ziel verfolgt ein α -AA-Mimetikum aufzubauen, sondern auch ein γ -AA-Mimetikum (Abbildung 3.16). Bei der zu substituierende Aminosäuresequenz an Position sechs bis acht handelt es sich um H₂N-Val-Thr-Ser-COOH. Aus diesem Grund sollte ein Mimetikum Baustein auf Basis dieser Aminosäuren dargestellt. Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Masterarbeit von *Gailer* in enger Zusammenarbeit durchgeführt.

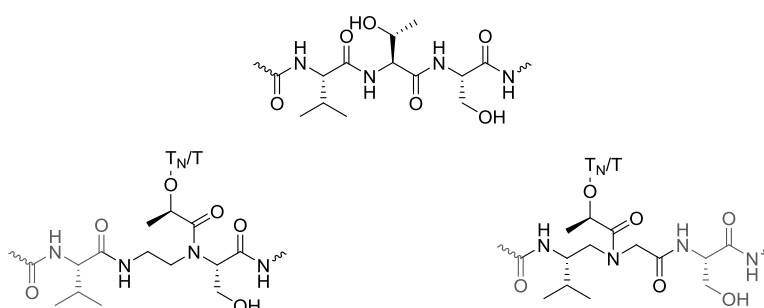
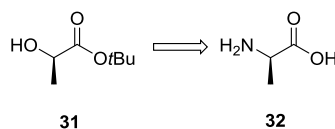


Abbildung 3.16: Ausschnitt aus der *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1 sowie die zwei AA-Mimetika. Links: α -AA-Dipeptid Thr-Ser und rechts: γ -AA-Dipeptid Val-Thr.

Sowohl für das α -AA-Mimetikum als auch das γ -AA-Mimetikum musste zunächst der Zuckerbaustein an ein Threonin Mimetikum gebunden werden, welches einer Milchsäure entspricht. Als Ausgangsverbindung diente das D-Alanin **32**, welches über vier Stufen in das Threonin-AA-Mimetikum **36** überführt werden konnte. Dazu wurde zunächst durch Desaminierung das entsprechende Milchsäurekonjugat erhalten, welches im Anschluss durch gezielte Schützung und entsprechender Entschützung zur Zielverbindung führt. Hierbei wurden verschiedene Synthesewege gewählt, welche innerhalb der Masterarbeit von *Gailer* näher erläutert werden.

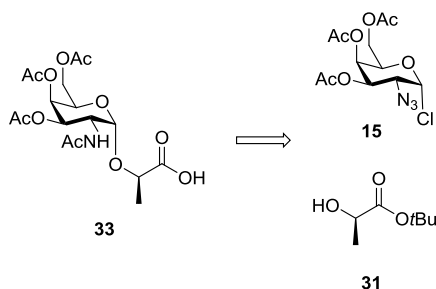


Schema 3.28: Synthese des Threonin Mimetikum Akzeptors **31** ausgehend von D-Alanin (**32**).

Im nächsten Schritt wurde der Threonin Mimetikum Akzeptor **31** schrittweise zum Monosaccharid **33** als auch zum Disaccharid **34** aufgebaut, welcher für das α -AA-Mimetikum als auch das γ -AA-Mimetikum herangezogen werden kann. Die Synthesestrategie verläuft dabei analog zur natürlichen T_N- und T-Antigen Synthese ausgehend vom Azidochlorid **15**.

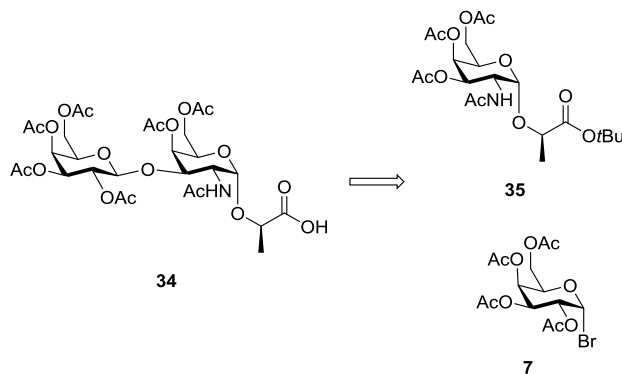
So wurde auch hier eine Glycosylierung nach *Königs Knorr* Bedingungen durchgeführt. Anders als bei dem Serin-T_N-Mimetikum **3** (Kapitel 3.2.1.2) konnte hier das α -Produkt von dem unerwünschten β -Produkt gut

isoliert werden. Die sich anschließende Reaktionen waren analog zu den bereits erörterten, sodass der freie T_N -Thr-Mimetikumbaustein **33** erhalten werden konnte.



Schema 3.29: Synthese des T_N -Thr-Mimetikumbausteins **33** ausgehend von Azidochlorid **15** und dem Thr-Mimetikum-Bausteins **31**.

Die Synthese des T-Threonin-Mimetikumbausteins **34** erfolgt ausgehend vom vollgeschützten T_N -Thr-Mimetikumbausteins **35** welcher über eine dreistufige Synthese zum Disaccharid aufgebaut wurde. Auch diese Synthese verlief analog zu der bereits erläuterten Synthese in Kapitel 3.2.1.1.

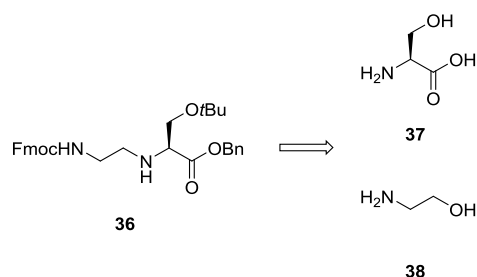


Schema 3.30: Synthese des T_N -Thr-Mimetikumbausteins **34** ausgehend von dem vollgeschützten T_N -Thr-Mimetikumbausteins **35** sowie des Galacosylbromids **7**.

Zunächst sollte auf Basis eines H_2N -Thr-Ser-COOH Dipeptids ein glycosyliertes α -AA-Mimetikum dargestellt werden. Nachdem der Saccharidbestandteil **33** und **34** des Mimetikums aufgebaut wurde, erfolgte die Synthese des Peptidrückgrats ausgehend von Ethanolamin (**38**) und L-Serin (**37**).

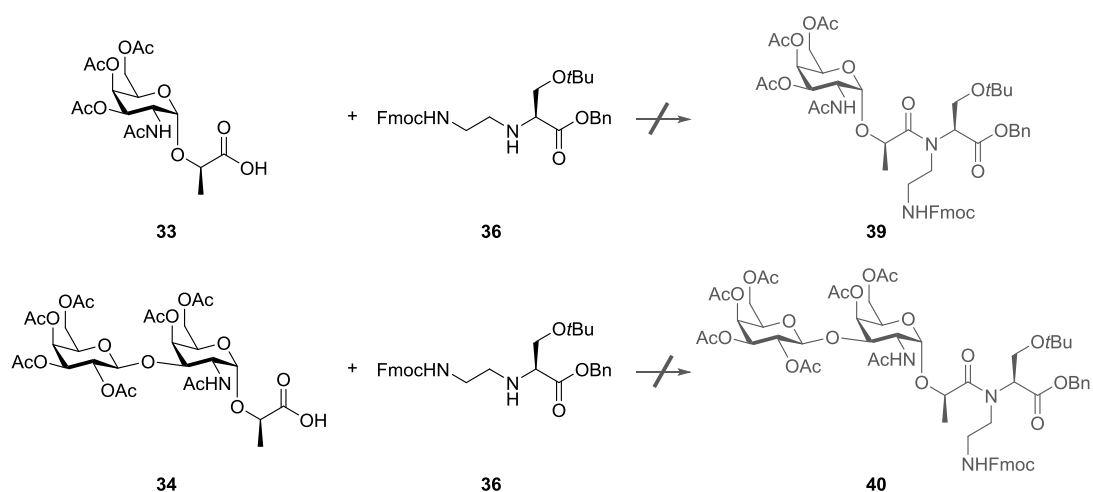
Zunächst wurde die Aminofunktion des Ethanolamin (**38**) mit der Schutzgruppe *Fmoc* geschützt um anschließend durch eine Oxidation das *Fmoc*-geschützte Glycinaldehyd zu erhalten. Dieser Baustein dient im Dipeptid als Threonin Rückgrat.

Bevor der Aldehyd an das L-Serin (**37**) gebunden werden konnte, musste das L-Serin (**37**) zunächst durch verschiedene Schutzgruppenstrategien blockiert werden. Das ungleiche Schutzgruppenmuster ist zwingend notwendig, da die Schutzgruppen getrennt voneinander entschützt werden sollen. Innerhalb dieser Arbeiten wurden verschiedene Schutzgruppenstrategien verwendet. Zuletzt wurde der vollgeschützte Serin-Baustein an den Aldehyden geknüpft, sodass der Peptidrückgratbaustein **36** hergestellt werden konnte.



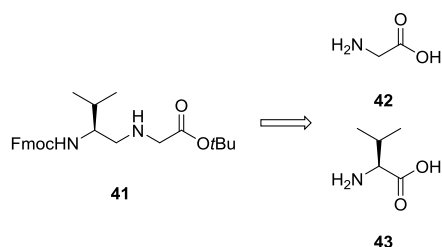
Schema 3.31: Synthese des Peptidrückgrats des α -AA-Peptids **36** ausgehend von Ethanolamin (**38**) und L-Serin (**37**).

Leider konnte auch nach mehrmaligen Versuchen das Peptidrückgrat des α -AA-Peptids **36** nicht an den Zuckerbaustein **33** und **34** gebunden werden, sodass nicht wie gewünscht ein α -AA-Dipeptid **39** und **40** dargestellt werden konnte.



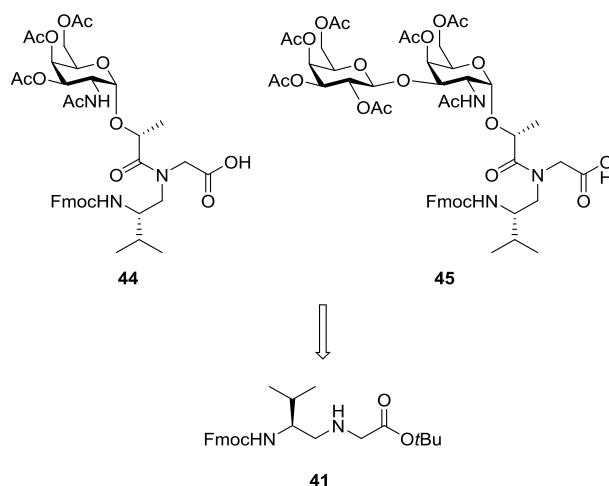
Schema 3.32: Kupplung zum gewünschten α -AA-Peptids **39** und **40** blieb erfolglos.

Neben der Synthese des glycosyliertes α -AA-Peptids wurde auch, wie eingangs erwähnt, der Plan verfolgt, ein γ -AA-Peptid auf Basis von NH_2 -Val-MimThr($\text{T}_\text{N}/\text{T}$)- CO_2H darzustellen. Das Peptidrückgrat dieses Mimetikum wurde ausgehend von Glycin (**42**) und L-Valin (**43**) hergestellt. Auch hier wurde mittels Schutzgruppenstrategie sowie Reduktion und Oxidation die gewünschten Produkte erhalten, welche in einem Schlüsselschritt zum gewünschten γ -AA-Peptidrückgrat **41** verknüpft wurden.



Schema 3.33: Synthese des Peptidrückgrats des γ -AA-Peptids **41** ausgehend von Glycin (**42**) und L-Valin (**43**)

Abschließend wurde das γ -AA-Peptidrückgrat sowohl an den T_N - **33** als auch an den T-Baustein **34** konjugiert, sodass die beiden glycosylierten Antigene erstmalig als Festphasenbausteine synthetisiert werden konnten.



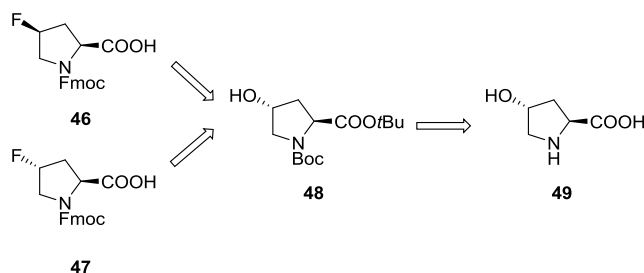
Schema 3.34: Synthese der γ -AA-Festphasenbausteine **44** und **45**.

In weiterführenden Arbeiten sollen die beiden Festphasenbausteine **44** und **45** in die *Tandem-Repeat*-Sequenz des MUC1 mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese eingebaut werden. Diese Peptide sollen im Anschluss dazu verwendet werden, Strukturvergleiche mittels NMR-Experimenten durchzuführen. Als Referenz Peptide dienen die analogen natürlichen Glycopeptide. Ferner sollen die Glycopeptide innerhalb von Abbaustudien auf ihre Stabilität bzw. ihren enzymatischen Abbau hin untersucht werden. Darüber hinaus ist auch die Bindungsaffinität gegenüber dem SM3-Antikörper von großem Interesse. Der SM3-Antikörper, stellt ein Antikörper dar, welcher spezifisch die an die *Tandem-Repeat*-Sequenz des MUC1 bindet.

3.2.2 Synthese der fluorierten Prolinbausteine

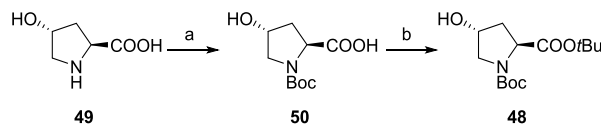
Die Synthesestrategie der fluorierten Prolinbausteine basiert sowohl auf literaturbekannten Verfahren, als auch auf Vorarbeiten von *Renkel*, unter Verwendung von *Boc*- und *tert*-Butylester-Schutzgruppen. Die Kombination dieser beiden Schutzgruppen ermöglicht die gemeinsame Abspaltung in einem Schritt, sodass die resultierenden fluorierten Aminosäuren **53** und **54** für den Einsatz in der Peptidsynthese lediglich *Fmoc*-geschützt werden müssen, wobei direkt *C*-terminal deblockierte Kupplungsbausteine erhalten werden. Diese können dann in der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt werden.

Die Synthese der beiden Fluorproline **46** und **47** erfolgte ausgehend von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin (**49**), da dieses kostengünstiger ist als das entsprechende *cis* Diastereomere. Außerdem verläuft die Oxidation und die sich anschließende Reduktion vom *trans*- ins *cis*-Isomer mit sehr guten Ausbeuten.



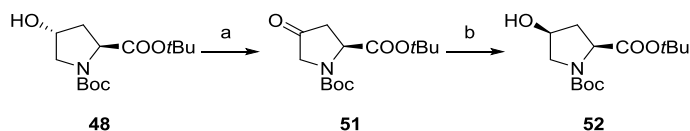
Schema 3.35: Retrospektivische Betrachtung der Fluorprolin Synthesen ausgehend von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin (**49**).

Im ersten Schritt wird *trans*-4-Hydroxy-L-Prolin (**49**) mit Di-*tert*-butyldicarbonat in einer Mischung aus Wasser und 1,4-Dioxan unter Zugabe von verdünnter Natriumhydroxidlösung (1 M) zu *N*-Boc-*trans*-4-Hydroxy-L-prolin (**50**) umgesetzt.^[377-379] Bei der anschließenden Reaktion wird der *tert*-Butylester **50** in das Boc-geschützte Prolin **48** mit einer Suspension aus Kupfer-(I)-chlorid, *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff und *tert*-Butanol in Dichlormethan bei Raumtemperatur überführt.^[377, 380]



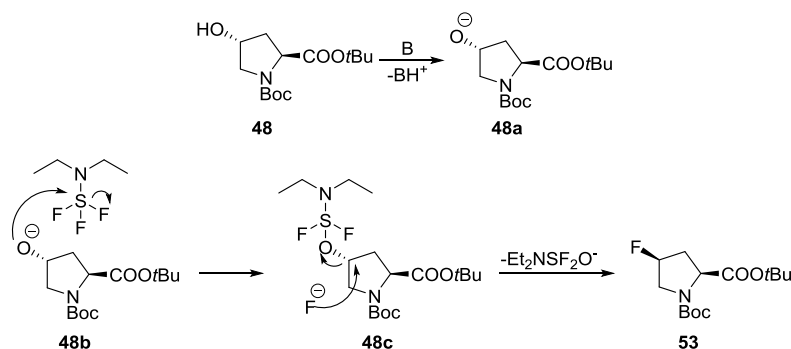
Schema 3.36: Synthese des Carboxyl- und Amidgeschützten Hydroxyprolinbausteins **48**. Reaktionsbedingungen: a) Boc_2O , NaOH, Dioxan, Wasser, RT, 24 h, 74%; b) Cu(I)Cl , DCC, *t*-BuOH, CH_2Cl_2 , RT, 4 h, 64%.^[377-380]

Der *tert*-Butylester **48** dient als Vorstufe für *N*-Fmoc-*cis*-4F-Pro (**46**). Um den Vorläufer des anderen fluorierten Prolins zu erhalten, wird **48** zunächst durch eine Swern-Oxidation zum *N*-Boc-4O-L-Pro-O*t*Bu **51** umgesetzt.^[377] Das 4-Oxo-L-prolin **51** kann dann direkt nach Reduktion mit Natriumboranat in Methanol und Diethylether zur Synthese des *N*-Fmoc-*trans*-4F-Pro (**52**) verwendet werden.^[377, 381]



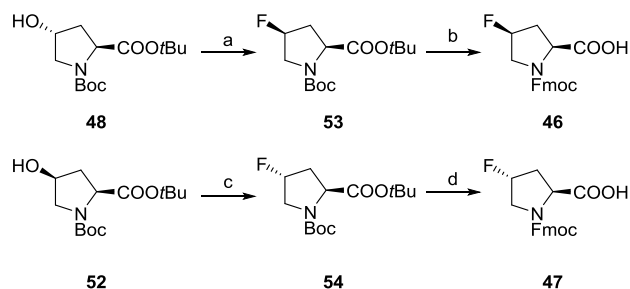
Schema 3.37: Überführung des *trans*-Hydroxyprolin **48** ins entsprechende *cis*-Hydroxyprolin **52** mit Hilfe einer Swern Oxidation und anschließender Reduktion. Reaktionsbedingungen: a) $(\text{COCl})_2$, DMSO, NEt_3 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 24 h, 94%; b) NaBH_4 , MeOH, Et_2O , RT, 30 min, 92%.^[377, 381]

Die geschützten Hydroxyproline **48** und **52** werden mit *N,N'*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST[®]) und 2,4,6-Collidin in der Mikrowelle in das gewünschte *N*-Boc-*cis*-4F-L-Pro-O*t*Bu (**53**) sowie *N*-Boc-*trans*-4F-L-Pro-O*t*Bu (**54**) überführt. Mechanistisch betrachtet wird bei der Fluorierung der Prolinbausteine **48** sowie **52** zunächst durch eine Hilfsbase der Alkohol zum Alkoholat deprotoniert. Dieses greift dann den Schwefel eines DAST[®]-Moleküls an, wobei ein Fluorid gegen den Sauerstoff des Prolins substituiert wird. Zuletzt greift das freigesetzte Fluoridion in einer bimolekularen nukleophilen Substitution den gebildeten Ester an und das 4F-Prolin wird erhalten. Da es sich im letzten Schritt um eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion handelt, kommt es zu einer Inversion (Walden-Umkehr) des an der Reaktion beteiligten Stereozentrums. Die schlechtere Ausbeute der Synthese des *trans*-4F-Prolin **54** im Vergleich zu der des *cis*-F-Prolins **53** ist im Wesentlichen auf die sterisch Hinderung durch die *tert*-Butyl-Gruppe zurückzuführen.



Schema 3.38: Mechanismus der Fluorierung mit Hilfe von DAST[®].

Um die fluorierten Proline **53** und **54** in der Festphasensynthese einsetzen zu können, werden sie in TFA und Anisol zunächst vollständig entschützt und anschließend ohne weitere Reinigung mit *N*-(9-*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat (*Fmoc*-OSu) und Natriumhydrogencarbonat in einem Wasser/Aceton-Gemisch zur Reaktion gebracht. Die so erhaltenen *Fmoc*-geschützten fluorierten Proline **46** und **47** stehen damit für den Aufbau der Glycopeptide bereit.



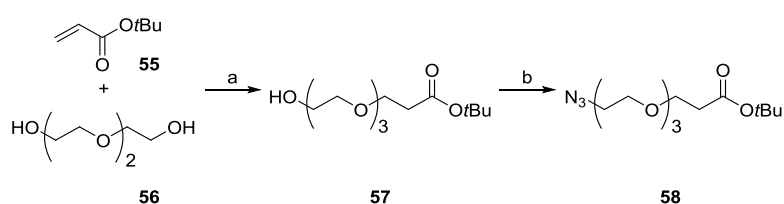
Schema 3.39: Monofluorierung mit DAST[®] und anschließender Umschätzung zum *N*-*Fmoc*-geschützten Fluorprolin **46** und **47**. Reaktionsbedingungen: a) DAST[®], 2,4,6-Collidin, CH₂Cl₂, 80 °C, 100 W, 3 h, 83%; b) 1. TFA, Anisol (10:1), RT, 4 h, 2. NaHCO₃, *Fmoc*-OSu, Aceton Wasser (1:1), RT, 18 h 86%; c) DAST[®], 2,4,6-Collidin, CH₂Cl₂, 80 °C, 100 W, 3 h, 78%; d) 1. TFA, Anisol (10:1), RT, 2,5 h, 2. NaHCO₃, *Fmoc*-OSu, Aceton Wasser (1:1), RT, 4 d, 96%.^[377, 382]

3.2.3 Synthese des Spaceraminosäurebausteins

Für die Synthese eines vollständigen vollsynthetischen tumorassozierten MUC1-(Glyco-)Peptid Vakzinen ist es notwendig, das synthetisierte tumorassozierte Antigen mit einer möglichen Immunstimulanz wie zum Beispiel Rinderserumalbumin (BSA) oder Tetanus-Toxoid (TTox) zu verbinden. Eine Möglichkeit bietet der nicht immunogene Triethylenglycollinker, welcher in dieser Arbeit als Spacer-Aminosäure Verwendung findet. Dieser fungiert als Abstandhalter und sorgt durch seine Molekülstruktur für die räumliche Distanz. Außerdem verhindert der Spacer aufgrund seiner geringen eigenen Immunogenität Eigenschaften eine gegenseitige konformationelle Beeinflussung des MUC1-Glycopeptids mit dem Carrierprotein. Andernfalls kann die Präsentation wichtiger Epitope und damit die immunogenen Eigenschaften des Vakzins beeinträchtigt werden.^[383, 384] Zudem zeichnet sich der Linker durch seine gute Wasserlöslichkeit aus, sodass immunologische Untersuchungen der synthetisierten Vakzine unter einfacher Handhabung im wässrigen Milieu durchgeführt werden können. Aufgrund seines Molekülbaus, analog zu natürlichen Aminosäuren, mit seinen funktionellen Gruppen, kann der Spacer an beliebiger Stelle in ein Peptid integriert werden und somit auch als universeller Abstandhalter in der automatischen

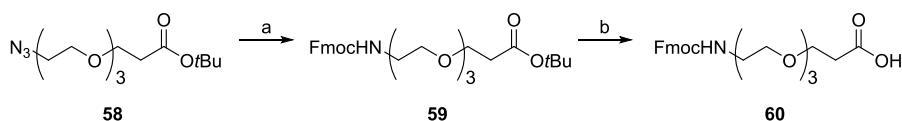
Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden. Um den Spacer als *Fmoc*-Aminosäuremimetikum in der Festphasensynthese einsetzen zu können wird die Aminogruppe mit einer *Fmoc*-Schutzgruppe versehen. Die Synthese des *N-Fmoc*-blockierten aminofunktionalisierten Triethylenglycolspacer mit freier Carboxylfunktion erfolgte nach einer bereits bekannten Synthesestrategie ausgehend von Triethylenglycol.^[385-387]

Im ersten Schritt dieser Synthese wird der spätere *C*-Terminus eingeführt, indem Triethylenglycol **56** mit Acrylsäure-*tert*-butylester **55** in einer *Hetero-Michael-Addition* unter Verwendung von katalytischen Mengen an Natrium in Tetrahydrofuran mit einer Ausbeute von 86% umgesetzt werden. Im nächsten Schritt erfolgt der Aufbau des *N*-Terminus, dabei wird die Hydroxyfunktion von **57** durch Behandlung mit Mesylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan mesyliert und durch eine nukleophile Substitutionsreaktion mit Natriumazid in das primäre Azid **58** überführt.



Schema 3.40: Darstellung des primären Azids **58** ausgehend von Triethylenglycol (**56**) und Acrylsäure-*tert*-butylester **55** Reaktionsbedingungen: a) kat. Na, THF, RT, 24 h, 86%; b) 1. MesCl, NEt₃, CH₂Cl₂, 0°C, 4.5 h; 2. NaN₃, DMF, 60 °C, 15 h, 88%.

Anschließend erfolgt die Umsetzung zum Amin durch die Reduktion der Azidofunktion mit Wasserstoff und Raney-Nickel in Isopropanol. Das freie Amin wird ohne weitere Aufarbeitung in einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) mit *Fmoc*-OSu in das vollständig geschützte *Fmoc*-blockierte Derivat **59** überführt. Im letzten Reaktionsschritt, der *tert*-Butyl-Deblockierung, wird durch zweieinhalbstündige Behandlung mit Trifluoressigsäure und Wasser (10:1) der Festphasenpeptidbaustein **60** erhalten. Das *Fmoc*-Spaceraminosäure **60** kann nun analog zu einer *Fmoc*-geschützten Aminosäure im Peptidsynthesizer aktiviert und an eine *N*-terminal deblockierte Aminosäure gekuppelt werden.



Schema 3.41: Darstellung des *Fmoc*-geschützten Triethylenglycolspacers **60**. Reaktionsbedingungen: a) 1. Raney-Ni, H₂, Isopropanol, RT, 18 h; 2. *Fmoc*-OSu, NaHCO₃, Aceton/Wasser (1:1), RT, 7d, 87%; b) TFA/Wasser (10:1), RT, 2.5 h, quant.

3.3 Synthese von Peptiden und Glycopeptiden aus der *Tandem Repeat-Domäne des epithelialen Mucins MUC1*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene (Glyco-)Peptide basierend auf der *Tandem Repeat-Domäne des epithelialen Mucins MUC1* mit der Aminosäuresequenz PPAHGVT*SAPDTRPAPGSTA an der festen Phase synthetisiert. Alle Peptide zeichnen sich durch ihre gleiche Länge von 20 Aminosäuren aus, welche auch in der gleichen Abfolge synthetisiert wurden. Einige Peptide weisen zudem eine Spacereinheit auf, welche am Amidende verknüpft vorliegt. Wieder andere weisen zusätzlich an Position sieben ein Zuckerbaustein auf, welcher entweder am Threonin α -verknüpft vorliegt oder in Form eines Mimetikums eingebaut wurde. Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag jedoch im Einbau von Fluorprolin an den Positionen 2, 10, 14 und 16. So wurden zahlreiche ausgewählte Peptide synthetisiert, welche an zwei Positionen des Peptids ein Fluorprolin aufweisen. Peptide ohne Fluorprolin wurden meist nur als Referenzpeptide synthetisiert, da diese die natürliche Struktur wiedergeben.

Die verschiedenen synthetisierten Peptide dienen unterschiedlichen Zwecken. Solche Glycopeptide, welche einen Spacer aufweisen, wurden als Vorstufen neuer Vakzine hergestellt. Aufgrund des zusätzlichen Einbaus von Fluorprolin wird eine erhöhte Stabilität als auch eine erhöhte Immunogenität der Peptide erwartet. Des Weiteren wurden analog hierzu auch solche Peptide hergestellt, die keinen Zucker, jedoch einen Spacer aufweisen. Ein Zweck dieser Peptide war es die strukturelle Veränderung durch den Zuckereinbau hin zu untersuchen.

Des Weiteren wurden zahlreiche Peptide synthetisiert, welche keinen Zucker und keinen Spacer aufweisen, jedoch an den oben genannten Stellen das unnatürliche Fluorprolin aufweisen. Diese Peptide dienen dem primären Zweck innerhalb von Abbaustudien zu untersuchen, welchen Einfluss der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren auf die enzymatische Stabilität hin hat.

Zuletzt wurden auch solche Peptide synthetisiert, welche den T_N-Mimetikum-Baustein aufweisen. Diese Peptide sollten im Wesentlichen mit den natürlichen Peptiden strukturell verglichen werden.

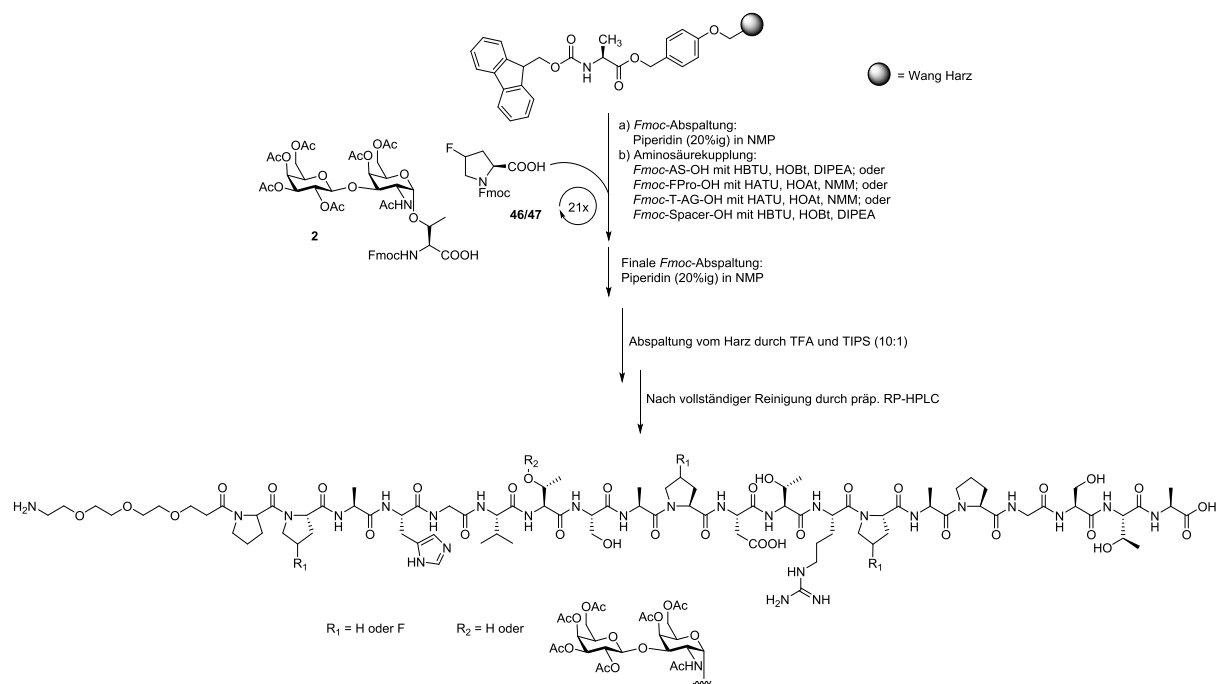
In den folgenden drei Kapiteln soll die Synthese der zahlreichen Peptide dargestellt werden. Die Kapitel richten sich primär nach dem Zweck, für den die Peptide hergestellt wurden. So werden im ersten Kapitel 3.3.1 die Synthesen neuartiger (Glyco-)Peptide zur potentiellen Verwendung als Vakzin erläutert. Diese Peptide weisen alle einen Spacer am Amidende auf. Im anschließenden Kapitel 3.3.2 wird auf die Synthese der Peptide eingegangen, die für den enzymatischen Abbau bestimmt waren. Im letzten Peptidsynthesekapitel 3.3.3 wird der Einbau des T_N-Mimetikumbausteins ins Peptid dargestellt.

Tabelle 3.1: Mikrowellen SPPS Parameter

Aminosäure	Anzahl Kupplungen	Leistung (W)	Max. Temp. (°C)	Zeit (s)	AS Konzentration (M)
<i>Kupplung</i>					
Arg	2	0	80	1800	1.00 mmol
		23	80	300	
FPro	1	0	80	2100	0.15 mmol
His	1	0	50	360	1.00 mmol
Restliche AS	1	23	80	300	1.00 mmol
Restliche AS nach	2	23	80	480	1.00 mmol
T-AG oder F-Pro		23	80	480	
T-AG	1	0	80	2100	0.15 mmol
Spacer	1	23	80	300	0.40 mmol
	Anzahl der Kupplungen	Leistung (W)	Max. Temp. (°C)	Zeit (s)	
<i>Entschützung</i>					
Initiale Entschützung	1	26	40	40	
Entschützung	1	30	80	180	

Bei den allgemeinen Standard-Kupplungsprotokoll der kommerziell erhältlichen Aminosäuren sowie des Spacers werden die Kupplungsreagenzien HBTU und HOBt sowie DIPEA verwendet und in der Regel auf maximal 80 °C erhitzt. Für die Kupplungen der fluorierten Proline und des T-Antigens werden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt sowie NMM verwendet. Während dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass höhere Ausbeuten und eine höhere Reinheit des Peptids bei der Peptidsynthese erzielt werden kann, wenn nach dem Einbau von Fluorprolin und T-Antigen alle folgenden Aminosäuren durch eine Doppelkupplung ans Peptid gebunden werden. Dafür wird der Kupplungsschritt doppelt durchgeführt wobei zwischen den Kupplungen das Peptid von nicht umgesetzten Aminosäuren gereinigt wird. Zwischen allen Syntheseschritten wird durch das Einleiten von DMF in das Reaktionsgefäß sowohl von oben, als auch von unten, das wachsende Peptid immer wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Außerdem wird der Reaktor regelmäßig zwischen den einzelnen Syntheseschritten mit Stickstoff begast. Hierdurch wird das Harz aufgelockert, sodass eine Verklumpung des Harzes vermieden werden kann. Nachdem der Spacer ans Peptid gekuppelt wurde erfolgt der finale Deblockierungsschritt am N-terminus des Spacers.

Im Anschluss an die vollautomatisierte Mikrowellen Peptidsynthese wird das Peptid in einen weiteren *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Der polymere Träger und die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen werden durch zweistündige Behandlung mit Trifluoressigsäure (10 mL) und Triisopropylsilan (TIPS) (1 mL) entfernt, sodass das Rohpeptid erhalten wird.



Schema 3.42: Allgemeines Protokoll der Peptidsynthese.

Die Vorreinigung des Rohpeptids erfolgt durch dreimaliges Ausfällen in eisgekühltem Diethylether, Zentrifugation und anschließender Lyophilisierung. Die vollständige Reinigung erfolgt im Anschluss durch präparative RP-HPLC. Analysiert werden die Peptide sowohl NMR-spektroskopisch als auch massenspektrometrisch über ESI-Messungen.

Die Ausbeuten dieser Peptide fallen vor allem auf Grund der präparativen Aufarbeitung so gering aus. Bei der präparativen HPLC wurde eine Methode verwendet, bei der die Peptide sehr langsam und über einen langen Zeitraum getrennt werden. Hierbei wird beim Auffangen des Peptids auf eine große Ausbeute verzichtet, um möglichst reine Peptide zu erhalten.

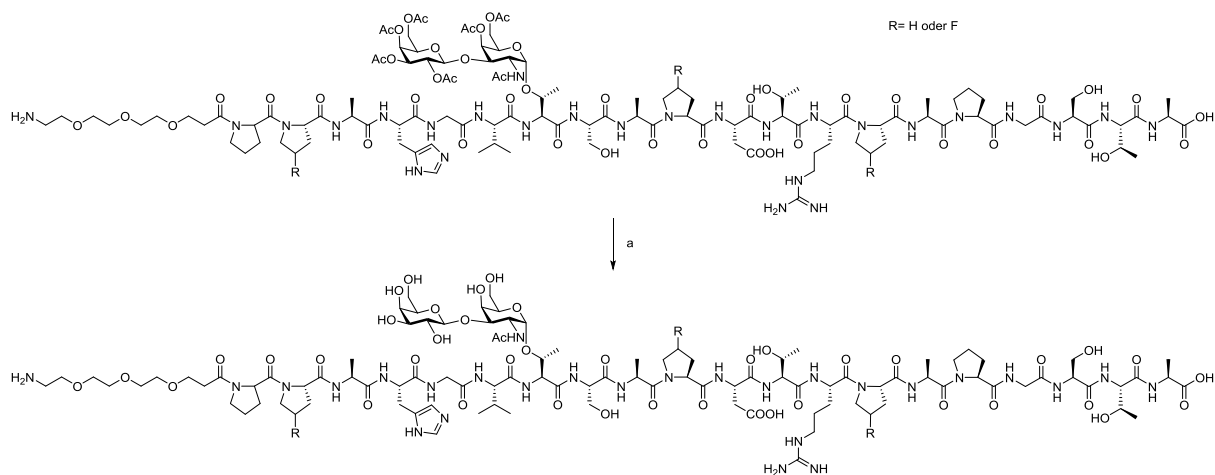
Mit Hilfe des oben genannten Protokolls wurden folgende zehn Peptide dargestellt (Tabelle 3.2). Die ersten fünf Peptide (**61** bis **65**) wurden zum einen für mögliche ELISA-Experimente aber auch zur Strukturaufklärung als auch für mögliche Abbaustudien synthetisiert. Die folgenden fünf Glycopeptide (**66** bis **70**) stellen neuartige Vakzinorstufen da. Die Peptide **61** und **66** wurden als Referenzpeptide synthetisiert. Sie stellen die natürlich vorkommende Peptidstruktur dar.

Tabelle 3.2: Aminosäuresequenzen und dazugehörige Ausbeuten.

NR	Aminosäuresequenz	Ausbeute
61	HN-TEG P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A-COOH	23%
62	HN-TEG P P A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R <i>cis</i> -FP A P G S T A-COOH	39%
63	HN-TEG P P A H G V T S A <i>trans</i> -FP D T R <i>trans</i> -FP A P G S T A-COOH	35%
64	HN-TEG P <i>cis</i> -FP A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	41%
65	HN-TEG P <i>trans</i> -FP A H G V T S A <i>tans</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	77%

66	HN-TEG P P A H G V T-AG(OAc) S A P D T R P A P G S T A-COOH	23%
67	HN-TEG P P A H G V T-AG(OAc) S A <i>cis</i> -FP D T R P A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH	32%
68	HN-TEG P P A H G V T-AG(OAc) S A <i>trans</i> -FP D T R P A <i>trans</i> -FP G S T A-COOH	39%
69	HN-TEG P <i>cis</i> -FP A H G V T-AG(OAc) S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	32%
70	HN-TEG P <i>trans</i> -FP A H G V T-AG(OAc) S A <i>trans</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	23%

Die synthetisierten Glycopeptide (**66**, **67**, **68**, **69** und **70**) müssen vor ihrer Verwendung als Vakzine zunächst von den Acetylschutzgruppen befreit werden. Die Entschützung wird mit einer frisch hergestellten wässrigen NaOH Lösung (pH= 11) durchgeführt, wobei darauf geachtet werden muss, dass es nicht zu einer unerwünschten β -Eliminierung kommt und somit zum Verlust des Zuckers. Die Entschützung wird durch regelmäßiges Einstellen des pH-Werts von maximal 10 über mehrere Tage durchgeführt. Die Reaktion kann über analytische HPLC überwacht werden. Nach beendeter Reaktion wird abschließend mit 1 M Essigsäure neutralisiert.



Schema 3.43: Acetylschutzgruppen Entfernung durch die Behandlung mit wässriger NaOH. Reaktionsbedingungen:
a) NaOH (aq), pH = 11, 3 – 4 d, RT.

Während dieser Arbeit stellte sich heraus, dass in der Entschützung eine besondere Schwierigkeit liegt. Der pH-Wert kann schnell überschritten werden. Dies ist vor allem der Fall an der Eintropfstelle der NaOH-Lösung in die wässrige Peptidlösung. Ferner verändert sich der pH-Wert einer frisch hergestellten NaOH-Lösung stündlich, sofern diese nicht unter Schutzatmosphäre verschlossen vorliegt. Es ist daher wichtig stets darauf zu achten eine frisch hergestellte NaOH-Lösung für die Entschützung zu verwenden. Ferner zeigte sich, dass das Auftreten der β -Eliminierung deutlich minimiert werden kann, wenn die Entschützung in sehr stark verdünnter Lösung (bis zu 250 mL Wasser auf ca. 20 mg Peptid) durchgeführt wird. Hierbei ist eine Überwachung durch analytische HPLC jedoch nur mit großem Aufwand möglich. Durch die starke Verdünnung müsste vor den HPLC-Läufen eine Test-Probe zunächst lyophilisiert werden, was mehrere Stunden in Anspruch nehmen kann. Ein weiterer Vorteil, der sich auch durch die starke Verdünnung ergibt, ist die Verwendung eines pH-Meters zur Überwachung des pH-Werts. Bei geringer Verdünnung reicht der Fühler des Geräts oft nicht genügend in die Lösung ein.

Die vollständige Reinigung der Glycopeptide erfolgt erneut durch präparative RP-HPLC und anschließender Lyophilisierung. Analysiert werden die Peptide sowohl NMR-spektroskopisch, als auch massenspektrometrisch über ESI-Messungen.

Neben den fünf Peptiden ohne T-Antigen (**61**, **62**, **63**, **64** und **65**) stehen nun weitere fünf neue Glycopeptide (**71**, **72**, **73**, **74** und **75**) für weitere immunologische Evaluierung zur Verfügung.

Tabelle 3.3: Aminosäuresequenzen und dazugehörige Ausbeuten.

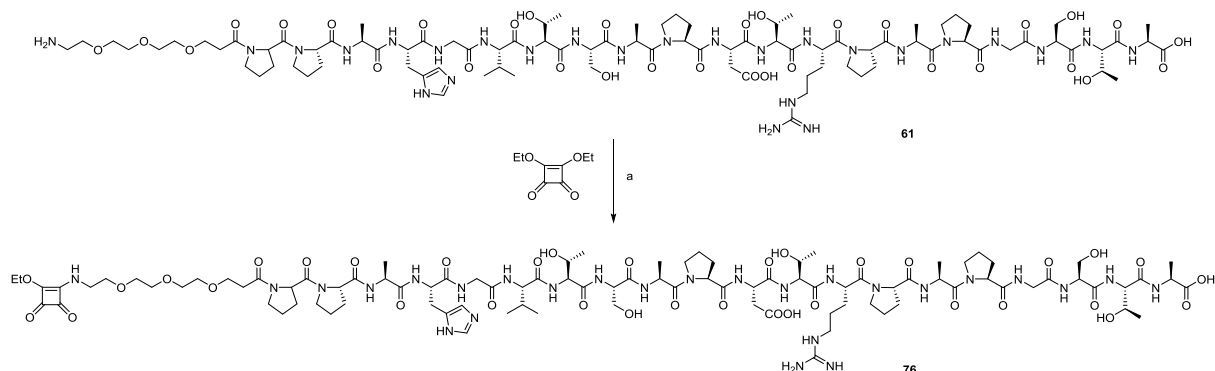
NR	Aminosäuresequenz	Ausbeute
71	HN-TEG P P A H G V T-AG S A P D T R P A P G S T A-COOH	53%
72	HN-TEG P P A H G V T-AG S A <i>cis</i> -FP D T R P A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH	83%
73	HN-TEG P P A H G V T-AG S A <i>trans</i> -FP D T R P A <i>trans</i> -FP G S T A-COOH	91%
74	HN-TEG P <i>cis</i> -FP A H G V T-AG S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	39%
75	HN-TEG P <i>trans</i> -FP A H G V T-AG S A <i>trans</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	63%

Um die Peptide als potentielle Antitumor-Vakzine einsetzen zu können, ist die Bindung an ein Carrierprotein von Nöten. So werden beispielsweise BSA,^[286, 287] KLH^[388] oder auch das TTox^[389-392] eingesetzt. Neben der Verwendung als Antitumor-Vakzin können die Peptide auch in ELISA Studien untersucht werden. Hierfür müssen die Peptide an BSA gebunden werden um die Peptide an die ELISA Mikrotiterplatten binden zu können.^[288-290] Es gibt eine Vielzahl an Möglichkeiten die synthetisierten (Glyco-)Peptide über ihr freien N-terminus des Spacers an ein Carrierprotein zu binden.^[80, 283, 393, 394]

Da die Bindung über Quadratsäure schon häufig zur Anwendung^[76, 156, 288] kam und bereits im Arbeitskreis um Hoffmann-Röder etabliert ist, wird auf diese Konjugationsmethode von Tietze *et al.*^[395, 396] in dieser Arbeit zurückgegriffen. Dabei reagiert der Quadratsäurediester mit der Spacer-Amino-Gruppe des Peptids zum Quadratsäuremonoamid. Diese wiederum kann dann mit einer Aminogruppe des Carrierprotein zum Quadratsäurediamid reagieren. Häufig sind es die Lysin-Seitenketten die mit dem Quadratsäurediester reagieren. Da das Protein viele Bindungsmöglichkeiten aufweist ist es durchaus möglich, dass mehrere Peptide an ein Protein binden. Wichtig bei der Wahl der Verknüpfung sind die möglichst milden Reaktionsbedingungen, bei denen das Peptid an das Protein konjugiert wird. Außerdem sollte keine Verbindung gewählt werden, die selbst immunogen ist, da sonst keine gewünschten Antikörper gebildet werden. So ein Spacer ist beispielsweise der Maleinimid-Spacer, bei diesem Spacer ist die Immunreaktion des Spacers so stark, dass keine Rückschlüsse auf die Immunreaktion auf das Hapten gezogen werden kann.^[397]

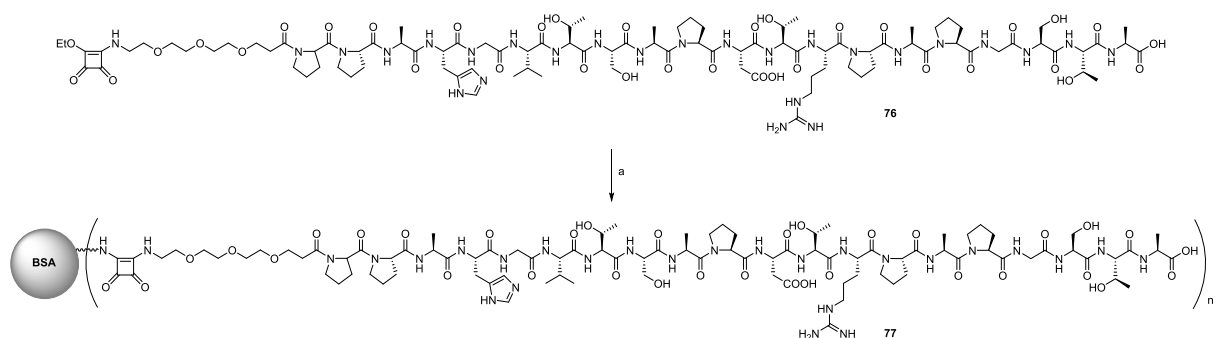
Die Kupplung des Quadratsäurediethylester mit dem Amino-Terminus des Spacers erfolgt in einer Lösung aus Ethanol und Wasser (1:1) bei einem pH-Wert von 8, welcher durch vorsichtige Zugabe von wässriger gesättigter Natriumcarbonat-Lösung eingestellt wird. Die Reaktion lässt sich gut durch analytische HPLC verfolgen, da das Quadratsäureamid eine zusätzliche Bande bei $\lambda \approx 270$ nm aufweist und so neben dem Peptid $\lambda \approx 214$ nm gut zu beobachten ist. Nach beendeter Reaktion wird mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Das Peptid wird im Anschluss mit Hilfe von semipräparativen HPLC gereinigt und in 62% Ausbeuten erhalten.

Über $^1\text{H-NMR}$ ist die selektive Bildung des Amids mit der Aminofunktion des Spacers deutlich zu charakterisieren. So ist die 12-CH_2 -Gruppe des Spacers stark tieffeldverschoben im Vergleich zum freien Spacer.



Schema 3.44: Darstellung des Quadratsäuremonoamids Reaktionsbedingungen: a) Na_2CO_3 , aq, pH = 8, EtOH/ H_2O (1:1), 3 h, RT, 62%.

Um das Quadratsäuremonoamid-peptid an BSA zu konjugieren, wird dieses in einer Phosphatpufferlösung (pH-Wert: 9.5) über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird die Reaktionslösung in einer Ultrafiltrationszelle (Membran: 30 kDa) überführt und mit entionisiertem Wasser so lange gewaschen, bis die Waschlösung einen neutralen pH-Wert aufweist. Dies ist notwendig, um die gelösten Salze sowie die nicht gebundenen Peptide vom Produkt abzutrennen. Die Überstandslösung, in der sich nur noch das Proteinkonjugat befindet wird aus der Ultrafiltrationszelle genommen und lyophilisiert.



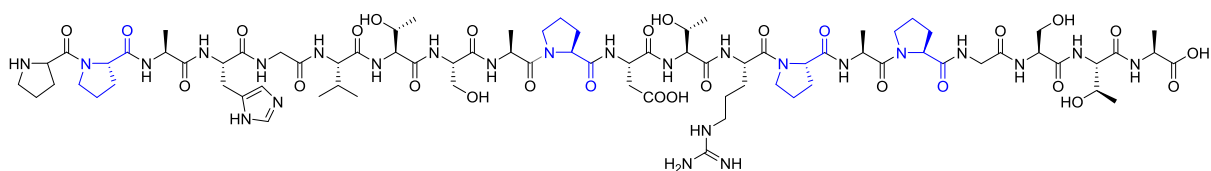
Schema 3.45: Konjugation des Quadratsäuremonoamids an BSA. Reaktionsbedingungen: a) BSA, Na_3HPO_4 (aq), pH = 9.5, 3 d, RT, quant.

Die Beladung der Proteine ist anhand von MALDI-Massenspektrometrie zu bestimmen. Das BSA-Konjugat **77** wurde für ELISA-Experimente synthetisiert. Bei diesen ELISA-Experimenten sollten immunologische Studien mit dem SM3-Antikörper durchgeführt werden. Hierbei sollte gezeigt werden, in welchem Maße sich die Bindung des Antikörpers durch den Einbau von Fluorprolin, Zucker und den Spacer verändert. Diese ELISA-Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Sie lieferten aber keine aussagekräftigen Ergebnisse, sodass an dieser Stelle davon abgesehen wird auf die Ergebnisse einzugehen. Problematisch hierbei war neben der Qualität des Antikörpers auch die bis dato noch nicht etablierte Methode mit den eigenen Peptiden. Für kommende ELISA-Experimente ist eine neue Ausarbeitung eines geeigneten ELISA-Protokolls notwendig.

Alternativ zu den ELISA-Experimenten hat man zusammen mit der Firma DynamicBiosensor versucht Kinetikmessungen an den synthetisierten Peptiden in Verbindung mit dem SM3 Antikörper durchzuführen. Hierzu hat man versucht die Peptide, die einen Spacer enthielten, an einen Chip über ein DNA-Fragment zu binden. In einer Echtzeit-Untersuchung sollte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, welchen Einfluss der Einbau von Fluorprolin bzw. der Einbau eines Zuckerbausteins auf die Bindungsaffinität des SM3-Antikörpers auf die entsprechenden Peptide hat. Diese Ergebnisse sollten anschließend mit den natürlichen Peptiden verglichen werden. Da für derartige Studien bisher keinerlei Versuchsprotokolle vorhanden waren, versuchte man zunächst die Peptide in ausreichenden Mengen am Chip zu binden. Dies konnte für zumindest einige Strukturen erreicht werden. Jedoch zeigten die Bindungsstudien mit dem SM3 Antikörper weder bei der natürlichen Sequenz noch bei den veränderten Strukturen aussagekräftig Ergebnisse. Einen Grund hierfür hat man zunächst in der Qualität des SM3 Antikörpers vermutet. Dies konnte man zumindest teilweise ausschließen, durch den Kauf des SM3 Antikörpers von verschiedenen Herstellern. In weiteren Versuchen konnte man schlussendlich feststellen, dass die gebundenen Peptide auf dem Chip „geknäult“ vorliegen, und somit für den Antikörper nicht bzw. nur noch sehr schwer zugänglich sind. Bedauerlicherweise konnte man bis zum Abschluss der praktischen Arbeiten keine Lösung für dieses Problem finden.

3.3.2 Synthese von Peptiden aus der *Tandem Repeat*-Domäne des epithelialen Mucins MUC1 unter Einsatz von Fluorprolin für die Verwendung in Abbaustudien

Um den Einfluss des Austauschs von Fluorprolin gegen Prolin unabhängig vom Spacer untersuchen zu können, wird bei der Synthese des MUC1-(20)-Peptids auf den Spacer verzichtet. Außerdem sollen mögliche Unterschiede, die auf der Konformation und der räumlichen Anordnung des Fluorsubstituenten beruhen, durch den jeweiligen Einsatz von *cis*- und *trans*- F-Prolin untersucht werden. Diese Peptide sind ferner für die Abbaustudien relevant und bestehen aus der folgenden Sequenz (Abbildung 3.18). Die blau hinterlegten Proline stellen die möglichen Fluorproline dar.



P - P - A - H - G - V - T - S - A - P - D - T - R - P - A - P - G - S - T - A
 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20

Abbildung 3.18: MUC1-(20)-Peptid aus der *Tandem Repeat*-Sequenz. Blau: Mögliche Proline, welche durch Fluorprolin ausgetauscht werden.

Sämtliche Peptide werden analog zu den Peptiden im vorangegangenen Kapitel an fester Phase vollautomatisch in der Mikrowelle Discover beziehungsweise dem Synthesizer Liberty 1 durchgeführt. Dabei erfolgt die Synthese durch zwei wiederholende Syntheseschritte (*Fmoc*-Abspaltung; Kupplung der neuen AS) nach der *Fmoc*-Strategie. Als Startaminosäure wird *Fmoc*-Alanin (Ansatzgröße: 0.1 mmol), gebunden an das säurelabile Wang-Harz verwendet.

Die Synthese beginnt mit der Abspaltung der *Fmoc*-Schutzgruppe der Startaminosäure. Diese Deblockierung wird mit 20%iger Lösung von Piperidin in Dimethylformamid durchgeführt. Dazu erhitzt die MW das Peptid

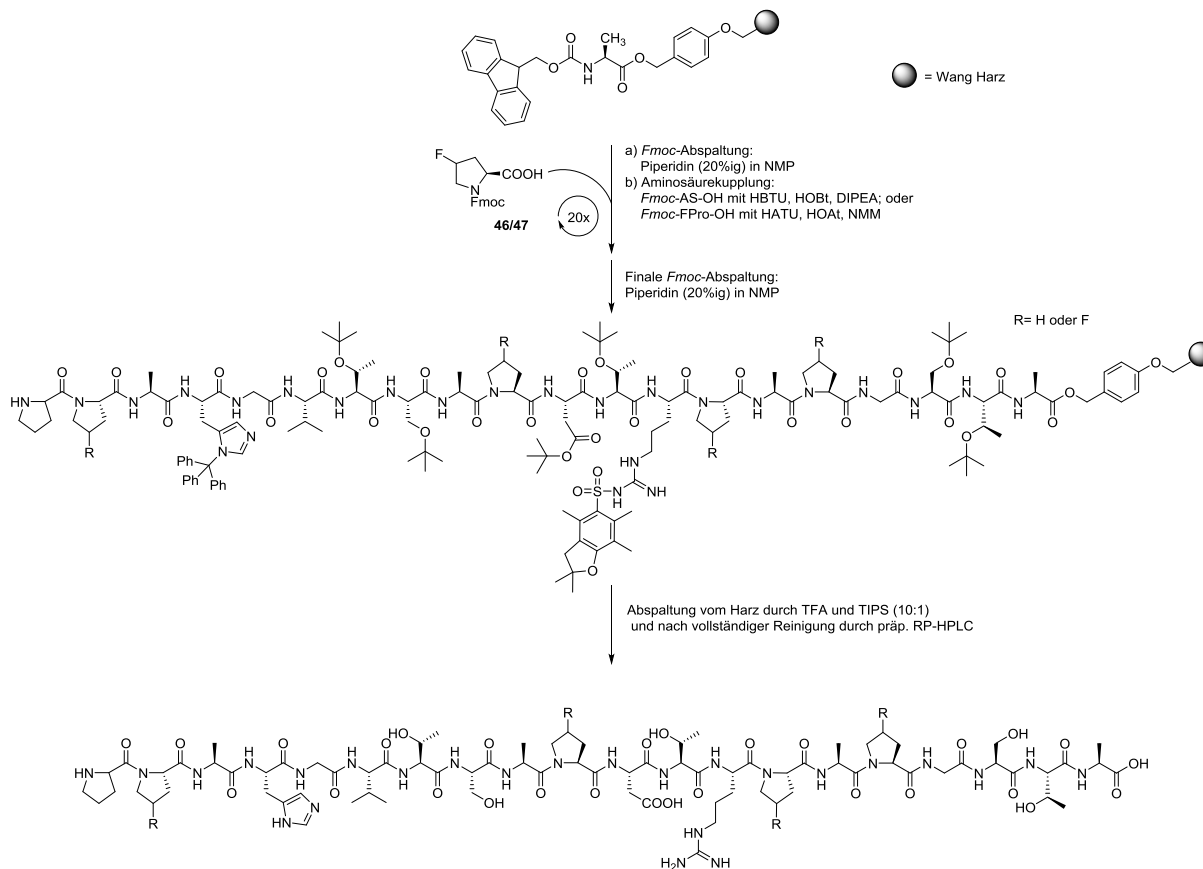
zunächst initial mit maximal 26 W auf 40 °C für 40 s und dann erneut mit maximal 30 W auf 80 °C für 3 min. Die Abspaltung der *Fmoc*-Gruppe wird photometrisch verfolgt. Der zweite sich wiederholende Schritt ist die Kupplung der folgenden Aminosäure mit dem vorher deblockierten Aminoterminus des am Harz gebundenen Peptids. Da für die verschiedenen Aminosäuren unterschiedliche Kupplungsbedingungen gewählt worden sind, sind diese übersichtshalber in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 3.4: Mikrowellen SPPS Parameter

Aminosäure	Anzahl Kupplungen	Leistung (W)	Max. Temp. (°C)	Zeit (s)	AS Konzentration (M)
<i>Kupplung</i>					
Arg	2	0	80	1800	1.00 mmol
		23	80	300	
FPro	1	0	80	2100	0.15 mmol
His	1	0	50	360	1.00 mmol
Restliche AS	1	23	80	300	1.00 mmol
Restliche AS	2	23	80	480	1.00 mmol
nach F-Pro		23	80	480	
	Anzahl Kupplungen	Leistung (W)	Max. Temp. (°C)	Zeit (s)	
<i>Entschützung</i>					
Initiale Entschützung	1	26	40	40	
Entschützung	1	30	80	180	

Bei den allgemeinen Standard-Kupplungsprotokoll der kommerziell erhältlichen Aminosäuren werden die Kupplungsreagenzien HBTU und HOBt sowie DIPEA verwendet und in der Regel auf maximal 80 °C erhitzt. Für die Kupplung der fluorierten Proline werden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt sowie NMM verwendet. Während dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass höhere Ausbeuten und eine höhere Reinheit des Peptids bei der Peptidsynthese erzielt werden kann, wenn nach dem Einbau der unnatürlichen Aminosäure alle folgenden Aminosäuren durch eine Doppelkupplung ans Peptid gebunden werden. Dafür wird der Kupplungsschritt doppelt durchgeführt, wobei zwischen den Kupplungen das Peptid von nicht umgesetzten Aminosäuren gereinigt wird. Zwischen allen Syntheseschritten wird durch das Einleiten von DMF in das Reaktionsgefäß sowohl von oben, als auch von unten, das wachsende Peptid immer wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und durchmischt, wodurch eine Verklumpung der wachsenden Peptidkette vermieden wird. Nachdem die letzte Aminosäure ans Peptid gekuppelt wurde erfolgt der finale Deblockierungsschritt am *N*-terminus der letzten Aminosäure.

Im Anschluss wird das Peptid in einen weiteren *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Der polymere Träger und die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen werden durch zweistündige Behandlung mit Trifluoressigsäure (10 mL) und Triisopropylsilan (TIPS) (1 mL) entfernt, sodass das Rohpeptid erhalten wird.



Schema 3.46: Allgemeines Protokoll der Peptidsynthese.

Die Vorreinigung des Rohpeptids erfolgt durch dreimaliges Ausfällen in eisgekühltem Diethylether, Zentrifugation und anschließender Lyophilisierung. Die vollständige Reinigung erfolgt im Anschluss durch präparative RP-HPLC. Analysiert werden die Peptide sowohl NMR-spektroskopisch, als auch massenspektrometrisch über ESI-Messungen.

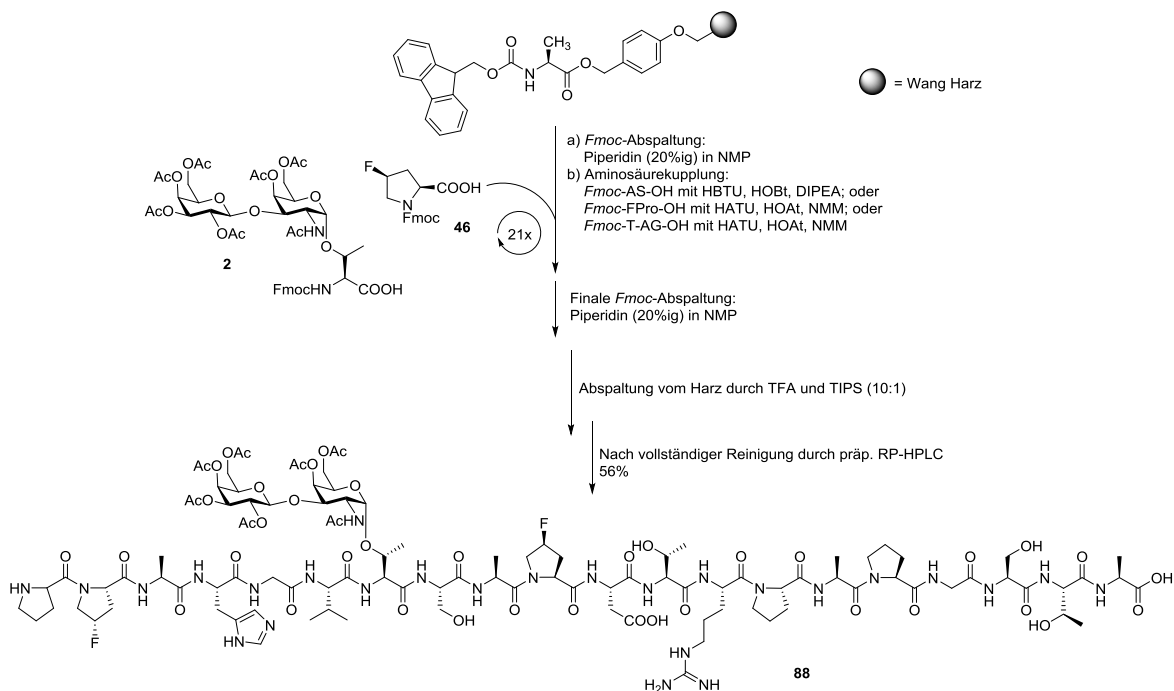
Mit Hilfe dieses Protokolls wurden folgende elf Peptide dargestellt. Diese Peptide wurden im Anschluss in den Abbaustudien verwendet. Als Referenzpeptid wurde stets **78** verwendet, da dieses Peptid die natürliche Sequenz wiedergibt.

Tabelle 3.5: Aminosäuresequenzen und dazugehörige Ausbeuten.

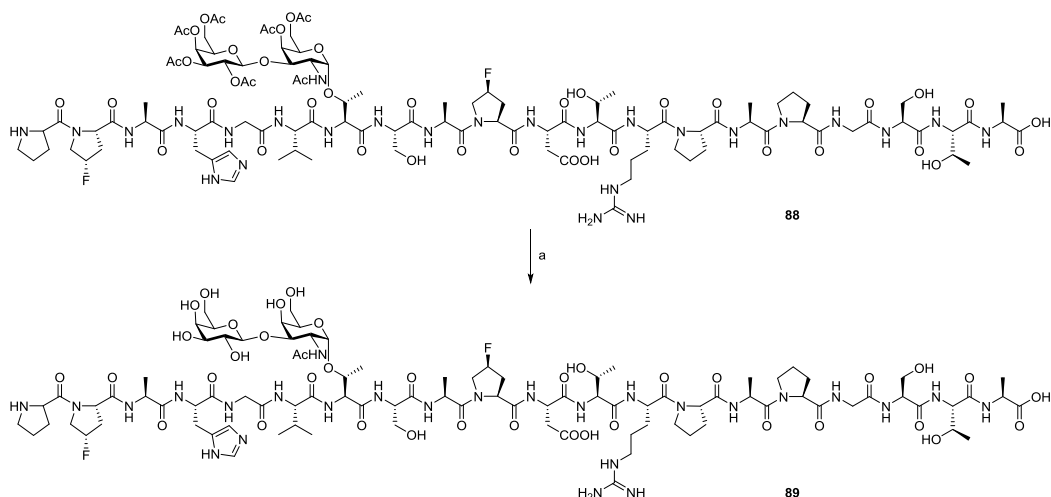
Nummer	Aminosäuresequenz	Ausbeute
78	HN-PPA H G V T S A P D T R P A P G S T A-COOH	66%
79	HN-PPA H G V T S A P D T R <i>cis</i> -FP A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH	59%
80	HN-PPA H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R P A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH	59%
81	HN-P <i>cis</i> -FP A H G V T S A P D T R P A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH	43%
82	HN-PPA H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R <i>cis</i> -FP A P G S T A-COOH	36%
83	HN-P <i>cis</i> -FP A H G V T S A P D T R <i>cis</i> -FP A P G S T A-COOH	64%
84	HN-P <i>cis</i> -FP A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	85%
85	HN-P <i>trans</i> -FP A H G V T S A <i>trans</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	71%
86	HN-PPA H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	35%
87	HN-P <i>cis</i> -FP A H G V T S A P D T R P A P G S T A-COOH	40%

Neben diesen zehn Peptiden wurde auch ein natürliches Glycopeptid ohne Spacer dargestellt. Dieses Peptid wurde nach erfolgreicher Durchführung der Abbaustudien synthetisiert. Ohne den Inhalt des unter 3.4 beschriebenen Kapitels vorwegzunehmen, war dieses Peptid von besonderem Interesse für anschließende Abbaustudien.

Das Peptid wurde nach den in Tabelle 3.1 beschriebenen Parametern und den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Bedingungen analog synthetisiert, wobei das T-Antigen **2** ohne zusätzliche Leistung bei einer maximalen Temperatur von 80 °C in einer Konzentration von 0.15 mmol für 35 min gekuppelt wurde. Nach dem Einbau des ersten *cis*-F-Prolins **46** wurden alle anschließenden natürlichen Aminosäuren doppelt gekuppelt.

**Schema 3.47:** Synthese des Glycopeptids **88** in 56%iger Ausbeute.

Das synthetisierte Glycopeptide **88** wurde nach der vollständigen Reinigung von den Acetylschutzgruppen befreit. Die Entschützung wird mit einer frisch hergestellten wässrigen NaOH Lösung (pH=11) durchgeführt, wobei darauf geachtet werden muss, dass es nicht zu einer unerwünschten β -Eliminierung kommt und somit zum Verlust des Zuckers. Die Entschützung wird durch regelmäßiges Einstellen des pH-Werts von maximal 10 über mehrere Tage durchgeführt. Die Reaktion kann über analytische HPLC überwacht werden. Nach beendeter Reaktion wird abschließend mit 1 M Essigsäure neutralisiert.



Schema 3.48: Entschützung des Glycopeptids **88** mit wässriger NaOH zum Erhalt des Glycopeptids **89**. Reaktionsbedingungen: (a) wässrige NaOH (pH = 11), RT, 7 d, 47%.

3.3.3 Synthese von Glycopeptiden aus der *Tandem Repeat*-Domäne des epithelialen Mucins MUC1, unter Verwendung des α -AA- T_N -Mimetikum-Bausteins

In einem weiteren Projekt dieser Arbeit, sollte der strukturelle Unterschied ausgehend von einem eingebauten T_N -Baustein gegenüber einem eingebauten α -AA- T_N -Mimetikum-Baustein untersucht werden. Dieser sollte sowohl an Peptiden mit, als auch solchen ohne Spacer untersucht werden.

Wie aus der folgenden Abbildung 3.19 ersichtlich ist, wurden sowohl zwei Peptide mit dem T_N -Baustein (blau hinterlegt) an Position 7 synthetisiert. Diese beiden Peptide geben die natürliche Struktur wieder. Daneben wurden zwei Peptide synthetisiert, welche an Position 7 und 8 den α -AA- T_N -Mimetikum-Baustein (blau hinterlegt) aufweisen. Bei den letztgenannten Peptiden wurde das Serin als auch das Threonin der natürlichen Sequenz an Position 7 und 8 gegen den Mimetikum Baustein ersetzt.

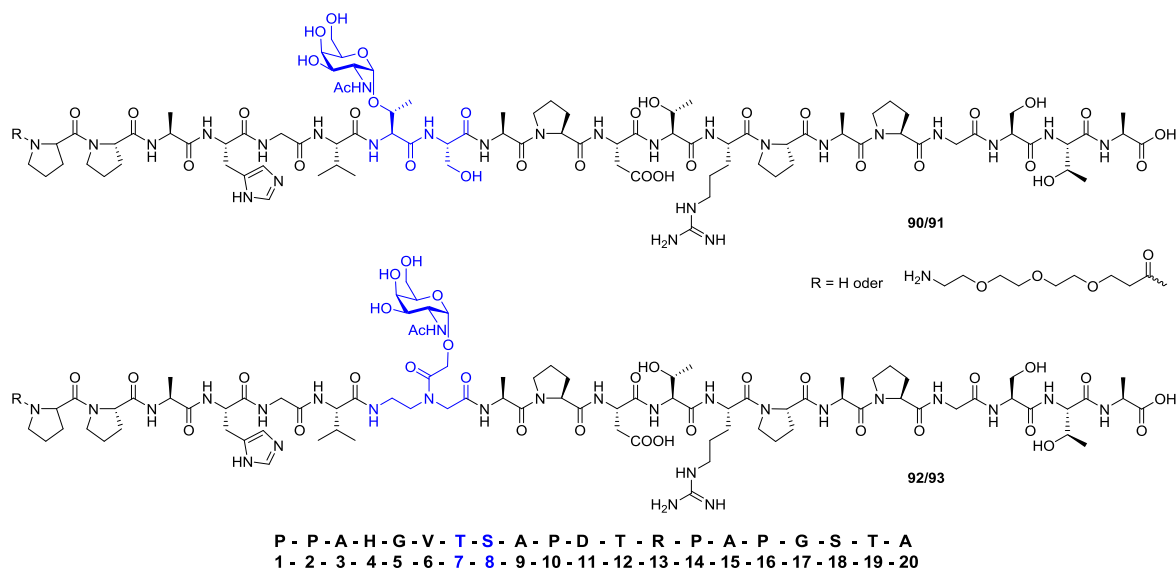


Abbildung 3.19: MUC1-(20)-Peptid aus der *Tandem Repeat*-Sequenz.

Für die Synthese wurde wieder auf das bereits beschriebene Standard-Verfahren zurückgegriffen, sodass sämtliche Peptide analog zu den Peptiden in den vorangegangenen Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 an fester Phase vollautomatisch in der Mikrowelle Discover beziehungsweise dem Synthesizer *Liberty 1* durchgeführt wurden. Dabei erfolgt die Synthese durch zwei wiederholende Syntheseschritte (*Fmoc*-Abspaltung; Kupplung der neuen AS) nach der *Fmoc*-Strategie. Als Startaminosäure wird *Fmoc*-Alanin (Ansatzgröße: 0.1 mmol), gebunden an das säurelabile Wang-Harz verwendet.

Die Synthese beginnt mit der Abspaltung der *Fmoc*-Schutzgruppe der Startaminosäure. Diese Deblockierung wird mit 20%iger Lösung von Piperidin in Dimethylformamid durchgeführt. Dazu erhitzt die MW das Peptid zunächst initial mit maximal 26 W auf 40 °C für 40 s und dann erneut mit maximal 30 W auf 80 °C für 3 min. Die Abspaltung der *Fmoc*-Gruppe wird photometrisch verfolgt. Der zweite sich wiederholende Schritt ist die Kupplung der folgenden Aminosäure mit dem vorher deblockierten Aminoterminus des am Harz gebundenen Peptids. Da für die verschiedenen Aminosäuren unterschiedliche Kupplungsbedingungen gewählt worden sind, sind diese übersichtshalber in der folgenden Tabelle angegeben.

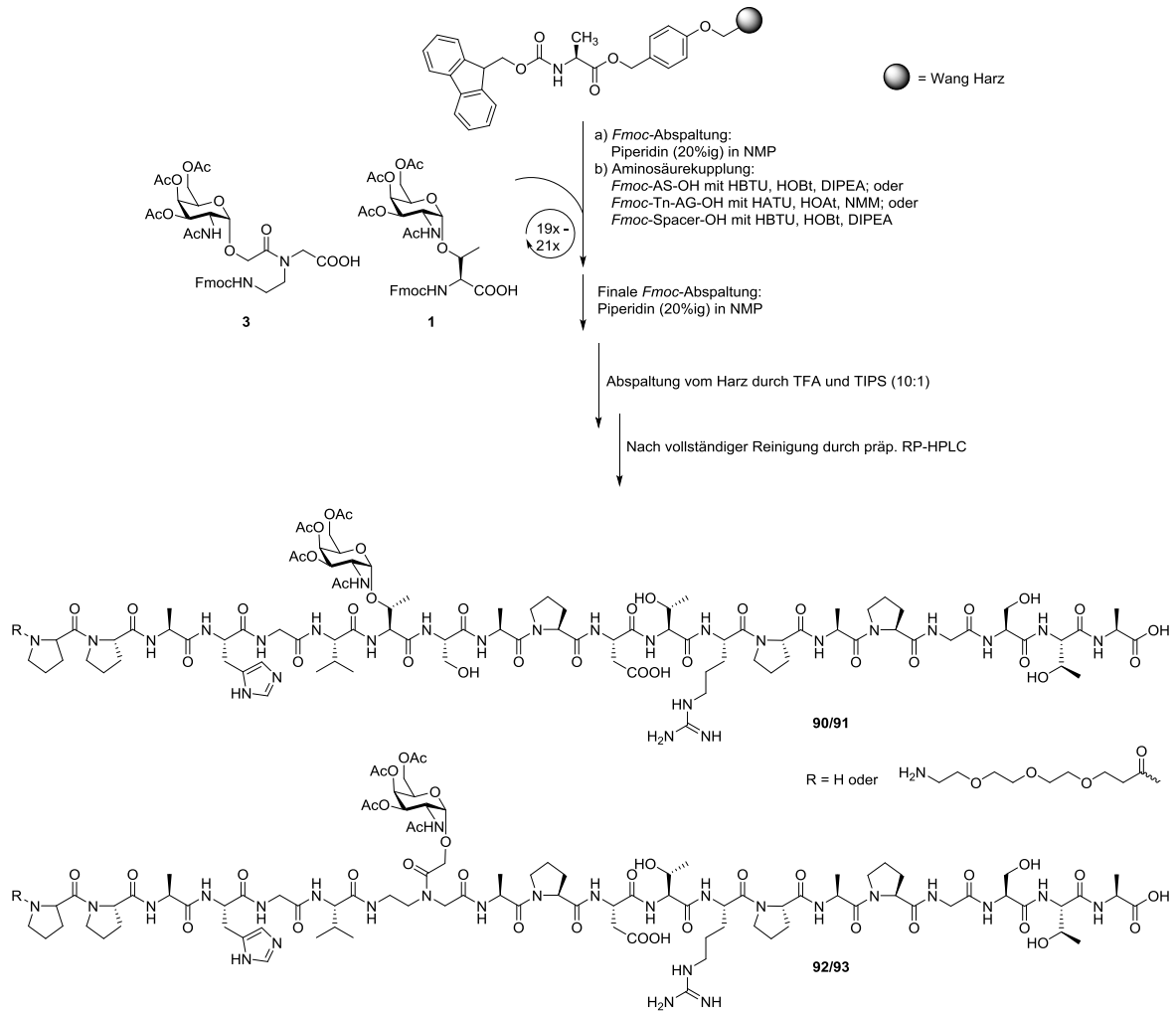
Tabelle 3.6: Mikrowellen SPPS Parameter

Aminosäure	Anzahl Kupplungen	Leistung (W)	Max. Temp. (°C)	Zeit (s)	AS Konzentration (M)
Kupplung					
Arg	2	0	80	1800	1.00 mmol
		23	80	300	
His	1	0	50	360	1.00 mmol
Restliche AS	1	23	80	300	1.00 mmol
Restliche AS nach	2	23	80	480	1.00 mmol
T _N -(Mim)AG		23	80	480	
T _N -(Mim)AG	1	0	80	2100	0.15 mmol
Spacer	1	23	80	300	0.40 mmol
	Anzahl Kupplungen	Leistung (W)	Max. Temp. (°C)	Zeit	(s)
Entschützung					
Initiale Entschützung	1	26	40	40	
Entschützung	1	30	80	180	

Bei den allgemeinen Standard-Kupplungsprotokoll der kommerziell erhältlichen Aminosäuren werden die Kupplungsreagenzien HBTU und HOBt sowie DIPEA verwendet und in der Regel auf maximal auf 80 °C erhitzt. Für die Kupplung der Zuckerbausteine werden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt sowie NMM verwendet.

Auch bei dieser Synthese zeigten sich höhere Ausbeuten und eine höhere Reinheit der Peptide, sofern die Aminosäuren, die sich an den Zuckerbausteinen anschließen, doppelt gekuppelt werden. Dafür wird der Kupplungsschritt doppelt durchgeführt, wobei zwischen den Kupplungen das Peptid von nicht umgesetzten Aminosäuren gereinigt wird. Zwischen allen Syntheseschritten wird durch das Einleiten von DMF in das Reaktionsgefäß sowohl von oben, als auch von unten, das wachsende Peptid immer wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und durchmischt, wodurch eine Verklumpung der wachsenden Peptidkette vermieden wird. Nachdem die letzte Aminosäure ans Peptid gekuppelt wurde erfolgt der finale Deblockierungsschritt am *N*-terminus der letzten Aminosäure.

Im Anschluss wird das Peptid in einen weiteren *Merrifield*-Festphasenreaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Der polymere Träger und die säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen werden durch zweistündige Behandlung mit Trifluoressigsäure (10 mL) und Triisopropylsilan (TIPS) (1 mL) entfernt, sodass das Rohpeptid erhalten wird.



Schema 3.49: Allgemeines Protokoll der Peptidsynthese.

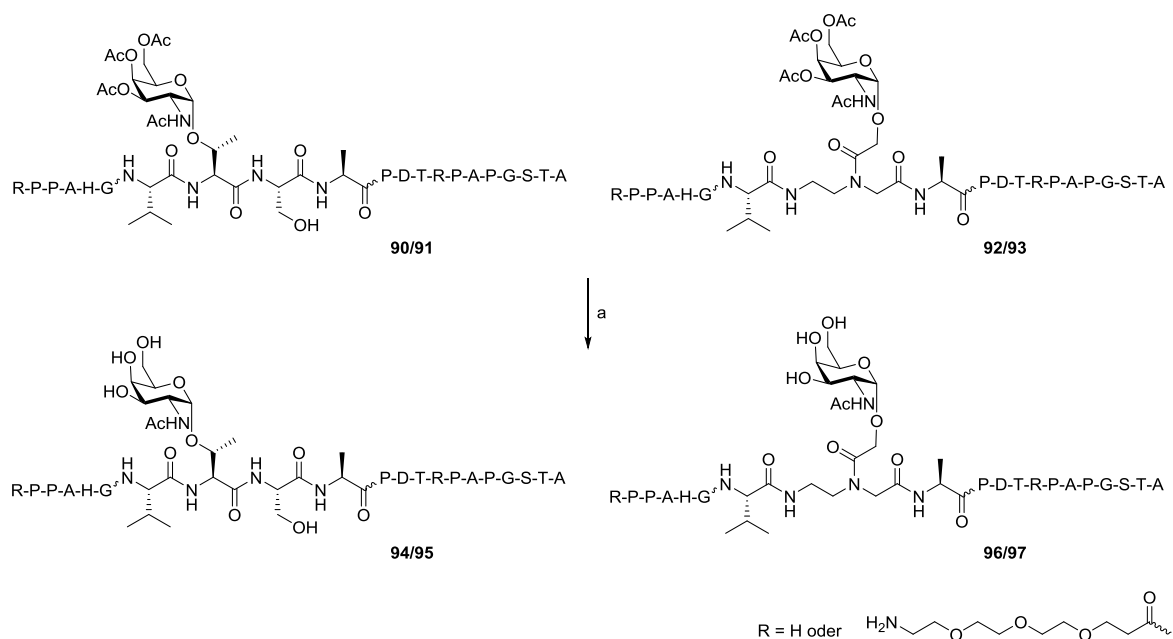
Die Vorreinigung des Rohpeptids erfolgt durch dreimaliges Ausfällen in eisgekühltem Diethylether, Zentrifugation und anschließender Lyophilisierung. Die vollständige Reinigung erfolgt im Anschluss durch präparative RP-HPLC. Analysiert werden die Peptide sowohl NMR-spektroskopisch, als auch massenspektrometrisch über ESI-Messungen.

Mit Hilfe dieses Protokolls wurden folgende vier Peptide (**90** bis **93**) dargestellt. Die Peptide **90** und **91** dienen als Referenzpeptide, da diese Peptide die natürliche Sequenz wiedergeben.

Tabelle 3.7: Aminosäuresequenzen und dazugehörige Ausbeuten.

Nummer	Aminosäuresequenz	Ausbeute
90	HN-PPAHGV T_N -AG(OAc) SAPDTRPAPGSTA-COOH	39%
91	HN-TEG-PPAHGV T_N -AG(OAc) SAPDTRPAPGSTA-COOH	54%
92	HN-PPAHGV T_N -Mim-AG(OAc) APDTRPAPGSTA-COOH	52%
93	HN-TEG-PPAHGV T_N -Mim-AG(OAc) APDTRPAPGSTA-COOH	33%

Die synthetisierten Glycopeptide wurden in einem nächsten Schritt von den Acetylenschutzgruppen befreit werden. Die Entschützung folgte analog wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit einer frisch hergestellten wässrigen NaOH Lösung (pH= 11), wobei darauf geachtet werden muss, dass es nicht zu einer unerwünschten β -Eliminierung kommt und somit zum Verlust des Zuckers. Die Entschützung wird durch regelmäßiges Einstellen des pH-Werts von maximal 10 über mehrere Tage durchgeführt. Nach beendeter Reaktion wird abschließend mit 1 M Essigsäure neutralisiert.



Schema 3.50: Acetylenschutzgruppen Entfernung durch die Behandlung mit wässriger NaOH. Reaktionsbedingungen: a) NaOH (aq), pH = 11, 3 – 4 d, RT.

Die vollständige Reinigung der Glycopeptide erfolgt durch präparative RP-HPLC und anschließender Lyophilisierung. Analysiert werden die Peptide sowohl NMR-spektroskopisch, als auch massenspektrometrisch über ESI-Messungen.

In der folgenden Tabelle 3.8 sind die Ausbeuten der Entschützung angegeben. Die Peptide **95** und **97** können in zukünftigen Projekten innerhalb einer immunologischen Evaluierung verwendet werden.

Tabelle 3.8: Aminosäuresequenzen und dazugehörige Ausbeuten.

Nummer	Aminosäuresequenz	Ausbeute
94	HN-P P A H G V T_N -AG(OH) S A P D T R P A P G S T A-COOH	53%
95	HN-TEG-P P A H G V T_N -AG(OH) S A P D T R P A P G S T A-COOH	76%
96	HN-P P A H G V T_N -Mim-AG(OH) A P D T R P A P G S T A-COOH	54%
97	HN-TEG-P P A H G V T_N -Mim-AG(OH) A P D T R P A P G S T A-COOH	50%

3.3.3.1 Strukturaufklärung: Vergleich zwischen T_N Mim- und T_N -Peptid (mit und ohne Spacer)

Wie bereits erläutert wurden die Peptide **94**, **95**, **96** und **97** aus dem Kapitel 3.3.3 in erster Linie zum Zwecke der Strukturaufklärung synthetisiert. Es sollte dabei herausgefunden werden, wie sich die natürlichen Bausteine von denen der Mimetika-Strukturen im Peptid unterscheiden.

Die Strukturaufklärung wurde anhand von zahlreichen NMR-Experimenten durchgeführt. Dazu wurden von den jeweiligen Peptiden COSY, HSQC, HMBC, NOESY als auch TOCSY-NMR Versuche durchgeführt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Versuche jeweils einzeln dargestellt werden.

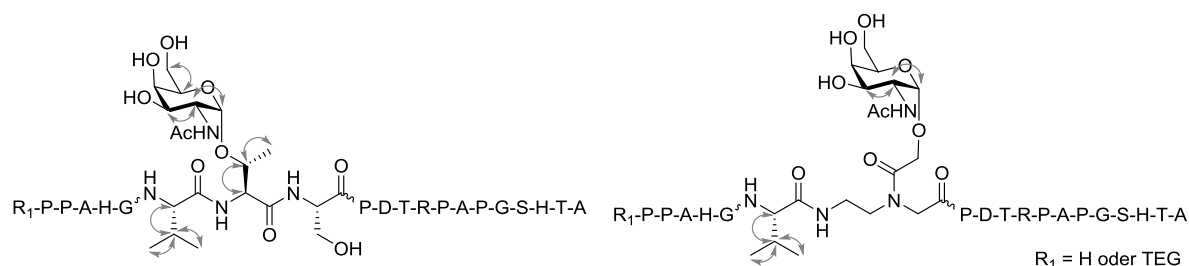


Abbildung 3.20: Ergebnisse der Auswertung von COSY-NMR-Spektren der Peptide **94**, **95**, **96** und **97**.

Anhand der COSY-NMR-Messungen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen **94** und **96** sowie zwischen den entsprechenden Peptiden mit Spacer **95** und **97** erkennbar (Abbildung 3.20). Dies ist nicht verwunderlich, da die COSY Messungen lediglich die Kopplungen benachbarter Protonen zeigt, die über drei Bindungen miteinander Verknüpft sind. Die COSY-Messung dienen in erster Linie als Hilfe für die Zuordnung der Protonen der einzelnen Aminosäuren.

Um sämtliche Protonen und Kohlenstoffe eines Peptids zuordnen zu können sind gerade die 2D-NMR-Experimente besonders hilfreich. Anhand der COSY-Messungen ist beispielsweise eine Zuordnung von α -Aminosäuren-Protonen ausgehend von den entsprechenden β -Aminosäuren-Protonen möglich. Die Protonen der α -Aminosäuren liegen alle im Bereich von ca. 4.00 bis ca. 4.80 ppm, während sich die β -Protonen über einen größeren Bereich erstrecken. Beispielsweise liegen die Serin β -Protonen im Bereich von ca. 3.65 ppm, während dagegen die β -Protonen der Alanine im Bereich von ca. 1.20 ppm liegen. Anhand der COSY-NMR-Messungen und den entsprechenden Kreuzpeaks können die entsprechenden Protonen somit zugeordnet werden. Anhand der COSY-Messungen sind ferner auch entsprechende NH-Protonen des Peptidrückgrats ausgehend von den α -Protonen zuordenbar.

Aus der Abbildung 3.20, in der die Ergebnisse der COSY-Messungen anhand von Pfeilen dargestellt sind, geht hervor, dass innerhalb des Zuckerbausteins zumindest **H1** zu **H2** und **H2** zu **H3** koppeln. Während im natürlichen T_N -Baustein auch eine Kupplung zwischen **H5** und **H6** erkennbar ist, ist diese im Mimetikumbaustein nicht zu erkennen. Diese Phänomen wurde sowohl in den Spektren mit als auch denen ohne Spacer beobachtet.

Die COSY-Kopplungen innerhalb der Aminosäure Valin sind gänzlich dieselben. So koppeln V^β -Protonen sowohl zu den benachbarten V^α -Protonen als auch zu den chemisch nicht äquivalenten V^γ -Protonen. Auffällig bei dem Vergleich der beiden COSY Spektren ist, dass die CH_2 -Gruppen des Mimetikums im

COSY nicht miteinander koppeln, während die T^β-Protonen sowohl zu den benachbarten T^α-Protonen als auch zu den T^γ-Protonen im natürlichen Baustein koppeln. Dies könnte an der schlechten Qualität der Messungen liegen. Anhand der COSY-Messungen sind demnach keine großen Veränderungen zwischen den einzelnen Peptiden erkennbar.

Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen ist in der folgenden Tabelle 3.9 aufgelistet. Hierbei wurden nur die chemischen Verschiebungen der Aminosäure Valin (Tabelle 3.10) und des Zuckerbausteins (Tabelle 3.9) der Peptide **94**, **95**, **96** und **97** betrachtet, da diese am besten vergleichbar sind.

Tabelle 3.9: Chemische Verschiebungen der Zuckerbausteine T_N- und T_N-Mim in ppm.

	1		2		3		4		5		6	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
94	4.73	93.3	3.97	49.2	3.61	68.5	3.69	67.9	3.65	71.3	3.50/ 3.44	60.4
95	4.73	98.5	3.96	49.4	3.64	68.2	3.72	68.0	3.68	71.4	3.51/ 3.43	60.4
96	4.76	97.6	4.03	49.8	3.63	71.6	3.75	67.8	3.54	71.8	3.52/ 3.44	60.3
Δ	+0.03	+0.3	+0.06	+0.6	+0.02	+3.1	+0.06	+0.1	-0.11	+0.5	+0.02/±0	-0.1
97	4.76	97.6	4.04	49.8	3.65	67.4	3.75	67.7	3.62	71.6	3.53/ 3.45	60.3
Δ	+0.03	+0.3	+0.08	+0.4	+0.1	-0.8	+0.03	-0.3	-0.06	+0.2	+0.02/+0.02	-0.1

Bei dem Vergleich der chemischen Verschiebungen zeigen sich im Bereich des Zuckerbausteins keine großen Veränderungen. Eine Verschiebung von wenigen ppm kann auch in der Aufnahme des NMR-Spektrums begründet liegen. Lediglich bei dem Kohlenstoffatom C3 kommt es innerhalb des Peptids **96** im Vergleich mit dem Peptid **94** zu einer Tieffeldverschiebung von +3.1 ppm, während es bei den entsprechenden Peptiden mit Spacer (**97** und **95**) zu einer klaren Hochfeldverschiebung von -0.8 ppm kommt. Dies lässt den Schluss zu, dass sich der Zuckerbaustein des Mimetikums in einer unterschiedlichen räumlichen Umgebung befindet als der entsprechende natürliche Zuckerbaustein.

Eine Tieffeldverschiebung kommt zustande, wenn es zu einer Entschirmung des äußeren Feldes kommt. Dies ist vor allem der Fall wenn Atome oder Atomgruppen die Elektronendichte verringern, beispielsweise durch Heteroatome. Der genau umgekehrte Fall löst eine Hochfeldverschiebung aus. Es ist daher anzunehmen, dass sich der Zucker-Baustein im Peptid **96** in gestreckter Form einen möglichst weiten Abstand zum Peptidrückgrat hat, während im Peptid **97** der Zuckerbaustein zum Peptidrückgrat hin gefaltet ist. Denkbar ist auch, dass der Zuckerbaustein im Peptid **97** zwar in gestreckter Form vorliegt, dieser aber in räumlicher Umgebung zum restlichen Peptid vorliegt. Mit anderen Worten, das Peptid „knäult“ sich um den Zucker. Um sichere Schlüsse über die räumliche Anordnung des Zuckers ziehen zu können ist ein Vergleich weiterer 2D-NMR Experimente notwendig, als auch entsprechende Kristallstrukturen.

Einen Einfluss vom Spacer auf die entsprechenden Peptide ist nicht erkennbar. Die chemischen Verschiebungen der Peptide **94** und **95** bzw. **96** und **97** unterscheiden sich nur minimal mit der Ausnahme des H3 bzw. C3-Atoms, sodass man davon ausgehen kann, dass der Spacer die räumliche Umgebung des Zuckerbausteins nicht verändert.

Ein Vergleich der chemischen Verschiebung der Aminosäure Valin ist in der folgenden Tabelle 3.10 zusammengefasst. Zum Vergleich eignet sich diese Aminosäure besonders, da die Kohlenstoff und Wasserstoffatome besonders eindeutig durch die 2D-NMR Messungen zugeordnet werden können. Ferner bietet diese Aminosäure den Vorteil, dass sie nur einmal im Peptid vorhanden ist, sodass eine falsche Zuordnung nahezu ausgeschlossen ist. Falsche Zuordnungen können unter Umständen auftreten, wenn eine Aminosäure mehrfach im Peptid vorhanden ist. Die chemischen Verschiebungen der gleichen Aminosäuren verändern sich aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebung nur minimal, sodass die einzelnen Wasserstoffatome häufig die gleiche Verschiebung aufweisen und somit in den NMR-Spektren übereinander liegen. Bei einer Anzahl von ca. 100 Kohlenstoffatomen und ca. 150 Wasserstoffatomen kann es daher zu fehlerhaften Zuordnungen kommen.

Die Aminosäure Valin bietet außerdem den Vorteil, dass diese an Position 8 des Peptids liegt. Sie stellt somit als benachbarte Aminosäure zum T_N-Baustein bzw. T_N-Mim-Bausteins eine geeignete Aminosäure da, die Aufschlüsse über die räumliche Veränderung des Einbaus der unnatürlichen Struktur gegenüber der natürlichen Struktur gegeben kann.

Tabelle 3.10: Chemische Verschiebungen der Aminosäure Valin in ppm.

	V ^α		V ^β		V ^{γa}		V ^{γb}	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
94	4.45	57.1	1.98	30.7	0.90	19.0	0.84	17.9
95	4.34	57.7	2.02	29.9	0.89	19.1	0.84	18.2
96	4.34	58.9	1.97	29.8	0.81	19.1	0.80	18.0
Δ	-0.11	+1.8	-0.01	-0.9	-0.09	+0.1	-0.04	+0.1
97	4.06	58.3	1.98	29.7	0.81	19.1	0.80	17.9
Δ	-0.28	+0.6	-0.04	-0.02	-0.08	±0	-0.04	-0.3

Ein Vergleich der Aminosäure Valin zeigt auch keine großen räumlichen Veränderungen zwischen den natürlichen und den Mimetika-Peptiden. Die chemische Verschiebung ist annähernd gleich. Die einzige Veränderung die zu beobachten ist, ist dass die V^γ-Protonen *a* und *b* in den Mimetika-Peptiden eine nahezu gleiche chemische Verschiebung zeigen. Dies weist daraufhin, dass sie auch eine annähernd gleiche chemische Umgebung aufweisen. In den natürlichen Peptiden **94** und **96** unterscheiden sich die V^γ-Protonen *a* und *b* in 0.06 bzw. 0.05 ppm. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass der Mimetikabaustein wahrscheinlich in gestreckter Form vorliegt, also weiter weg vom Peptidrückgrat als der natürliche T_N-Baustein. Diese Vermutung ist jedoch eher vage, da die ¹³C-Signale der entsprechenden V^γ-Kohlenstoffe nahezu identisch sind.

In der folgenden Abbildung 3.21 sind die Ergebnisse der HMBC-Messungen dargestellt. Innerhalb der HMBC-Spektren sind Korrelationen über mehrere Bindungen sichtbar. Diese zeigen anders als die COSY-Spektren eine Korrelation zwischen ¹H-Atomen und ¹³C-Atomen auf und nicht nur zwischen benachbarter ¹H-Protonen.

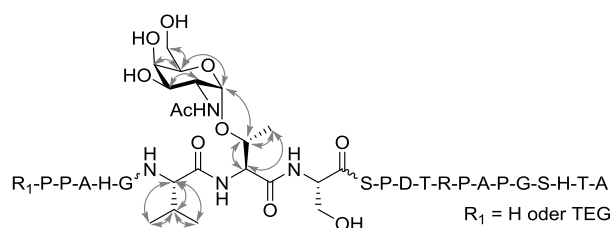


Abbildung 3.21: Ergebnisse der Auswertung von HMBC-NMR-Spektren der Peptide **94** und **95**.

Wie aus der Abbildung 3.21 erkennbar ist, sind neben den erwarteten Kopplungen innerhalb des Zuckerbausteins bzw. der Aminosäuren auch Kopplungen darüber hinaus erkennbar. Gut erkennbar ist beispielsweise die Kopplung zwischen dem β_{T_N} -Proton bzw. Kohlenstoff und dem $H1$ bzw. $C1$ des Zuckerbausteins. Diese Kopplung ist sichtbar, auch über die Etherbindung hinweg. Eine Kopplung über die Amidbindungen innerhalb der HMBC-Spektren ist nicht erkennbar.

Die HMBC-Spektren der Peptide mit den entsprechenden Mimetika Bausteine sind wenig aussagekräftig. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit keine geeigneten Bedingungen gefunden werden um entsprechend qualitativ hochwertige HMBC-Spektren dieser Peptide messen zu können.

In der folgenden Abbildung 3.22 sind Ergebnisse der Auswertung der NOESY-Experimente dargestellt. Übersichtshalber werden nur solche Kopplungen aufgezeigt die von struktureller Bedeutung sind; also solche die über den Raum hinweg gebildet werden.

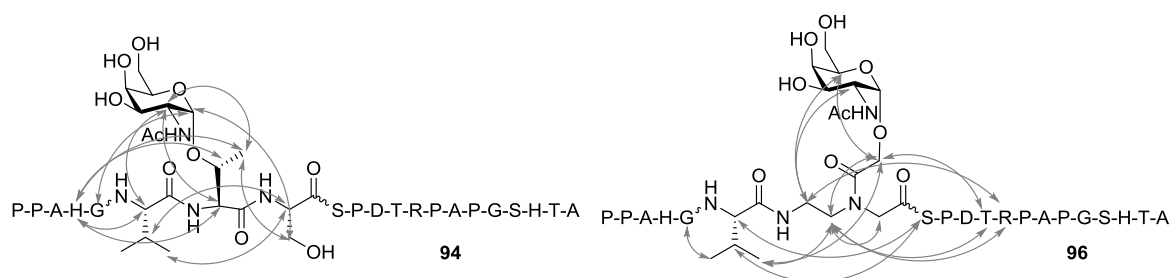


Abbildung 3.22: Ergebnisse der Auswertung von NOESY-NMR-Spektren der Peptide **94** und **96**.

Im Vergleich zwischen der natürlichen Struktur und der des Mimetikums zeigt sich auffällig, dass die Protonen der Aminosäure Valin als auch das Rückgrat des Mimetikum mit weit entfernten Aminosäuren koppeln. Beispielsweise koppeln die CH_2 -Gruppen des Mimetikumbausteins mit den weit entfernten Aminosäuren Threonin und Argenin. Dies lässt den Schluss zu, dass durch den Einbau des Mimetikums das Peptidrückgrat gebogen wird. Ferner deuten die NMR-Ergebnisse daraufhin, dass der Mimetikum-Baustein in einer Art Schlaufe vorliegt. Die natürliche Struktur liegt im Gegensatz dazu in gestreckter Form vor. Dieses Ergebnis war derart nicht zu erwarten gewesen, da davon ausgegangen wurde, dass sich die Strukturänderung nur minimal aufs Peptidrückgrat auswirkt. In der folgenden Abbildung 3.23 ist die Struktur dargestellt, die anhand der NMR-Ergebnisse angenommen wird.

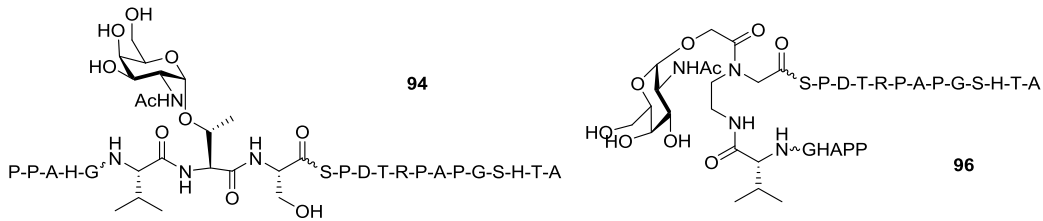


Abbildung 3.23: Loop-Bildung durch den Einbau des Mimetikumbausteins.

Bei dem Vergleich zwischen den entsprechenden Peptiden mit Spacer ist ein ähnliches Ergebnis ersichtlich. Zwar lässt sich auch in der natürlichen Struktur eine leichte Biegung erkennen, diese ist aber nicht so deutlich erkennbar wie in dem entsprechenden Mimetikum Peptid. In den NMR-Ergebnissen zeigt sich wieder, dass die Aminosäuren Threonin und Arginin in räumlicher Nähe zum Mimetikumrückgrat stehen. Dies lässt die Vermutung zu, dass es in dem oben dargestellten Bereich zu einer Loop-Bildung kommt.

Beim Vergleich der Zuckerbausteine mit und ohne Spacer lässt sich außerdem erkennen, dass der Zuckerbaustein im Spacer-Peptid zum Peptidrückgrat hingewandt ist. Wie in Abbildung 3.24 ersichtlich ist scheint sich der Zuckerbaustein in Richtung Valin gebeugt zu haben. Dagegen liegt der Zuckerbaustein im Peptid ohne Spacer in gestreckter Form vor. Dieser Schluss kann aus den diversen NOESY-Kopplungen zwischen den H- und C-Atomen des Zuckers und des Valins gezogen werden (Abbildungen 3.22 bis 3.24). Somit hat der Spacer einen Einfluss auf die Faltung des Zuckers, wobei dieser Einfluss der gleiche zwischen Mimetikum und natürlichem Baustein ist.

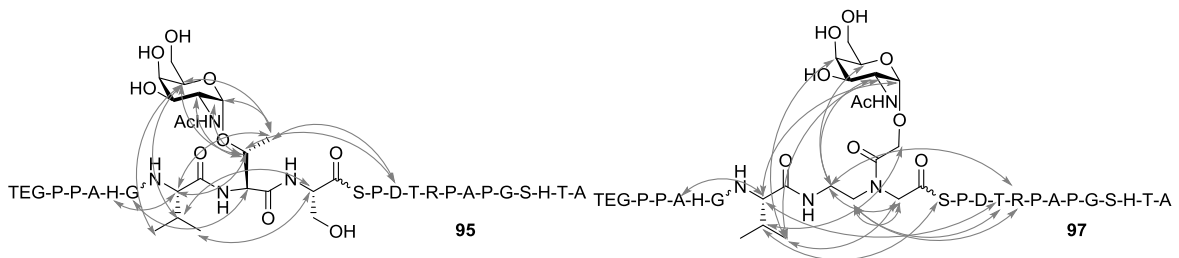


Abbildung 3.24: Ergebnisse der Auswertung von NOESY-NMR-Spektren der Peptide **95** und **97**.

3.4 Stabilitätstest mittels Abbaustudien

Um möglichst stabile aber dennoch immunogene tumorassoziierte Peptidantigene aus der extrazellulären, repetitiven Sequenz des epithelialen Mucin MUC1 zu erhalten, wurden die synthetisierten Peptide zunächst durch Abbaustudien auf ihre metabolische Stabilität hin untersucht. Dabei sollte vor allem untersucht werden, welchen Einfluss das Fluorprolin an den verschiedenen Positionen sowie der Spacer auf die Stabilität hat. Für den Abbau wurde Proteinase K verwendet, da diese Proteinase genügend Schnittstellen aufweist, die einen Abbau gewährleisten.

3.4.1 Aufnahme von Kalibrationskurven

Grundlage des Stabilitätsassys ist die Tatsache, dass der zeitliche Abbau der Peptide durch Proteinase K mittels analytischer Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) verfolgt werden kann. Dazu mussten zunächst eine Kalibrationsmessungen verschiedener Konzentrationen durchgeführt werden. Diese dienen dem Zweck zu untersuchen, ob ein linearer Zusammenhang zwischen dem Integral des Peaks der HPLC Messung und der Menge des Peptids gibt.

Hierzu wurden von ausgewählten Peptiden (**78** bis **85**) eine Verdünnungsreihe der Peptidkonzentrationen ausgehend von 0 mg/mL bis 10 mg/mL hergestellt und im Anschluss via. HPLC vermessen. Als Puffer wurde ein 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH-Wert: 7.8) mit 5 mM CaCl₂ sowie mit 25%ige Essigsäure gewählt. Die Pufferbedingungen entsprechen den gleichen Bedingungen, die auch für die Abbaustudien verwendet wurden.

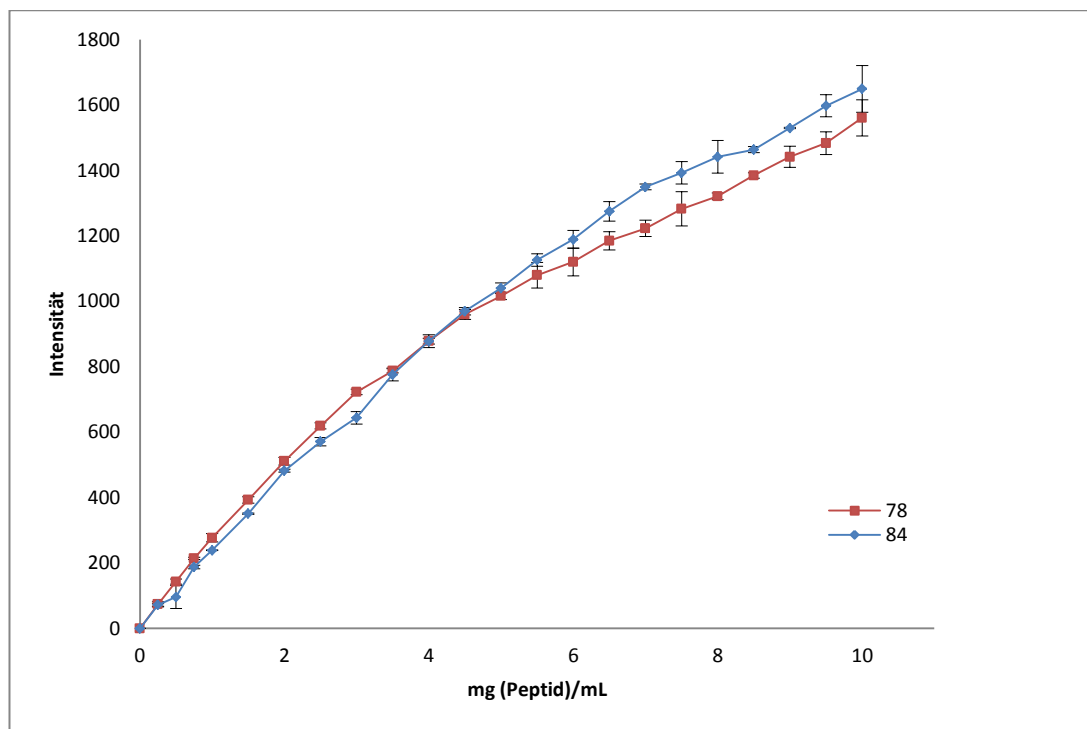


Abbildung 3.25: Exponentieller Zusammenhang zwischen den Konzentrationen (0 bis 10 mg/mL) der Peptide **78** und **84** und der Summe des jeweiligen Integrals.

In der Abbildung 3.25 sind der Übersicht halber nur zwei Peptide **78** und **84** beispielhaft angegeben. Die Übrigen Peptide **79** bis **83** zeigen vergleichbare Grafen (nicht gezeigt). Wie aus der Abbildung 3.25 zu

entnehmen ist, zeigt die Konzentration des Peptides **78** bzw. **84** und das berechnete Integral der HPLC-Läufe der Peptide einen exponentiellen Zusammenhang, wobei sich mit höheren Konzentration (<5.5 mg/mL) eine Sättigung einstellt. Bei sehr hohen Peptidkonzentrationen wird ein Maximum erreicht, welches nicht mehr vom HPLC-Detektor vermessen werden kann.

Weitere Messungen mit einer deutlich niedrigeren Konzentration (0 bis 5 mg/mL), haben gezeigt, dass bei derartigen Konzentrationen ein linearer Zusammenhang zwischen dem berechneten Integral der Peptide und der Menge an Peptid bestehen. In der folgenden Abbildung 3.26 sind wieder nur zwei der insgesamt acht Messreihen angegeben.

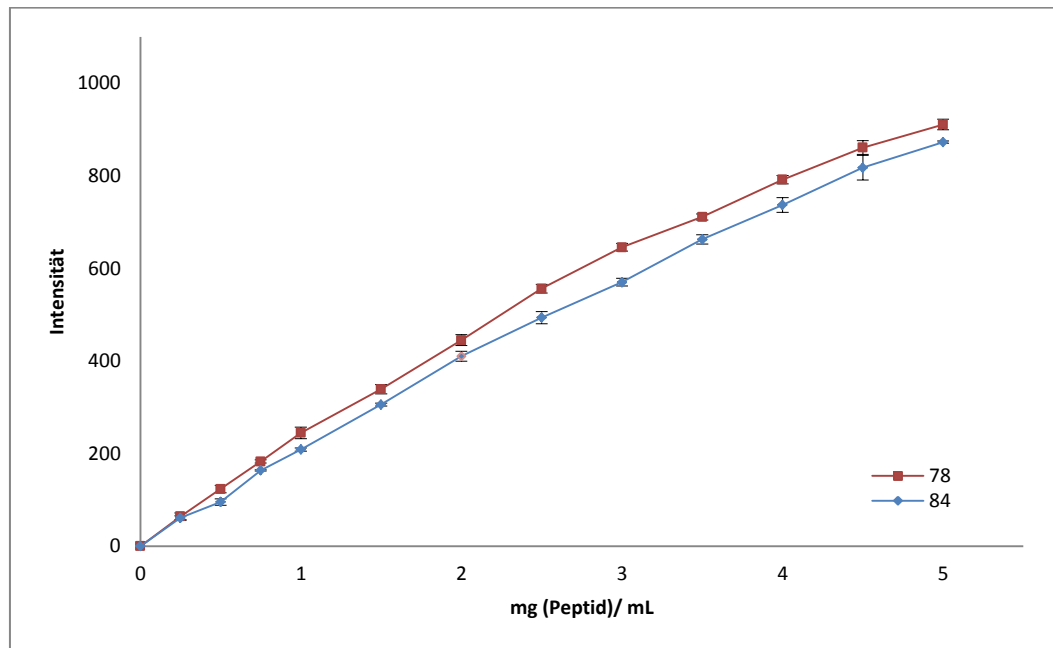
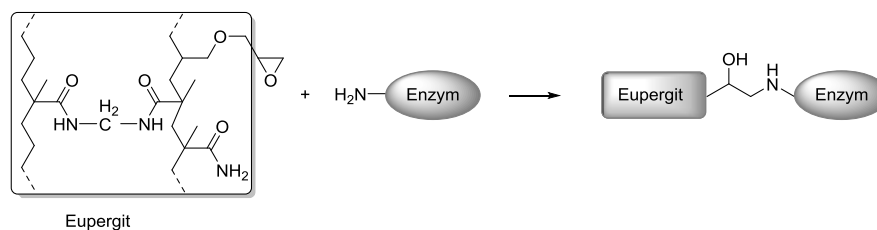


Abbildung 3.26: Linearer Zusammenhang zwischen den Konzentrationen (0 bis 5 mg/mL) der Peptide **78** und **84** und der Summe des Integrals.

Da bei den Abbaustudien nur eine Anfangskonzentration von 1.5 mg pro 550 μ l eingesetzt wird, kann mit einem linearen Zusammenhang gerechnet werden. Dies wird gerade in der obigen Abbildung 3.26 deutlich.

3.4.3 Abbaustudien

Als Enzym für den Abbau wurde Proteinase K verwendet, welche auf dem Träger Eupergit[®] C immobilisiert ist. Eupergit[®] C besteht aus makroporösen Kügelchen mit einem Durchmesser von 100 bis 250 μ m, welche durch Copolymerisation von *N,N'*-Metylen-bis-(methacrylamid), Glycidylmethacrylat, Allylglycidylether und Methacrylamid aufgebaut sind.^[398] Proteinase K wird dabei über die Aminogruppen an die Oxirangruppen, die bei neutralem und alkalischem pH-Wert reagieren, an den Träger gebunden.



Schema 3.51: Struktur von Eupergit[®] C und die kovalente Immobilisierung an ein Enzym.

Der Vorteil gegenüber einem gelösten Enzym, ist die Tatsache, dass eine spezielle Aufreinigung der Probe vor den HPLC-Läufen nicht notwendig ist. Ein bloßes Abdekantieren der Probe, ermöglicht die HPLC-Aufnahmen ohne störende Enzyme.

Die Abbaustudien werden in Anlehnung an einen von *Hook et al.*^[399] entwickelten Assays durchgeführt. Als Puffer wurde ein 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH-Wert: 7.8) mit 5 mM CaCl₂ gewählt und jeweils für die Messungen frisch hergestellt. Außerdem wurde das jeweilige Peptid in einer Stammlösung (30 mg/mL) bereitgestellt. Für eine Messung wurde jeweils 1 mg Proteinase K auf Eupergit vorgelegt, mit 500 µL Puffer versetzt und anschließend mit 50 µL der Peptid-Stammlösung versetzt, sodass in jeder Probe eine Konzentration von 1.5 mg Peptid pro 550 µL Puffer vorlag. Die sich anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C für die jeweilige Dauer und wurde durch Hinzugabe von 100 µL 25%iger Essigsäure abgebrochen. Alle Proben werden im Anschluss mittels HPLC vermessen, wobei der Restgehalt des unverdauten Peptids bestimmt wird.

Zunächst wurden solche Peptide abgebaut, bei denen zwei von fünf möglichen Proline durch *cis*-4-F-Pro ausgetauscht wurden. Ausgetauscht wurden die Proline an den Positionen 2, 10, 14 oder 16. Die abgebauten Peptide sind der Übersicht halber in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 3.11: Ausgewählte Peptide für die Abbaustudien.

Nummer	Aminosäuresequenz
78	HN-P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A-COOH
79	HN-P P A H G V T S A P D T R <i>cis</i> -FP A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH
80	HN-P P A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R P A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH
81	HN-P <i>cis</i> -FP A H G V T S A P D T R P A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH
82	HN-P P A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R <i>cis</i> -FP A P G S T A-COOH
83	HN-P <i>cis</i> -FP A H G V T S A P D T R <i>cis</i> -FP A P G S T A-COOH
84	HN-P <i>cis</i> -FP A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH

Die Ergebnisse dieser Abbaustudien und die Auswertung mittels HPLC sind in der folgenden Abbildung 3.27 gezeigt. Der Abbau der unterschiedlichen Peptide zeigt im Vergleich zur natürlichen Sequenz **78** auf den ersten Blick keine signifikanten Unterschiede bis auf die Ausnahme des Peptides **84** auf.

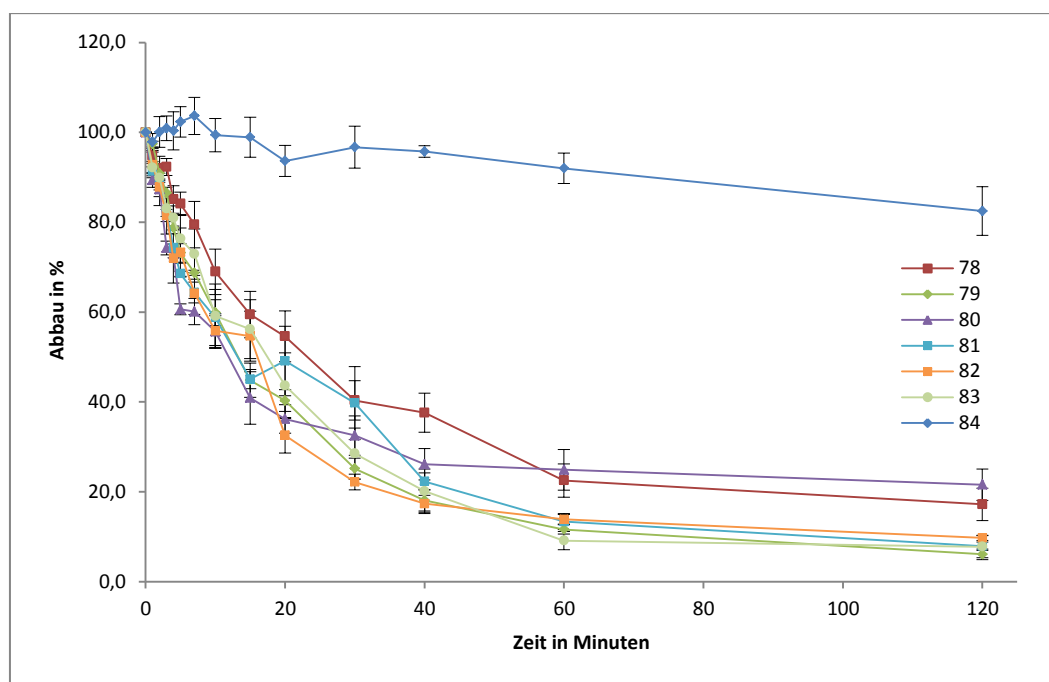


Abbildung 3.27: Ergebnisse der Abbaustudien der Peptide **78**, **79**, **80**, **81**, **82**, **83** und **84**.

Bei dem Peptid **84** handelt es sich um das in Abbildung 3.28 gezeigte Peptid. Verglichen mit der natürlichen Sequenz wurden in diesem Peptid, an den Positionen 2 und 10, die natürlichen Proline gegen *cis*-4FPro ausgetauscht. Auffällig bei der Messung ist, dass dieses Peptid sogar noch nach zwei Stunden fast vollständig vorhanden ist. Im Vergleich ist die natürliche Sequenz durch Proteinase K bereits nach ca. 20 min. zur Hälfte (bezogen auf die anfängliche Menge) verdaut wurde.

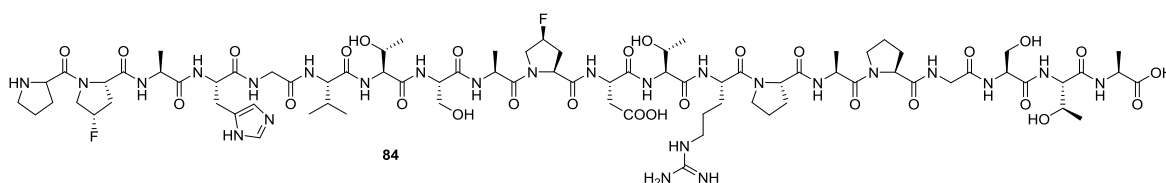


Abbildung 3.28: Stabilstes Peptid **84** in den Abbaustudien.

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse der Abbaustudien fällt auf, dass sämtliche Peptide (mit Ausnahme von **84** und **80**) sogar schneller durch Proteinase K abgebaut werden als die natürliche Sequenz **78**. Festzuhalten ist ferner, dass die Peptide **78**, **79**, **80**, **81**, **82** und **83** eine Halbwertszeit von lediglich 10 bis 25 min haben. Dies ist deutlich zu kurz für eine mögliche Evaluierung als Impfstoff, sodass sich diese Strukturen nicht als geeignete Vakzinkandidaten eignen.

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse der Abbaustudien wurden Langzeitstudien des Peptids **84** durchgeführt. Das Peptid **78** diente als Referenz, da es die natürliche Struktur wiedergibt. Diese Studie diente zum einen um herauszufinden, welche Halbwertszeit das Peptid **84** aufweist. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob sich die gezeigte Stabilität des Peptids **84** auf eine Hemmung der Proteinase K zurückführen lässt, oder ob das Peptid eine erhöhte Stabilität durch die Substitution durch Fluor aufweist. Die Ergebnisse dieser Abbaustudien und die Auswertung mittels HPLC sind in der folgenden Abbildung 3.29 gezeigt.

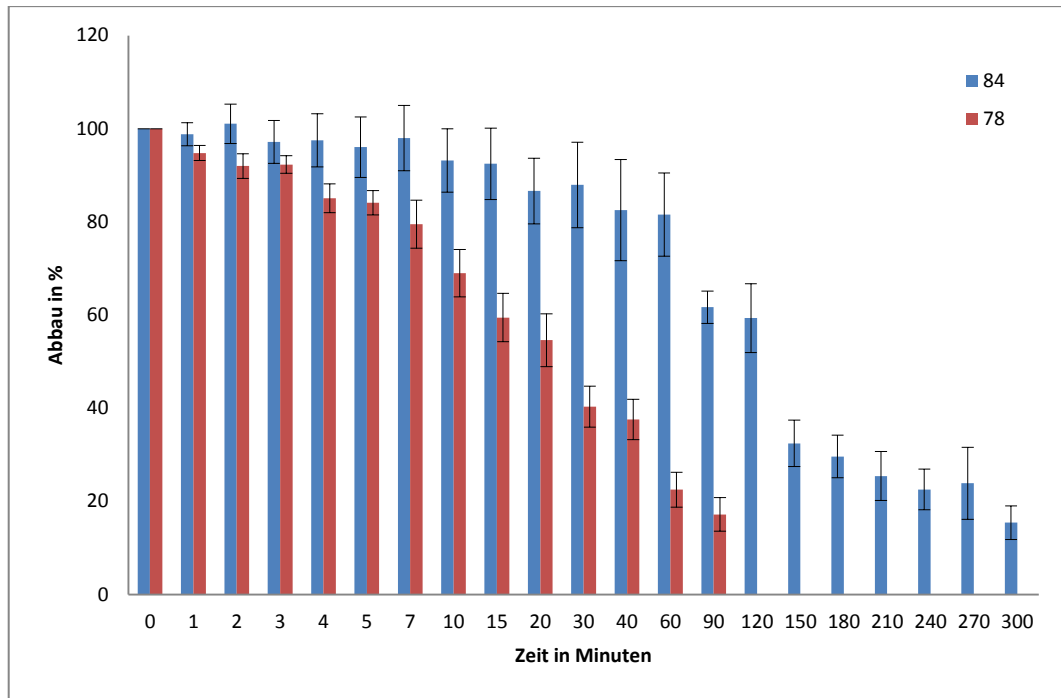


Abbildung 3.29: Langzeitabbaustudie von **84** im Vergleich zur natürlichen Sequenz **78**.

Die Langzeitabbaustudie zeigt, dass das Peptid **84** eine Halbwertszeit von ca. 2 h aufweist, während das Referenzpeptid bereits nach ca. 10 Minuten zur Hälfte abgebaut wurde. Die Tatsache, dass sich das Peptid über einen längeren Zeitraum abbauen lässt, lässt die Vermutung zu, dass dieses Peptid keine Hemmung der Proteinase K auslöst, sondern stabiler gegenüber dem Abbau ist, als im Vergleich zur natürlichen Sequenz.

Um herauszufinden, an welchen Positionen im Peptid die Proteinase K bevorzugt schneidet, wurden von den Lösungen der abgebauten Peptide ESI-Messungen durchgeführt. Anhand der isolierten Fragmente konnten Rückschlüsse der Schnittstellen gezogen werden. Die bevorzugten Schnittstellen sind in der folgenden Abbildung 3.30 durch Blitze gekennzeichnet.

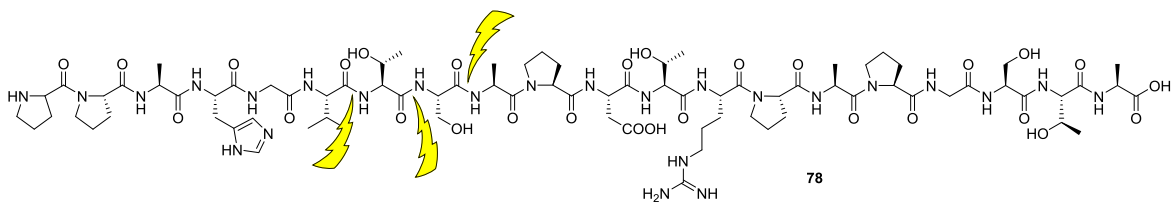


Abbildung 3.30: Schnittstellen von Proteinase K.

Wie aus der Abbildung 3.30 hervorgeht schneidet Proteinase K bevorzugt an den Positionen zwischen 6 und 7, zwischen 7 und 8 und zwischen 8 und 9. Also zwischen den Aminosäuren Valin, Threonin, Serin und Alanin. Peptid **84** weist an den Positionen 10 und 2 ein F-Pro auf. Die F-Proline flankieren somit die bevorzugten Schnittstellen von Proteinase K.

Eine Vermutung, warum das Peptid **84** gegenüber Proteinase K so stabil ist, könnte in einer strukturellen Veränderung des Peptids liegen. Gerade die Aminosäure Prolin zeichnet sich als strukturgebende Aminosäure aus. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erläutert besitzt das *cis*-FPro eine bevorzugte Konformation, sodass der Einbau ins Peptid zu einer Strukturveränderung geführt haben könnte.

Da eine komplette Strukturanalyse eines Peptids mit 20 Aminosäuren ausgesprochen aufwendig ist, wurden zunächst die charakteristischen Aminosäuren Histidin, Valin, Aspartat und Arginin verglichen. Diese Aminosäuren flankieren die Schnittstellen von Proteinase K und sind zudem über das Peptid verteilt, sodass eine Strukturveränderung innerhalb des Peptids auch Auswirkungen auf diese vier Aminosäuren zeigt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse aus den NOESY-NMR-Messungen der Peptide **78** und **84** sowie ein Vergleich der jeweiligen chemischen Verschiebungen dargestellt.

Tabelle 3.12: Chemische Verschiebungen von Valin der Peptide **78** und **84** im Vergleich.

	V^{α}		V^{β}		$V^{\gamma a}$		$V^{\gamma b}$	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
78	4.30	57.8	2.00	30.7	0.86	19.3	0.82	18.0
84	4.31	57.8	2.00	30.7	0.86	19.3	0.83	18.0
Δ	+0.01	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	+0.01	± 0

Wie eindeutig aus der Tabelle **3.12** ersichtlich ist, zeigt Valin keine Veränderung in der chemischen Verschiebung im Vergleich zwischen dem natürlichen Peptid **78** und der unnatürlichen Struktur **84** auf.

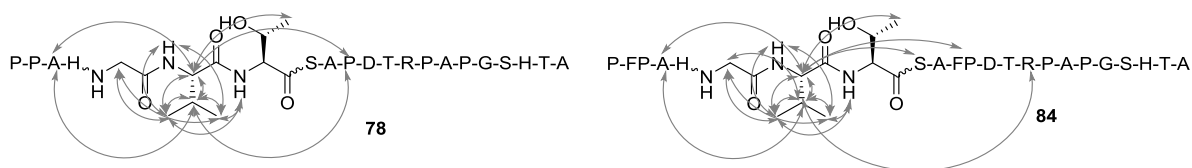


Abbildung 3.31: Ergebnisse der NOESY-NMR Messungen ausgehend von Valin.

Auch die Ergebnisse aus den NOESY-Messungen ausgehend von der Aminosäure Valin, die in der Abbildung 3.31 abgebildet sind, zeigen keine strukturellen Änderungen zwischen der natürlichen Struktur **78** und dem Peptid **84** auf. Lediglich die Kopplung zwischen den R^{γ} -Protonen und dem V^{β} -Proton ist nur in dem Peptid **84** zu erkennen.

Tabelle 3.13: Chemische Verschiebungen von Histidin der Peptide **78** und **84** im Vergleich.

	H^{α}		H^{β}		H^{γ}		H^{δ}		H^{ϵ}	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
78	4.58	51.4	3.11/2.98	27.1	-	129.0	7.38	117.1	8.97	133.7
84	4.58	51.6	3.12/2.97	27.1	-	129.0	7.36	117.1	8.94	133.7
Δ	± 0	-0.2	-0.01	± 0	-	± 0	-0.02	± 0	-0.03	± 0

Auch die chemischen Verschiebungen der Aminosäure Histidin, gezeigt in Tabelle 3.13, zeigen im Vergleich zwischen den Peptiden **78** und **84** keine großen Unterschiede.

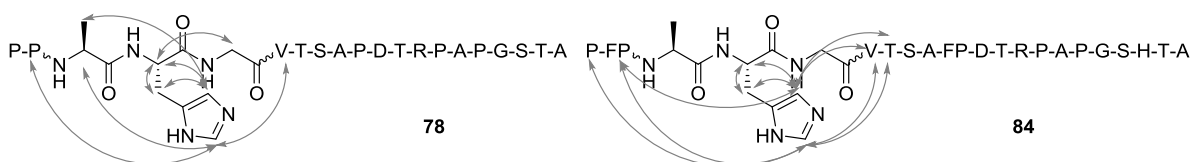


Abbildung 3.32: Ergebnisse der NOESY-NMR Messungen ausgehend von Histidin.

Aus den NOESY-Ergebnissen, die in der Abbildung 3.32 gezeigt sind, lässt sich jedoch ablesen, dass die natürliche Struktur im Bereich des Histidins gestreckt vorliegt, wohingegen der Bereich im entsprechenden unnatürlichen Peptid gebogen bzw. verknäult vorliegt. Dies lässt sich an daran erkennen, dass gerade die H^{ϵ} - als auch die H^{δ} -Protonen zu den weiter weg entfernten Aminosäuren Prolin (Position 1), Fluorprolin (Position 2), Valin (Position 6) und Threonin (Position 7) koppeln. Im natürlichen Peptid ist dagegen eine Kopplung nur zu den benachbarten Aminosäuren Alanin und Glycin erkennbar.

Tabelle 3.14: Chemische Verschiebungen von Aspartat der Peptide **78** und **84** im Vergleich.

	D^{α}		D^{β}		D^{γ}	
	1H	^{13}C	1H	^{13}C	1H	^{13}C
78	4.54	49.5	2.74/2.50	35.6	-	170.3
84	4.61	49.3	2.70/2.46	35.7	-	170.2
Δ	+0.7	-0.2	-0.04/-0.04	+0.1	-	-0.1

Wie aus der Tabelle 3.14 erkennbar ist, sind die chemischen Verschiebungen von Aspartat in den beiden Peptiden nahezu gleich. Ein Unterschied ist bei den D^{α} -Protonen zu beobachten. Diese Änderung ist nicht verwunderlich, da sich bei der benachbarten Aminosäure einmal um Prolin und zum anderen um das entsprechende Fluorprolin handelt.

Die NOESY-Messungen ergaben folgende Ergebnisse, die in der Abbildung 3.33 dargestellt sind.

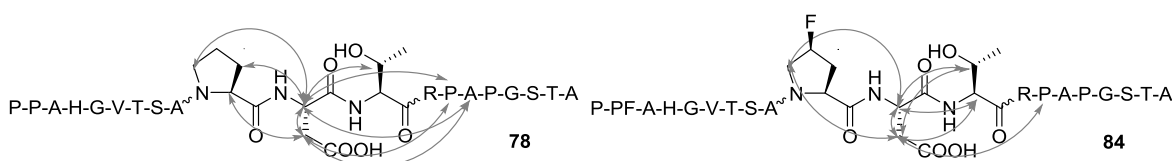


Abbildung 3.33: Ergebnisse der NOESY-NMR Messungen ausgehend von Aspartat.

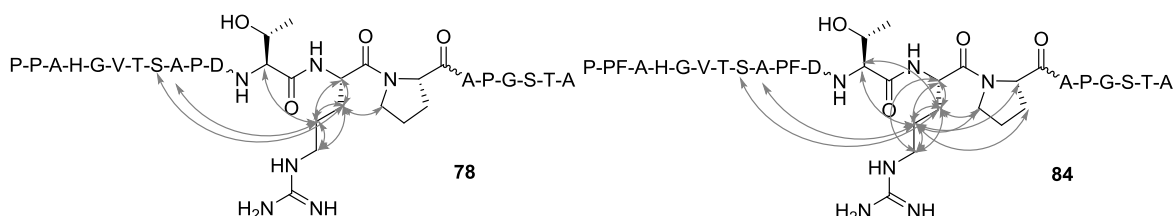
Anhand der Auswertung der NOESY-Spektren konnte gezeigt werden, dass sich durch den Einbau von Fluorprolin an Position 10 keine strukturelle Veränderung im Bereich des Aspartats ergibt. Dieser Bereich liegt in einer gestreckten Form vor, sowohl im Peptid **78** als auch im Peptid **84**. Dieser Schluss kann gezogen werden, da sich keine weit entfernten Kopplungen über den Raum zeigen, wie sie beispielsweise im Peptid **84** im Bereich des Histidin beobachtet werden konnte.

Zuletzt wurde zusätzlich noch der Bereich um die Aminosäure Arginin betrachtet. Die chemische Verschiebung ist in der kommenden Tabelle 3.15 aufgelistet.

Tabelle 3.15: Chemische Verschiebungen von Arginin der Peptide **78** und **84** im Vergleich.

	R^{α}		R^{β}		R^{γ}		R^{δ}		R^{ϵ}	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
78	4.49	50.1	1.70/1.52	28.3	1.84/1.53	24.5	3.09	40.6	-	156.8
84	4.48	50.1	1.70/1.52	28.3	1.84/1.53	24.6	3.08	40.5	-	156.9
Δ	-0.01	± 0	± 0	± 0	± 0	+0.1	-0.01	-0.1	-	+0.1

Ein Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Peptiden ist auch hier nicht erkennbar. In der folgenden Abbildung 3.34 sind die Ergebnisse aus den NOESY-Spektren zusammengefasst.

**Abbildung 3.34:** Ergebnisse der NOESY-NMR Messungen ausgehend von Arginin.

Auch im Bereich der Aminosäure Arginin konnte keine strukturelle Veränderung festgestellt werden. Während das Carboxylende der Peptide gestreckt vorliegt, faltet sich dieses ab der Aminosäure Arginin. Dies kann aus den Kopplungen zwischen den R^{γ} und den Protonen des Serins und des Alanins festgestellt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass die strukturelle Änderung durch den Einbau von Fluorprolin an den Positionen zwei und zehn zu einer strukturellen Veränderung im Bereich des Histidin führt. Das restliche Peptid liegt dagegen in einer ähnlichen Form wie die natürliche Struktur vor.

Aufgrund der Tatsache, dass durch den bloßen Austausch von zwei Prolinen an den Positionen zwei und zehn gegen zwei *cis*-Fluor Proline, eine derart erhöhte Stabilität generiert werden kann, sollte in diesen Zusammenhang die Auswirkung der einzelnen Positionen untersucht werden. Anzunehmen ist, dass gerade die Substitution an Position zehn für die strukturelle Veränderung und die damit verbundene Stabilität gegenüber Proteinase K verantwortlich ist. Hierzu wurden zwei Peptide synthetisiert, bei denen lediglich eine Position durch *cis*-Fluorprolin ersetzt wurde. Diese Peptide wurden im Anschluss abgebaut und mit den Peptiden **78** und **84** verglichen. Die Ergebnisse dieser Abbaustudien sind in der folgenden Abbildung 3.35 gezeigt.

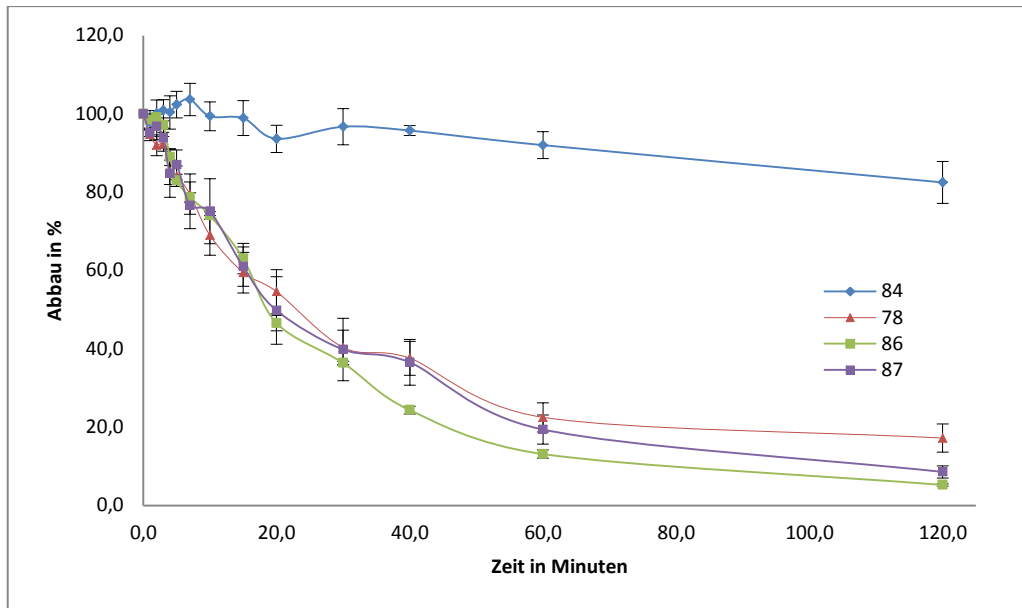


Abbildung 3.35: Ergebnisse der Abbaustudien der Peptide **78**, **84**, **86** und **87**.

Überraschenderweise zeigte sich bei den Messungen, dass der Austausch von nur einem Fluorprolin keinerlei Auswirkungen auf die Stabilität hat. Nur die Kombination aus zwei Fluorprolinen an den Positionen zwei und zehn führt zum stabilen Peptid.

Aufgrund der Tatsache, dass sich die beiden Konformere des 4-F-Pro (*cis* und *trans*) in ihrer Faltung unterscheiden, sollte in diesem Zusammenhang auch der Unterschied der Stabilität zwischen *cis* und *trans* Fluorprolin untersucht werden. Dazu wurde ein Peptid synthetisiert, bei denen die Positionen zwei und zehn durch ein *trans*-Fluorprolin ersetzt wurden. Dieses Peptid wurde im Anschluss abgebaut. Die Ergebnisse dieser Abbaustudie sind in der folgenden Abbildung 3.36 gezeigt.

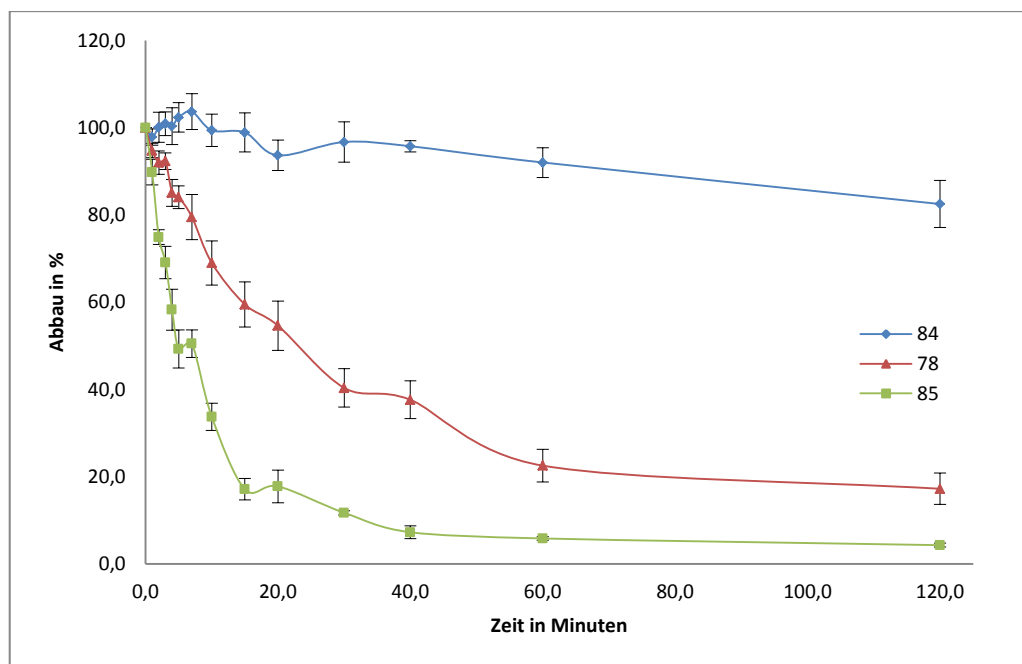


Abbildung 3.36: Ergebnisse der Abbaustudien der Peptide **78**, **84** und **85**.

Hierbei zeigte sich, dass der Einfluss von *cis* zu *trans*-Fluorprolin einen beträchtlichen Einfluss auf die Stabilität des Peptids hat. So liegt die Halbwertszeit des *trans* Isomers bei unter 10 min, während das *cis* Isomer noch nach 2 h kaum abgebaut ist.

Für die Synthese eines vollständigen vollsynthetischen tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid Vakzinen ist es notwendig, das synthetisierte tumorassoziierte Antigen mit einer möglichen Immun-Stimulanz, wie zum Beispiel Rinderserumalbumin (BSA) oder Tetanus Toxoid (TTTox) zu verbinden. Eine Möglichkeit bietet der nicht immunogene Triethylenglycollinker. Dieser fungiert als Abstandhalter und sorgt durch seine Molekülstruktur für die räumliche Distanz. Daher ist es notwendig nicht nur den Einfluss des Peptidrückgrats zu untersuchen, sondern auch den Einfluss durch den Spacer. Dazu wurden zwei weitere Peptide in Anlehnung an das Peptid **78** und **84** mit Spacer synthetisiert und durch Proteinase K abgebaut. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 3.37 gezeigt.

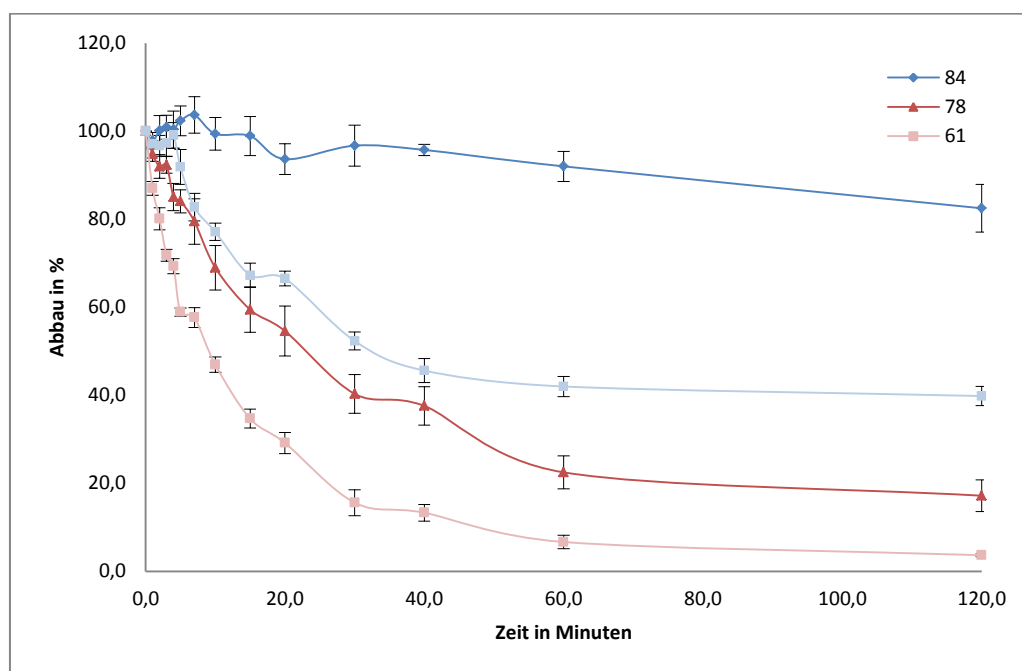


Abbildung 3.37: Ergebnisse der Abbaustudien der Peptide **61**, **64**, **78** und **84**.

Bei diesen Messungen ist auffällig, dass der Spacer einen negativen Einfluss auf die Stabilität hat. So werden die Peptide **61** und **64** im Vergleich zu ihren Peptiden ohne Spacer deutlich schneller abgebaut. Dieses Ergebnis war derartig nicht zu erwarten gewesen, da gerade vom Spacer ein stabilisierender Effekt in der Literatur vorausgesagt wird. Diese Aussage kann durch diese Abbaustudien nicht unterstützt werden.

In zukünftigen Arbeiten könnte es von Interesse sein den stabilisierenden Effekt des Zuckerbausteins zu untersuchen. Durch die große Struktur des Zuckers ist es denkbar, dass das Peptidrückgrat abgeschirmt wird, sodass von einer erhöhten Stabilität ausgegangen werden kann. Andersherum ist es aber auch denkbar, dass gerade durch die Zuckerstruktur und möglicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Zucker und dem Peptidrückgrat eine Verknäulung gefördert wird, die das Peptidrückgrat nach außen hin wölbt und somit einen erleichterten Angriff der Proteinase bietet.

Zusammenfassend kann herausgestellt werden, dass der Austausch von unnatürlichen Aminosäuren zu einer erhöhten Stabilität führen kann. Diese Stabilität kann jedoch durch weitere Modifizierungen, wie dem Einbau von Spacern wieder negativ beeinflusst werden. Auf dem Weg ein stabiles und gleichzeitig immunogenes Vakzin bereitzustellen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Nach wie vor stellt die Entwicklung von neuartigen Antitumorvakzinen auf der Basis mucinartiger Glycopeptide einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von Krebs sowie einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen dar. Diese beruht auf einer gezielten Aktivierung des menschlichen Immunsystems unter Verwendung von tumorspezifischen Vakzinen. Hierbei soll eine Immunantwort gegen den Tumor selbst bzw. die im Körper befindlichen Metastasen induziert werden, ohne dass gesundes Gewebe zu beschädigen. Glycopeptidkonjugate unterliegen im Körper jedoch meist einem raschen Abbau durch zahlreiche Enzyme. Daher ist es von Vorteil, wenn sich die metabolische (und chemische) Stabilität der Verbindung durch geringfügige chemische Veränderung verbessern ließe.

Bei der Entwicklung von synthetischen Impfstoff-Konjugaten zur therapeutischen Behandlung und Prävention von Krebserkrankungen nehmen nicht nur die Glycopeptidpartialstrukturen aus krebsassoziierten Zelloberflächen-Glycoproteinen, die sowohl tumorassoziierte Peptid- als auch Saccharidepitope beinhalten, eine entscheidende Rolle ein; dies wurde bereits mehrfach durch fluorierte Kohlenhydratanaloga beziehungsweise daraus aufgebaute Glycopeptidanaloga von *Hoffmann-Röder et al.* gezeigt. Auch das Peptidrückgrat ist von entscheidender Bedeutung. So trägt die Struktur des Rückgrats und die damit verbundene Faltung des Peptids zur Stabilität des gesamten Peptids und damit auch zur Stabilität eines potentiellen Vakzins bei.

Aufbauend auf dieser Grundlage wurde in der vorliegenden Arbeit das Ziel verfolgt potentielle Tumorvakzine zu synthetisieren, die eine erhöhte Stabilität aufgrund ihres veränderten Peptidrückgrats aufweisen. Dies sollte durch den gezielten Einbau von fluorierten Prolinen und anderen Aminosäuremimetika erreicht werden. Zusätzlich zu der erhöhten metabolischen Stabilität könnten die modifizierten Peptide auch eine erhöhte Immunogenität nach sich ziehen, wobei der Erhalt der Antikörperspezifität gewahrt werden muss. Dabei diene die *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1 mit ihren 20 Aminosäuren als natürliches Vorbild.

Hierzu wurden in dieser Arbeit zahlreiche Peptide aus der *Tandem Repeat*-Domäne des MUC1 synthetisiert, in die unnatürliche Aminosäuren integriert wurden. Im Vordergrund stand die rückgratmodifizierende Aminosäure F-Pro, da die *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1 reich an Prolin ist und somit die Struktur der Peptide gezielt an verschiedenen Positionen des Peptids modifiziert werden kann. Da bereits bekannt war, dass auch Zuckerbausteine für eine erhöhte Stabilität sorgen und die Faltung des Peptidrückgrats verändern können, wurden auch Glycopeptide mit verändertem Peptidrückgrat synthetisiert. Hierbei wurde nicht nur fluorierte Proline eingebaut, sondern auch α -AA-T_N-Mimetika, wobei dieser Baustein innerhalb dieser Arbeit zudem erstmalig synthetisch zugänglich gemacht worden ist. Ferner sollte auch der Einfluss des Spacers auf die Peptide hin untersucht werden. Die Darstellung der Peptide erfolgte durch automatisierte, mikrowellenunterstützte Festphasensynthese.

Um derartige Peptidrückgrat-modifizierte Peptide hinsichtlich ihrer Stabilität und Struktur untersuchen zu können, mussten in der vorliegenden Arbeit zunächst sämtliche Bausteine (Abbildung 4.1) synthetisiert werden.

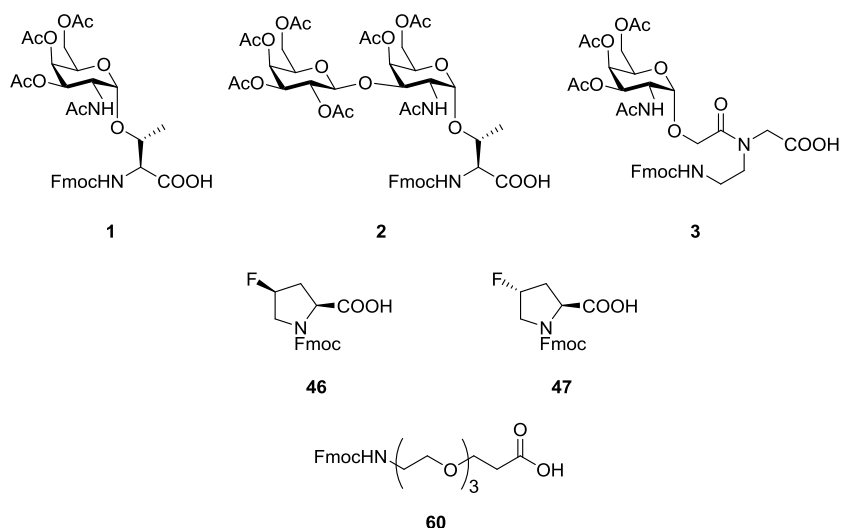
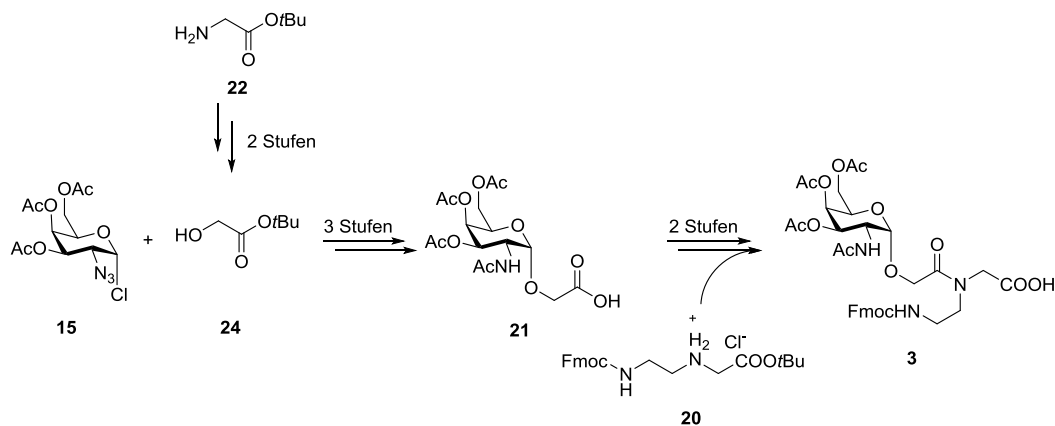


Abbildung 4.1: Übersicht der synthetisierten Festphasenbausteine.

Die beiden Glycosylaminosäuren **1** und **2**, also der T_N- sowie der T-Antigen-Baustein, wurden nach einer literaturbekannten Schutzgruppenstrategie erhalten. Ausgehend von D-(+)-Galactose und L-Threonin wurden die beiden Bausteine in neun bzw. dreizehn Stufen erhalten. Die Synthese der beiden Fluorproline **46** und **47** erfolgte ausgehend von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin. Die Bausteine wurden in einer vier bzw. sechsstufigen Synthese erhalten, wobei die Synthese bereits literaturbekannt war. Der literaturbekannte Spacer **60** konnte in einer vierstufigen Synthese ausgehend von Triethylenglycol und Acrylsäure-*tert*-butylester erhalten werden.

Das T_N-Mimetikum **3** wurde in dieser Arbeit erstmalig über sieben Stufen aus Azidochlorid **15**, Glycin-*tert*-butylester **22** und dem Hydrochlorid **21** synthetisiert. Ein Schlüsselschritt bei der Synthese ist die Glycosylierung ausgehend von dem Azidochlorid **15** und dem Glycin-*tert*-butylester **24** unter Bildung des α -Produkts **25**. Die Glycosylierung erfolgte in Anlehnung an die *Königs-Knorr*-Glycosylierung, wobei Silbersalze als Promotoren eingesetzt wurden. Ein weiterer Schlüsselschritt war die Kupplung des Hydrochlorids **20** mit der freien Säure **21**. Dieser Schritt wurde unter Verwendung der Kupplungsreagenzien HATU und HOAt durchgeführt.



Schema 4.1: Synthese des α -AA-T_N-Mimetikum-Baustein **3**.

Bei der Analyse des Festphasenbausteins konnte festgestellt und nachgewiesen werden, dass der Baustein mehrere Rotamere aufweist, die durch die freie Drehung des Zuckers um das Mimetikumpeptidrückgrats auftreten (Abbildung 4.2). Erkannt wurde dies durch den doppelten Signalsatzes des $C1$ -Kohlenstoff-Atoms und des $H1$ -Wasserstoffsatoms, wobei die Kopplungskonstanten des $H1$ jeweils die gleichen waren.

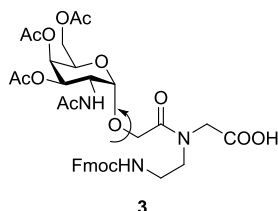


Abbildung 4.2: Darstellung der Rotationsachse des Festphasenbausteins H_2N -Mim-Ser(T_N)-Gly-COOH **3**.

Ein Ziel in diesem Zusammenhang, welches in zukünftigen Arbeiten verfolgt werden könnte, wäre der synthetische Zugang eines α -T-Mimetikums auf der Basis eines α -AA-Peptids, wie es in der folgenden Abbildung 4.3 gezeigt ist. Zahlreiche Versuche, ein solches Mimetikum synthetisch herzustellen scheiterten, sodass ein völlig neuer Syntheseweg erarbeitet werden muss.

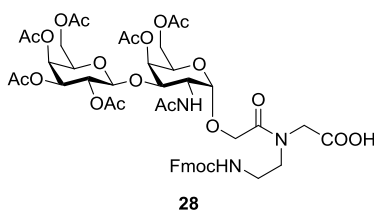


Abbildung 4.3: Ausblick: Synthese des H_2N -Mim-Ser(T)-Gly-COOH **28**.

Da das beschriebene Mimetikum nur chemisch ähnlich ist, zu der Peptidstruktur in die es eingebaut werden soll, wurde in dieser Arbeit auch das Ziel verfolgt, ein glycosyliertes Mimetikum aufzubauen, welches chemisch identisch ist, sodass das Serin durch ein Threonin ausgetauscht wurde und das Glycin durch ein Serin. Hierbei stand neben der Synthese des α -AA- auch die Synthese eines γ -AA- T_N - bzw. γ -AA-T-Mimetikum-Bausteins (H_2N -Mim-Thr(T_N) bzw. (T)-Ser-COOH) im Fokus. Während die Synthese des α -AA-Mimetikum-Bausteins **39** und **40** letztendlich an den Schlüsselschritten der Kupplung scheiterten, so ist es jedoch erstmalig gelungen sowohl ein γ -AA- T_N - **44** als auch ein γ -AA-T-Mimetikum-Bausteins **45** zu synthetisieren (Abbildung 4.4). In zukünftigen Arbeiten können diese Bausteine in ein Peptid eingebaut werden und hinsichtlich ihrer Struktur und Stabilität gegenüber diverser Enzyme hin untersucht werden. Darüber hinaus ist auch die Bindungsaffinität dieser Peptide gegenüber spezifischen Antikörpern wie dem SM3-Antikörper in zukünftigen Arbeiten bedeutungsvoll.

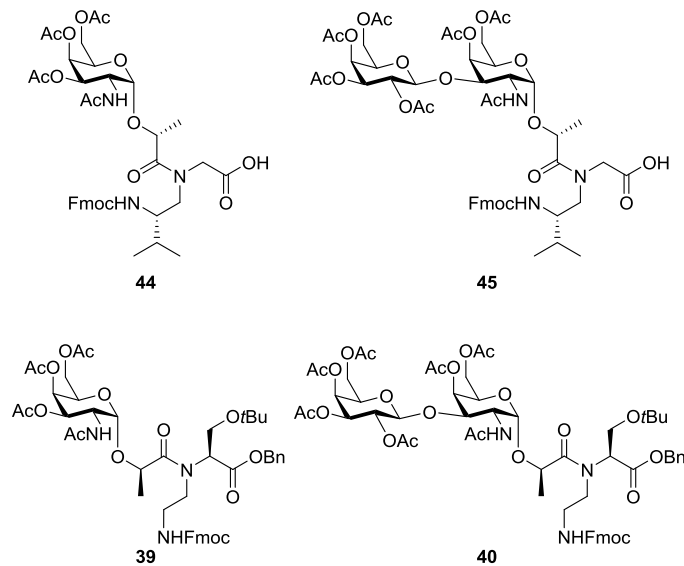


Abbildung 4.4: α -AA- und γ -AA-Mimetikum-Bausteine für den Einbau in die *Tandem Repeat*-Sequenz des MUC1.

Neben der Synthese neuartiger Mimetika stand der Einbau der in Abbildung 4.1 gezeigten Bausteine in die *Tandem Repeat*-Domäne des MUC1 im Mittelpunkt dieser Arbeit. Hierbei sollten neuartige Peptide synthetisiert werden, die für den Einsatz als Vakzin-Vorstufe herangezogen werden können. Hierfür weisen diese Peptide zwingend auch einen Spacer auf, an denen ein BSA-Konjugat gekoppelt werden kann.

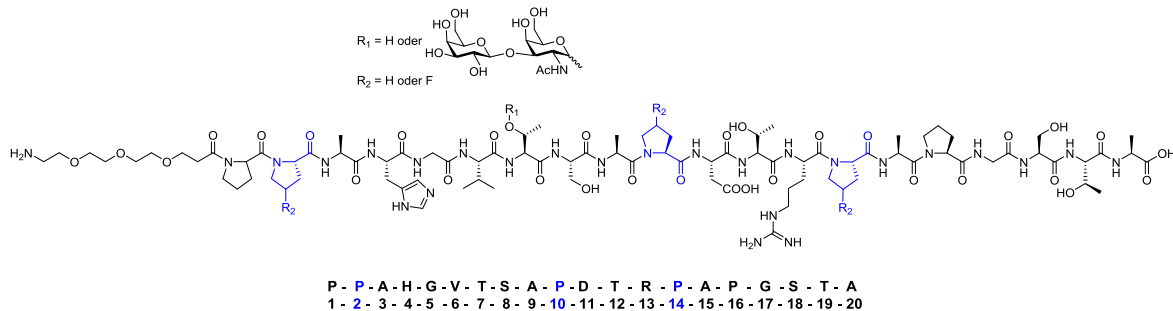


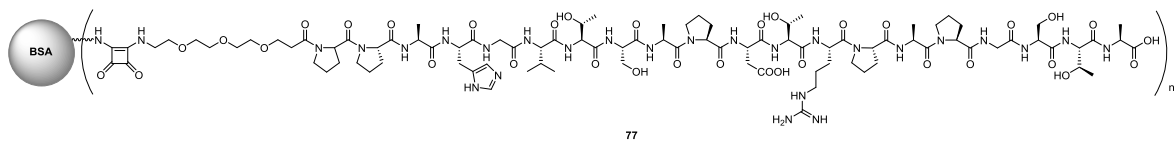
Abbildung 4.5: Übersicht der zehn Vakzin-Vorstufen, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in diesem Zusammenhang fünf Peptide synthetisiert, wobei eins dieser Peptide die natürliche Sequenz widerspiegelt und damit kein fluoriertes Prolin aufweist. Die übrigen vier Peptide weisen an den Positionen 2 und 10 bzw. an den Positionen 10 und 14 jeweils eins der oben abgebildeten Fluorprolin auf (Abbildung 4.1). Neben diesen fünf Peptiden wurden auch die entsprechenden fünf Glycopeptide synthetisiert, sodass in Summe zehn neue Vakzin-Vorstufen hergestellt wurden, die in der Abbildung 4.5 gezeigt sind. Eine Übersicht ist auch in der folgenden Tabelle 4.1 gegeben, wobei sich die Ausbeuten auf die Peptidsynthese selbst beziehen, wohingegen die Ausbeuten in den Klammern die der OAc-Entschützung und anschließender Aufreinigung entsprechen.

Tabelle 4.1: Aminosäuresequenzen und die dazugehörigen Ausbeuten der Vakzin-Vorstufen.

NR	Aminosäuresequenz	Ausbeute (Entschüttung)
61	HN-TEG P P A H G V T S A P D T R P A P G S T A-COOH	23%
62	HN-TEG P P A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R <i>cis</i> -FP A P G S T A-COOH	39%
63	HN-TEG P P A H G V T S A <i>trans</i> -FP D T R <i>trans</i> -FP A P G S T A-COOH	35%
64	HN-TEG P <i>cis</i> -FP A H G V T S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	41%
65	HN-TEG P <i>trans</i> -FP A H G V T S A <i>tans</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	77%
71	HN-TEG P P A H G V T-AG S A P D T R P A P G S T A-COOH	23% (53%)
72	HN-TEG P P A H G V T-AG S A <i>cis</i> -FP D T R P A <i>cis</i> -FP G S T A-COOH	32% (83%)
73	HN-TEG P P A H G V T-AG S A <i>trans</i> -FP D T R P A <i>trans</i> -FP G S T A-COOH	39% (91%)
74	HN-TEG P <i>cis</i> -FP A H G V T-AG S A <i>cis</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	32% (39%)
75	HN-TEG P <i>trans</i> -FP A H G V T-AG S A <i>tans</i> -FP D T R P A P G S T A-COOH	23% (63%)

Um die synthetisierten Peptide in ELISA-Experimenten einsetzen zu können wurde das Peptid **61** mit einer Quadratsäure versehen, um es anschließend an BSA zu konjugieren (Abbildung 4.6).

**Abbildung 4.6:** BSA-Konjugat zur Verwendung in ELISA-Experimenten.

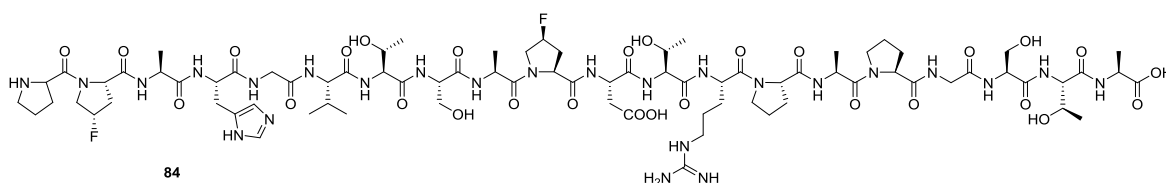
Mit diesem Peptid wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Diese Versuche waren jedoch wenig aussagekräftig, sodass es eine Aufgabe für zukünftige Arbeiten ist, eine neue Methode zu etablieren, die sich für die synthetisierten (Glyco-)Peptide eignet.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage nach der Stabilität der *Tandem Repeat*-Domäne des MUC1 unter Einsatz von fluorinierten Prolinen. Hierbei ist es erstmalig gelungen neun Peptide zu synthetisieren, die an mindestens einer Position ein fluoriniertes Prolin aufweisen. Diese Peptide wurden ohne Spacer synthetisiert. Ferner wurde ein Referenzpeptid synthetisiert, welches der natürlichen Peptidsequenz entspricht. Außerdem wurde ein Glycopeptid synthetisiert, welches sowohl ein T-Antigen-Baustein enthält, als auch zwei *cis*-FPro. Die elf Peptide und ihre entsprechenden Ausbeuten sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4.2: Aminosäuresequenzen der Peptide zur Eignung in Stabilitätstests.

Nummer	Aminosäuresequenz	Ausbeute (Entschüttung)
78	HN-PPAHGVTSAPDTRPAPGSTA-COOH	66%
79	HN-PPAHGVTSAPDTR <i>cis</i> -FP A <i>cis</i> -FP GSTA-COOH	59%
80	HN-PPAHGVTS A <i>cis</i> -FP DTRPA <i>cis</i> -FP GSTA-COOH	59%
81	HN-P <i>cis</i> -FP AHGVTSAPDTRPA <i>cis</i> -FP GSTA-COOH	43%
82	HN-PPAHGVTS A <i>cis</i> -FP DTR <i>cis</i> -FP APGSTA-COOH	36%
83	HN-P <i>cis</i> -FP AHGVTSAPDTR <i>cis</i> -FP APGSTA-COOH	64%
84	HN-P <i>cis</i> -FP AHGVTS A <i>cis</i> -FP DTRPAPGSTA-COOH	85%
89	HN-P <i>cis</i> -FP AHGV T-AG(OH)S A <i>cis</i> -FP DTRPAPGSTA-COOH	56% (47%)
85	HN-P <i>trans</i> -FP AHGVTS A <i>tans</i> -FP DTRPAPGSTA-COOH	71%
86	HN-PPAHGVTS A <i>cis</i> -FP DTRPAPGSTA-COOH	35%
87	HN-P <i>cis</i> -FP AHGVTSAPDTRPAPGSTA-COOH	40%

Die Stabilität dieser Peptide wurde durch Abbaustudien ermittelt. Hierfür wurden sämtliche Peptide, aufgelistet in der Tabelle 4.2, durch das Enzym Proteinase K abgebaut. Diese Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Peptid **84**, welches an den Positionen 2 und 10 ein *cis*-F-Pro enthält eine Halbwertszeit von ca. 2 h aufweist, wohingegen das Referenzpeptid **78** bereits zur Hälfte nach nur 10 min abgebaut ist. Dieses Ergebnis konnte durch Langzeitstudien bestätigt werden. Das Peptid **84** ist in der folgenden Abbildung 4.7 gezeigt.

**Abbildung 4.7:** Stabilstes Peptid der Abbaustudien.

Anhand von NMR-Strukturanalyse konnte festgestellt werden, dass die strukturelle Änderung durch den Einbau von Fluorprolin an den Positionen zwei und zehn zu einer leichten strukturellen Veränderung im Bereich des Histidin führt. Das restliche Peptid liegt dagegen in einer ähnlichen Form wie die natürliche Struktur vor, sodass der Schluss gezogen werden kann, dass die Stabilität des Peptids **84** nicht durch eine unterschiedliche Struktur gegeben wird, sondern durch den Austausch von Prolin gegen unnatürliche Aminosäuren.

In weiteren Studien konnte ferner gezeigt werden, dass sich die Stabilität nur durch die Kombination der beiden *cis*-F-Pro ergeben. Der Einbau nur eines *cis*-F-Pro an den entsprechenden Stellen führte nicht zu einer vergleichbaren Stabilität. Auch der Vergleich des Einbaus von *trans*-F-Pro an den genannten Positionen führte zu keiner erhöhten Stabilität.

Aufgrund der Ermangelung an Glycopeptidmengen wurde ein Abbau des Glycopeptids **89** nicht durchgeführt. Dies kann Aufgabe zukünftiger Arbeiten sein. Da es bereits bekannt ist, dass Zuckerstrukturen eine erhöhte Stabilität des Peptids nach sich ziehen, sind Abbaustudien dieses Peptids von Interesse.

In weiteren Studien sollte auch die durch den Einbau des Spacers ausgelöste Stabilitätsänderung untersucht werden. Hierfür wurde das natürliche Peptid **78** sowie das stabilste Peptid **84** in Abbaustudien mit ihren entsprechenden Peptiden mit Spacer verglichen. Die Ergebnisse waren sehr überraschend, da gezeigt werden konnte, dass der Spacer eine destabilisierende Wirkung auf das Peptid hat. Dies konnte sowohl für das natürliche als auch das unnatürliche Peptid nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie sind in der folgenden Abbildung 4.8 gezeigt.

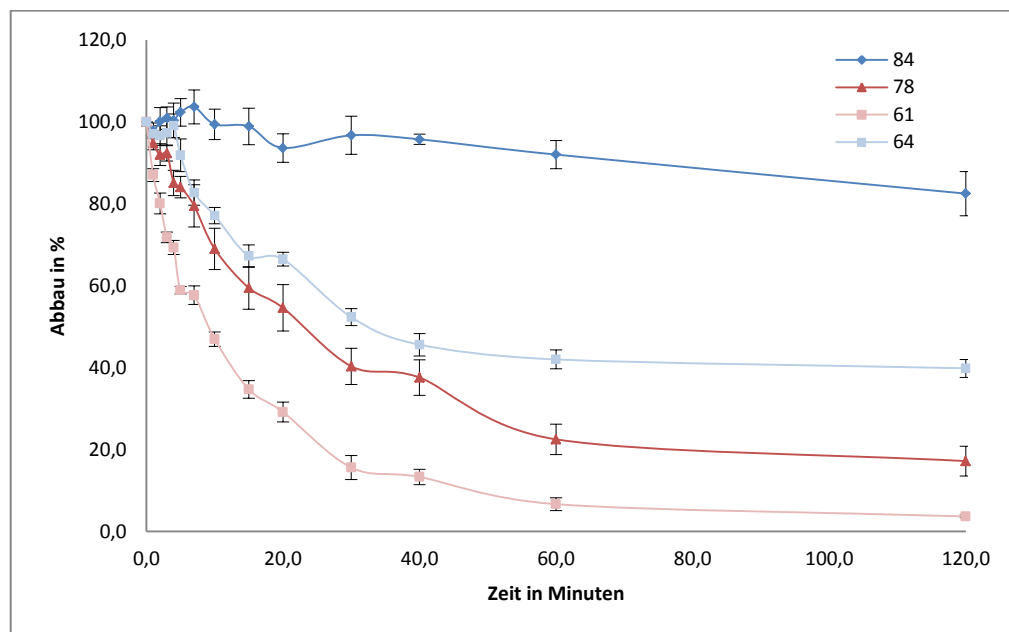


Abbildung 4.8: Ergebnisse der Abbaustudien der Peptide **61**, **64**, **78** und **84**.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte demnach erstmalig ein stabileres Peptid synthetisiert werden als das natürliche Peptid. Es bleibt festzuhalten, dass dies erreicht werden konnte durch den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren, wobei die Struktur annähernd gleich geblieben ist. Die Stabilität des Peptids kann jedoch durch andere Faktoren wie den Spacer verringert werden. Es kann demnach Ziel weiterer Arbeiten sein, ein Spacer zu finden, der sich stabilisierend auf das Peptid auswirkt.

In einem letzten Projekt sollte die Strukturveränderung durch den Einbau des α -AA- T_N -Mimetikum-Bausteins (H_2N -Mim-Ser(T_N)-Gly-COOH) untersucht werden. Hierzu wurden die folgenden vier Peptide synthetisiert und anhand von NMR-Experimenten untersucht.

Tabelle 4.3: Aminosäuresequenzen der Peptide zur Strukturanalyse.

Nummer	Aminosäuresequenz	Ausbeute (Entschützung)
94	HN-PPAHGV T_N-AG(OH) SAPDTRPAPGSTA-COOH	39% (53%)
95	HN-TEG-PPAHGV T_N-AG(OH) SAPDTRPAPGSTA-COOH	54% (76%)
96	HN-PPAHGV T_N-Mim-AG(OH) APDTRPAPGSTA-COOH	52% (54%)
97	HN-TEG-PPAHGV T_N-Mim-AG(OH) APDTRPAPGSTA-COOH	33% (50%)

Anhand der NMR-Experimente konnte gezeigt werden, dass sich der Mimetikum-Baustein in den Peptiden **96** und **97** in einer Schlaufe befindet. Das Peptid liegt somit verknäult im Bereich des Mimetikums vor. Die natürlichen Peptide liegen dagegen in gestreckter Form vor, insbesondere im Bereich des Zuckerbausteins. Dies konnte vor allem durch NOESY-Experimente nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist ausgesprochen ungewöhnlich, da man zuvor davon ausgegangen ist, dass sich das Peptid durch den Mimetikum-Baustein nicht groß verändert, da sich das Peptidrückgrat chemisch kaum verändert. Dieses Ergebnis konnte sowohl bei den Peptiden mit als auch ohne Spacer festgestellt werden. Ein weiterer struktureller Unterschied konnte zwischen den beiden Mimetika Peptiden mit und ohne Spacer festgestellt werden. Bei dem Peptid mit Spacer **97** konnte gezeigt werden, dass sich der Zuckerbaustein in das Peptidrückgrat hineinbeugt. Dieses Ergebnis konnte in dem Peptid **96** ohne Spacer nicht festgestellt werden. Ob diese Strukturveränderung auch Auswirkungen auf die Stabilität der Peptide hat, wird Arbeit zukünftiger Projekte sein.

Aufbauend auf den hier gezeigten Ergebnissen ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten die *Tandem Repeat*-Domäne des MUC1 zu verändern. Neben den bereits aufgezählten Möglichkeiten können beispielsweise auch andere fluorierte Aminosäuren, wie beispielsweise das Serin oder Threonin, zum Einsatz kommen, um noch stabilere Peptide zu synthetisieren.

EXPERIMENTELLER TEIL

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Allgemeine Arbeitsweisen

5.1.1 Verwendete Apparaturen und Messgeräte

Alle Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur und unter Rühren durchgeführt. Versuche mit luft- und feuchtigkeitsempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Apparaturen unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre und unter Verwendung der Septentechnik durchgeführt. Dabei wurden Flüssigkeiten mittels Einwegspritzen und Feststoffe im Argon- beziehungsweise Stickstoff-Gegenstrom in das Reaktionsgefäß gegeben. Im Anschluss an die flashchromatographische Reinigung wurden die erhaltenen Reinsubstanzen stets einmal mit Dichlormethan kodestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Mikrowellenunterstützte Versuche erfolgten mittels eines *Discover*-Geräts der Firma *CEM*, Matthews, NC (USA). Die spezifischen Bedingungen der Reaktionsdurchführung sind in den jeweiligen Kapiteln vermerkt, wobei der angegebene Leistungswert die maximale Leistung darstellt, mit der die Probe auf die gewünschte Temperatur aufgeheizt wurde.

Drehwerte: Die spezifischen Drehwerte wurden an einem Polarimeter *Krüss P800-P8100-T* der Firma *Krüss*, Hamburg (Deutschland) bestimmt und auf die Natrium-D-Linie (589.5 nm) extrapoliert. Hierzu wurde eine Extrapolation nach *Lippke* und *Thaler* herangezogen.^[400] Lösungsmittel, Messtemperatur und Konzentration, die in g/100 mL angegeben ist, sind für die einzelnen Verbindungen vermerkt.

Analytische RP-HPLC: Analytische RP-HPLC wurde an einer *Jasco*-HPLC-Pumpe (PU-2080 Plus) mit einer tenären *Jasco*-Gradienteneinheit (LG-2080-02-S) und einem *Jasco*-3-Wege-Entgaser (DG-2080-53) sowie einem *Jasco*-Diodenarraydetektor (MD-2010Plus) von der Firma *Jasco Germany GmbH*, Groß-Umstadt (Deutschland) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 214$ nm. Als Säule wurde eine *Phenomenex Luna*-Säule, (C18 (2), 5 μm , 250 \times 4.6 mm) der Firma *Phenomenex*, Torrance, CA (USA) verwendet. Als Eluent dienten Wasser/Acetonitril-Gemische unter Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure mit einer Flussrate von 1 mL/min. Die verwendeten Gradienten sind in der jeweiligen Synthesvorschrift der entsprechenden Verbindungen aufgeführt.

Semipräparative RP-HPLC: Die semipräparativen RP-HPLC-Trennungen wurden an zwei *Jasco* Gradientenpumpen (PU-2087 Plus) und einem UV-Detektor mit variabler Wellenlängenauswahl, ebenfalls von der Firma *Jasco Germany GmbH*, Groß-Umstadt (Deutschland) durchgeführt. Als Säule wurde eine *Luna*-Säule (300, C18, 5 μm , 250 \times 20 mm) der Firma *Phenomenex* Torrance CA (USA) verwendet. Als Eluent dienten Wasser/Acetonitril-Gemische unter Zusatz von 0.1% Trifluoressigsäure mit einer Flussrate von 20 mL/min. Die verwendeten Gradienten sind in der jeweiligen Synthesvorschrift der entsprechenden Verbindungen aufgeführt.

Als Eluenten für die analytische und die semipräparative RP-HPLC wurde Acetonitril (HPLC-grade) von der Firma *VWR BDH Prolabo*, Darmstadt (Deutschland) verwendet. Das HPLC-Wasser wurde einer *Arium® ProUV* Reinstwasser-Anlage der Firma *Satorius Stedim Biotech S.A.*, Göttingen (Deutschland) entnommen.

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und $^{19}\text{F-NMR}$): Die Kernresonanzspektren wurden an den Spektrometern AMX 600, WH 400, AC 300 und ARX 200 mit Cryo-Kopf der Firma *Varian*, Darmstadt (Deutschland) beziehungsweise an den Spektrometern Avance III HD und Avance III HD mit Cryo-Kopf 800 der Firma *Brucker*, Billerica, MA (USA) bei Raumtemperatur aufgenommen.

Die chemischen Verschiebungen der Signale wurden in Einheiten der δ -Skala in ppm angegeben und beziehen sich bei den ^1H - und ^{13}C -Spektren auf δ (TMS) = 0. Zur Kalibrierung der ^1H -Spektren wurden die Resonanzsignale der Restprotonen des deuterierten Lösungsmittels als interner Standard genutzt. Die Kalibrierung der ^{13}C -Spektren erfolgte über das ^{13}C -Signal des Lösungsmittels [δ (CDCl_3) = 77.23, δ (DMSO) = 39.51]. Die jeweils durchgeführten NMR-Experimente sowie die verwendeten Lösungsmittel sind bei den entsprechenden Verbindungen vermerkt.

Signalmultiplizitäten sind folgendermaßen abgekürzt: breites Singulett = bs, Singulett = s, pseudo Singulett = ps, Dublett = d, pseudo Dublett = pd, Dublett von Dubletts = dd, Triplett = t, pseudo Triplett = pt, Multiplett = m. Die Angabe der Kopplungskonstante J erfolgt in Hertz (Hz). Bei der Schreibweise $J_{n,m}$ geben n und m die Kopplungspartner an.

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

- Cx D-Galactosamin (unter Umständen an D-Galactose geknüpft)
- Cx' D-Galactose (an D-Galactosamin geknüpft)
- T L-Threonin

Die Benennung der übrigen Aminosäure-Bausteine innerhalb der synthetisierten Peptide erfolgt nach der IUPAC-Empfehlung von 1983 im „one-letter-code“.^[401] Tritt die gleiche Aminosäure innerhalb der Peptidsequenz mehrfach auf, so erfolgt eine willkürliche Nummerierung. Dies dient der Kennzeichnung der Zugehörigkeit der einzelnen Signale zu einem Aminosäurerest, hieraus kann aber meist kein Rückschluss auf dessen genaue Position im (Glyco-)Peptid gezogen werden. Dies lässt sich anhand der aufgenommenen Spektren nur bedingt ermitteln.

Massenspektrometrie (MS): Die Messung von Elektronenspray-Massenspektren (ESI) wurden von der Massenspektrometrieabteilung des Departments Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München an einem *Thermo Finnigan LTQ FT* Gerät der Firma *Conquer Scientific*, San Diego (USA) aufgenommen. Die Angabe der Messwerte erfolgt in m/z . Die in den Summenformeln in den 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 . Der Übersichtlichkeit halber, werden bei sämtlichen aufgeführten Verbindungen meist nur ein – in der Regel jeweils der erste – Isotopenpeak bei der

Interpretation der Massenspektren aufgeführt. Es ist jedoch anzumerken, dass das zu erwartende Isotopenmuster beobachtet wurde.

Schmelzpunkt (Smp.): Alle Schmelzpunkte wurden an einem *Melting Point B-540* Gerät der Firma *Büchi*, Flawil (Schweiz) gemessen und sind unkorrigiert vermerkt.

Glycopeptid-Festphasensynthese: Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthesen an fester Phase erfolgten automatisiert für alle Peptide unter Verwendung eines *Liberty 1* Geräts sowie der Mikrowelle *Discover* der Firma *CEM*, Matthews NC (USA). Zur Synthesekontrolle diente ein externes *UV-Monitoring* Gerät derselben Firma. Hierbei wurde die *Fmoc*-Abspaltung detektiert.

Die Synthese erfolgte im 0.10 mmol Maßstab, wobei kommerziell erhältliches *Fmoc-Ala-Wang-LL* vorbeladenes Harzes der Firma *Merck Novabiochem KGaA*, Darmstadt (Deutschland) (Beladung 0.32 mmol/g bis 0.35 mmol/g) als erste Aminosäure verwendet wurde. Die verwendeten *Fmoc*-geschützten Aminosäuren wurden von der Firma *Orpegen-Pharma*, Heidelberg (Deutschland) bezogen.

5.1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Aluminiumplatten-60-F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte je nach Anforderung durch Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm, etwa durch Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm und/oder durch Anfärbung unter Verwendung der folgenden Färbereagenzien und anschließendem Erhitzen:

- „*Ninhydrin-Reagenz*“ (1.5 g Ninhydrin, 15 mL Eisessig und 500 mL Methanol).
- „*Seebach-Reagenz*“ (2.5 g Molybdätdiphosphorsäure, 1.0 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 6 mL konzentrierter Schwefelsäure und 94 mL entionisiertem Wasser).
- „*Methoxyphenol-Reagenz*“ (1:1-Mischung aus 0.2%iger ethanolischer 4-Methoxyphenol-Lösung und 2 N ethanolischer Schwefelsäure).

Die verwendeten Fließmittelgemische sind in den entsprechenden Kapiteln unter Angabe von Volumenanteilen vermerkt.

Säulenchromatographie (SC): Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel der Firma *Acros Organics*, Nidderau (Deutschland) mit einer Korngröße von 35 bis 70 μm und einer Porengröße von 60 Å verwendet. Die Flashchromatographie wurde in der Regel bei einem leicht erhöhten Druck von 0.2 bis 0.3 bar durchgeführt. Die Angabe der eingesetzten Lösungsmittelverhältnisse erfolgte in Volumenprozent und sind in den entsprechenden Kapiteln vermerkt.

5.1.3 Chemikalien

Lösungsmittel: Sofern nicht anders angegeben, wurden für die Reaktionen Lösungsmittel in der Qualität *pro analysis* (p.a.) verwendet.

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 vor Gebrauch frisch destilliert. Absolute Lösungsmittel wie Diethylether, 1,4-Dioxan, Toluol und Tetrahydrofuran wurden durch Trocknung über Natrium/Benzophenon erhalten und vor Verwendung nach literaturbekanntem Methoden destilliert.^[402]

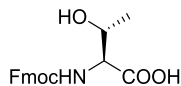
Chloroform (CDCl_3) zur Verwendung der NMR-Proben wurde über Aluminiumoxid (Al_2O_3) filtriert.

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

5.2 Synthesevorschriften T-Antigen Festphasenbaustein

5.2.1 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-threonin (**9**)^[358, 359]

(*N*-Fmoc-L-Thr-OH)



In 800 mL eines Gemisches aus Aceton und Wasser (1:1) wurden 25.0 g (210 mmol, 1.0 Äquiv.) L-Threonin (**5**) und 17.7 g (210 mmol, 1.0 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat gelöst. Unter Rühren wurden portionsweise 70.6 g (210 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylsuccinimidylcarbonat (*Fmoc*-OSu) gegeben. Nachdem der Ansatz 15 h gerührt wurde, wurde die Reaktionslösung mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 angesäuert, bevor das Aceton im Vakuum entfernt wurde. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und 200 mL Wasser gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde dreimal mit je 100 mL Toluol und anschließend zweimal mit je 100 mL Dichlormethan kodestilliert.

Man erhielt 64.4 g (189 mmol, 90%) *N*-Fmoc-L-Thr-OH **9** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (EtOAc/HOAc = 10:1) = 0.57.

Masse/Molekulargewicht: C₁₉H₁₉NO₅ (341.36 g/mol) [341.1263].

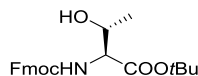
HR ESI-MS (positiv), m/z: 364.1152 ([M+Na]⁺, ber.: 364.1155).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.71 (d, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.56 (t, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.8$ Hz, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.39 – 7.21 (m, 4 H, **H2-**, **H3-**, **H6-**, **H7-Fmoc**), 6.10 (d, $J_{NH,T\alpha} = 9.1$ Hz, 1 H, **NH-Fmoc**), 4.49 – 4.26 (m, 4 H, **CH₂-Fmoc**, T ^{α} , T ^{β}), 4.16 (t, $J_{H9,CH2} = 6.9$ Hz, 1 H, **H9-Fmoc**), 1.22 (d, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T ^{γ}) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 174.5 (COOH), 157.3 (C=O-Fmoc), 143.9, 143.7 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 68.1 (T ^{β}), 67.5 (CH₂-Fmoc), 59.2 (T ^{α}), 47.1 (C9-Fmoc), 19.5 (T ^{γ}) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 14 von 19 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[403, 404]

5.2.2 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin-*tert*-butylester (**10**)^[360, 361]*(N-Fmoc-L-Thr-OtBu)*

Eine Mischung aus 176 g (855 mmol, 4.0 Äquiv.) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, 95.0 g (1.28 mol, 6.0 Äquiv.) *tert*-Butanol und 2.97 g (30.0 mmol, 0.2 Äquiv.) wasserfreiem Kupfer(I)-chlorid wurde unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Die dunkelgrüne Reaktionsmischung wurde mit 200 mL absol. Dichlormethan verdünnt und unter Eiskühlung innerhalb von 1.5 h mit einer Lösung aus 200 mL absol. Dichlormethan und 73.0 g (214 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-threonin (**9**), versetzt. Danach wurde der Reaktionsansatz weitere 2 h gerührt. Der ausgefallene Harnstoff wurde durch *Hyflo*[®] filtriert und der Rückstand wurde dreimal mit je 200 mL kaltem Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit je 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 100 mL Ethylacetat aufgenommen und über Nacht bei -25 °C gelagert, wobei weiterer Harnstoff auskristallisierte. Dieser wurde erneut abfiltriert, bevor das Rohprodukt vom Lösungsmittel befreit und flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 4:1 → 2:1) gereinigt wurde.

Man erhielt 55.9 g (141 mmol, 66%) *N-Fmoc-L-Thr-OtBu* **10** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 2:1) = 0.39.

$[\alpha]_D^{22}$ (1.00, CHCl₃) = -9.3 (Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = (1.15, CHCl₃) = -9.0).^[355]

Smp: 82.1 °C (Lit.: 83.0 °C).^[355]

Masse/Molekulargewicht: C₂₃H₂₇NO₅ (397.46 g/mol) [397.1889].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 420.1780 ([M+Na]⁺, ber.: 420.1781), 436.1519 ([M+K]⁺, ber.: 436.1521).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 (d, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.61 (d, $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.3$ Hz, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.40 (t, $J_{H3,H2/4} = J_{H6,H5/7} = 7.5$ Hz, 2 H, **H3-**, **H6-Fmoc**), 7.31 (t, $J_{H2,H1/3} = J_{H7,H6/8} = 7.5$ Hz, 2 H, **H2-**, **H7-Fmoc**), 5.59 (d, $J_{NH,T\alpha} = 9.0$ Hz, 1 H, **NH-Fmoc**), 4.42 (d, $J_{CH_2,CH} = 7.1$ Hz, 2 H, **CH₂-Fmoc**), 4.34 – 4.18 (m, 3 H, **H9-Fmoc**, T ^{α} , T ^{β}), 1.90 (bs, 1 H, **OH**), 1.47 (s, 9 H, C(CH₃)₃-Ester), 1.25 (d, $J_{T\gamma,T\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T ^{γ}) ppm.

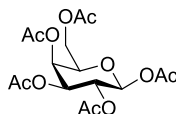
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.3 (C=O-Ester, C=O-NHAc), 156.9 (C=O-Fmoc), 143.9 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.8 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.3 (C1-, C8-Fmoc), 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 82.8 (C(CH₃)₃-Ester), 68.5 (T ^{β}), 67.3 (CH₂-Fmoc), 59.7 (T ^{α}), 47.3 (C9-Fmoc), 28.2 (C(CH₃)₃-Ester), 20.7 (T ^{γ}) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 15 von 23 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[355, 404]

5.2.3 Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**11**)^[362, 363]

(β -Ac₅Gal)



Eine Suspension von 50.0 g (610 mmol, 1.1 Äquiv.) Natriumacetat in 600 mL Essigsäureanhydrid wurde auf 80 °C erhitzt. Nachdem die Heizquelle entfernt wurde, wurden portionsweise 100 g (555 mmol, 1.0 Äquiv.) D-(+)-Galactose (**6**) so unter Rühren zugegeben, dass die Reaktionsmischung am Sieden blieb. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung erneut 1 h auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz auf 1 L Eis gegeben und 21 h zur Kristallisation gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet.

Man erhielt 117 g (300 mmol, 54%) β -Ac₅Gal **11** des Rohproduktes als farblosen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 1:1) = 0.42.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +21.2$ (Lit.: $[\alpha]_D^{20} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +22.0$).^[405]

Smp: 139 – 140 °C (Lit.: 140 °C).^[406]

Masse/Molekulargewicht: C₁₆H₂₂O₁₁ (390.34 g/mol) [390.1162].

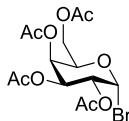
HR ESI-MS (positiv), m/z: 413.1060 ([M+Na]⁺, ber.: 413.1054).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.69$ (d, $J_{H1,H2} = 8.3$ Hz, 1 H, **H1**), 5.41 (dd, $J_{H4,H3} = 3.5$ Hz, $J_{H4,H5} = 3.5$ Hz, $J_{H4,H2/6} = 1.1$ Hz, 1 H, **H4**), 5.32 (dd, $J_{H2,H3} = 10.5$ Hz, $J_{H2,H1} = 8.3$ Hz, 1 H, **H2**), 5.07 (dd, $J_{H3,H2} = 10.4$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.4$ Hz, 1 H, **H3**), 4.13 (qd, $J_{H6,H5} = 11.3$ Hz, $J_{H6,H5} = 6.6$ Hz, 2 H, **H6a/b**), 4.05 (td, $J_{H5,H6} = 6.6$ Hz, $J_{H5,H6} = 1.2$ Hz, 1 H, **H5**), 2.15, 2.11, 2.03, 1.98 (4 \times s, 15 H, 5 \times CH₃-OAc) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.5, 170.3, 170.1, 169.5, 169.1$ (5 \times C=O-Ac), 92.3 (**C1**), 71.8 (**C5**), 70.9 (**C3**), 68.0 (**C2**), 66.9 (**C4**), 61.2 (**C6**), 20.9, 20.8, 20.7 (5 \times CH₃-OAc) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 14 von 16 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[407]

5.2.4 Synthese von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylbromid (**7**)^[362, 365](α -Ac₄GalBr)

Zunächst wurde eine Mischung aus 70 mL Bromwasserstofflösung in Eisessig (33%ig) und 15 mL Essigsäureanhydrid auf 0 °C abgekühlt. Daraufhin wurden 39.0 g (99.9 mmol) β -Ac₅Gal **11** portionsweise hinzugegeben, sodass die Temperatur von 35 °C nicht überschritten wurde. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und vorsichtig in 300 mL Eiswasser gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde zweimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und zweimal mit je 200 mL gesättigter Natrium-hydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Anschließend wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Man erhielt 38.6 g (93.9 mmol, 94%) α -Ac₄GalBr **7** des Rohproduktes als braunen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 1:1) = 0.65.

Smp.: 84.1 – 84.9 °C (Lit.: 83 – 84 °C).^[408]

Masse/Molekulargewicht: C₁₄H₁₉BrO₉ (411.20 g/mol) [410.0212].

HR EI-MS (positiv), m/z: 411.0296 ([M+H]⁺, ber.: 411.0285).

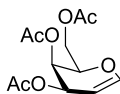
HR ESI-MS (negativ), m/z: 331.1029 ([M-Br]⁻, ber.: 331.1024).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.68 (dd, $J_{H1,H2}$ = 4.0 Hz, $J_{H1,H3}$ = 0.6 Hz, 1 H, **H1**), 5.50 (dd, $J_{H4,H3}$ = 3.3 Hz, $J_{H4,H5}$ = 1.4 Hz, 1 H, **H4**), 5.38 (dd, $J_{H3,H2}$ = 10.7 Hz, $J_{H3,H4}$ = 3.3 Hz, 1 H, **H3**), 5.03 (dd, $J_{H2,H3}$ = 10.7 Hz, $J_{H2,H1}$ = 4.0 Hz, 1 H, **H2**), 4.47 (t, $J_{H5,H6a/b}$ = 6.7 Hz, 1 H, **H5**), 4.17 (dd, $J_{H6a,H6b}$ = 11.5 Hz, $J_{H6a,H5}$ = 6.4 Hz, 1 H, **H6a**), 4.09 (dd, $J_{H6b,H6a}$ = 11.5 Hz, $J_{H6b,H5}$ = 6.8 Hz, 1 H, **H6b**), 2.13, 2.10, 2.04, 1.99 (4 × s, 12 H, 4 × CH₃-OAc) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 170.4, 170.2, 170.0, 169.9 (4 × C=O-Ac), 88.2 (C1), 71.2 (C5), 68.1 (C3), 67.9 (C2), 67.1 (C4), 60.9 (C6), 20.8, 20.7 (4 × CH₃-OAc) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 12 von 14 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[409, 410]

5.2.5 Synthese von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-D-galactal (**12**)^[362](Ac₃Gal)

Es wurden 116 g (282 mmol, 1.0 Äquiv.) α -Ac₄GalBr **7** in 200 mL Ethylacetat gelöst und unter Rühren zu einer siedenden Suspension aus 185 g (2.82 mol, 10 Äquiv.) aktiviertem Zinkpulver¹ und 24.7 mL (25.5 g, 311 mmol, 1.1 Äquiv.) *N*-Methylimidazol, gelöst in 700 mL Ethylacetat, getropft. Die Reaktionsmischung wurde 2 h unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen durch *Hyflo*[®] filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 300 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und 400 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 2:1) gereinigt.

Man erhielt 48.5 g (178 mmol, 63%) Ac₃Gal **12** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 1:1) = 0.64.

$[\alpha]_D^{22}$ (1.00, CHCl₃) = +12.0 (Lit.: $[\alpha]_D^{23}$ (2.00, CHCl₃) = +12.4).^[411]

Smp.: 32.0 – 32.4 °C (Lit.: 30 °C).^[411, 412]

Masse/Molekulargewicht: C₁₂H₁₆O₇ (272.25 g/mol) [272.0896].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 295.0792 ([M+Na]⁺, ber.: 295.0788).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.45 (dd, $J_{H1,H2}$ = 6.3 Hz, $J_{H1,H3}$ = 1.8 Hz, 1 H, **H1**), 5.55 – 5.53 (m, 1 H, **H3**), 5.43 – 5.41 (m, 1 H, **H4**), 4.72 (d, $J_{H2,H1}$ = 13.2 Hz, 1 H, **H2**), 4.33 – 4.30 (m, 1 H, **H5**), 4.28 – 4.24 (m, 1 H, **H6a**), 4.22 – 4.19 (m, 1 H, **H6b**), 2.12, 2.07, 2.01 (3 × s, 9 H, CH₃-OAc) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 170.7, 170.4, 170.2 (3 × C=O-Ac), 145.5 (C1), 99.0 (C2), 72.9 (C5), 64.0 (C3), 63.9 (C4), 62.0 (C6), 20.9, 20.8 (3 × CH₃-OAc) ppm.

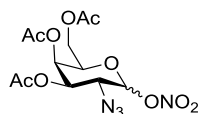
Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 11 von 12 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[411, 413]

¹ Die Aktivierung des Zinks erfolgte durch Zugabe von 1 M Salzsäure. Anschließend wurde jeweils dreimal mit je 200 mL Wasser, Methanol und Diethylether gewaschen.

5.2.6 Synthese von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α/β -D-galactopyranosylnitrat (**13**)^[366]

(α/β -Ac₃GalN₃NO₂)



In eine Suspension aus 151 g (275 mmol, 3.0 Äquiv.) trockenem Cerammoniumnitrat und 8.97 g (138 mmol, 1.5 Äquiv.) trockenem Natriumazid in 300 mL absol. Acetonitril wurden bei -30 °C und unter Argonatmosphäre 25.0 g (91.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Ac₃Gal **12**, gelöst in 150 mL absol. Acetonitril, zugetropft. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung zunächst 36 h bei -10 °C und dann weitere 24 h bei -5 °C gerührt. Die Suspension wurde mit 400 mL Ethylacetat verdünnt und auf 400 mL Eiswasser gegeben. Anschließend wurde die organische Phase abgetrennt, dreimal mit je 100 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abgetrennt und das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (^CHex/EtOAc = 2:1).

Man erhielt 16.2 g (43.0 mmol, 47%) α/β -Ac₃GalN₃NO₂ **13** als blassgelben Feststoff (Anomerengemisch).

R_f (^CHex/EtOAc = 1:1) = 0.64.

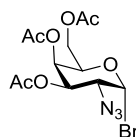
Masse/Molekulargewicht: C₁₂H₁₆N₄O₁₀ (376.28 g/mol) [376.0866].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.33 (d, $J_{H1\alpha,H2\alpha}$ = 4.4 Hz, 1 H, **H1** (α)), 5.56 (d, $J_{H1\beta,H2\beta}$ = 8.5 Hz, 1 H, **H1** (β)), 5.48 (d, $J_{H4\alpha,H3\alpha}$ = 2.6 Hz, 1 H, **H4** (α)), 5.38 (d, $J_{H4\beta,H3\beta}$ = 2.9 Hz, 1 H, **H4** (β)), 5.23 (dd, $J_{H3\alpha,H4\alpha}$ = 3.3 Hz, $J_{H3\alpha,H2\alpha}$ = 11.4 Hz, 1 H, **H3** (α)), 4.95 (dd, $J_{H3\beta,H4\beta}$ = 3.3 Hz, $J_{H3\beta,H2\beta}$ = 10.7 Hz, 1 H, **H3** (β)), 4.44 (pt, 2 H, **H5** (α)), 4.19 – 4.00 (m, 6 H, **H2** (α), **H5** (β), **H6** (α)_{a,b}, **H6** (β)_{a,b}), 3.81 (dd, $J_{H2\beta,H1\beta}$ = 9.0 Hz, $J_{H2\beta,H3\beta}$ = 10.7 Hz, 1 H, **H2** (β)), 2.20, 2.09, 2.03 (3 \times s, 18 H, 3 \times CH₃-OAc) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[414]

5.2.7 Synthese von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylbromid (**14**)^[366]

(α -Ac₃GalN₃Br)



Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Suspension aus 9.78 g (113 mmol, 5.3 Äquiv.) trockenem Lithiumbromid in 100 mL absol. Acetonitril unter Rühren bei Raumtemperatur 8.00 g (21.3 mmol, 1.0 Äquiv.) α/β -Ac₃GalN₃NO₂ **13**, gelöst in 50 mL absol. Acetonitril, getropft. Nach 20 h Rührzeit wurde der Reaktionsansatz mit 170 mL Dichlormethan verdünnt. Die organische Phase wurde zweimal mit je 150 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 2:1) gereinigt.

Man erhielt 5.60 g (14.1 mmol, 66%) α -Ac₃GalN₃Br (**14**) als hellgelben amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 1:1) = 0.61.

Masse/Molekulargewicht: C₁₂H₁₆BrN₃O₇ (394.18 g/mol) [393.0172].

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.45 (d, $J_{H1,H2}$ = 3.8 Hz, 1 H, **H1**), 5.48 (dd, $J_{H4,H3}$ = 3.2 Hz, $J_{H4,H5}$ = 1.4 Hz, 1 H, **H4**), 5.32 (dd, $J_{H3,H2}$ = 10.9 Hz, $J_{H3,H4}$ = 3.4 Hz, 1 H, **H3**), 4.46 (pt, 1 H, **H5**), 4.19 – 4.04 (m, 2 H, **H6a/b**), 3.96 (dd, $J_{H2,H3}$ = 10.9 Hz, $J_{H2,H1}$ = 3.7 Hz, 1 H, **H2**), 2.13, 2.04, 2.03 (3 × s, 9 H, 3 × CH₃-OAc) ppm.

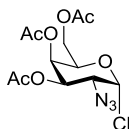
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 170.5, 169.9, 169.7 (3 × C=O-Ac), 89.1 (C1), 71.6 (C5), 70.0 (C3), 66.7 (C4), 60.9 (C6), 58.8 (C2), 20.8, 20.7 (3 × CH₃-OAc) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[415-417]

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 11 von 12 Signalen beobachtet.

5.2.8 Synthese von 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylchlorid (**15**)^[353]

(α -Ac₃GalN₃Cl)



Es wurden 11.8 g (43.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Ac₃Gal **12** in 250 mL Acetonitril gelöst und auf –30 °C gekühlt. Anschließend wurden 3.37 g (51.8 mmol, 1.2 Äquiv.) Natriumazid und 5.60 g (34.5 g, 0.8 Äquiv.) Eisen(III)-chlorid hinzugefügt. Nach 1.5 h Rührzeit wurden 6 mL (64.8 mmol, 1.5 Äquiv.) Wasserstoffperoxid tropfenweise hinzugegeben. Nach weiteren 6 h und 23 h nach Reaktionsstart wurden nochmals je 1.70 g (25.9 mmol, 0.6 Äquiv.) Natriumazid und 6 mL (64.8 mmol, 1.5 Äquiv.) Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Nach 26.5 h wurden ein letztes Mal 6 mL (64.8 mmol, 1.5 Äquiv.) Wasserstoffperoxid hinzugegeben und 1 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung durch Hyflo[®] filtriert und mit Eiswasser so lange ausgeschüttelt, bis die organische Phase farblos war. Die organische Phase wurde dreimal mit je 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dreimal mit je 100 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 3:1) gereinigt.

Man erhielt 11.2 g (32.1 mmol, 74%) α -Ac₃GalN₃Cl **15** als farblosen amorphen Feststoff.

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

$[\alpha]_D^{22}$ = (1.00, CHCl₃) = +106.8 (Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = (0.67, CHCl₃) = +146).^[418]

Masse/Molekulargewicht: C₁₂H₁₆ClN₃O₇ (349.72 g/mol) [349.0677].

HR EI-MS (positiv), m/z: 314.0980 ([M-Cl]⁺, ber.: 314.0983).

HR ESI-MS (negativ), m/z: 348.0941 ($[M-H]^-$, ber.: 348.0604).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 6.16 (d, $J_{\text{H1,H2}}$ = 3.8 Hz, 1 H, **H1**), 5.49 (dd, $J_{\text{H4,H3}}$ = 3.2 Hz, $J_{\text{H4,H5}}$ = 1.4 Hz, 1 H, **H4**), 5.35 (dd, $J_{\text{H3,H2}}$ = 10.8 Hz, $J_{\text{H3,H4}}$ = 3.3 Hz, 1 H, **H3**), 4.50 (t, $J_{\text{H5,H6a}}$ = $J_{\text{H5,H6b}}$ = 6.3 Hz, 1 H, **H5**), 4.16 – 4.13 (m, 1 H, **H6a**), 4.11– 4.07 (m, 2 H, **H6b**, **H2**), 2.14, 2.05, 2.04 ($3 \times$ s, 9 H, $3 \times \text{CH}_3\text{-OAc}$) ppm.

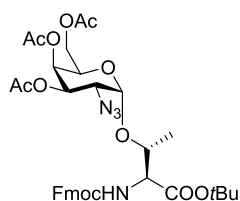
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ = 170.4, 169.8, 169.6 ($3 \times \text{C=O-Ac}$), 92.7 (**C1**), 69.8 (**C5**), 68.8 (**C3**), 66.8 (**C4**), 60.0 (**C6**), 58.7 (**C2**), 20.7 ($3 \times \text{CH}_3\text{-OAc}$) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im $^{13}\text{C-NMR}$ werden nur 10 von 12 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[353]

5.2.9 Synthese von *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 (**4**)^[137, 353]

(*N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalN₃)-OtBu)



Ausgehend vom α -Ac₃GalN₃Br:

Zunächst wurde eine Suspension von 4.62 g (11.6 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Fmoc-*L*-Thr-OtBu **10** und 8.60 g aktiviertem Molsieb (4 Å) in 100 mL eines Gemisches aus absol. Dichlormethan und absol. Toluol (1:1) 1 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Bei 0 °C wurden unter Lichtausschluss 3.37 g (12.2 mmol, 1.1 Äquiv.) trockenes Silbercarbonat und 460 mg (2.22 mmol, 0.2 Äquiv.) Silberperchlorat in 4 mL absol. Toluol zugegeben. Anschließend wurden innerhalb von 30 min 5.50 g (14.0 mmol, 1.2 Äquiv.) α -Ac₃GalN₃Br **14**, gelöst in 100 mL eines Gemisches aus absol. Dichlormethan und absol. Toluol (1:1), zutropft. Nachdem die Reaktionsmischung 3 d bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Suspension mit 150 mL Dichlormethan verdünnt und anschließend durch Hyflo[®] filtriert. Das Filtrat wurde je zweimal mit 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie je zweimal mit 100 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 2:1$).

Man erhielt 5.12 g (7.21 mmol, 62%) *N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalN₃)-OtBu **4** als farblosen amorphen Feststoff.

Ausgehend vom α -Ac₃GalN₃Cl:

Zunächst wurde eine Suspension von 5.00 g (12.6 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Fmoc-*L*-Thr-OtBu **10** und 9.00 g aktiviertem Molsieb (4 Å) in 150 mL eines Gemisches aus absol. Dichlormethan und absol. Toluol

(1:1) 1 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Unter Lichtausschluss wurden bei 0 °C 3.64 g (13.2 mmol, 1.1 Äquiv.) trockenes Silbercarbonat und 522 mg (2.52 mmol, 0.2 Äquiv.) Silberperchlorat in 5 mL absol. Toluol zugegeben. Anschließend wurden innerhalb von 30 min 5.28 g (15.1 mmol, 1.2 Äquiv.) α -Ac₃GalN₃Cl **15**, gelöst in 150 mL eines Gemisches aus absol. Dichlormethan und absol. Toluol (1:1), zugetropft. Nachdem die Reaktionsmischung 3 d bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Suspension mit 150 mL Dichlormethan verdünnt und anschließend durch Hyflo[®] filtriert. Das Filtrat wurde je zweimal mit 150 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie je zweimal mit 150 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (^CHex/EtOAc = 2:1).

Man erhielt 5.36 g (7.55 mmol, 60%) *N-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalN₃)-OtBu* **4** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 2:1) = 0.42 (α -Anomer).

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +62.8$ (Lit.: $[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +63.7$).^[419]

Smp.: 73.1 – 78.0 °C.

Masse/Molekulargewicht: C₃₅H₄₂N₄O₁₂ (710.74 g/mol) [710.2799].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 733.2707 ([M+Na]⁺, ber.: 733.2691).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.75$ (d, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.62 (d, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.6$ Hz, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.40 – 7.37 (m, 2 H, **H3-**, **H6-Fmoc**), 7.32 – 7.28 (m, 2 H, **H2-**, **H7-Fmoc**), 5.63 (d, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.5$ Hz, 1 H, **NH-Fmoc**), 5.45 (d, $J_{\text{H4,H3}} = 2.3$ Hz, 1 H, **H4**), 5.32 (dd, $J_{\text{H3,H2}} = 11.2$ Hz, $J_{\text{H3,H2}} = 3.2$ Hz, 1 H, **H3**), 5.09 (d, $J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, 1 H, **H1**), 4.48 – 4.33 (m, 3 H, T ^{β} , **CH₂-Fmoc**), 4.32 – 4.21 (m, 3 H, T ^{α} , **H5**, **H9-Fmoc**), 4.10 (d, $J_{\text{H6,H5}} = 6.5$ Hz, 2 H, **H6a/b**), 3.62 (dd, $J_{\text{H2,H3}} = 11.2$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.7$ Hz, 1 H, **H2**), 2.13, 2.06, 2.03 (3 \times s, 9 H, 3 \times **CH₃-OAc**), 1.53 (s, 9 H, C(**CH₃)₃-Ester), 1.34 (d, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, T ^{γ}) ppm.**

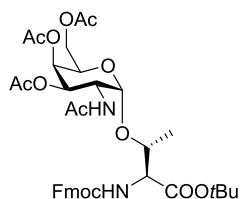
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.6, 170.2, 170.1$ (3 \times C=O-OAc, C=O-NHAc), 169.4 (C=O-Ester), 157.1 (C=O-Fmoc), 144.1 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.3 (C2-, C7-Fmoc), 125.5 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 99.4 (C1), 83.1 (C(CH₃)₃-Ester), 76.4 (T ^{β}), 68.3 (C3), 67.8 (C4, CH₂-Fmoc), 67.4 (C5), 62.0 (C6), 59.4 (T ^{α}), 58.0 (C2), 47.4 (C9-Fmoc), 28.2 (C(CH₃)₃-Ester), 20.9 (3 \times CH₃-OAc), 19.2 (T ^{γ}) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 24 von 35 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[154]

5.2.10 Synthese von *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 (**16**)^[137]

(*N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalNAc)-OtBu)



In 240 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (3:2:1) wurden 1.80 g (2.53 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalN₃)-OtBu **4** gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1.70 g (25.3 mmol, 10 Äquiv.) aktivierter Zink-Staub² gegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz mit 100 mL Tetrahydrofuran verdünnt und durch *Hyflo*[®] filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt und anschließend fünfmal mit je 100 mL Toluol und zweimal mit je 100 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 200 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 1:1) gereinigt.

Man erhielt 1.53 g (2.10 mmol, 83%) *N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalNAc)-OtBu **16** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 1:1) = 0.11.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +64.4$ (Lit.: $[\alpha]_D^{22} = (1.03, \text{CHCl}_3) = +63.4$).^[367]

Masse/Molekulargewicht: C₃₇H₄₆N₂O₁₃ (726.78 g/mol) [726.3000].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 727.3080 ([M+H]⁺, ber.: 727.3073), 749.2896 ([M+Na]⁺, ber.: 749.2892).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.77$ (d, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, 2 H, **H4**-, **H5**-Fmoc), 7.64 (d, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.7$ Hz, 2 H, **H1**-, **H8**-Fmoc), 7.43 – 7.38 (m, 2 H, **H3**-, **H6**-Fmoc), 7.37 – 7.29 (m, 2 H, **H2**-, **H7**-Fmoc), 5.99 (d, $J_{\text{NH,H2}} = 9.8$ Hz, 1 H, **NH**-Ac), 5.57 (d, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 9.4$ Hz, 1 H, **NH**-Fmoc), 5.39 (d, $J_{\text{H4,H3}} = 2.4$ Hz, 1 H, **H4**), 5.09 (dd, $J_{\text{H3,H2}} = 11.3$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.0$ Hz, 1 H, **H3**), 4.88 (d, $J_{\text{H1,H2}} = 3.7$ Hz, 1 H, **H1**), 4.61 (td, $J_{\text{H2,H3}} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.0$ Hz, 1 H, **H2**), 4.51 – 4.36 (m, 2 H, **CH**₂-Fmoc), 4.29 – 4.15 (m, 4 H, **H5**, **H9**-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 4.15 – 4.04 (m, 2 H, **H6a/b**), 2.16, 2.04, 2.03, 1.99 (4 \times s, 12 H, **CH**₃-OAc, **CH**₃-NHAc), 1.46 (s, 9 H, C(**CH**₃)₃-Ester), 1.32 (d, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T ^{γ}) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.1$ (C=O-NHAc), 170.5, 170.4 (3 \times C=O-OAc), 170.1 (C=O-Ester), 156.6 (C=O-Fmoc), 143.9 (C1a, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.3 (C2-, C7-Fmoc), 125.3, 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 100.1 (C1), 83.4 (C(CH₃)₃-Ester), 77.4 (T ^{β}),

² Aktiviert wurde der Zink-Staub durch Waschen mit einer 2%ige Kupfersulfat-Lösung (2.84 g in 80 mL dest. Wasser) danach mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether.

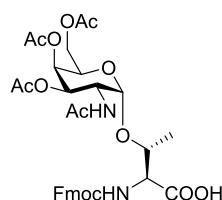
68.8 (C3), 67.5, 67.4 (CH₂-Fmoc, C4, C5), 62.3 (C6), 59.0 (T^α), 47.4 (C2), 47.3 (C9-Fmoc), 28.2 (C(CH₃)₃-Ester), 23.4, 21.2, 20.9, 20.8 (CH₃-NHAc, 3 × CH₃-OAc), 18.7 (T^γ) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 28 von 37 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[137, 368]

5.2.11 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (**1**)^[370]

(*N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalNAc)-OH)



Bei 0 °C wurden 1.00 g *N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalNAc)-OtBu **16** in 8.0 mL Toluol und 0.8 mL Anisol gelöst. Danach wurden vorsichtig 8 mL Trifluoressigsäure in den Reaktionsansatz getropft. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur 4 h gerührt, bevor 25 mL Toluol zugesetzt wurden. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc/AcOH = 10:10:1) gereinigt.

Man erhielt 920 mg (quant.) *N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalNAc)-OH **1** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc/AcOH = 10:10:1) = 0.26.

HPLC (0 min: 4% MeCN + 0.1% TFA, 96% H₂O + 0.1% TFA → 15min: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flussrate: 1 mL/min): t_R = 14.84 min, λ = 214 nm.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +64.0$ (Lit.: $[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +63.7$).^[419]

Masse/Molekulargewicht: C₃₃H₃₈N₂O₁₃ (670.67 g/mol) [670.2374].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 671.2448 ([M+H]⁺, ber.: 671.2452), 688.2717 ([M+NH₄]⁺, ber.: 688.2712).

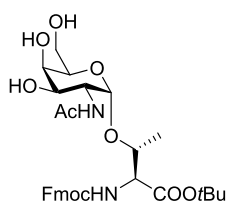
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃): δ = 7.77 – 7.71 (m, 2 H, **H4**-, **H5-Fmoc**), 7.61 (d, $J_{H1,H2} = 7.4$ Hz, 1 H, **H1-Fmoc**), 7.50 – 7.46 (m, 1 H, **H8-Fmoc**), 7.41 – 7.34 (m, 2 H, **H3**-, **H6-Fmoc**), 7.32 – 7.27 (m, 2 H, **H2**-, **H7-Fmoc**), 6.16 – 6.06 (m, 1 H, **NH-Ac**), 5.98 – 5.86 (m, 1 H, **NH-Fmoc**), 5.40 – 5.23 (m, 1 H, **H4**), 5.17 – 5.10 (m, 1 H, **H3**), 5.03 (d, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, 1 H, **H1**), 4.97 (d, $J_{H1^*,H2} = 3.8$ Hz, 1 H, **H1***), 4.65 – 4.60 (m, 1 H, **CH₂-Fmoc***), 4.59 – 4.52 (m, 1 H, **CH₂-Fmoc**), 4.52 – 4.45 (m, 3 H, **CH₂-Fmoc**, T^α, **H2**), 4.45 – 4.27 (m, 5 H, T^β, **H2***, T^{β*}, **CH₂-Fmoc***), 4.27 – 4.15 (m, 3 H, **H9-Fmoc**, **H9-Fmoc***, **H5**), 4.15 – 4.03 (m, 2 H, **H6a/b**), 2.16, 2.04, 2.02, 1.97 (4 × s, 12 H, **CH₃-OAc**, **CH₃-NHAc**), 1.32 – 1.17 (m, 3 H, T^γ, T^{γ*}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.0, 170.5$ ($3 \times \text{C=O-OAc}, \text{C=O-NHAc}, \text{COOH}$), 156.8 (C=O-Fmoc), 143.8 ($\text{C1a-}, \text{C8a-Fmoc}$), 141.5 ($\text{C4a-}, \text{C5a-Fmoc}$), 127.9 ($\text{C3-}, \text{C6-Fmoc}$), 127.2 ($\text{C2-}, \text{C7-Fmoc}$), 125.1 (C1-Fmoc), 124.8 (C8-Fmoc), $120.2, 120.1$ ($\text{C4-}, \text{C5-Fmoc}$), 99.6 (C1), 98.9 (C1^*), 77.5 (T^β), 75.8 ($\text{T}^{\beta*}$), 67.9 (C3), 67.4 ($\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 67.2 (C4), 67.1 ($\text{C5}, \text{CH}_2\text{-Fmoc}^*$), 62.1 (C6), 58.7 (T^α), 48.7 (C2^*), 48.1 (C2), 47.4 (C9-Fmoc), 47.1 (C9-Fmoc^*), 22.8 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), $20.8, 20.7, 20.6$ ($3 \times \text{CH}_3\text{-OAc}$), 18.5 (T^γ), 18.2 (T^γ) ppm.

Aufgrund mehrerer Konformere kommt es teilweise zu einer Signalüberlappung. Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[355]

5.2.12 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -*D*-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**17**)^[367,370]

(*N*-Fmoc-Thr-(α -GalNAc)-*O*tBu)



Eine Lösung aus 5.50 g (7.57 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Fmoc-Thr-(α -Ac₃GalNAc)-*O*tBu **16** in 50 mL absol. Methanol wurde unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes tropfenweise mit einer frisch hergestellten 1%igen methanolischen Natriummethanolat-Lösung versetzt, bis ein pH-Wert von 8.5 erreicht wurde. Der Reaktionsansatz wurde 12 h gerührt, wobei der pH-Wert in Abständen von 30 min kontrolliert und gegebenenfalls nachreguliert wurde. Nach vollständiger Deacetylierung wurde mit verdünnter Essigsäure (1 M) neutralisiert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde fünfmal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($\text{C}^{\text{Hex}}/\text{EtOAc}/\text{AcOH} = 10:10:1$) gereinigt.

Man erhielt 4.48 g (7.46 mmol, 98%) *N*-Fmoc-Thr-(α -GalNAc)-*O*tBu **17** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (EtOAc) = 0.09.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +39.4$ (Lit.: $[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +40.2$).^[367]

Masse/Molekulargewicht: $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (600.67 g/mol) [600.2683].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 601.2756 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 601.2756), 623.2582 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 623.2575).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.75$ (d, $J_{\text{H4},\text{H3}} = J_{\text{H5},\text{H6}} = 7.6$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.60 (d, $J_{\text{H1},\text{H2}} = J_{\text{H8},\text{H7}} = 7.7$ Hz, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.39 (t, $J_{\text{H3},\text{H2/4}} = J_{\text{H6},\text{H4/7}} = 7.3$ Hz, 2 H, **H3-**, **H6-Fmoc**), 7.30 (t, $J_{\text{H2},\text{H1/3}} = J_{\text{H7},\text{H6/8}} = 7.6$ Hz, 2 H, **H2-**, **H7-Fmoc**), 6.87 (d, $J_{\text{NH},\text{H2}} = 8.2$ Hz, 1 H, **NH-Ac**), 5.81 (d, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.5$ Hz, 1 H, **NH-Fmoc**), 4.87 (d, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 3.8$ Hz, 1 H, **H1**), $4.52 - 4.34$ (m, 2 H, **CH}_2\text{-Fmoc}**), $4.33 - 4.20$ (m, 3 H, **H9-Fmoc**, T^α , **H2**), $4.18 - 4.00$ (m, 2 H, **H4**, T^β), $3.93 - 3.78$ (m, 4 H, **H3**, **H5**, **H6a/b**), 2.10 (s, 3 H, **CH}_3\text{-NHAc}**), 1.44 (s, 9 H, **C(CH}_3\text{)}_3\text{-Ester}**), 1.29 (d, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, T^γ) ppm.

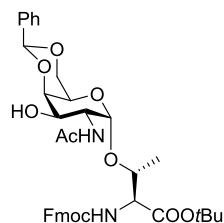
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.8$ (C=O-NHAc), 171.0 (C=O-Ester), 156.7 (C=O-Fmoc), 143.9, 143.8 (C1a, C8a-Fmoc), 141.4 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.2 (C1-, C8-Fmoc), 120.1 (C4-, C5-Fmoc), 99.7 (C1), 83.4 (C(CH₃)₃-Ester), 76.6 (T ^{β}), 70.9 (C3), 70.2 (C5), 69.6 (C4), 67.3 (CH₂-Fmoc), 62.6 (C6), 59.1 (T ^{α}), 50.9 (C2), 47.3 (C9-Fmoc), 28.0 (C(CH₃)₃-Ester), 23.1 (CH₃-NHAc), 19.0 (T ^{γ}) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im $^{13}\text{C-NMR}$ werden nur 24 von 31 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[367]

5.2.13 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-*L*-threonin-*tert*-butylester (**8**)^[76, 370]

(*N*-Fmoc-Thr-(α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu)



Eine Lösung von 3.80 g (6.32 mmol, 1.0 Äquiv.) *Fmoc*-Thr-(α GalNAc)-*Ot*Bu **17** und 1.89 mL (1.90 g, 12.7 mmol, 2.0 Äquiv.) Benzaldehyddimethylacetal wurde mit 125 mL Acetonitril (HPLC grade) versetzt. Anschließend wurden drei Spatelspitzen *p*-Toluolsulfonsäure zum Reaktionsansatz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 40 °C und 200 mbar 3.5 h gerührt. Nach Zugabe von 0.3 mL Triethylamin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($\text{C}^{\text{Hex}}/\text{EtOAc} = 1:4$).

Man erhielt 3.66 g (5.31 mmol, 84%) *Fmoc*-Thr-(α -4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*Ot*Bu **8** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f ($\text{C}^{\text{Hex}}/\text{EtOAc} = 1:4$) = 0.40.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +65.4$ (Lit.: $[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +64.4$).^[420]

Masse/Molekulargewicht: C₃₈H₄₄N₂O₁₀ (688.77 g/mol) [688.2996].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 689.3068 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 689.3069), 711.3379 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 711.2888).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.76$ (d, $J_{\text{H4},\text{H3}} = J_{\text{H5},\text{H6}} = 7.5$ Hz, 2 H, **H4**-, **H5**-Fmoc), 7.64 – 7.61 (m, 2 H, **H1**-, **H8**-Fmoc), 7.53 – 7.51 (m, 2 H, **H**_{ar}-Bn), 7.44 – 7.40 (m, 2 H, **H3**-, **H6**-Fmoc), 7.39 – 7.31 (m, 5 H, 3 × **H**_{ar}-Bn, **H2**-, **H7**-Fmoc), 6.47 (d, $J_{\text{NH},\text{H2}} = 8.3$ Hz, 1 H, **NH**-GalNAc), 5.58 (s, 1 H, **CH**-Bn), 5.41 (d, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 9.6$ Hz, 1 H, **NH**-Fmoc), 4.96 (d, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 3.2$ Hz, 1 H, **H1**), 4.53 – 4.47 (m, 3 H, **H2**, **CH**₂-Fmoc), 4.29 – 4.07 (m, 6 H, **H4**, **H6**_{a/b}, **H9**-Fmoc, T ^{α} , T ^{β}), 3.88 – 3.86 (m, 1 H, **H3**), 3.73 (bs, 1 H, **H5**), 2.09 (s, 3 H, **CH**₃-OAc), 1.48 (s, 9 H, C(CH₃)₃-Ester), 1.30 (d, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T ^{γ}) ppm.

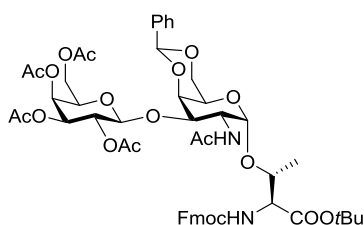
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.6$ (C=O-NHAc), 171.0 (C=O-Ester), 156.5 (C=O-Fmoc), 143.9, 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.6 (C_q-Bn), 129.3, 128.4 (C_{ar}-Bn), 128.0 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 126.5 (C_{ar}-Bn), 125.1 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 101.4 (CH-Bn), 100.6 (C1), 83.6 (C_q-tBu), 76.9 (T^β), 75.7 (C4), 70.1 (C3), 69.3 (C6), 67.4 (CH₂-Fmoc), 63.9 (C5), 59.0 (T^α), 50.7 (C2), 47.4 (C9-Fmoc), 28.3 (C(CH₃)₃-Ester), 23.2 (CH₃-OAc), 19.2 (T^γ) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im $^{13}\text{C-NMR}$ werden nur 29 von 38 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[76, 370, 420]

5.2.14 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-*O*-benzyliden-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**18**)^[137, 143]

(*N*-Fmoc-Thr-([β Ac₄Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O*tBu)



Eine Suspension von 1.80 g (2.61 mmol, 1.0 Äquiv.) *Fmoc*-Thr-(α 4,6-*O*-Bzn-GalNAc)-*O*tBu **8** und 1.5 g Molsieb (4 Å) in 30 mL absol. Nitromethan/Dichlormethan (3:2) wurde unter Argonatmosphäre 1 h gerührt. Anschließend wurden 1.31 g (5.22 mmol, 2.0 Äquiv.) Quecksilbercyanid zugegeben, bevor 3.22 g (7.84 mmol, 3.0 Äquiv.) α/β -Ac₄GalBr **7**, gelöst in 10 mL absol. Nitromethan/Dichlormethan (3:2), zutropft wurden. Der Reaktionsansatz wurde 21 h bei Raumtemperatur gerührt, durch *Hyflo*[®] filtriert und mit 50 mL Dichlormethan gewaschen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 50 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 1:1).

Man erhielt 1.26 g (1.24 mmol, 69%) *Fmoc*-Thr-([β Ac₄Gal-(1→3)]- α -GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O*tBu **18** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 1:2) = 0.44.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +70.8$.

Masse/Molekulargewicht: C₅₂H₆₂N₂O₁₉ (1019.06 g/mol) [1018.3947].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 1019.4013 ([M+H]⁺, ber.: 1019.4020), 1036.4272 ([M+NH₄]⁺, ber.: 1036.4285), 1041.3832 ([M+Na]⁺, ber.: 1041.3839).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.78$ (d, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.5$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.62 (d, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 8.3$ Hz, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.56 – 7.51 (m, 2 H, H_{ar}-Bn), 7.45 – 7.29 (m, 7 H, **H3-**, **H6-Fmoc**, H_{ar}-

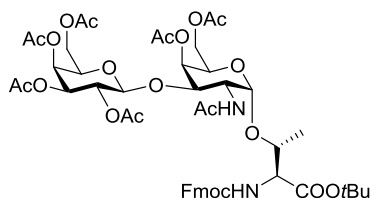
Bn, **H2**-, **H7-Fmoc**), 5.84 (d, $J_{\text{NH,H2}} = 9.4$ Hz, 1 H, **NH-Ac**), 5.73 (d, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 10.1$ Hz, 1 H, **NH-Fmoc**), 5.56 (s, 1 H, **CH-Bn**), 5.39 (d, $J_{\text{H4',H3'}} = 3.2$ Hz, 1 H, **H4'**), 5.23 – 5.16 (m, 1 H, **H2'**), 5.00 – 4.92 (m, 2 H, **H3'** {4.98}, **H1** {4.94}), 4.75 – 4.64 (m, 2 H, **H1'** {4.73}, **H2** {4.68}), 4.58 – 4.45 (m, 2 H, **CH₂-Fmoc**), 4.30 – 4.18 (m, 6 H, **H4** {4.28}, **H9-Fmoc** {4.25}, **T^{\alpha}** {4.23}, **H6a'** {4.22}, **H6a** {4.21}, **T^{\beta}** {4.21}), 4.16 – 4.01 (m, 2 H, **H6b** {4.06}, **H6b'** {4.08}), 3.94 – 3.84 (m, 2 H, **H5'** {3.90}, **H3** {3.88}), 3.68 (bs, 1 H, **H5**), 2.17, 2.14, 2.06, 2.03, 2.01 (5 × s, 15 H, **CH₃-OAc**, **CH₃-NHAc**), 1.45 (s, 9 H, **C(CH₃)₃-Ester**), 1.30 – 1.24 (m, 3 H, **T^{\gamma}**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.9$ (C=O-NHAc), 170.6, 170.3, 169.9, 169.6, (5 × C=O-OAc, C=O-Ester), 156.6 (C=O-Fmoc), 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 137.7 (C_q-Bn), 129.0 (C_{ar}-Bn), 128.3 (C3-, C6-Fmoc), 127.9 (C_{ar}-Bn), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 126.3 (C_{ar}-Bn), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 101.4 (C1'), 100.8 (CH-Bn), 100.5 (C1), 83.3 (C(CH₃)₃-Ester), 77.4 (T^{\beta}), 75.7 (C4), 74.4 (C3), 71.0 (C5', C3'), 69.2 (C6), 68.8 (C2'), 67.1 (C4'), 67.0 (CH₂-Fmoc), 63.8 (C5), 61.4 (C6'), 59.2 (T^{\alpha}), 47.9 (C2), 47.3 (C9-Fmoc), 28.2 (C(CH₃)₃-Ester), 23.6 (CH₃-NHAc), 21.1, 20.9, 20.8, 20.7 (4 × CH₃-OAc), 19.1 (T^{\gamma}) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 40 von 52 Signalen beobachtet.

5.2.15 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin-*tert*-butylester (**19**)^[370, 374]

(*N*-Fmoc-Thr-([β Ac₄Gal-(1→3)]- α -Ac₂GalNAc)-*O*tBu)



Eine Lösung bestehend aus 1.98 g (1.94 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Fmoc-Thr-([β Ac₄Gal-(1→3)]- α GalNAc-4,6-*O*-Bn)-*O*tBu **18** in 100 mL 90%iger Essigsäure wurde 4 h bei 80 °C zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kdestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung sofort weiter umgesetzt. Dazu wurde dieses in 50 mL eines Lösungsmittelgemisches aus Pyridin/Essigsäureanhydrid (2:1) gelöst und mit einer Spatelspitze an Dimethylaminopyridin versetzt und 18 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde erneut fünfmal mit je 50 mL Toluol und zweimal mit je 50 mL Dichlormethan kdestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (C₆Hex/EtOAc = 1:2) gereinigt.

Man erhielt 1.58 g (1.55 mmol, 80%) *N*-Fmoc-Thr-([β Ac₄Gal-(1→3)]- α Ac₂GalNAc)-*O*tBu **19** als farblosen amorphen Feststoff über zwei Stufen.

R_f (C₆Hex/EtOAc = 1:2) = 0.24.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +47.0$ (Lit.: $[\alpha]_D^{23} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +46.6$).^[374]

Smp: 120.7 °C.

Masse/Molekulargewicht: C₄₉H₆₂N₂O₂₁ (1015.03 g/mol) [1014.3845].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 1015.3908 ([M+H]⁺, ber.: 1015.3918), 1037.3729 ([M+Na]⁺, ber.: 1037.3737).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.78$ (d, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.6$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.61 (d, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.0$ Hz, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.42 (t, $J_{\text{H3,H2/4}} = J_{\text{H6,H4/7}} = 7.7$ Hz, 2 H, **H3-**, **H6-Fmoc**), 7.32 (t, $J_{\text{H2,H1/3}} = J_{\text{H7,H6/8}} = 7.9$ Hz, 2 H, **H2-**, **H7-Fmoc**), 5.85 (d, $J_{\text{NH,H2}} = 9.4$ Hz, 1 H, **NH-Ac**), 5.41 (d, $J_{\text{NH,T}\alpha} = 8.2$ Hz, 1 H, **NH-Fmoc**), 5.39 – 5.31 (m, 2 H, **H4**, **H4'**), 5.09 (dd, $J_{\text{H2,H1}} = 7.6$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 10.5$ Hz, 1 H, **H2'**), 4.94 (dd, $J_{\text{H3',H2'}} = 10.9$ Hz, $J_{\text{H3',H4'}} = 2.6$ Hz, 1 H, **H3'**), 4.83 (d, $J_{\text{H1,H2}} = 2.9$ Hz, 1 H, **H1**), 4.60 – 4.45 (m, 4 H, **H2**, **H1'**, **CH₂-Fmoc**), 4.30 – 4.21 (m, 2 H, **H9-Fmoc**, T ^{α}), 4.21 – 4.05 (m, 5 H, T ^{β} , **H3**, **H6a**, **H6a,b'**), 3.99 (dd, $J_{\text{H6b,H6a}} = 10.9$ Hz, $J_{\text{H6b,H5}} = 7.0$ Hz, 1 H, **H6b**), 3.91 – 3.84 (m, 1 H, **H5'**), 3.82 – 3.75 (m, 1 H, **H5**), 2.15, 2.13, 2.06, 2.05, 2.01, 1.97 (7 \times s, 21 H, 6 \times **CH₃-OAc**, **CH₃-NHAc**), 1.46 (s, 9 H, C(**CH₃**)₃-Ester), 1.29 (d, $J_{\text{T}\gamma,\text{T}\beta} = 4.7$ Hz, 3 H, T ^{γ}) ppm.

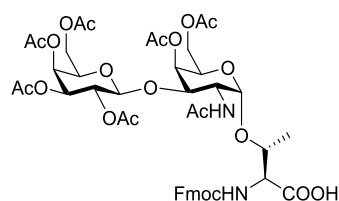
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.6, 170.5, 170.3, 170.0, 169.6$, (6 \times C=O-OAc, C=O-NHAc, C=O-Ester), 156.5 (C=O-Fmoc), 143.8 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 128.0 (C3-, C6-Fmoc), 127.2 (C2-, C7-Fmoc), 125.0 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 101.1 (C1'), 100.2 (C1), 83.4 (C(CH₃)₃-Ester), 77.4 (T ^{β}), 73.5 (C5), 70.9 (C3'), 70.8 (C5'), 69.2 (C4), 68.8 (C2'), 68.1 (C3), 67.1 (CH₂-Fmoc), 66.9 (C4'), 63.1 (C6), 61.1 (C6'), 59.1 (T ^{α}), 48.5 (C2), 47.4 (C9-Fmoc), 28.2 (C(CH₃-Ester), 23.6 (CH₃-NHAc), 20.9, 20.8 (6 \times CH₃-OAc), 18.7 (T ^{γ}) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 34 von 49 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[374]

5.2.16 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (2)^[374]

(*N*-Fmoc-Thr-([β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-OH)



Bei 0 °C wurden 1.00 g (0.98 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Fmoc-Thr-([β Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)]- α -Ac₂GalNAc)-*O*tBu **19** in 8.0 mL Toluol und 0.8 mL Anisol gelöst. Danach wurden vorsichtig 8 mL Trifluoressigsäure in den Reaktionsansatz getropft. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur 4 h gerührt, bevor 25 mL Toluol zugesetzt wurden. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (C₆Hex/EtOAc/AcOH = 10:10:1) gereinigt.

Man erhielt 940 mg (quant.) *N-Fmoc-Thr*-([βAc₄Gal-(1→3)]-α Ac₂GalNAc)-OH **2** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc = 100:4:1) = 0.17.

HPLC (0 min: 4% MeCN + 0.1% TFA, 96% H₂O + 0.1% TFA → 15min: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flussrate: 1 mL/min): t_R = 15.49 min, λ = 214 nm.

$[\alpha]_D^{22}$ = (1.00, CHCl₃) = +67.6 (Lit.: $[\alpha]_D^{22}$ = (1.00, CHCl₃) = +69.2).^[419]

Smp: 134.6 °C.

Masse/Molekulargewicht: C₄₅H₅₄N₂O₂₁ (958.91 g/mol) [958.3219].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 959.3309 ([M+H]⁺, ber.: 959.3292), 976.3570 ([M+NH₄]⁺, ber.: 976.3557), 981.3107 ([M+Na]⁺, ber.: 981.3111).

HR ESI-MS (negativ), m/z: 957.3136 ([M-H]⁻, ber.: 957.3146).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.78 (d, $J_{H4,H3}$ = $J_{H5,H6}$ = 7.5 Hz, 2 H, **H4**-, **H5-Fmoc**), 7.62 (d, $J_{H1,H2}$ = $J_{H8,H7}$ = 8.1 Hz, 2 H, **H1**-, **H8-Fmoc**), 7.41 (t, $J_{H3,H2/4}$ = $J_{H6,H4/7}$ = 7.5 Hz, 2 H, **H3**-, **H6-Fmoc**), 7.32 (t, $J_{H2,H1/3}$ = $J_{H7,H6/8}$ = 7.2 Hz, 2 H, **H2**-, **H7-Fmoc**), 6.07 (d, $J_{NH,H2}$ = 8.7 Hz, 1 H, **NH-Ac**), 5.59 – 5.52 (m, 1 H, **NH-Fmoc**), 5.39 – 5.33 (m, 2 H, **H4**, **H4'**), 5.12 – 5.04 (m, 1 H, **H2'**), 5.00 (d, $J_{H1,H2}$ = 3.0 Hz, 1 H, **H1**), 4.95 (dd, $J_{H3',H2'}$ = 10.5 Hz, $J_{H3',H4'}$ = 3.1 Hz, 1 H, **H3'**), 4.57 (d, $J_{H1',H2'}$ = 7.8 Hz, 1 H, **H1'**), 4.52 (d, $J_{CH_2,CH}$ = 6.7 Hz, 2 H, **CH₂-Fmoc**), 4.44 – 4.33 (m, 3 H, **H2**, T^β, T^α), 4.29 – 4.07 (m, 5 H, **H9-Fmoc**, **H3**, **H6a**, **H6a,b'**), 4.04 – 3.93 (m, 1 H, **H6b**), 3.91 – 3.74 (m, 2 H, **H5**, **H5'**), 2.15, 2.12, 2.06, 2.04, 2.00, 1.97, 1.93 (7 × s, 21 H, 6 × **CH₃-OAc**, **CH₃-NHAc**), 1.29 (d, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.2 Hz, 3 H, T^γ) ppm.

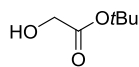
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.3 (**COOH**), 170.7, 170.6, 170.5, 170.4, 170.2, 169.9, 169.5 (6 × **C=O-OAc**, **C=O-NHAc**), 156.7 (**C=O-Fmoc**), 143.9, 143.8 (**C1a**-, **C8a-Fmoc**), 141.5 (**C4a**-, **C5a-Fmoc**), 128.0 (**C3**-, **C6-Fmoc**), 127.3 (**C2**-, **C7-Fmoc**), 125.1 (**C1**-, **C8-Fmoc**), 120.3, 120.2 (**C4**-, **C5-Fmoc**), 100.5 (**C1'**), 99.7 (**C1**), 77.4 (T^β), 72.7 (**C5**), 71.0 (**C5'**), 70.7 (**C3'**), 69.0 (**C2'**), 68.8 (**C4**), 67.9 (**C3**), 67.1 (**CH₂-Fmoc**), 66.9 (**C4'**), 63.0 (**C6**), 61.1 (**C6'**), 58.6 (T^α), 49.2 (**C2**), 47.3 (**C9-Fmoc**), 23.0 (**CH₃-NHAc**), 20.9, 20.8, 20.7, 20.2 (6 × **CH₃-OAc**), 18.5 (T^γ) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 39 von 45 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[374]

5.3 Synthesevorschriften des α -AA-T-Mimetikum Festphasenbausteins

5.3.1 Synthese von 2-Hydroxyessigsäure-*tert*-butylester (**24**)^[375]



Zu einer Mischung aus 5.00 g Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid **22** (29.9 mmol, 1.0 Äquiv.) und 3.09 g Natriumnitrit (44.8 mmol, 1.5 Äquiv.) in 25 mL Wasser und 25 mL Dichlormethan wurde unter starkem Rühren bei 0 °C über 30 min tropfenweise eine Lösung aus 1.22 g (14.9 mmol, 0.5 Äquiv.) Natriumacetat und 1 mL konzentrierter Schwefelsäure in 10 mL Wasser gegeben. Nach vollständiger Zugabe, wurde der Reaktionsansatz 30 min bei 0 °C gerührt, anschließend auf Raumtemperatur gebracht und die organische Phase abgetrennt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung erneut mit 25 mL Dichlormethan versetzt und zur Reaktion gebracht. Innerhalb eines Zeitraumes von 4 h wurde die organische Phase viermal abgetrennt und wieder mit 25 mL Dichlormethan versetzt, bis diese farblos war. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit je 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit 4 mL Schwefelsäure (0.5 M) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden weitere 4 mL Schwefelsäure (0.5 M) hinzugefügt, bevor weitere 7 h bei Raumtemperatur gerührt wurde. Die Reaktionsmischung wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und die wässrige Phase wurde mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Man erhielt 2.63 g (19.9 mmol, 67%) 2-Hydroxyessigsäure-*tert*-butylester **24** als blass gelbes Öl über zwei Stufen.

Masse/Molekulargewicht: C₆H₁₂O₃ (132.16 g/mol) [132.0786].

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ = 3.86 (s, 2 H, CH₂), 1.41 (s, 9 H, C(CH₃)₃-Ester) ppm.

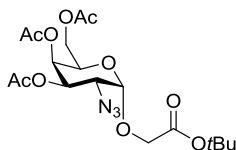
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-D₆): δ = 171.9 (C=O-Ester), 80.0 (C(CH₃)₃-Ester), 60.1 (CH₂), 27.8 (CH₃-*t*Bu) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 4 von 6 Signalen beobachtet.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[375, 421, 422]

5.3.2 Synthese von *O*-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure-*tert*-butylester (**25**)

(α -Ac₃GalN₃-O-CH₂-CO-*Ot*Bu)



Alle Edukte sowie die Reagenzien wurden unter Lichtausschluss im Vakuum getrocknet. Die verwendeten Lösungsmittel wurden im Vorfeld frisch destilliert. Eine Suspension aus 2.63 g (19 mmol, 2.1 Äquiv.) Hydroxyessigsäure-*tert*-butylester **24**, 2.0 g aktiviertem Molsieb (3 Å) und 80 mL absol. Toluol/absol. Dichlormethan (1:1) wurden eine Stunde unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz 3.46 g (12.5 mmol, 1.4 Äquiv.) Silbercarbonat, sowie 480 mg (2.13 mmol, 0.3 Äquiv.) Silberperchlorat bei 0 °C zugefügt und es wurden weitere 30 min. gerührt. Unter Lichtausschluss wurde eine Lösung aus 3.11 g (8.89 mmol, 1.0 Äquiv.) 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosylchlorid (**15**) in 80 mL absol. Toluol/Dichlormethan (1:1) langsam hinzugegeben. Nachdem 3 d bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde der Reaktionsansatz durch *Hyflo*[®] filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 2:1) gereinigt.

Man erhielt 1.92 g (4.31 mmol, 49%) *O*-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galacto-pyranosyl)-2-hydroxyessigsäure *tert*-butylester **25** als farbloses, zähflüssiges Öl.

R_f (^CHex/EtOAc = 2:1) = 0.43.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +109.6$ (Lit.: $[\alpha]_D^{20} = (1.15, \text{CHCl}_3) = -9.0$).^[355]

Masse/Molekulargewicht: C₁₈H₂₇N₃O₁₀ (445.42 g/mol) [445.1696].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 463.2039 ([M+NH₄]⁺, ber.: 463.2035), 468.1593 ([M+Na]⁺, ber.: 468.1589).

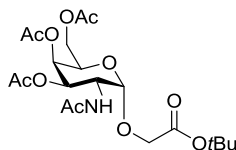
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.46$ (dd, $J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 1.3$ Hz, 1 H, **H4**), 5.41 (dd, $J_{\text{H3,H2}} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, 1 H, **H3**), 5.15 (d, $J_{\text{H1,H2}} = 3.5$ Hz, 1 H, **H1**), 4.35 (td, $J_{\text{H5,H6}} = 6.6$ Hz, $J_{\text{H5,H4}} = 1.3$ Hz, 1 H, **H5**), 4.17 (d, $J_{\text{O-CH2a, O-CH2b}} = 16.3$ Hz, 1 H, O-CH₂a), 4.08 (d, $J_{\text{O-CH2b, O-CH2a}} = 16.3$ Hz, 1 H, O-CH₂b), 4.08 (dd, $J_{\text{H6a,H6b}} = 11.0$ Hz, $J_{\text{H6a/b,H5}} = 6.6$ Hz, 2 H, **H6a/b**), 3.71 (dd, $J_{\text{H2,H3}} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H2,H3}} = 3.5$ Hz, 1 H, **H2**), 2.14, 2.05 (3 \times s, 9 H, 3 \times CH₃-OAc), 1.48 (s, 9 H, C(CH₃)₃-Ester) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.5, 170.1, 169.8$ (3 \times C=O-OAc), 168.2 (C=O-Ester), 98.0 (C1), 82.5 (C(CH₃)₃-Ester), 68.3 (C3), 67.7 (C4), 67.3 (C5), 64.8 (O-CH₂), 61.7 (C6), 57.4 (C2), 28.2 (CH₃-OAc), 20.8 (3 \times CH₃-OAc) ppm.

Aufgrund von Signalüberlappungen im ¹³C-NMR werden nur 14 von 18 Signalen beobachtet.

5.3.3 Synthese von *O*-(2-Acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure-*tert*-butylester (**26**)

(α -Ac₃GalNAc-O-CH₂-CO-COtBu)



In 180 mL einer Mischung aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (3:2:1) wurden 4.31 g (4.31 mmol, 1.0 Äquiv.) *O*-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galacto-pyranosyl)-2-hydroxyessigsäure-*tert*-butylester (**25**) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 2.93 g (44.8 mmol, 10 Äquiv.) aktivierter Zink-Staub³ gegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 20 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor mit 100 mL Tetrahydrofuran verdünnt und durch Hyflo[®] filtriert wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt und anschließend fünfmal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde in 80 mL Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit je 40 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 40 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^cHex/EtOAc = 1:1) gereinigt.

Man erhielt 1.67 g (3.62 mmol, 84%) α -Ac₃GalNAc-O-CH₂-CO-COtBu **26** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (EtOAc) = 0.45.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +98.9$.

Smp.: 141.3 °C.

Masse/Molekulargewicht: C₂₀H₃₁NO₁₁ (461.46 g/mol) [461.1897].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 484.1798 ([M+Na]⁺, ber.: 484.1789).

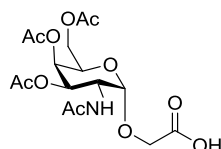
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.24 (d, $J_{\text{NH,H2}} = 9.6$ Hz, 1 H, **NH**), 5.37 (dd, $J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 1.3$ Hz, 1 H, **H4**), 5.18 (dd, $J_{\text{H3,H2}} = 11.3$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.2$ Hz, 1 H, **H3**), 4.86 (d, $J_{\text{H1,H2}} = 3.6$ Hz, 1 H, **H1**), 4.59 (ddd, $J_{\text{H2,H3}} = 11.1$ Hz, $J_{\text{H2,NH}} = 9.6$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.6$ Hz, 1 H, **H2**), 4.26 (td, $J_{\text{H5,H6}} = 6.6$ Hz, $J_{\text{H5,H4}} = 1.7$ Hz, 1 H, **H5**), 4.13 – 4.02 (m, 4 H, O-CH₂a/b, **H6a/b**), 2.15 (s, 3 H, **CH₃-NHAc**), 2.03, 1.99, 1.98 (3 \times s, 9 H, 3 \times **CH₃-OAc**), 1.46 (s, 9 H, **C(CH₃)₃-Ester**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 170.9, 170.7, 170.5, 170.4 (3 \times **C=O-OAc**, **C=O-NHAc**), 169.0 (**C=O-Ester**), 98.9 (**C1**), 82.6 (**C(CH₃)₃-Ester**), 68.5 (**C3**), 67.5 (**C4**, **C5**), 65.3 (**O-CH₂**), 61.9 (**C6**), 47.6 (**C2**), 28.2, 23.5, 20.9 (5 \times **CH₃-OAc**) ppm.

³ Aktiviert durch Waschen des Zink-Staubs mit einer 2%ige Kupfersulfat-Lösung (2.84 g in 80 mL dest. Wasser) danach mit Wasser, Essigsäureethylester und Diethylether.

5.3.4 Synthese von *O*-(2-Acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure (**21**)

(α -Ac₃GalNAc-O-CH₂-COOH)



Eine Lösung aus 598 mg (1.30 mmol, 1.0 Äquiv.) *O*-(2-Acetamido-3,4,5-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-hydroxyessigsäure-*tert*-butylester **26** in 11 mL Trifluoressig-säure/Anisol (10:1) wurde 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand fünfmal mit 20 mL Toluol, sowie zweimal mit 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das erhaltene Produkt **21** wurde direkt weiter umgesetzt.

R_f (EtOAc) = 0.16

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +72.4$.

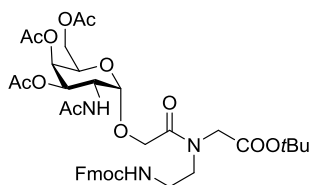
Masse/Molekulargewicht: C₁₆H₂₃NO₁₁ (405.35 g/mol) [405.1271].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 428.1469 ([M+Na]⁺, ber.: 428.1162).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.50 (d, $J_{\text{NH,H2}} = 9.4$ Hz, 1 H, **NH**), 5.39 (dd, $J_{\text{H4,H3}} = 3.3$ Hz, $J_{\text{H4,H5}} = 1.3$ Hz, 1 H, **H4**), 5.22 (dd, $J_{\text{H3,H2}} = 11.4$ Hz, $J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz, 1 H, **H3**), 4.95 (d, $J_{\text{H1,H2}} = 3.6$ Hz, 1 H, **H1**), 4.58 (ddd, $J_{\text{H2,H3}} = 11.4$ Hz, $J_{\text{H2,NH}} = 9.5$ Hz, $J_{\text{H2,H1}} = 3.6$ Hz, 1 H, **H2**), 4.29 – 4.26 (m, 1 H, **H5**), 4.13 – 4.08 (m, 4 H, O-CH₂a/b, H6a/b), 2.17 (s, 3 H, CH₃-NHAc), 2.05, 2.04, 2.00 (3 \times s, 9 H, 3 \times CH₃-OAc) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 172.3, 172.1, 171.1, 170.7, 170.5 (3 \times C=O-OAc, C=O-NHAc, C=O-Ester), 98.4 (C1), 68.2 (C3), 67.6 (C5), 67.4 (C4), 64.5 (O-CH₂), 61.9 (C6), 48.0 (C2), 23.1, 20.9, 20.9 (4 \times CH₃-OAc) ppm.

5.3.5 Synthese von *N*-((*N'*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-(*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyacetyl)-glycin-*tert*-butylester (**27**)



598 mg (1.30 mmol, 1.0 Äquiv.) *O*-(2-Acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure **21** wurden mit 1.32 g (3.90 mmol, 3.0 Äquiv.) *N*-((*N'*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid **20**, sowie 643 mg (1.69 mmol, 1.3 Äquiv.) HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5]-pyridinium-3-oxid hexafluorophosphat) und 230 mg (1.69 mmol, 1.3 Äquiv.) HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol) in 12 mL

Pyridin 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 20 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit je 15 mL Salzsäure (1 M), sowie einmal mit 15 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/MeOH = 20:1) gereinigt.

Man erhielt 0.83 g (1.05 mmol, 81%) **27** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (EtOAc) = 0.53.

HPLC (0 min: 4% MeCN + 0.1% TFA, 96% H₂O + 0.1% TFA → 15min: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flussrate: 1 mL/min): t_R = 17.29 min, λ = 214 nm.

$[\alpha]_D^{22}$ = (1.00, CHCl₃) = +45.4.

Smp.: 73.7 °C.

Masse/Molekulargewicht: C₃₉H₄₉N₃O₁₄ (783.82 g/mol) [783.3215].

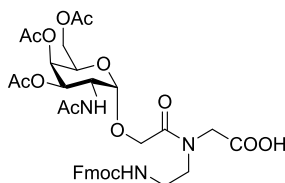
HR ESI-MS (positiv), m/z: 784.3308 ([M+H]⁺, ber.: 784.3287), 806.3130 ([M+Na]⁺, ber.: 806.3107).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.78 – 7.73 (m, 2 H, **H1**-, **H8-Fmoc**), 7.62 – 7.54 (m, 2 H, **H4**-, **H5-Fmoc**), 7.43 – 7.38 (m, 2 H, **H2**-, **H7-Fmoc**), 7.34 – 7.28 (m, 2 H, **H3**-, **H6-Fmoc**), 7.06 (d, $J_{NH,T\alpha}$ = 8.9 Hz, 1 H, **NH-Ac**), 6.92 (d, $J_{NH,T\alpha}$ = 9.2 Hz, 1 H, **NH-Ac** *), 5.97 – 5.93 (m, 1 H, **NH-Fmoc**), 5.41 – 5.39 (m, 1 H, **NH-Fmoc***), 5.37 (bs, 1 H, **H4**), 5.30 (bs, 1 H, **H4***), 5.20 – 5.17 (m, 1 H, **H3**), 4.85 (d, $J_{H1,H2}$ = 3.6 Hz, 1 H, **H1**), 4.70 (d, $J_{H1,H2}$ = 3.0 Hz, 1 H, **H1***), 4.61 – 4.55 (m, 1 H, **H2**), 4.53 – 4.46 (m, 1 H, **H2***), 4.40 – 4.33 (m, 3 H, **CH₂-Fmoc**, **O-CH_{2a}**), 4.32 – 4.26 (m, 1 H, **O-CH_{2a}**), 4.25 – 4.18 (m, 2 H, **H9-Fmoc**, **H5**), 4.09 – 4.04 (m, 4 H, **CH₂CH₂**, **H6a**), 3.97 – 3.84 (m, 4 H, **CH₂CH₂**, **H6b**), 3.37 (bs, 2 H, **CH₂-COOtBu**), 2.15, 2.14, 2.08, 2.04, 2.02, 1.99, 1.96 (s, 12 H, 3 × **CH₃-OAc**, **CH₃-NHAc**), 1.49, 1.48, 1.44 (s, 9 H, **C(CH₃)₃-Ester**) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 171.3, 170.9, 170.6, 170.5, 170.1, 169.7, 169.1, 168.2 (3 × **C=O-OAc**, **C=O-NHAc**, 2 × **C=O-Ester**), 156.8 (**C=O-Fmoc**), 144.0, 143.9, 143.8, 143.6 (**C1a**-, **C8a-Fmoc**), 141.4 (**C4a**-, **C5a-Fmoc**), 128.0, 127.9 (**C2**-, **C7-Fmoc**), 127.3, 127.2 (**C3**-, **C6-Fmoc**), 125.2, 125.0 (**C4**-, **C5-Fmoc**), 120.1 (**C1**-, **C8-Fmoc**), 99.8 (**C1**), 99.3 (**C1***), 83.9 (**C(CH₃)₃-Ester***), 82.9 (**C(CH₃)₃-Ester**), 68.8 (**C3**), 68.7 (**C3***), 67.5 (**C5**, **C4***), 67.4 (**C4**, **C5**), 66.9 (**CH₂-Fmoc**), 65.5 (**O-CH₂**), 61.9 (**C6**), 61.8 (**C6***), 49.9 (**CH₂CH₂**), 47.7 (**C2**), 47.6 (**C2***), 47.3 (**CH₂CH₂**, **C9-Fmoc**), 39.3 (**CH₂-COOtBu**), 39.2 (**CH₂-COOtBu***), 28.2 (**CH₃-tBu**), 23.3, 21.2, 20.9, 20.8 (4 × **CH₃-OAc**) ppm.

Die Spektren weisen zwei Rotamere auf. Diese werden durch einen Stern (*) voneinander abgegrenzt und liegen im Verhältnis 3.5:1 vor (berechnet anhand des Integralverhältnisses zwischen **H1** und **H1***).

5.3.6 Synthese von *N*-((*N*'-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-(*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galctopyranosyl)-2-hydroxyacetyl)-glycin (**3**)



Bei 0 °C wurden 100 mg (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) **27** in 0.8 mL Anisol gelöst. Danach wurden vorsichtig 8 mL Trifluoressigsäure in den Reaktionsansatz getropft. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur 1 h gerührt, bevor 25 mL Toluol zugesetzt wurden. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}/\text{AcOH} = 10:10:1$) gereinigt.

Man erhielt 92.8 mg (quant.) **3** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (EtOAc/MeOH) = 0.23.

HPLC (0 min: 4% MeCN + 0.1% TFA, 96% H₂O + 0.1% TFA → 15min: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flussrate: 1 mL/min): $t_R = 12.77$ min, $\lambda = 214$ nm.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = +48.4$.

Smp.: 112.6 °C.

Masse/Molekulargewicht: C₃₅H₄₁N₃O₁₄ (727.72 g/mol) [727.2589].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 728.2662 ([M+H]⁺, ber.: 728.2661).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.76 - 7.69$ (m, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.57 – 7.51 (m, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.41 – 7.33 (m, 2 H, **H2-**, **H7-Fmoc**), 7.32 – 7.25 (m, 2 H, **H3-**, **H6-Fmoc**), 6.88 (d, $J_{\text{NH},\text{T}\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, **NH-Ac**), 6.01 – 5.94 (m, 1 H, **NH-Fmoc**), 5.34 (bs, 1 H, **H4**), 5.18 – 5.12 (m, 1 H, **H3**), 4.87 (d, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 3.6$ Hz, 1 H, **H1**), 4.68 (d, $J_{\text{H1},\text{H2}} = 3.5$ Hz, 1 H, **H1***), 4.58 – 3.72 (m, 13 H, **H2*** {4.53}, **H2** {4.44}, **CH_{2a}-Fmoc** {4.40}, **O-CH_{2a}** {4.36}, **O-CH_{2a}** {4.32}, **CH_{2b}-Fmoc** {4.28}, **H9-Fmoc*** {4.22}, **CH_{2a}-COOH** {4.18}, **H9-Fmoc** {4.17}, **H5** {4.11}, **H6a** {4.07}, **H6b** {3.92}, **CH_{2b}-COOH** {3.82}), 3.63 – 3.20 (m, 4 H, **NHCH₂CH_{2b}** {3.47}, **NHCH_{2a}CH₂** {3.38}, **NHCH_{2a}CH₂**, **NHCH₂CH_{2a}** {3.27}), 2.13, 2.10, 2.03, 2.00, 1.95, 1.94 (6 × s, 12 H, 3 × **CH₃-OAc**, **CH₃-NHAc**) ppm.

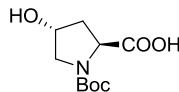
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 173.1, 172.0, 171.7, 171.3, 170.8, 170.6, 170.4, 170.3$ (3 × **C=O-OAc**, **C=O-NHAc**, 2 × **C=O-Ester**), 156.9 (**C=O-Fmoc**), 143.9 (**C1a-**, **C8a-Fmoc**), 141.4 (**C4a-**, **C5a-Fmoc**), 127.9 (**C2-**, **C7-Fmoc**), 127.3 (**C3-**, **C6-Fmoc**), 125.2 (**C4-**, **C5-Fmoc**), 120.1 (**C1-**, **C8-Fmoc**), 99.8 (**C1**), 99.3 (**C1***), 68.6 (**C3**), 68.5 (**C3***), 67.5 (**C5**), 67.4 (**C4**, **CH₂-Fmoc**), 65.7 (**O-CH₂**), 61.8 (**C6**), 49.2 (**CH₂-COOH**), 48.2 (**NHCH₂CH₂**), 48.1 (**C2**), 47.9 (**C2***), 47.3 (**C9-Fmoc***), 47.2 (**C9-Fmoc**), 39.2 (**NHCH₂CH₂**), 23.1, 22.7, 20.9 (4 × **CH₃-OAc**) ppm.

Die Spektren weisen zwei Rotamere auf. Diese werden durch einen Stern (*) voneinander abgegrenzt und liegen im Verhältnis 3.5:1 vor (berechnet anhand des Integralverhältnisses zwischen **H1** und **H1***).

5.4 Synthesevorschriften der F-Prolin Festphasenbausteine

5.4.1 Synthese von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (**50**)^[377-379]

(*N*-*Boc*-Hyp)



In 160 mL eines Gemisches aus 1,4-Dioxan und Wasser (2:1) wurden 10.0 g (76.3 mmol, 1.0 Äquiv.) *trans*-4-Hydroxy-L-prolin (**49**) gelöst und mit 120 mL einer verdünnten Natriumhydroxid-Lösung (1 M) versetzt. Nachdem der Reaktionsansatz auf 0 °C abgekühlt war, wurden unter Rühren 20.0 g (91.5 mmol, 1.2 Äquiv.) Di-*tert*-butyl-dicarbonat, gelöst in 31 mL 1,4-Dioxan, zutropft. Die Lösung wurde langsam binnen 24 h auf Raumtemperatur erwärmt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum auf 50 mL reduziert und der erhaltene Rückstand wurde in 200 mL Ethylacetat aufgenommen. Mit verdünnter Salzsäure (1 M) wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Man erhielt 13.1 g (56.6 mmol, 74%) *N*-*Boc*-Hyp **50** als farblosen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc = 1:2) = 0.06.

Masse/Molekulargewicht: C₁₀H₁₇NO₅ (231.25 g/mol) [231.1107].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 254.0998 ([M+Na]⁺, ber.: 254.1004).

HR ESI-MS (negativ), m/z: 230.1035 ([M-H]⁻, ber.: 230.1034).

N-*tert*-Butoxycarbonyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin **50** existiert als Gemisch zweier Konformere: K₁:K₂ = 2:1.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.47 (bs, 1 H, COOH), 5.03 (bs, 1 H, *H*_α), 4.23 (bs, 1 H, OH), 4.14 – 4.08 (m, 1 H, *H*_γ), 3.38 – 3.33 (m, 1 H, *H*_{δa}), 3.26 – 3.23 (m, 1 H, *H*_{δb}), 2.15 – 2.05 (m, 1 H, *H*_{βa}), 1.93 – 1.84 (m, 1 H, *H*_{βb}), 1.39, 1.34 (2 × s, 9 H, (CH₃)₃-*Boc*) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 174.3 (COOH, K₁), 173.8 (COOH, K₂), 153.7 (C=O-*Boc*, K₂), 153.2 (C=O-*Boc*, K₁), 78.7 (C(CH₃)₃-Ester), 68.5 (C_γ, K₂), 67.8 (C_γ, K₁), 57.7 (C_α, K₁), 57.4 (C_α, K₂), 54.7 (C_δ, K₂), 54.3 (C_δ, K₁), 38.7 (C_β, K₁), 38.0 (C_β, K₂), 28.1 (3 × (CH₃)₃-*Boc*, K₂), 27.9 (3 × (CH₃)₃-*Boc*, K₁) ppm.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 4.43 – 4.37 (m, 1 H, *H*_γ), 4.36 – 4.28 (m, 1 H, *H*_α), 3.57 – 3.50 (m, 1 H, *H*_{δa}), 3.48 – 3.40 (m, 1 H, *H*_{δb}), 2.33 – 2.23 (m, 1 H, *H*_{βa}), 2.11 – 2.03 (m, 1 H, *H*_{βb}), 1.47, 1.44 (2 × s, 9 H, (CH₃)₃-*Boc*) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 176.7 (COOH, K₁), 176.3 (COOH, K₂), 156.4 (C=O-*Boc*, K₂), 156.0 (C=O-*Boc*, K₁), 81.7 (C(CH₃)₃-Ester, K₁), 81.4 (C(CH₃)₃-Ester, K₂), 70.7 (C_γ, K₂), 70.1 (C_γ, K₁), 59.4 (C_α,

K₁), 58.9 (C_α, K₂), 55.9 (C_δ, K₂), 55.5 (C_δ, K₁), 40.1 (C_β, K₁), 39.4 (C_β, K₂), 28.7 (3 × (CH₃)₃-Boc, K₂), 28.5 (3 × (CH₃)₃-Boc, K₁) ppm.

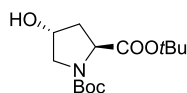
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 4.53 – 4.47 (m, 1 H, H_γ), 4.42 (t, J_{αH,βH} = 7.5 Hz, 1 H, H_α), 3.66 – 3.47 (m, 2 H, H_δ), 2.44 – 2.33 (m, 1 H, H_{βa}), 2.26 – 2.10 (m, 1 H, H_{βb}), 1.48, 1.42 (2 × s, 9 H, (CH₃)₃-Boc) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 178.0 (COOH, K₂), 174.3 (COOH, K₁), 157.0 (C=O-Boc, K₁), 154.2 (C=O-Boc, K₂), 82.2 (C(CH₃)₃-Ester, K₁), 81.1 (C(CH₃)₃-Ester, K₂), 69.8 (C_γ, K₁), 69.6 (C_γ, K₂), 58.0 (C_α, K₁), 57.9 (C_α, K₂), 54.8 (C_δ, K₁), 54.8 (C_δ, K₂), 39.2 (C_β, K₂), 37.4 (C_β, K₁), 28.5 (3 × (CH₃)₃-Boc, K₁), 28.4 (3 × (CH₃)₃-Boc, K₂) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[423]

5.4.2 Synthese von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin-*tert*-butylester (**48**)^[377, 380]

(*N*-Boc-Hyp-O*t*Bu)



Eine Suspension aus 1.09 g (11.0 mmol, 0.2 Äquiv.) trockenem Kupfer(I)-chlorid, 50.0 g (243 mmol, 3.3 Äquiv.) *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff und 26.3 mL (20.7 g, 279 mmol, 3.8 Äquiv.) *tert*-Butanol wurde unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss 3 d gerührt. Anschließend wurde die Suspension mit 130 mL absol. Dichlormethan verdünnt, auf 0 °C abgekühlt und mit 17.0 g (73.5 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Boc-Hyp **50** gelöst in 130 mL Dichlormethan tropfenweise versetzt. Nachdem der Ansatz 2 h bei 0 °C und anschließend 4 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde dieser durch Hyflo[®] filtriert und der Rückstand wurde mehrfach mit insgesamt 150 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit je 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Ethylacetat aufgenommen und nach 3 d im Gefrierfach wurde erneut ausgefallener Harnstoff entfernt. Das Rohprodukt wurde im Vakuum erneut vom Lösungsmittel befreit und flashchromatographisch an Kieselgel (C₆Hex/EtOAc = 1:1) gereinigt.

Man erhielt 13.5 g (46.8 mmol, 64%) *N*-Boc-Hyp-O*t*Bu **48** als farblose Kristalle.

R_f (C₆Hex/EtOAc 1:2) = 0.40.

[α]_D²² = (1.00, CH₂Cl₂) = -64.2.

Masse/Molekulargewicht: C₁₄H₂₅NO₅ (287.35 g/mol) [287.1733].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 288.1806 ([M+H]⁺, ber.: 288.1805), 310.1624 ([M+Na]⁺, ber.: 310.1625).

N-Boc-Hyp-O*t*Bu **48** existiert als Gemisch zweier Konformere: K₁:K₂ = 1.6 : 1.

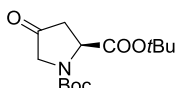
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 4.42 (s, 1 H, H_γ), 4.28 – 4.22 (m, 1 H, H_α), 3.57 (d, J_{δHa,δHb} = 4.4 Hz, 1 H, H_{δa}, K₂), 3.55 (d, J_{δHa,δHb} = 4.4, 1 H, H_{δa}, K₁), 3.51 – 3.37 (m, 1 H, H_{δb}), 2.53 – 2.46 (m, 1 H, OH) 2.28 – 2.17 (m, 1 H, H_{βa}), 2.04 - 1.96 (m, 1 H, H_{βb}), 1.42 – 1.40 (m, 18 H, (CH₃)₃-Boc, (CH₃)₃-Ester) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.3$ (C=O-Ester), 154.4 (C=O-Boc), 81.4 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Ester, K}_2$), 81.3 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Ester, K}_1$), 80.4 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Boc, K}_1$), 80.1 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Boc, K}_2$), 70.4 ($\text{C}\gamma$, K_2), 69.5 ($\text{C}\gamma$, K_1), 58.7 ($\text{C}\alpha$, K_1), 58.7 ($\text{C}\alpha$, K_2), 54.9 ($\text{C}\delta$, K_2), 54.8 ($\text{C}\delta$, K_1), 39.4 ($\text{C}\beta$, K_1), 38.6 ($\text{C}\beta$, K_2), 28.6 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Ester, K}_2$), 28.5 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Ester, K}_1$), 28.2 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Boc, K}_1$), 28.1 ($\text{C(CH}_3)_3\text{-Boc, K}_2$) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[380, 424, 425]

5.4.3 Synthese von *N-tert-Butoxycarbonyl-4-oxo-L-prolin-tert-butylester* (**51**)^[377]

(*N-Boc-4O-L-Pro-OrBu*)



In einem ausgeheizten Kolben wurden zunächst 90 mL absol. Dichlormethan auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Unter Rühren wurde 3.28 mL (4.86 g, 38.3 mmol, 1.1 Äquiv.) Oxalylchlorid hinzugegeben, wonach 5.5 mL (5.98 g, 76.6 mmol, 2.2 Äquiv.) absol. Dimethylsulfoxid gelöst in 20 mL absol. Dichlormethan, zu dem Reaktionsgemisch gegeben wurde. Es wurde 10 min gerührt, bevor 10.0 g (34.8 mmol, 1.0 Äquiv.) *N-Boc-Hyp-OrBu* **48**, gelöst in 40 mL absol. Dichlormethan, portionsweise zu dem Reaktionsgemisch gegeben wurden und weitere 15 min gerührt. Anschließend wurden 24 mL (17.6 g, 174 mmol, 5.0 Äquiv.) trockenes Triethylamin vorsichtig zugesetzt und der Reaktionsansatz wurde unter Rühren binnen 24 h von $-78\text{ }^\circ\text{C}$ auf Raumtemperatur erwärmt. Die gelbe Lösung wurde mit 125 mL Wasser versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 100 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung, 100 mL 1%iger Schwefelsäure, 50 mL Wasser und 50 mL ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte flashchromatographisch an Kieselgel ($\text{C}^{\text{Hex}}/\text{EtOAc} = 4:1$).

Man erhielt 9.33 g (32.7 mmol, 94%) *N-Boc-4O-L-Pro-OrBu* **51** als gelbe Kristalle.

R_f ($\text{C}^{\text{Hex}}/\text{EtOAc} 4:1$) = 0.36.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CH}_2\text{Cl}_2) = +7.62$.

Masse/Molekulargewicht: $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ (285.34 g/mol) [285.1576].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 303.0823 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, ber.:303.1920), 308.1469 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 308.1474).

HR ESI-MS (negativ), m/z: 284.1506 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, ber.: 284.1498).

N-Boc-4O-L-Pro-OrBu (**52**) existiert als Gemisch zweier Konformere: $\text{K}_1 : \text{K}_2 = 1.3 : 1$

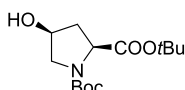
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.62$ (d, $J_{\alpha\text{H},\beta\text{Htrans}} = 10.1$ Hz, 1 H, $\text{H}\alpha$, K_2), 4.54 (d, $J_{\alpha\text{H},\beta\text{Htrans}} = 9.9$ Hz, 1 H, $\text{H}\alpha$, K_1), $3.89 - 3.81$ (m, 2 H, $\text{H}\delta\text{a/b}$), $2.92 - 2.82$ (m, 1 H, $\text{H}\beta\text{a}$), 2.50 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, $\text{H}\beta\text{b}$, K_1), 2.47 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, $\text{H}\beta\text{b}$, K_1), $1.44 - 1.43$ (m, 18 H, $\text{C(CH}_3)_3\text{-Boc}$, $\text{C(CH}_3)_3\text{-Ester}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 209.2$ (C=O, C_γ , K_2), 208.3 (C=O, C_γ , K_1), 171.1 (C=O-Ester, K_2), 171.0 (C=O-Ester, K_1), 154.5 (C=O-Boc, K_1), 153.9 (C=O-Boc, K_2), 82.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester, K_1), 81.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester, K_2), 57.3 (C_δ , K_1), 56.8 (C_δ , K_2), 53.2 (C_α , K_2), 52.7 (C_α , K_1), 41.6 (C_β , K_1), 41.1 (C_β , K_2), 28.5, 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[425, 426]

5.4.4 Synthese von *N-tert*-Butoxycarbonyl-*cis*-4-hydroxy-L-prolin-*tert*-butylester (**52**)^[381]

(*N*-Boc-*cis*-L-Hyp-*Or*Bu)



Es wurden 2.00 g (7.01 mmol, 1.0 Äquiv.) *N-tert*-Butoxycarbonyl-4-oxo-L-prolin-*tert*-butylester (**51**) in 22 mL absol. Methanol sowie 28 mL absol. Diethylether gelöst und bei 0 °C unter Argonatmosphäre mit 690 mg (18.3 mmol, 2.6 Äquiv.) Natriumborhydrid, suspendiert in 22 mL absol. Methanol und 28 mL absol. Diethylether, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 0 °C und anschließend weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Der so erhaltene Rückstand wurde in 40 mL Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit je 40 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 40 mL Wasser und 40 mL Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das so erhaltene Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc} = 1:1$) gereinigt.

Man erhielt 1.86 g (6.50 mmol, 92%) *N*-Boc-*cis*-L-Hyp-*Or*Bu **52** als gelbe Kristalle.

R_f ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc} 1:1$) = 0.33.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -5.42$ (Lit.: $[\alpha]_D^{24} = (0.5, \text{CHCl}_3) = -2.52$).^[427]

Masse/Molekulargewicht: $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ (287.35 g/mol) [287.1733].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 288.1808 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 288.1811), 310.1626 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 310.1630).

N-Boc-*cis*-L-Hyp-*Or*Bu **52** existiert als Gemisch zweier Konformere: $K_1 : K_2 = 1.6 : 1$.

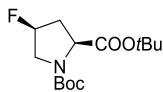
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.31 - 4.25$ (m, 1 H, H_γ), 4.22 – 4.11 (m, 1 H, H_α), 3.73 – 3.41 (m, 3 H, $H_{\delta a/b}$, OH), 2.32 – 2.20 (m, 1 H, $H_{\beta a}$), 2.05 – 1.97 (m, 1 H, $H_{\beta b}$), 1.50 – 1.40 (m, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.8$ (C=O-Ester, K_2), 174.5 (C=O-Ester, K_1), 154.6 (C=O-Boc, K_2), 154.1 (C=O-Boc, K_1), 82.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester, K_2), 82.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester, K_1), 80.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc, K_1), 80.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc, K_2), 71.6 (C_γ , K_2), 70.6 (C_γ , K_1), 59.0 (C_α , K_1), 58.9 (C_α , K_2), 56.4 (C_δ , K_2), 56.0 (C_δ , K_1), 38.9 (C_β , K_1), 37.9 (C_β , K_2), 28.6, 28.1, 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Boc) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[381, 427]

5.4.5 Synthese von *N-tert-Butoxycarbonyl-cis-4-fluor-L-prolin-tert-butylester* (**53**)^[377]

(*N-Boc-cis-4F-L-Pro-OtBu*)



In einem mikrowelleneigenem Druckgefäß wurde 1.00 g (3.48 mmol, 1.0 Äquiv.) *N-Boc-Hyp-OtBu* **48** in 5 mL absol. Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 1.1 mL (1.00 g, 8.26 mmol, 2.4 Äquiv.) 2,4,6-Collidin sowie 0.56 mL (0.67 g, 4.16 mmol, 1.2 Äquiv.) Diethylaminoschwefeltrifluorid zur Reaktionslösung gegeben und in der Mikrowelle bei 100 W und 80 °C 3 h gerührt. Schließlich wurde der Ansatz mit 4 mL Methanol versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und zweimal mit 5 mL verdünnter Salzsäure (1 M) sowie zweimal mit 5 mL Wasser gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc = 4:1) gereinigt.

Man erhielt 0.84 g (2.89 mmol, 83%) *N-Boc-cis-4F-L-Pro-OtBu* (**53**) als gelbes Öl.

R_f (^CHex/EtOAc 4:1) = 0.36.

Masse/Molekulargewicht: C₁₄H₂₄FNO₄ (289.34 g/mol) [289.1689].

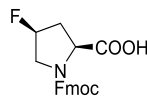
HR ESI-MS (positiv), m/z: 178.0509 ([*M-Boc-tBu+H*]⁺, ber.: 178.0512), 312.1581 ([*M+Na*]⁺, ber.: 312.1587).

N-Boc-cis-4F-L-Pro-OtBu **53** existiert als Gemisch zweier Konformere: K₁:K₂ = 1.8 : 1.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 5.14 (pd, $J_{\gamma\text{H},\text{F}} = 53.0$ Hz, $J_{\gamma\text{H},\text{H}\beta/\text{H}\delta} = 4.1$ Hz, 1 H, *H*γ), 4.40 (pd, $J_{\alpha\text{H},\beta\text{Htrans}} = 9.5$ Hz, 1 H, *H*α, K₂), 4.29 (pd, $J_{\alpha\text{H},\beta\text{Htrans}} = 9.4$ Hz, 1 H, *H*α, K₁), 3.84 – 3.57 (m, 2 H, *H*δ), 2.48 – 2.20 (m, 2 H, *H*β), 1.47, 1.46, 1.44 (m, 18 H, C(CH₃)₃-*Boc*, C(CH₃)₃-Ester) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 170.9 (C=O-Ester, K₁), 170.6 (C=O-Ester, K₂), 154.0 (C=O-*Boc*, K₂), 153.9 (C=O-*Boc*, K₁), 92.4 (d, $J = 177.0$ Hz, Cγ, K₂), 91.4 (d, $J = 177.2$ Hz, Cγ, K₁), 81.5 (C(CH₃)₃-Ester), 80.2 (C(CH₃)₃-*Boc*, K₁), 80.2 (C(CH₃)₃-*Boc*, K₂), 58.6 (Cα, K₁), 58.2 (Cα, K₂), 53.3 (d, $J_{\delta\text{C},\text{F}} = 24.7$ Hz, Cδ, K₂), 53.1 (d, $J_{\delta\text{C},\text{F}} = 24.7$ Hz, Cδ, K₁), 37.9 (d, $J_{\beta\text{C},\text{F}} = 22.0$ Hz, Cβ, K₁), 36.9 (d, $J_{\beta\text{C},\text{F}} = 21.7$ Hz, Cβ, K₂), 28.6 (C(CH₃)₃-Ester, K₂), 28.5 (C(CH₃)₃-Ester, K₁), 28.0 (C(CH₃)₃-*Boc*) ppm.

¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃): δ = -171.6 – -172.4 (m, *F*γ) ppm.

5.4.6 Synthese von *N*-(9-*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*cis*-4-fluor-*L*-prolin (46**)**^[377, 382]*(N-Fmoc-cis-4F-Pro)*

Bei 0 °C wurden zunächst 0.70 g (2.45 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-*Boc*-*cis*-4F-*L*-Pro-*Ot*Bu **53** in 0.8 mL Anisol gelöst. Danach wurden vorsichtig 8 mL Trifluoressigsäure in den Reaktionsansatz getropft. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur 4 h gerührt, bevor 25 mL Toluol zugesetzt wurden. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde fünfmal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Der verbleibende Rückstand wurde in 15 mL eines Gemisches aus Aceton und Wasser (1:1) gelöst und mit 0.41 g (4.90 mmol, 2.0 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Langsam wurden unter Rühren portionsweise 0.83 g (2.45 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(9-*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat zugesetzt und die Reaktionsmischung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Mit verdünnter Salzsäure (1 M) wurde die Reaktioslösung auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Anschließend wurde das Aceton im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 15 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und zweimal mit je 15 mL Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc/AcOH = 10:10:1) gereinigt.

Man erhielt 0.75 g (2.11 mmol, 86%) *N*-*Fmoc*-*cis*-4F-*L*-Pro **46** als farblos amorphes Feststoff.

HPLC (0 min: 4% MeCN + 0.1% TFA, 96% H₂O + 0.1% TFA → 15min: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flussrate: 1 mL/min): $t_R = 14.25$ min, $\lambda = 214$ nm.

R_f (^CHex/EtOAc/AcOH = 10:10:1) = 0.40.

$[\alpha]_D^{22} = (1.00, \text{CHCl}_3) = -49.1$ (Lit.: $[\alpha]_D^{22} = (0.50, \text{CHCl}_3) = -55.0$).^[240]

Masse/Molekulargewicht: C₂₀H₁₈FNO₄ (355.36 g/mol) [355.1220].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 356.1293 ([M+H]⁺, ber.: 356.1298), 378.1111 ([M+Na]⁺, ber.: 378.1112).

N-*Fmoc*-*cis*-4F-*L*-Pro (**46**) existiert als Gemisch zweier Konformere: $K_1 : K_2 = 1.7 : 1$.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.75 - 7.69$ (m, 2 H, *H*4-, *H*5-*Fmoc*), 7.59 – 7.50 (m, 2 H, *H*1-, *H*8-*Fmoc*), 7.40 – 7.23 (m, 4 H, *H*2-, *H*3-, *H*6-, *H*7-*Fmoc*), 5.20 (pd, $J_{\text{H,F}} = 52.4$ Hz, 1 H, *H*γ), 4.63 – 4.35 (m, 3 H, *H*α, *CH*₂-*Fmoc*), 4.27 – 4.16 (m, 1 H, *H*9-*Fmoc*), 3.87 – 3.60 (m, 2 H, *H*δ), 2.67 – 2.28 (m, 2 H, *H*β) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 176.3$ (COOH, *K*₁), 175.3 (COOH, *K*₂), 155.4 (C=O-*Fmoc*, *K*₂), 154.6 (C=O-*Fmoc*, *K*₁), 144.0, 143.9, 143.8 (*C*1a-, *C*8a-*Fmoc*), 141.6, 141.5, 141.4 (*C*4a-, *C*5a-*Fmoc*), 128.0 (*C*3-, *C*6-*Fmoc*, *K*₁), 127.9 (*C*3-, *C*6-*Fmoc*, *K*₂), 127.3 (*C*2-, *C*7-*Fmoc*, *K*₁), 127.2 (*C*2-, *C*7-*Fmoc*, *K*₂), 125.3 (*C*1-, *C*8-*Fmoc*, *K*₂), 125.0 (*C*1-, *C*8-*Fmoc*, *K*₁), 120.2 (*C*4-, *C*5-*Fmoc*), 92.0 (d, $J_{\text{C,F}} = 178.5$ Hz, *C*γ, *K*₁), 91.2 (d,

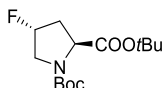
$J_{\gamma,C,F} = 177.8$ Hz, $C\gamma$, K_2), 68.1 (CH_2 -Fmoc, K_1), 67.9 (CH_2 -Fmoc, K_2), 57.9, 57.3 ($C\alpha$), 53.8, 53.6, 53.5, 53.3 ($C\delta$), 47.3 ($C9$ -Fmoc), 37.7 (d, $J_{\beta,C,F} = 21.9$ Hz, $C\beta$, K_2), 36.31 (d, $J_{\beta,C,F} = 22.0$ Hz, $C\beta$, K_1) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -172.1 - -173.6$ (m, $F\gamma$) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[240, 276]

5.4.7 Synthese von *N*-tert-Butoxycarbonyl-*trans*-4-fluor-L-prolin-*tert*-butylester (54)

(*N*-Boc-*trans*-4F-L-Pro-*Ot*Bu)



In einem mikrowelleneegnetem Druckgefäß wurden 0.48 g (1.68 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Boc-*cis*-L-Hyp-*Ot*Bu **52** in 2 mL absol. Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 0.53 mL (0.49 g, 4.02 mmol, 2.4 Äquiv.) 2,4,6-Collidin sowie 0.26 mL (0.32 g, 1.98 mmol, 1.2 Äquiv.) Diethylaminoschwefeltrifluorid zur Reaktionslösung gegeben und das Reaktionsgemisch wurde bei 100 W und 80 °C 2 h in der Mikrowelle gerührt. Schließlich wurde der Ansatz mit 2 mL Methanol versetzt und mit 15 mL Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde in 15 mL Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase wurde zweimal mit 15 mL verdünnter Salzsäure (1 M) sowie zweimal mit 15 mL Wasser gewaschen. Es wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel ($C_{Hex}/EtOAc = 4:1$) gereinigt.

Man erhielt 0.38 g (1.31 mmol, 78%) *N*-tert-Butoxycarbonyl-*trans*-4-fluor-L-prolin-*tert*-butylester (**54**) als gelbes Öl.

R_f ($C_{Hex}/EtOAc$ 4:1) = 0.39.

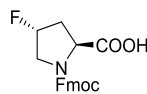
Masse/Molekulargewicht: $C_{14}H_{24}FNO_4$ (289.34 g/mol) [289.1689].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 178.0510 ($[M-Boc-tBu+H]^+$, ber.: 178.0512), 290.1762 ($[M+H]^+$, ber.: 290.1768).

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.18$ (pd, $J_{\gamma,H,F} = 52.6$ Hz, 1 H, $H\gamma$), 4.34 (t, $J_{\alpha H, \beta H} = 8.1$ Hz, 1 H, $H\alpha$, K_2), 4.29 (t, $J_{\alpha H, \beta H} = 8.2$ Hz, 1 H, $H\alpha$, K_1), 3.96 – 3.51 (m, 2 H, $H\delta$), 2.63 – 2.50 (m, 1 H, $H\beta a$), 2.12 – 1.99 (m, 1 H, $H\beta b$), 1.44 – 1.42 (m, 18 H, $C(CH_3)_3$ -Ester, $C(CH_3)_3$ -Boc) ppm.

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 171.8$ ($C=O$ -Ester, K_1), 171.7 ($C=O$ -Ester, K_2), 154.2 ($C=O$ -Boc, K_2), 154.0 ($C=O$ -Boc, K_1), 92.1 (d, $J = 178.5$ Hz, $C\gamma$, K_2), 91.2 (d, $J = 178.5$ Hz, $C\gamma$, K_1), 81.6 ($C(CH_3)_3$ -Ester, K_2), 81.5 ($C(CH_3)_3$ -Ester, K_1), 80.5 ($C(CH_3)_3$ -Boc, K_1), 80.3 ($C(CH_3)_3$ -Boc, K_2), 58.3 ($C\alpha$), 53.4 (d, $J_{\delta,C,F} = 22.8$ Hz, $C\delta$, K_2), 53.1 (d, $J = 22.7$ Hz, $C\delta$, K_1), 37.8 (d, $J_{\beta,C,F} = 22.8$ Hz, $C\beta$, K_1), 36.7 (d, $J_{\beta,C,F} = 22.6$ Hz, $C\beta$, K_2), 28.5 ($C(CH_3)_3$ -Ester), 28.2 ($C(CH_3)_3$ -Boc, K_1), 28.1 ($C(CH_3)_3$ -Boc, K_2) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -176.5 - -177.1$ (m, K_1), $-177.3 - -177.9$ (m, K_2) ppm.

5.4.8 Synthese von *N*-(9-*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*trans*-4-fluor-L-prolin (47**)***(N-Fmoc-trans-4F-Pro)*

Bei 0 °C wurden 226 mg (0.78 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-*Boc-trans*-4F-L-Pro-*Or*Bu **54** in 0.8 mL Anisol gelöst und tropfenweise mit 8 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde anschließend bei Raumtemperatur 2.5 h gerührt und erneut mit 25 mL Toluol versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde fünfmal mit je 20 mL Toluol und zweimal mit je 20 mL Dichlormethan kodestilliert. Der verbleibende Rückstand wurde in 15 mL eines Gemisches aus Aceton und Wasser (1:1) gelöst und mit 131 mg (1.56 mmol, 2.0 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Unter Rühren wurden portionsweise 263 mg (0.78 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-(9-*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-succinimidylcarbonat zugesetzt und das Reaktionsgemisch 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Mit verdünnter Salzsäure (1 M) wurde die Reaktioslösung auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Anschließend wurde das Aceton im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde dreimal mit je 15 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 15 mL verdünnter Salzsäure (1 M) und zweimal mit je 15 mL Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel (^CHex/EtOAc/AcOH = 10:10:1) gereinigt.

Man erhielt 266 mg (0.75 mmol, 96%) *N*-*Fmoc-trans*-4F-Pro **47** als gelblichen amorphen Feststoff.

R_f (^CHex/EtOAc/AcOH = 10:10:1) = 0.26.

HPLC (0 min: 4% MeCN + 0.1% TFA, 96% H₂O + 0.1% TFA → 15min: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flussrate: 1 mL/min): t_R = 14.83 min, λ = 214 nm.

$[\alpha]_D^{22}$ (1.00, CH₂Cl₂) = -74.64.

Masse/Molekulargewicht: C₂₀H₁₈FNO₄ (355.36 g/mol) [355.1220].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 378.1111 ([M+Na]⁺, ber.: 378.1118).

N-*Fmoc-trans*-4F-Pro **47** existiert als Gemisch zweier Konformere: K₁ : K₂ = 1.7 : 1.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.75 – 7.69 (m, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.56 – 7.51 (m, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.41 – 7.22 (m, 4 H, **H2-**, **H3-**, **H6-**, **H7-Fmoc**), 5.22 (pd, $J_{\text{H,F}} = 52.1$ Hz, 1 H, **H γ**), 4.58 – 4.35 (m, 3 H, **H α** , **CH₂-Fmoc**), 4.27 – 4.10 (m, 1 H, **H9-Fmoc**), 4.04 – 3.86 (m, 1 H, **H δ a**), 3.65 – 3.54 (m, 1 H, **H δ b**), 2.71 – 2.50 (m, 1 H, **H β a**), 2.32 – 2.08 (m, 1 H, **H β b**) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 176.9 (**COOH**, K₁), 175.2 (**COOH**, K₂), 156.0 (**C=O-Fmoc**, K₁), 154.6 (**C=O-Fmoc**, K₂), 144.1, 143.8 (**C1a-**, **C8a-Fmoc**), 141.5 (**C4a-**, **C5a-Fmoc**), 128.0 (**C3-**, **C6-Fmoc**, K₁), 127.9 (**C3-**, **C6-Fmoc**, K₂), 127.4 (**C2-**, **C7-Fmoc**, K₁), 127.3 (**C2-**, **C7-Fmoc**, K₂), 125.2 (**C1-**, **C8-Fmoc**, K₂), 125.0 (**C1-**, **C8-Fmoc**, K₁), 120.3 (**C4-**, **C5-Fmoc**, K₂), 120.1 (**C4-**, **C5-Fmoc**, K₁), 91.5 (d, $J_{\text{C,F}} = 179.5$ Hz, **C γ -**,

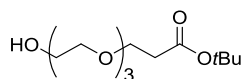
K₁), 90.9 (d, $J_{\gamma C,F} = 179.8$ Hz, C γ , K₂), 68.4 (CH₂-Fmoc, K₁), 68.0 (CH₂-Fmoc, K₂), 58.0 (C α , K₁), 57.2 (C α , K₂), 53.8 (d, $J_{\delta C,F} = 23.1$ Hz, C δ , K₂), 53.6 (d, $J_{\delta C,F} = 22.0$ Hz, C δ , K₁), 47.4 (C9-Fmoc, K₂), 47.3 (C9-Fmoc, K₁), 37.9 (d, $J_{\beta C,F} = 22.8$ Hz, C β , K₂), 36.2 (d, $J_{\beta C,F} = 22.4$ Hz, C β , K₁) ppm.

¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃): $\delta = -176.8 - -177.5$ (m, F γ , K₁), $-177.6 - -178.1$ (m, F γ , K₂) ppm.

5.5 Synthesevorschriften des Triethylenglycolspacer

5.5.1 Synthese von 12-Hydroxy-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**57**)^[368, 385, 428]

(HO-[TEG]-COO*t*Bu)



Zu einer Lösung von 32.0 mL (0.24 mol, 2.9 Äquiv.) wasserfreiem Triethylenglycol in 150 mL absol. THF wurden unter Argonatmosphäre 65.0 mg (2.83 mmol, 0.1 Äquiv.) Natrium gegeben. Nachdem das Natrium vollständig gelöst war, wurden 12.0 mL (83.3 mmol, 1.0 Äquiv.) Acrylsäure-*tert*-butylester zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 2 mL verdünnter Salzsäure (1 N) wurde die Reaktionsmischung neutralisiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der so erhaltene Rückstand wurde in 100 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und dreimal mit je 50 mL EtOAc gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend noch einmal mit 30 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt.

Man erhielt 19.8 g (71.3 mmol, 86%) HO-[TEG]-COO*t*Bu **57** als farblose Flüssigkeit.

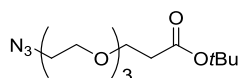
R_f (EtOAc) = 0.35.

Masse/Molekulargewicht: C₁₃H₂₆O₆ (278.35 g/mol) [278.1729].

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[385, 429]

5.5.2 Synthese von 12-Azido-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester (**58**)^[368, 385, 428, 429]

(N₃-[TEG]-COO*t*Bu)



Eine Lösung von 19.0 g (68.3 mmol, 1.0 Äquiv.) HO-[TEG]-COO*t*Bu **57** in 170 mL absol. Dichlormethan wurde mit 16.5 mL (116 mmol, 1.7 Äquiv.) Triethylamin versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Langsam wurden unter Rühren 8.26 mL (109 mmol, 1.6 Äquiv.) Methansulfonsäurechlorid zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde anschließend 4.5 h gerührt. Das entstandene Triethylaminhydrochlorid wurde mit *Hyflo*[®] abfiltriert und der Filtrückstand wurde mit 50 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde zweimal mit 20 mL Eiswasser und einmal mit 20 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei 25.7 g eines gelblichen Öls erhalten wurden. Dieser Rückstand wurde in 100 mL DMF aufgenommen, mit 26.7 g (410 mmol, 6.0 Äquiv.) Natriumazid versetzt und bei 60 °C 15 h gerührt. Das DMF wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in 50 mL Wasser gelöst. Die wässrige Phase wurde dreimal mit

jeweils 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 3:1 \rightarrow 2:1).

Man erhielt 18.2 g (60.1 mmol, 88%) N_3 -[TEG]-COOtBu **58** als farblose Flüssigkeit.

R_f ($^{\text{C}}\text{Hex}/\text{EtOAc}$ = 2:1) = 0.34.

Masse/Molekulargewicht: $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$ (303.36 g/mol) [303.1794].

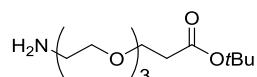
HR ESI-MS (positiv), m/z: 327.1718 ($[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, ber.: 327.1770).

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 3.66 – 3.52 (m, 12 H, OCH_2), 3.30 (t, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2}$ = 5.1 Hz, 2 H, N_3CH_2), 2.41 (t, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2}$ = 6.6 Hz, 2 H, CH_2), 1.36 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ -Ester) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[385, 428, 429]

5.5.3 Synthese von 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecansäure-*tert*-butylester^[368, 428, 430]

(NH_2 -[TEG]-COOtBu)



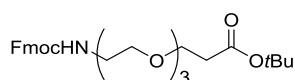
Eine Pipettenspitze Raney-Nickel in Wasser wurde mehrmals mit Isopropanol gewaschen und als Suspension zu einer Lösung von 18.0 g (59.3 mmol) N_3 -[TEG]-COOtBu **58**, gelöst in 140 mL Isopropanol, gegeben. Durch wiederholtes Anlegen von Vakuum und Belüften mit Argon wurde die Reaktionsmischung von Sauerstoff befreit und anschließend mit Wasserstoff überschichtet. Die Lösung wurde 18 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Das Raney-Nickel wurde mit *Hyflo*[®] abfiltriert und das Filtrat wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[430]

Masse/Molekulargewicht: $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ (277.36 g/mol) [277.1889].

5.5.4 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,9-trioxadecan-säure-*tert*-butylester (**59**)^[368, 430]

(*Fmoc*NH-[TEG]-COOtBu)



Zu einer Lösung von 16.5 (59.5 mmol, 1.0 Äquiv.) NH_2 -[TEG]-COOtBu **58** in einer Mischung aus Aceton und Wasser (1:1) wurden 5.52 g (65.4 mmol, 1.1 Äquiv.) Natrium-hydrogencarbonat gegeben. Unter

Rühren wurde die Reaktionsmischung portionsweise mit 23.0 g (68.4 mmol, 1.2 Äquiv.) *Fmoc-OSu* versetzt und 7 d stark gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH = 5.5 angesäuert, wobei sich das Produkt als Öl abschied. Das Aceton wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde viermal mit jeweils 60 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 150 mL verdünnter Salzsäure (1 N) und 150 mL Wasser gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde flash-chromatographisch an Kieselgel ($C_{\text{Hex}}/\text{EtOAc} = 2:1$) gereinigt.

Man erhielt 25.8 g (51.7 mmol, 87% über zwei Stufen) *FmocNH*-[TEG]-COOtBu **59** als gelbes Öl.

R_f ($C_{\text{Hex}}/\text{EtOAc} = 2:1$) = 0.12.

Masse/Molekulargewicht: $C_{28}H_{37}NO_7$ (499.60 g/mol) [499.2570].

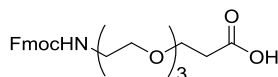
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.74$ (d, $J_{\text{H4,H3}} = J_{\text{H5,H6}} = 7.4$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-** *Fmoc*), 7.58 (d, $J_{\text{H1,H2}} = J_{\text{H8,H7}} = 7.4$ Hz, 2 H, **H1-**, **H8-** *Fmoc*), 7.40 – 7.26 (m, 4 H, **H2-**, **H3-**, **H6-**, **H7-** *Fmoc*), 5.38 (sb, 1 H, **NH**-Urethan), 4.38 (d, $J_{\text{CH}_2\text{CH}} = 6.9$ Hz, 2 H, **CH**₂-*Fmoc*), 4.20 (t, $J_{\text{H9,CH}_2} = 6.7$ Hz, 1 H, **H9-** *Fmoc*), 3.70 – 3.53 (m, 12 H, 6 × **OCH**₂), 3.40 – 3.35 (m, 2 H, 12-**CH**₂), 2.47 (t, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_2} = 6.6$ Hz, 2 H, 2-**CH**₂), 1.42 (s, 9 H, **C(CH**₃)₃-Ester) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 171.1$ (C=O-Ester), 156.7 (C=O-Urethan), 144.2 (**C1a-**, **C8a-** *Fmoc*), 141.5 (**C4a-**, **C5a-** *Fmoc*), 127.8 (**C3-**, **C6-** *Fmoc*), 127.2 (**C2-**, **C7-** *Fmoc*), 125.3 (**C1-**, **C8-** *Fmoc*), 120.1 (**C4-**, **C5-** *Fmoc*), 80.7 (**C(CH**₃)₃-Ester), 76.6 (**CH**₂-11), 70.8, 70.7, 70.6, 70.3 (**CH**₂-9, **CH**₂-8, **CH**₂-5, **CH**₂-6), 67.1 (**CH**₂-3), 66.8 (**CH**₂-*Fmoc*), 47.5 (**C9-** *Fmoc*), 41.2 (*FmocHNCH*₂), 36.4 (2-**CH**₂), 28.3 (**C(CH**₃)₃-Ester) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[368, 430]

5.5.5 Synthese von *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-12-amido-4,7,9-trioxadecansäure (**60**)^[368, 430]

(*FmocNH*-[TEG]-COOH)



Es wurden 25.0 g (50.0 mmol) *FmocNH*-[TEG]-COOtBu **59** in einer Mischung aus 30 mL Trifluoressigsäure und 3 mL Wasser 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 50 mL Toluol verdünnt und im Vakuum eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde dreimal mit jeweils 50 mL Toluol und dreimal mit jeweils 50 mL Dichlormethan kodestilliert.

Man erhielt 22.2 g (50.0 mmol, quant.) *FmocNH*-[TEG]-COOH **60** als gelbes Öl.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{HOAc} = 40:1:0.5$) = 0.17.

Masse/Molekulargewicht: $C_{24}H_{29}NO_7$ (443.50 g/mol) [443.1944].

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 10.42 (s_b, 1 H, COOH), 7.74 (d, $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$ Hz, 2 H, **H4-**, **H5-Fmoc**), 7.58 – 7.55 (m, 2 H, **H1-**, **H8-Fmoc**), 7.39 – 7.14 (m, 4 H, **H2-**, **H3-**, **H6-**, **H7-Fmoc**), 6.55 (s_b, 1 H, NH-Urethan), 4.47 – 4.42 (m, 2 H, **CH₂-Fmoc**), 4.26 – 4.17 (m, 1 H, **H9-Fmoc**), 3.76 – 3.56 (m, 12 H, 6 × **OCH₂**), 3.41 – 3.28 (m, 2 H, 12-**CH₂**), 2.59 (t, $J_{CH_2,CH_2} = 6.0$ Hz, 2 H, 2-**CH₂**) ppm.

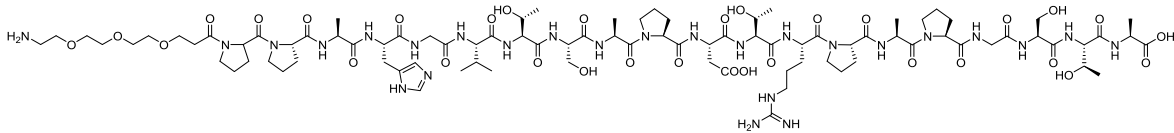
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 176.1 (COOH), 144.0 (C1a-, C8a-Fmoc), 141.5 (C4a-, C5a-Fmoc), 127.9 (C3-, C6-Fmoc), 127.3 (C2-, C7-Fmoc), 125.5 (C1-, C8-Fmoc), 120.2 (C4-, C5-Fmoc), 70.7, 70.4, 70.2 (4 × **OCH₂**), 66.5 (CH₂-3), 47.4 (CH₂-12), 34.9 (CH₂-2) ppm.

Weitere analytische Daten siehe Literatur.^[368, 430]

5.6 Synthesevorschriften der Peptide zum Einsatz als Vakzin-Vorstufe

5.6.1 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (61)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst für 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal für 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT · H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid für 5 min zur Reaktion gebracht. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen verwendet. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure für 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss für 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren-Entschützung mit Piperidin in NMP (20% v/v, 7 mL) durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan für 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*)

(Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 48 mg (23%, 0.02 mmol) des Peptids **61** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 12.2$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{89}H_{144}N_{26}O_{32}$ (2090.28 g/mol) [2089.0440].

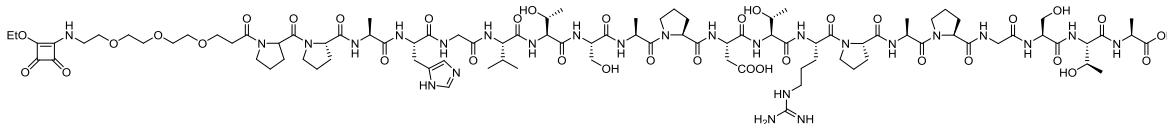
HR ESI-MS (positiv), m/z: 697.6905 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 697.3558), 1056.0314 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1045.5298).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.22$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^ε), 8.32 – 8.15 (m, 3 H, D^{NH} {8.23}, G₁^{NH} {8.22}, G₂^{NH} {8.20}), 8.13 – 8.04 (m, 3 H, A₃^{NH} {8.09}, H^{NH}, A₂^{NH} {8.05}), 8.02 (d, $J_{VNH,V\alpha} = 7.9$ Hz, 1 H, V^{NH}), 7.99 – 7.92 (m, 3 H, R^{NH}, A_{1,4}^{NH} {7.95}), 7.87 (d, $J_{TNH,T2\alpha} = 8.0$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.84 – 7.74 (m, 2 H, S_{1,2}^{NH} {7.79}), 7.71 (d, $J_{TNH,T3\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₃^{NH}), 7.55 – 7.51 (m, 1 H, R^{NH} {7.53}), 7.38 (s, 1 H, H^δ), 7.31 (d, $J_{TNH,T1\alpha} = 8.1$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 4.61 – 4.34 (m, 8 H, R^α {4.49}, D^α {4.55}, A₂^α, H^α {4.58}, P_{2,3}^α {4.51}, A₃^α {4.47}, S₁^α {4.39}), 4.33 – 4.24 (m, 6 H, P₁^α {4.33}, S₂^α, T₂^α, V^α {4.31}, P_{4,5}^α {4.29}), 4.22 – 4.12 (m, 4 H, T₃^α {4.20}, T₁^α, A₄^α {4.19}, A₁^α {4.18}), 4.08 – 4.03 (m, 1 H, T₃^β {4.06}), 3.99 – 3.84 (m, 4 H, T₂^β {3.97}, T₁^β {3.94}, G₁^α {3.87}), 3.82 – 3.61 (m, 6 H, G₂^α {3.72}, S₁^β {3.64}, P₁^δ {3.63}), 3.61 – 3.43 (m, 22 H, S₂^β {3.60}, 2 × OCH₂ {3.59}, P_{2,5}^δ {3.57}, 2 × OCH₂ {3.55}, 2 × OCH₂, P_{3,4}^δ {3.50}), 3.15 – 3.04 (m, 3 H, H^{βb} {3.12}, R^δ {3.11}), 3.01 – 2.93 (m, 3 H, H^{βa} {2.99}, H₂NCH₂ {2.98}), 2.74 (dd, $J_{D\beta a, D\beta b} = 16.6$ Hz, $J_{D\beta a, D\alpha} = 6.1$ Hz, 1 H, D^{βa}), 2.62 – 2.41 (m, 3 H, CH_{2a}CO {2.56}, CH_{2b}CO {2.46}, D^{βb} {2.52}), 2.14 – 1.66 (m, 23 H, P₃^{βa} {2.11}, P_{1,2,4,5}^{βa} {2.04}, V^β {2.00}, P₂^γ {1.94}, P₃^γ {1.92}, P_{1,4,5}^γ, R^{γa} {1.85}, P_{1,5}^{βb} {1.84}, P₃^{βb} {1.80}, P_{2,4}^{βb} {1.77}, R^{βa} {1.71}), 1.52 (bs, 2 H, R^{βb}, R^{γb}), 1.26 (d, $J_{A1\beta, A1\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄^β), 1.21 – 1.14 (m, 9 H, A_{1,2}^β {1.18}, A₃^β {1.19}), 1.05 (d, $J_{T3\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₃^γ), 1.03 (d, $J_{T2\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.00 (d, $J_{T1\gamma, T\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.86 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^{γb}), 0.83 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γa}) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ (A₄^{C=O}), 172.4 (A₁^{C=O}), 171.9 (D^γ), 170.9 (A₃^{C=O}, V^{C=O}), 170.5 (A₂^{C=O}), 170.4 (D^{C=O}), 170.2 (P^{C=O}), 170.1 (P^{C=O}), 170.0 (H^{C=O}), 169.7 (T₃^{C=O}), 169.5 (T_{2,1}^{C=O}), 169.4 (S₂^{C=O}), 169.3 (P^{C=O}), 169.2 (G₁^{C=O}), 168.9 (S₁^{C=O}, G₂^{C=O}), 168.8 (P^{C=O}), 168.6 (CH₂CO), 156.8 (R^ε), 133.7 (H^ε), 129.1 (H^γ), 117.1 (H^δ), 69.7 (2 × OCH₂), 69.6 (2 × OCH₂), 66.9 (T₁^β), 66.7 (OCH₂), 66.6 (T₂^β), 66.3 (OCH₂), 66.2 (T₃^β), 61.8 (S₁^β), 61.6 (S₂^β), 59.2 (P_{1,4,5}^α), 58.0 (T₃^α), 57.9 (T₁^α), 57.8 (T₂^α, V^α), 57.6 (P_{2,3}^α), 54.9 (S₁^α), 54.8 (S₂^α), 51.4 (H^α), 50.1 (R^α), 49.5 (D^α), 48.4 (A₁^α), 46.7 (P_{1,5}^δ, A₄^α), 46.5 (A₂^α), 46.3 (A₃^α), 42.0 (G₂^α), 41.9 (G₁^α), 40.6 (R^δ), 38.7 (H₂NCH₂), 35.6 (D^β), 34.2 (CH₂CO), 30.6 (V^β), 29.1 (P_{1,2,4,5}^β), 28.3 (R^β), 28.1 (P₃^β), 27.1 (H^β), 24.5 (P_{1,2,4,5}^γ, R^γ), 24.3 (P₃^γ), 19.8 (T₃^γ), 19.6 (T₁^γ), 19.3 (V^{γb}), 19.1 (T₂^γ), 18.0 (V^{γa}), 17.6 (A₁^β), 17.2 (A₄^β), 16.8 (A₂^β), 16.7 (A₃^β), ppm.

5.6.2 Synthese von 1-(Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin)-2-ethoxycyclobuten-3,4-dion (**76**)

(EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



29 mg (13.8 μ mol, 1.0 Äquiv.) Peptid **61** wurden in 5 mL einer Mischung aus Wasser und Ethanol (1:1) gelöst und mit 2.14 μ L (2.46 mg, 14.5 μ mol, 1.1 Äquiv.) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion versetzt. Langsam wurden geringe Mengen (ca 20 μ L) an gesättigter Natriumcarbonatlösung portionsweise zugegeben, bis ein pH-Wert von maximal 8 erreicht ist. Die Reaktionslösung wurde für 2.5 h zur Reaktion gebracht und im Anschluss mit 1 M Essigsäure neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohpeptid lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) \rightarrow (40:60) 20 min; (40:60) \rightarrow (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 19 mg (62%, 8.5 μ mol) des Peptids **76** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 12.9$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₉₅H₁₄₈N₂₆O₃₅ (2214.38 g/mol) [2213.0600].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 1107.5363 ([M+2H]²⁺, ber.: 1107.5378), 1129.5192 ([M+2Na]²⁺, ber.: 1129.5192), 1145.49994 ([M+2K]²⁺, ber.: 1145.4932).

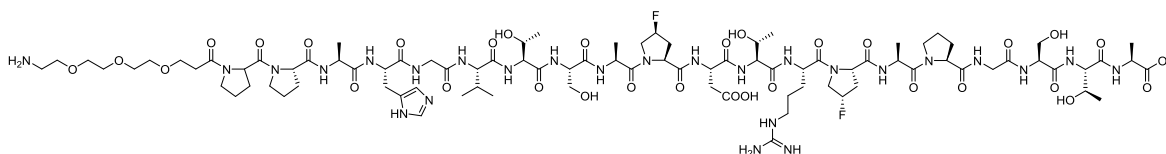
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 14.15$ (bs, 1 H, COOH), 8.93 (s, 1 H, H^c), 8.23 (d, $J_{\text{DNH},\text{D}2\alpha} = 7.8$ Hz, 1 H, D^{NH}), 8.21 – 8.15 (m, 2 H, G₂^{NH} {8.20}, G₁^{NH} {8.18}), 8.13 – 7.97 (m, 4 H, A₃^{NH} {8.11}, A₁^{NH} {8.09}, H^{NH} {8.02}, V^{NH} {8.01}), 7.97 – 7.91 (m, 2 H, R^{NH} {7.96}, A₄^{NH} {7.95}), 7.87 (d, $J_{\text{TNH},\text{T}2\alpha} = 8.1$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.81 – 7.76 (m, 2 H, S₁^{NH} {7.79}, S₂^{NH} {7.77}), 7.71 (d, $J_{\text{T}3\text{NH},\text{T}3\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₃^{NH}), 7.68 – 7.61 (m, 1 H, A₂^{NH} {7.63}), 7.47 (bs, 1 H, R^{NH}), 7.37 (s, 1 H, H ^{δ}), 7.31 (d, $J_{\text{TNH},\text{T}1\alpha} = 8.3$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 4.60 – 4.52 (m, 3 H, H ^{α} {4.56}, D ^{α} {4.55}, A₁ ^{α} {4.53}), 4.52 – 4.40 (m, 3 H, R ^{α} {4.50}, P₃ ^{α} {4.49}, A₃ ^{α} {4.46}), 4.40 – 4.24 (m, 8 H, S₁ ^{α} {4.38}, P₄ ^{α} {4.33}, P₂ ^{α} {4.32}, T₂ ^{α} {4.31}, V ^{α} {4.30}, S₂ ^{α} {4.29}, P_{1,5} ^{α} {4.27}), 4.22 – 4.12 (m, 4 H, T_{1,3} ^{α} {4.20}, A₄ ^{α} {4.18}, A₂ ^{α} {4.16}), 4.09 – 4.04 (m, 1 H, T₃ ^{β} {4.06}), 4.00 – 3.84 (m, 4 H, T₂ ^{β} {3.97}, T₁ ^{β} {3.94}, G₁ ^{α} {3.87}), 3.77 – 3.67 (m, 2 H, G₂ ^{α} {3.72}), 3.67 – 3.53 (m, 12 H, S₁ ^{$\beta\alpha$} {3.64}, P₁ ^{δ} {3.63}, S₂ ^{$\beta\alpha$} {3.60}, OCH₂ {3.58}, P₂ ^{δ} , S₁ ^{$\beta\beta$} {3.57}, S₂ ^{$\beta\beta$} {3.55}, P₃ ^{δ} {3.54}), 3.53 – 3.25 (m, 16 H, OCH₂ {3.51}, P₅ ^{δ} , 2 \times OCH₂ {3.50}, P₄ ^{δ} {3.49}, 2 \times OCH₂ {3.47}, HNCH₂ {3.43}), 3.16 – 3.04 (m, 3 H, H ^{$\beta\beta$} {3.13}, R ^{δ} {3.09}), 3.00 – 2.98 (m, 1 H, H ^{$\beta\alpha$} {2.98}), 2.74 (dd, $J_{\text{D}\beta\alpha,\text{D}\beta\beta} = 16.3$ Hz, $J_{\text{D}\beta\alpha,\text{D}\alpha} = 6.0$ Hz, 1 H, D ^{$\beta\alpha$}), 2.59 – 2.40 (m, 3 H, CH_{2a}CO {2.56}, D ^{$\beta\beta$} {2.51}, CH_{2b}CO {2.45}), 2.13 – 1.66 (m, 23 H, P₃ ^{$\beta\alpha$} {2.10}, P₂ ^{$\beta\alpha$} {2.04}, P₅ ^{$\beta\alpha$} {2.03}, P_{1,4} ^{$\beta\alpha$} {2.01}, V ^{β} {2.00}, P₃ ^{γ} {1.92}, P_{1,2,4,5} ^{γ} , R ^{$\gamma\alpha$} {1.85}, P_{1,2,5} ^{$\beta\beta$} {1.84}, P₃ ^{$\beta\beta$} {1.79}, P₄ ^{$\beta\beta$} {1.77}, R ^{$\beta\alpha$} {1.70}), 1.52 (bs, 2 H, R ^{$\beta\beta$} , R ^{$\gamma\beta$}), 1.26 (d, $J_{\text{A}1\beta,\text{A}1\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄ ^{β}), 1.21 – 1.12 (m, 9 H, A₁₋₃ ^{β}

{1.18}), 1.05 (d, $J_{T\gamma_3, T\beta_3} = 6.4$ Hz, 3 H, T_3^γ), 1.03 (d, $J_{T\gamma_2, T\beta_2} = 6.2$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.00 (d, $J_{T\gamma_1, T\beta_1} = 6.3$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.86 (d, $J_{V\gamma_b, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.83 (d, $J_{V\gamma_a, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 188.8, 183.3$ ($2 \times \text{C=O-Squarat}$), 173.8 ($\text{A}_4^{\text{C=O}}$), 172.3 ($\text{A}_2^{\text{C=O}}$), 171.9 ($2 \times \text{P}^{\text{C=O}}$), 171.8 (D^γ), 171.2 ($\text{P}^{\text{C=O}}$), 171.0 ($\text{V}^{\text{C=O}}$), 170.9 ($\text{A}_3^{\text{C=O}}$), 170.8 ($\text{P}^{\text{C=O}}$), 170.5 ($\text{A}_1^{\text{C=O}}$), 170.1 ($\text{D}^{\text{C=O}}$), 170.0 ($\text{S}_1^{\text{C=O}}$), 169.9 ($\text{H}^{\text{C=O}}$), 169.6 ($\text{T}_{1,3}^{\text{C=O}}$), 169.4 ($\text{T}_2^{\text{C=O}}$), 169.2 ($\text{P}^{\text{C=O}}$, $\text{R}^{\text{C=O}}$), 168.8 ($\text{G}_2^{\text{C=O}}$), 168.7 ($\text{G}_1^{\text{C=O}}$), 168.6 ($\text{S}_2^{\text{C=O}}$), 168.5 (CH_2CO), 156.7 (C=C-Squarat), 156.6 (R^ϵ), 133.6 (H^ϵ), 129.0 (H^γ), 117.0 (H^δ), 69.7 ($4 \times \text{OCH}_2$), 68.7 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Squarat}$), 66.8 (T_1^β), 66.5 (T_2^β), 66.4 (OCH_2), 66.3 (OCH_2), 66.2 (T_3^β), 61.7 (S_1^β), 61.6 (S_2^β), 59.6 ($\text{P}_{1,5}^\alpha$), 59.1 ($\text{P}_{2,4}^\alpha$), 58.0 (T_3^α), 57.7 (P_3^α , $\text{T}_{1,2}^\alpha$, V^α), 54.9 (S_1^α), 54.8 (S_2^α), 51.3 (H^α), 50.0 (R^α), 49.5 (D^α), 48.5 (A_2^α), 47.6 (A_4^α), 46.7 ($\text{P}_{1,3,5}^\delta$), 46.6 (P_2^δ), 46.5 (A_1^α), 46.2 (A_3^α), 43.7 (HNCH_2), 41.9 ($\text{G}_{1,2}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 35.6 (D^β), 34.2 (CH_2CO), 30.5 (V^β), 28.8 ($\text{P}_{1,4,5}^\beta$), 28.9 (P_2^β), 28.3 (R^β), 28.1 (P_3^β), 27.0 (H^β), 24.7 (P_5^γ), 24.5 ($\text{P}_{1,4}^\gamma$, R^γ), 24.4 (P_2^γ), 24.3 (P_3^γ), 19.8 (T_3^γ), 19.5 (T_1^γ), 19.3 ($\text{V}^{\gamma b}$), 19.1 (T_2^γ), 18.0 ($\text{V}^{\gamma a}$), 17.2 (A_4^β), 17.3 (A_2^β), 16.8 (A_1^β), 16.5 (A_3^β), 15.6 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Squarat}$) ppm.

5.6.3 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (62)

($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH}$)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere

Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc-FPro-OH* (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 82 mg (39%, 0.03 mmol) des Peptids **62** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 10.3$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{89}H_{142}F_2N_{26}O_{32}$ (2126.26 g/mol) [2125.0252].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 709.3498 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 709.3495), 716.6771 ($[M+2H+Na]^{3+}$, ber.: 716.6767), 1062.0032 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1063.5204).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.29$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^e), 8.30 – 8.12 (m, 3 H, $G_{1,2}^{NH}$ {8.20}, A_3^{NH} {8.14}), 8.11 – 7.69 (m, 11 H, H^{NH} {8.05}, V^{NH} {8.02}, A_2^{NH} , D^{NH} {8.00}, R^{NH} {7.99}, A_4^{NH} {7.95}, A_1^{NH} {7.90}, T_2^{NH} {7.86}, S_2^{NH} {7.81}, S_1^{NH} {7.80}, T_3^{NH} {7.71}), 7.52 (bs, 1 H, R^{NH}), 7.38 (s, 1 H, H^d), 7.29 – 7.23 (m, 1 H, T_1^{NH}), 5.34 (bs, 1 H, FP_1^y), 5.25 (bs, 1 H, FP_2^y), 4.67 – 4.35 (m, 9 H, D^a {4.61}, H^a {4.57}, A_3^a {4.54}, A_1^a {4.52}, R^a {4.46}, FP_2^a {4.44}, FP_1^a {4.43}, P_3^a , S_1^a {4.38}), 4.35 – 4.23 (m, 5 H, T_2^a {4.31}, V^a {4.30}, $P_{1,2}^a$ {4.28}, S_2^a {4.27}), 4.23 – 4.09 (m, 4 H, T_3^a {4.20}, A_4^a {4.18}, T_1^a {4.17}, A_2^a {4.16}), 4.09 – 3.82 (m, 7 H, T_3^b {4.06}, T_2^b {3.97}, $FP_1^{b\beta}$ {3.96}, T_1^b , $FP_2^{b\beta}$ {3.92}, G_1^a {3.89}), 3.82 – 3.44 (m, 26 H, $FP_1^{\delta a}$ {3.78}, $FP_2^{\delta a}$ {3.74}, G_2^a {3.72}, S_1^b {3.64}, P_3^{δ} {3.62}, $2 \times OCH_2$ {3.59}, P_2^{δ} {3.57}, S_2^b {3.56}, $2 \times OCH_2$ {3.55}, P_1^{δ} {3.50}, $2 \times OCH_2$ {3.49}), 3.19 – 3.03 (m, 3 H, $H^{b\beta}$ {3.11}, R^{δ} {3.10}), 3.03 – 2.90 (m, 3 H, H^{ba} {2.99}, H_2NCH_2 {2.97}), 2.74 – 2.35 (m, 7 H, D^{ba} {2.70}, $CH_{2a}CO$ {2.55}, $CH_{2b}CO$ {2.47}, D^{bb} {2.46}, $FP_1^{b\beta}$ {2.40}), 2.34 – 1.66 (m, 19 H, $FP_2^{b\beta}$ {2.34}, FP_1^{ba} {2.17}, FP_2^{ba} {2.14}, P_1^{ba} {2.11}, $P_{2,3}^{b\beta}$, V^b {2.00}, R^{yb} {1.93}, P_3^y {1.86}, P_1^y , R^{ya} {1.85}, P_2^y {1.83}, $P_1^{b\beta}$ {1.79}, $P_{2,3}^{ba}$ {1.78}, $R^{b\beta}$ {1.73}), 1.55 (bs, 1 H, R^{ba}), 1.26 (d, $J_{A4\beta, A4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_4^b), 1.24 – 1.11 (m, 9 H, A_3^b {1.20}, A_2^b {1.18},

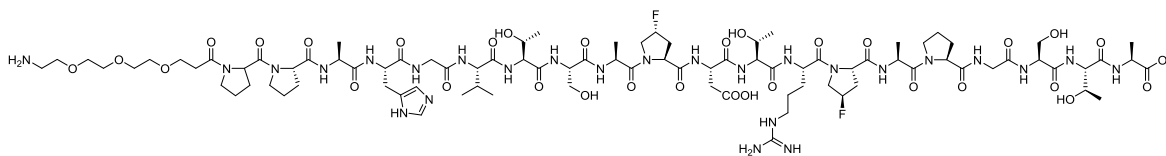
A_1^β {1.16}), 1.09 – 0.95 (m, 6 H, T_3^γ {1.05}, T_2^γ {1.03}, T_1^γ {1.02}), 0.86 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^β), 0.83 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^α) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($A_4^{C=O}$), 172.4 ($A_2^{C=O}$), 172.0 (D^γ), ($P_3^{C=O}$), 171.6 ($P_2^{C=O}$), 171.1 ($A_3^{C=O}$), 170.9 ($V^{C=O}$), 170.6 ($A_1^{C=O}$), 170.3 ($D^{C=O}$), 170.2 ($P_1^{C=O}$), 170.1 ($S_{1,2}^{C=O}$), 170.0 ($G_1^{C=O}$, $R^{C=O}$, $H^{C=O}$), 169.8 ($FP_{1,2}^{C=O}$), 169.7 ($T_{1,3}^{C=O}$), 169.6 ($T_2^{C=O}$), 168.9 ($G_2^{C=O}$), 168.5 (CH_2CO), 156.7 (R^ϵ), 133.7 (H^ϵ), 129.0 (H^γ), 117.1 (H^δ), 93.0 (FP_2^γ), 91.9 (FP_1^γ), 69.6 ($4 \times OCH_2$), 66.8 (T_1^β), 66.7 (OCH_2), 66.6 (T_2^β), 66.3 (T_3^β), 66.2 (OCH_2), 61.8 (S_1^β), 61.7 (S_2^β), 59.9 (P_1^α), 59.2 (P_2^α), 58.8 (P_1^α), 58.3 ($FP_{1,2}^\alpha$), 58.1 (T_1^α), (T_3^α), 57.8 (T_2^α), 57.7 (V^α), 54.9 ($S_{1,2}^\alpha$), 53.1 ($FP_{1,2}^\delta$), 51.4 (H^α), 50.2 (R^α), 49.3 (D^α), 48.5 (A_2^α), 47.7 (A_4^α), 46.7 (P_{1-3}^δ), 46.6 (A_3^α), 46.2 (A_1^α), 42.0 (G_2^α), 41.9 (G_1^α), 40.6 (R^δ), 38.7 (H_2NCH_2), 35.7 (D^β), 35.6 (FP_2^β), 35.5 (FP_1^β), 34.2 (CH_2CO), 30.6 (V^β), 28.8 ($P_{2,3}^\beta$), 28.3 (R^β), 28.1 (P_1^β), 27.0 (H^β), 24.5 (P_{1-3}^γ), 24.4 (R^γ), 19.8 (T_3^γ), 19.6 (T_1^γ), 19.3 (V^β), 19.1 (T_2^γ), 18.0 (V^α), 17.6 (A_2^β), 17.2 (A_4^β), 16.9 (A_1^β), 16.8 (A_3^β) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO- D_6): -173.9 – -174.7 (m, 1 F, FP_1^γ), -174.8 – -175.5 (m, 1 F, FP_2^γ) ppm.

5.6.4 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (63)

($H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CO$ -Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*trans*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst

das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc-FPro-OH* (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 74 mg (35%, 0.03 mmol) des Peptids **63** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 10.3$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₈₉H₁₄₂F₂N₂₆O₃₂ (2126.26 g/mol) [2125.0252].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 709.6833 ([M+3H]³⁺, ber.: 709.3495), 1064.0214 ([M+2H]²⁺, ber.: 1063.5204).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 14.15$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^f), 8.41 (d, $J_{\text{DNH},\text{D}\alpha} = 7.7$ Hz, 1 H, D^{NH}), 8.28 (d, $J_{\text{A3NH},\text{A3}\alpha} = 7.1$ Hz, 1 H, A₃^{NH}), 8.25 – 8.17 (m, 2 H, G₁^{NH} {8.22}, G₂^{NH} {8.21}), 8.14 (d, $J_{\text{A2NH},\text{A2}\alpha} = 7.9$ Hz, 1 H, A₂^{NH}), 8.05 (d, $J_{\text{HNH},\text{H}\alpha} = 8.0$ Hz, 1 H, H^{NH}), 8.02 (d, $J_{\text{VNH},\text{V}\alpha} = 8.2$ Hz, 2 H, V^{NH}, R^{NH} {8.01}), 8.00 (d, $J_{\text{A1NH},\text{A1}\alpha} = 7.0$ Hz, 1 H, A₁^{NH}), 7.95 (d, $J_{\text{A4NH},\text{A4}\alpha} = 7.1$ Hz, 1 H, A₄^{NH}), 7.87 (d, $J_{\text{T2NH},\text{T2}\alpha} = 8.1$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.82 – 7.72 (m, 2 H, S₁^{NH} {7.79}, S₂^{NH} {7.77}), 7.70 (d, $J_{\text{T3NH},\text{T3}\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₃^{NH}), 7.50 (bs, 1 H, R^{NH}), 7.38 (s, 1 H, H^δ), 7.36 (d, $J_{\text{T1NH},\text{T1}\alpha} = 8.1$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 5.41 – 5.35 (m, 1 H, FP₁^γ {5.38}), 5.34 – 5.28 (m, 1 H, FP₂^γ {5.32}), 4.60 – 4.53 (m, 2 H, H^α {4.57}, D^α {4.55}), 5.35 – 4.48 (m, 3 H, P₃^α {4.51}, A₂^α {4.50}, R^α {4.49}), 4.48 – 4.34 (m, 4 H, A₃^α {4.46}, FP_{1,2}^α {4.41}, S₁^α {4.38}), 4.34 – 4.23 (m, 5 H, S₂^α {4.32}, T₂^α, V^α {4.31}, P₁^α {4.29}, P₂^α {4.27}), 4.23 – 4.13 (m, 4 H, T₁^α {4.21}, T₃^α {4.20}, A₄^α {4.18}, A₁^α {4.16}), 4.11 – 3.85 (m, 7 H, FP₂^{δb} {4.09}, T₃^β {4.06}, FP₁^{δb} {4.04}, T₂^β {3.98}, T₁^β {3.94}, G₁^α {3.89}), 3.77 – 3.61 (m, 8 H, FP₁^{δa} {3.73}, G₂^α {3.72}, FP₂^{δa} {3.68}, S₁^β {3.65}, P₁^δ {3.63}), 3.61 – 3.43 (m, 18 H, OCH₂ {3.59}, S₂^β {3.57}, 2 × OCH₂ {3.56}, OCH₂, P₂^δ {3.54}, 2 × OCH₂, P₃^δ {3.50}), 3.15 – 3.04 (m, 3 H, H^{βb} {3.13}, R^δ {3.09}), 3.01 – 2.94 (m, 3 H, H^{βa} {2.99}, H₂NCH₂ {2.98}), 2.73 (dd, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\beta\text{b}} = 16.3$ Hz, $J_{\text{D}\beta\text{a},\text{D}\alpha} = 6.3$ Hz, 1 H, D^{βa}), 2.59 – 2.34 (m, 5 H, CH_{2a}CO {2.56}, D^{βb} {2.52}, CH_{2b}CO {2.47}, FP₁^{βb} {2.39}, FP₂^{βb} {2.37}), 2.14 – 1.65 (m, 18 H, P₃^{βb} {2.11}, P₂^{βb} {2.04}, FP₁^{βa} {2.03}, V^β {2.01}, P₁^{βa} {2.00}, FP₂^{βa}

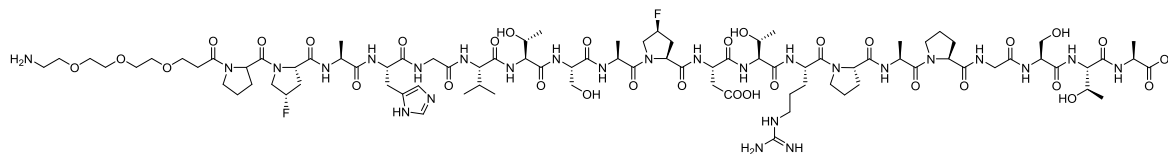
{1.96}, P_2^γ , $R^{\gamma b}$ {1.95} {1.95}, P_3^γ {1.92}, $R^{\gamma a}$ {1.87}, P_1^γ {1.86}, $P_2^{\beta a}$ {1.84}, $P_3^{\beta a}$ {1.80}, $P_1^{\beta b}$ {1.78}, $R^{\beta b}$ {1.68}), 1.53 (bs, 1 H, $R^{\beta a}$), 1.27 (d, $J_{A_4\beta, A_4\alpha} = 7.2$ Hz, 3 H, A_4^β), 1.21 (d, $J_{A_3\beta, A_3\alpha} = 6.9$ Hz, 3 H, A_3^β), 1.20 – 1.17 (m, 6 H, A_2^β {1.19}, A_1^β {1.18}), 1.06 (d, $J_{T_3, T_3\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T_3^γ), 1.04 (d, $J_{T_2, T_2\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.00 (d, $J_{T_1, T_1\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.87 (d, $J_{V_7b, V_7\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.83 (d, $J_{V_7a, V_7\beta} = 6.9$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ ($A_4^{C=O}$), 172.3 ($A_1^{C=O}$), 171.9 ($G_2^{C=O}$, $P_2^{C=O}$), 171.8 (D^γ), 171.5 ($P_1^{C=O}$), 171.4 ($V^{C=O}$), 171.0 ($FP_{1,2}^{C=O}$), 170.8 ($A_{2,3}^{C=O}$), 170.2 ($P_3^{C=O}$), 170.1 ($D^{C=O}$, $S_1^{C=O}$), 170.0 ($H^{C=O}$, $S_2^{C=O}$), 169.7 ($T_3^{C=O}$), 169.6 ($T_{1,2}^{C=O}$), 169.5 ($R^{C=O}$), 168.8 ($G_1^{C=O}$), 168.4 (CH_2CO), 156.7 (R^e), 133.5 (H^e), 128.9 (H^γ), 117.0 (H^δ), 93.0 (FP_2^γ), 92.1 (FP_1^γ), 69.7 ($4 \times OCH_2$), 66.8 (T_1^β), 66.6 (OCH_2 , T_2^β), 66.3 (OCH_2 , T_3^β), 61.7 ($S_{1,2}^\beta$), 59.8 (P_2^α), 59.2 (P_1^α), 58.1 ($FP_{1,2}^\alpha$), 58.0 ($T_{1,3}^\alpha$), 57.8 (T_2^α , V^α), 57.6 (P_3^α), 54.9 (S_1^α), 54.7 (S_2^α), 53.4 (FP_2^δ), 53.3 (FP_1^δ), 51.4 (H^α), 50.1 (R^α), 49.5 (D^α), 48.4 (A_1^α), 47.6 (A_4^α), 46.8 ($P_{2,3}^\delta$), 46.6 (A_2^α , P_1^δ), 46.4 (A_3^α), 42.0 (G_2^α), 41.9 (G_1^α), 40.5 (R^δ), 38.6 (H_2NCH_2), 35.8 (FP_2^β), 35.6 (D^β , FP_1^β), 34.2 (CH_2CO), 30.7 (V^β), 29.0 (P_2^β), 28.8 (P_1^β), 28.1 (P_3^β , R^β), 27.0 (H^β), 24.5 ($P_{1,2}^\gamma$, R^γ), 24.3 (P_3^γ), 19.8 (T_3^γ), 19.5 (T_1^γ), 19.3 (T_2^γ , $V^{\gamma b}$), 18.0 ($V^{\gamma a}$), 17.6 (A_1^β), 17.2 (A_4^β), 16.6 (A_2^β), 16.5 (A_3^β) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO- D_6): -178.0 – -179.0 (m, 2 F, $FP_{1,2}^\gamma$) ppm.

5.6.5 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (64)

($H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CO$ -Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst für 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal für 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid für 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung

zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure für 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss für 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan für 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 88 mg (41%, 0.04 mmol) des Peptids **64** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 12.1$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₈₉H₁₄₂F₂N₂₆O₃₂ (2126.26 g/mol) [2125.0252].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 709.6829 ([M+3H]³⁺, ber.: 709.3495), 1062.5071 ([M+2H]²⁺, ber.: 1063.5204).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 14.22$ (bs, 1 H, COOH), 8.89 (s, 1 H, H^e), 8.66 – 8.55 (m, 1 H, H^{NH} {8.60}), 8.32 – 7.75 (m, 12 H, G₁^{NH} {8.23}, G₂^{NH} {8.21}, A₃^{NH} {8.14}, H^{NH} {8.12}, A₂^{NH} {8.10}, V^{NH} {8.04}, D^{NH} {8.00}, R^{NH} {7.96}, A₄^{NH} {7.95}, T₂^{NH} {7.87}, S₁^{NH} {7.82}, S₂^{NH} {7.79}), 7.73 – 7.68 (m, 2 H, A₁^{NH} {7.72}, T₃^{NH} {7.71}), 7.58 (bs, 1 H, R^{NH} {7.58}), 7.35 (s, 1 H, H^o), 7.28 – 7.23 (m, 1 H, T₁^{NH} {7.25}), 5.41 – 5.22 (m, 2 H, FP₁^γ {5.37}, FP₂^γ {5.28}), 4.68 – 4.51 (m, 3 H, D^α {4.62}, H^α {4.58}, A₃^α {4.54}), 4.50 – 4.35 (m, 6 H, R^α {4.48}, P₁^α, FP₁^α, A₂^α {4.46}, FP₂^α {4.42}, S₂^α {4.38}), 4.34 – 4.22 (m, 6 H, P₂^α {4.32}, T₂^α, V^α {4.31}, S₁^α {4.28}, P₃^α {4.27}, A₁^α {4.24}), 4.22 – 4.11 (m, 3 H, T_{1,3}^α {4.20}, A₄^α {4.18}), 4.09 – 4.00 (m, 2 H, T₃^β {4.06}, FP₁^{δb} {4.02}), 4.00 – 3.83 (m, 6 H, T₂^β {3.98}, T₁^β {3.92}, FP₂^{δb}, G₂^α {3.87}, FP₁^{δa} {3.85}), 3.79 – 3.68 (m, 3 H, FP₂^{δa} {3.73}, G₁^α {3.71}), 3.66 – 3.45 (m, 22 H, P₂^{δa} {3.65}, S₂^β {3.64}, S₁^β {3.60}, OCH₂ {3.59}, OCH₂ {3.58}, P₃^δ {3.56}, 2 × OCH₂, P₁^δ {3.55}, P₂^{δb} {3.50}, 2 × OCH₂ {3.49}), 3.09 (bs, 3 H, H^{bb} {3.09}, R^δ {3.08}), 2.97 (bs, 3 H, H^{Ba} {2.98}, H₂NCH₂ {2.97}), 2.72 – 2.66 (m, 1 H, D^{Ba}

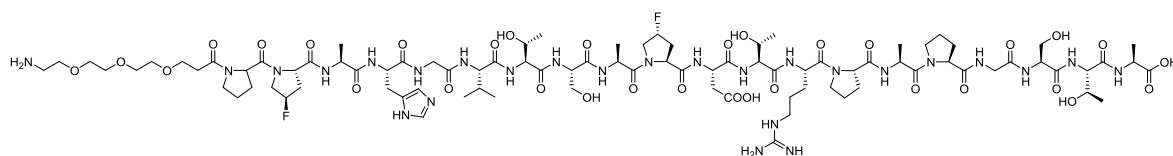
{2.69}), 2.62 – 2.28 (m, 7 H, CH_{2a}CO {2.58}, CH_{2b}CO {2.49}, $\text{D}^{\beta b}$ {2.46}, $\text{FP}_1^{\beta b}$ {2.39}, $\text{FP}_2^{\beta b}$ {2.32}), 2.26 – 2.11 (m, 3 H, $\text{FP}_1^{\beta a}$ {2.22}, $\text{FP}_2^{\beta a}$ {2.20}, $\text{P}_1^{\beta b}$ {2.16}), 2.09 – 1.91 (m, 9 H, $\text{P}_{2,3}^{\beta b}$ {2.02}, V^{β} {2.00}, $\text{P}_{1,3}^{\gamma}$ {1.95}), 1.90 – 1.65 (m, 6 H, $\text{P}_1^{\beta a}$ {1.88}, P_2^{γ} , $\text{P}_{2,3}^{\beta a}$ {1.84}, $\text{R}^{\beta b}$ {1.70}), 1.53 (bs, 3 H, R^{γ} , $\text{R}^{\beta a}$), 1.26 (d, $J_{A4\beta, A4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_4^{β}), 1.23 – 1.13 (m, 9 H, A_3^{β} {1.20}, A_2^{β} {1.19}, A_1^{β} {1.16}), 1.05 (d, $J_{T3\gamma, T3\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, T_3^{γ}), 1.04 – 0.98 (m, 6 H, T_2^{γ} {1.02}, T_1^{γ} {1.01}), 0.86 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $\text{V}^{\gamma a}$), 0.82 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, $\text{V}^{\gamma b}$) ppm.

^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($\text{A}_4^{\text{C=O}}$), 172.2 ($\text{A}_1^{\text{C=O}}$), 172.0 ($\text{P}_{2,3}^{\text{C=O}}$, D^{γ}), 171.8 ($\text{A}_3^{\text{C=O}}$), 171.1 ($\text{P}_1^{\text{C=O}}$), 171.0 ($\text{A}_2^{\text{C=O}}$), 170.9 ($\text{V}^{\text{C=O}}$), 170.4 ($\text{FP}_2^{\text{C=O}}$), 170.2 ($\text{FP}_1^{\text{C=O}}$, $\text{D}^{\text{C=O}}$, $\text{T}_1^{\text{C=O}}$), 170.1 ($\text{S}_2^{\text{C=O}}$), 170.0 ($\text{G}_1^{\text{C=O}}$, $\text{H}^{\text{C=O}}$), 169.7 ($\text{T}_3^{\text{C=O}}$), 169.5 ($\text{S}_1^{\text{C=O}}$, $\text{T}_2^{\text{C=O}}$), 169.4 ($\text{R}^{\text{C=O}}$), 169.2 ($\text{G}_2^{\text{C=O}}$), 168.7 (CH_2CO), 156.8 (R^{ϵ}), 133.7 (H^{ϵ}), 129.1 (H^{γ}), 117.1 (H^{δ}), 93.2 (FP_2^{γ}), 92.0 (FP_1^{γ}), 69.6 (OCH_2), 66.8 (T_1^{β}), 66.6 (OCH_2 , T_2^{β}), 66.2 (OCH_2 , T_3^{β}), 61.7 (S_2^{β}), 61.5 (S_1^{β}), 59.8 (P_3^{α}), 59.1 (P_2^{α}), 58.8 (FP_2^{α}), 58.2 (FP_1^{α}), 58.0 ($\text{T}_{1,3}^{\alpha}$), 57.8 (T_2^{α} , V^{α}), 57.7 (P_1^{α}), 54.9 ($\text{S}_{1,2}^{\alpha}$), 53.3 (FP_1^{δ}), 53.0 (FP_1^{δ}), 51.5 (H^{α}), 50.1 (R^{α}), 49.2 (D^{α}), 48.2 (A_1^{α}), 47.6 (A_4^{α}), 47.3 ($\text{P}_{1,3}^{\delta}$), 46.8 (P_2^{δ}), 46.6 (A_3^{α}), 46.3 (A_2^{α}), 42.0 (G_1^{α}), 41.9 (G_2^{α}), 40.5 (R^{δ}), 38.6 (H_2NCH_2), 35.7 (D^{β}), 35.3 (FP_1^{β}), 35.2 (FP_2^{β}), 34.2 (CH_2CO), 30.6 (V^{β}), 29.1 ($\text{P}_{2,3}^{\beta}$), 28.3 (P_1^{β}), 28.2 (R^{β}), 27.1 (H^{β}), 24.5 ($\text{P}_{1,3}^{\gamma}$, R^{γ}), 19.8 (T_3^{γ}), 19.4 (T_1^{γ}), 19.2 ($\text{V}^{\gamma a}$), 19.1 (T_2^{γ}), 18.0 ($\text{V}^{\gamma b}$), 17.9 (A_1^{β}), 17.2 (A_4^{β}), 16.8 (A_3^{β}), 16.6 (A_2^{β}) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -174.3 – -175.0 (m, 1 F, FP_1^{γ}), -175.3 – -176.2 (m, 1 F, FP_2^{γ}) ppm.

5.6.6 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (65)

($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ -Pro-*trans*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc*-Ala-Wang vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle

Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc-Arg(Pbf)-OH* und *Fmoc-His(Trt)-OH* wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc-FPro-OH* (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 163 mg (77%, 0.08 mmol) des Peptids **65** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 10.2$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₈₉H₁₄₂F₂N₂₆O₃₂ (2126.26 g/mol) [2125.0252].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 709.3493 ([M+3H]³⁺, ber.: 709.3495), 1064.0217 ([M+2H]²⁺, ber.: 1063.5204).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 14.19$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H⁶), 8.46 – 8.16 (m, 4 H, D^{NH} {8.41}, G_{1,2}^{NH} {8.20}, A₁^{NH} {8.13}), 8.16 – 7.85 (m, 7 H, A₃^{NH} {8.10}, H^{NH} {8.06}, V^{NH} {8.03}, R^{NH} {7.96}, A₄^{NH} {7.95}, T₂^{NH} {7.88}, A₂^{NH} {7.85}), 7.85 – 7.67 (m, 3 H, S₁^{NH} {7.81}, S₂^{NH} {7.78}, T₃^{NH} {7.70}), 7.54 – 7.33 (m, 2 H, R^{NH} {7.48}, H⁵, T₁^{NH} {7.36}), 5.40 (ps, 1 H, FP₁^γ), 5.33 (ps, 1 H, FP₂^γ), 4.65 – 4.13 (m, 18 H, H^α, P₃^α {4.56}, D^α {4.54}, A₁^α {4.50}, R^α {4.49}, FP₁^α {4.48}, A₃^α {4.46}, FP₂^α {4.40}, S₂^α {4.38}, S₁^α {4.32}, P₁^α {4.31}, V^α {4.30}, T₂^α {4.29}, P₂^α {4.27}, T_{1,3}^α {4.20}, A₄^α {4.18}, A₂^α {4.17}), 4.10 – 3.83 (m, 7 H, FP₁^{δb} {4.06}, FP₂^{δb}, T₃^β {4.04}, T₂^β {3.98}, T₁^β {3.96}, G₁^α {3.87}), 3.81 – 3.31 (m, 26 H, G₂^α {3.72}, FP₁^{δa} {3.71}, FP₂^{δa} {3.67}, S₁^β {3.65}, P₂^{δa} {3.63}, OCH₂ {3.58}, P₃^δ {3.57}, S₂^β {3.56}, 2 × OCH₂ {3.55}, OCH₂ {3.53}, P₁^δ {3.52}, 2 × OCH₂ {3.50}, P₂^{δb} {3.48}), 3.17 – 3.04 (m, 3 H, H^{βb}, R^δ {3.10}), 3.04 – 2.84 (m, 3 H, H₂NCH₂, H^{βa} {2.97}), 2.61 – 2.31 (m, 8 H, D^{βa} {2.72}, CH_{2a}CO {2.56}, D^{βb} {2.52}, CH_{2b}CO {2.46}, FP₁^β {2.38}, FP₂^β {2.36}), 2.10 – 1.65 (m, 14 H, P₂^{βa} {2.06}, P₃^{βa} {2.04}, P₁^{βa}

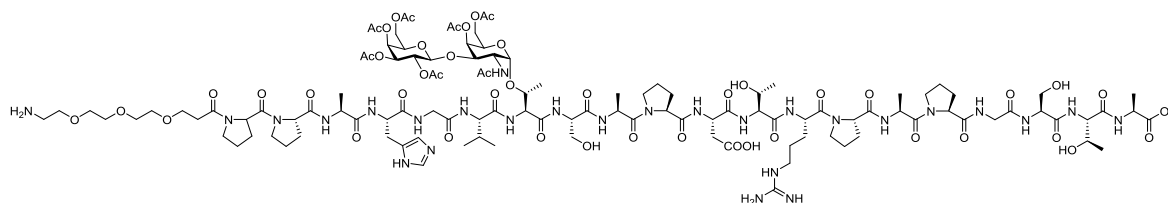
{2.03}, V^β {2.01}, P_3^γ {1.95}, $P_3^{\beta\beta}$, $P_{1,2}^\gamma$ {1.84}, $P_1^{\beta\beta}$ {1.83}, $P_2^{\beta\beta}$ {1.77}, $R^{\beta\beta}$ {1.70}), 1.52 (bs, 3 H, R^γ , $R^{\beta\alpha}$), 1.26 (d, $J_{A_4\beta, A_4\alpha} = 7.4$ Hz, 3 H, A_4^β), 1.24 – 1.12 (m, 9 H, A_1^β {1.22}, A_3^β {1.19}, A_2^β {1.18}), 1.05 (d, $J_{T_3\gamma, T_3\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T_3^γ), 1.04 (d, $J_{T_2\gamma, T_2\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.00 (d, $J_{T_1\gamma, T_1\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.87 (d, $J_{V_7\alpha, V_7\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V_7^α), 0.83 (d, $J_{V_7\beta, V_7\alpha} = 6.8$ Hz, 3 H, V_7^β) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($A_4^{C=O}$), 172.3 ($A_2^{C=O}$), 172.0 ($P_3^{C=O}$), 171.9 ($P_2^{C=O}$), 171.8 (D^γ), 171.0 ($A_3^{C=O}$, $FP_2^{C=O}$), 170.9 ($FP_1^{C=O}$, $P_1^{C=O}$, $R^{C=O}$, $V^{C=O}$), 170.2 ($D^{C=O}$), 170.1 ($S_{1,2}^{C=O}$), 170.0 ($G_1^{C=O}$, $H^{C=O}$), 169.7 ($T_{1-3}^{C=O}$), 169.1 ($A_1^{C=O}$), 168.8 ($G_2^{C=O}$), 168.5 (CH_2CO), 156.7 (R^e), 133.5 (H^e), 129.0 (H^f), 117.0 (H^d), 93.0 (FP_2^γ), 92.2 (FP_1^γ), 69.7 ($2 \times OCH_2$), 69.6 ($2 \times OCH_2$), 66.9 (T_1^β), 66.6 (OCH_2 , T_2^β), 66.3 (OCH_2 , T_3^β), 61.7 (S_2^β), 61.6 (S_1^β), 59.8 (P_3^α), 59.1 (P_1^α), 58.1 (T_3^α), 58.0 (FP_2^α), 57.9 (T_2^α), 57.8 (T_1^α , V^α), 57.7 (FP_1^α), 57.5 (P_2^α), 54.9 (S_2^α), 54.8 (S_1^α), 53.4 (FP_1^δ), 53.2 (FP_1^δ), 51.4 (H^α), 50.0 (R^α), 49.5 (D^α), 48.5 (A_2^α), 47.6 (A_4^α), 46.8 (P_2^δ), 46.7 ($P_{1,3}^\delta$), 46.6 (A_1^α), 46.3 (A_3^α), 41.9 ($G_{1,2}^\alpha$), 40.5 (R^δ), 38.7 (H_2NCH_2), 35.6 (D^β), 35.5 ($FP_{1,2}^\beta$), 34.3 (CH_2CO), 30.6 (V^β), 29.1 ($P_{1,3}^\beta$), 28.3 (R^β), 28.0 (P_2^β), 27.0 (H^β), 24.5 (P_3^γ , R^γ), 24.4 ($P_{1,2}^\gamma$), 19.7 (T_3^γ), 19.5 (T_1^γ), 19.3 (T_2^γ , V_7^α), 18.0 (V_7^β), 17.7 (A_1^β), 17.5 (A_2^β), 17.1 (A_4^β), 16.6 (A_3^β) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO- D_6): -176.8 – -177.5 (m, 1 F, FP_1^γ), -177.6 – -178.9 (m, 1 F, FP_2^γ) ppm.

5.6.7 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (66)

($H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CO$ -Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-T_{AG}-OH wurde für alle

Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-T_{AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 64 mg (23%, 0.02 mmol) des Peptids **66** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 13.6$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₁₁₅H₁₇₉N₂₇O₄₈ (2707.94 g/mol) [2706.2396].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 903.0891 ([M+3H]³⁺, ber.: 903.0877), 1354.1294 ([M+2H]²⁺, ber.: 1354.1276).

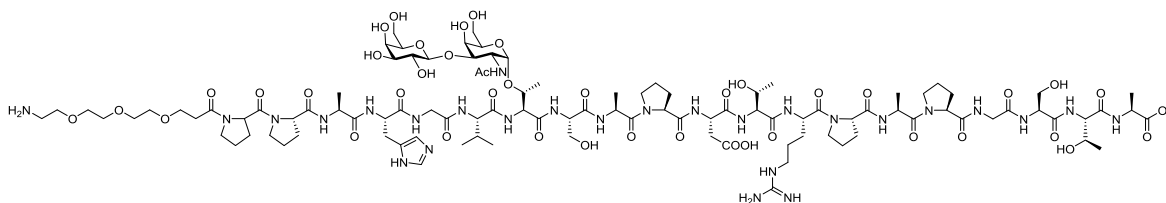
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-*D*₆): $\delta = 8.96$ (s, 1 H, H^f), 8.24 – 7.65 (m, 14 H, D^{NH}, G₂^{NH} {8.21}, G₁^{NH} {8.20}, H^{NH} {8.10}, A₂^{NH} {8.09}, A₃^{NH} {8.08}, A₁^{NH} {8.01}, T*^{NH} {8.00}, V^{NH} {7.97}, A₄^{NH}, R^{NH} {7.96}, S₂^{NH} {7.80}, S₁^{NH} {7.79}, T₂^{NH} {7.72}), 7.48 (bs, 1 H, R^{NH}), 7.37 (s, 1 H, H^δ), 7.36 – 7.30 (m, 1 H, T₁^{NH} {7.34}), 5.34 – 5.21 (m, 2 H, H₄ {5.30}, H₄' {5.23}), 5.09 – 5.05 (m, 1 H, H₂' {5.07}), 4.87 – 4.71 (m, 3 H, H₅' {4.85}, H₁ {4.81}, H₁' {4.75}), 4.61 – 3.29 (m, 54 H, H^α {4.57}, D^α {4.55}, R^α, V^α {4.50}, A₃^α {4.49}, A₂^α {4.46}, T*^α, H₂ {4.45}, S₁^α {4.39}, P^α {4.32}, P^α, S₂^α {4.30}, P^α {4.27}, T_{1,2}^α {4.20}, H₃ {4.18}, A₄^α {4.17}, A₁^α {4.16}, T*^β, H₃' {4.13}, H_{6a} {4.13}, T₂^β {4.06}, H_{6a}' {4.01}, H₅ {3.95}, T₁^β {3.94}, H_{6b}' {3.92}, G₁^{αα} {3.86}, H_{6b} {3.82}, G₁^{αβ} {3.78}, G₂^α {3.72}, S_{1,2}^{βa} {3.64}, P^δ {3.63}, 2 × OCH₂ {3.58}, P^δ {3.57}, OCH₂ {3.56}, S_{1,2}^{βb} {3.55}, OCH₂ {3.54}, P^δ {3.53}, 2 × OCH₂, P^δ {3.50}, P^δ {3.36}), 3.17 – 3.04 (m, 1 H, H^{βa} {3.12}), 3.03 – 2.93 (m, 5 H, R^δ {3.09}, H^{βb}, H₂NCH₂ {2.97}), 2.77 – 2.70 (m, 1 H, D^{βa} {2.74}), 2.61 – 2.38 (m, 3 H, CH_{2a}CO {2.57}, D^{βb} {2.53}, CH_{2b}CO {2.47}), 2.14 – 1.66 (m, 50 H, P₁^{βa} {2.10}, CH₃-OAc

{2.09}, $\text{CH}_3\text{-OAc}$, P^β {2.04}, $\text{CH}_3\text{-OAc}$ {2.01}, V^β {2.00}, $2 \times \text{CH}_3\text{-OAc}$ {1.98}, $\text{P}_{1-5}^{\gamma a}$ {1.93}, $\text{CH}_3\text{-OAc}$ {1.90}, $\text{P}_{1-5}^{\gamma b}$ {1.85}, P^β {1.84}, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$ {1.83}, $\text{P}_{1}^{\beta b}$ {1.80}, P^β {1.77}, $\text{R}^{\beta a}$ {1.70}), 1.52 (bs, 3 H, R^γ , $\text{R}^{\beta b}$), 1.26 (d, $J_{\text{A}4\beta, \text{A}\alpha} = 7.4$ Hz, 3 H, A_4^α), 1.24 – 1.16 (m, 9 H, A_3^α {1.22}, A_2^α {1.19}, A_1^α {1.18}), 1.14 (d, $J_{\text{T}^*\gamma, \text{T}\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, $\text{T}^*\gamma$), 1.05 (d, $J_{\text{T}2\gamma, \text{T}2\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.00 (d, $J_{\text{T}1\gamma, \text{T}1\beta} = 6.0$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.91 (d, $J_{\text{V}\gamma b, \text{V}\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $\text{V}^{\gamma b}$), 0.83 (d, $J_{\text{V}\gamma a, \text{V}\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $\text{V}^{\gamma a}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, DMSO-D_6): $\delta = 173.8$ ($\text{A}_4^{\text{C=O}}$), 172.3 ($\text{A}_1^{\text{C=O}}$, $\text{T}^{\text{C=O}}$), 171.9 (D^γ), 170.9 ($\text{A}_3^{\text{C=O}}$, $\text{R}^{\text{C=O}}$), 170.8 ($\text{A}_2^{\text{C=O}}$), 170.2 ($\text{D}^{\text{C=O}}$), 170.0 ($\text{S}_{1,2}^{\text{C=O}}$, $\text{V}^{\text{C=O}}$), 169.9 ($\text{H}^{\text{C=O}}$, $\text{T}_{1,2}^{\text{C=O}}$, $3 \times \text{COAc}$), 169.6 ($3 \times \text{COAc}$), 169.2 (CO-NHAc), 168.9 ($\text{G}_2^{\text{C=O}}$), 168.7 ($\text{G}_1^{\text{C=O}}$), 156.6 (R^ϵ), 133.4 (H^ϵ), 129.1 (H^γ), 116.7 (H^δ), 99.9 ($\text{C}1'$), 98.2 ($\text{C}1$), 75.3 (T^{β}), 74.2 ($\text{C}5$), 70.0 ($\text{C}2'$), 69.5 ($2 \times \text{OCH}_2$), 69.4 ($2 \times \text{OCH}_2$), 69.2 ($\text{C}3'$, $\text{C}4$), 68.2 ($\text{C}5'$), 67.0 ($\text{C}3$), 66.7 ($\text{C}4'$), 66.6 ($\text{T}_{1,2}^\beta$), 66.3 ($2 \times \text{OCH}_2$), 66.0 (T_2^β), 62.9 ($\text{C}6$), 61.5 ($\text{S}_{1,2}^\beta$), 60.3 ($\text{C}6'$), 59.5 (P_5^α), 59.1 ($\text{P}_{3,4}^\alpha$), 58.9 ($\text{P}_{1,2}^\alpha$), 57.7 ($\text{T}_{1,2}^\alpha$), 57.3 (V^α), 55.9 (T^{α}), 54.7 (S_1^α), 54.6 (S_2^α), 51.2 (H^α), 49.8 (D^α , R^α), 48.2 (A_1^α), 47.4 (A_4^α), 46.5 (P_{1-3}^δ), 46.4 (P_4^δ), 46.2 (A_3^α , P_5^δ), 46.1 ($\text{C}2$), 46.0 (A_2^α), 41.8 (G_2^α), 41.7 (G_1^α), 40.3 (R^δ), 38.4 (H_2NCH_2), 35.3 (D^β), 34.0 (CH_2CO), 30.8 (V^β), 28.8 (P_{1-5}^β), 28.1 (R^β), 26.7 (H^β), 24.3 (R^γ), 24.2 (P_{1-5}^γ), 22.6 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 20.4 , 20.3 , 20.2 , 20.1 ($6 \times \text{CH}_3\text{-OAc}$), 19.6 (T_2^γ), 19.3 (T_1^γ), 18.9 ($\text{V}^{\gamma b}$), 17.9 ($\text{V}^{\gamma a}$), 17.7 ($\text{T}^*\gamma$), 17.3 (A_1^β), 16.9 (A_4^β), 16.5 (A_3^β), 16.4 (A_2^β) ppm.

5.6.8 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (71)

($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH}$)



64 mg (23.6 μmol , 1.0 Äquiv.) Glycopeptid **66** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) \rightarrow (40:60) 20 min; (40:60) \rightarrow (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 31 mg (53%, 12.6 μmol) des Peptids **71** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 7.6$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $\text{C}_{103}\text{H}_{167}\text{N}_{27}\text{O}_{42}$ (2455.62 g/mol) [2454.1762].

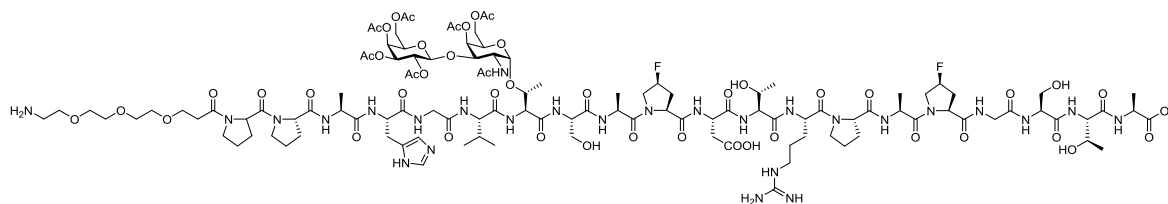
HR ESI-MS (positiv), m/z: 819.3997 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 819.0665), 1239.0841 ($[M+H+Na]^{2+}$, ber.: 1239.0866).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): δ = 8.95 (s, 1 H, H^e), 8.34 – 7.77 (m, 13 H, T^{*NH} {8.32}, D^{NH} {8.25}, G_2^{NH} {8.23}, G_1^{NH} {8.21}, $A_{2,3}^{NH}$ {8.13}, H^{NH} {8.10}, $S_{1,2}^{NH}$ {8.05}, A_1^{NH} {8.02}, A_4^{NH} , V^{NH} {7.96}, R^{NH} {7.94}), 7.71 (d, $J_{TNH,T2\alpha}$ = 8.9 Hz, 1 H, T_2^{NH}), 7.58 (bs, 1 H, R^{NH}), 7.37 (s, 1 H, H^d), 7.36 – 7.30 (m, 1 H, T_1^{NH} {7.34}), 4.81 (bs, 1 H, $H1$), 4.60 – 4.02 (m, 22 H, H^a {4.57}, D^a {4.53}, V^a , R^a {4.50}, A_3^a {4.49}, A_2^a {4.46}, T^{*a} {4.45}, S_1^a {4.37}, S_2^a , P_{1-5}^a {4.30}, $H1'$ {4.23}, $T_{1,2}^a$ {4.20}, A_4^a {4.18}, A_1^a {4.16}, $H2$ {4.15}, T^{*b} {4.12}, T_2^b {4.06}), 3.97 – 3.82 (m, 3 H, T_1^b {3.95}, $H4$ {3.90}, G_1^{aa} {3.86}), 3.78 – 3.42 (m, 29 H, G_1^{ab} {3.76}, G_2^{aa} , $H5$ {3.73}, G_2^{ab} {3.70}, $H3$ {3.68}, S_1^{ba} {3.65}, P_1^d {3.63}, $H3'$ {3.62}, $2 \times OCH_2$ {3.59}, P_2^d {3.58}, S_1^{bb} , $2 \times OCH_2$ {3.55}, $H6a$, $H6a'$, S_2^{ba} , OCH_2 , P_3^d {3.53}, OCH_2 {3.50}, P_4^d {3.49}, $H6b$, $H6b'$, S_2^{bb} {3.46}), 3.38 – 3.23 (m, 5 H, P_5^d {3.36}, $H2'$ {3.33}, $H5'$ {3.32}, $H4'$ {3.26}), 3.17 – 3.03 (m, 3 H, H^{ba} {3.12}, R^d {3.09}), 3.03 – 2.94 (m, 3 H, H^{bb} , H_2NCH_2 {2.98}), 2.73 (dd, $J_{D\beta a, D\beta b}$ = 16.5 Hz, $J_{D\beta a, D\alpha}$ = 5.9 Hz, 1 H, D^{ba}), 2.60 – 2.40 (m, 3 H, $CH_{2a}CO$ {2.56}, D^{bb} {2.53}, $CH_{2b}CO$ {2.47}), 2.13 – 1.66 (m, 28 H, P_1^b {2.10}, P_{2-3}^b {2.04}, V^b {1.97}, P_{1-5}^y {1.86}, CH_3-NHAc , P_4^b {1.84}, P_5^{bb} {1.77}, R^{ba} {1.71}), 1.52 (bs, 3 H, R^y , R^{bb}), 1.26 (d, $J_{A_4\beta, A_4\alpha}$ = 7.3 Hz, 3 H, A_4^a), 1.24 – 1.16 (m, 9 H, A_3^a {1.21}, A_2^a {1.19}, A_1^a {1.18}), 1.14 (d, $J_{T^{*y}, T\beta}$ = 5.8 Hz, 3 H, T^{*y}), 1.05 (d, $J_{T_2^y, T_2\beta}$ = 6.4 Hz, 3 H, T_2^y), 1.00 (d, $J_{T_1^y, T_1\beta}$ = 6.1 Hz, 3 H, T_1^y), 0.90 (d, $J_{V^y b, V\beta}$ = 6.5 Hz, 3 H, V^{yb}), 0.85 (d, $J_{V^y a, V\beta}$ = 6.7 Hz, 3 H, V^{ya}) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): δ = 173.9 ($A_4^{C=O}$), 172.5 ($T^{*C=O}$), 172.4 ($A_1^{C=O}$), 172.1 ($G_1^{C=O}$), 171.8 ($A_3^{C=O}$, D^y), 171.3 ($V^{C=O}$), 170.9 ($A_2^{C=O}$, $R^{C=O}$, $CO-NHAc$), 170.2 ($D^{C=O}$, $H^{C=O}$), 170.0 ($S_{1,2}^{C=O}$), 169.4 ($T_1^{C=O}$), 169.6 ($T_2^{C=O}$), 168.9 ($G_2^{C=O}$), 156.6 (R^e), 133.3 (H^e), 129.4 (H^y), 116.7 (H^d), 104.6 ($C1'$), 98.3 ($C1$), 77.8 ($C3$), 75.2 ($C5$), 75.0 (T^{*b}), 72.9 ($C4'$), 71.3 ($C5'$), 70.5 ($C2'$), 69.5 ($2 \times OCH_2$), 69.4 (OCH_2), 67.9 ($C3'$), 67.6 ($C4$), 66.6 (T_1^b), 66.3 ($2 \times OCH_2$), 66.2 (T_2^b , OCH_2), 61.5 (S_1^b), 60.4 ($C6$, $C6'$, S_2^b), 59.2 (P_{1-5}^a), 57.8 ($T_{1,2}^a$), 57.3 (V^a), 55.9 (T^{*a}), 54.7 (S_1^a), 54.6 (S_2^a), 51.2 (H^a), 49.8 (A_3^a , R^a), 49.3 (D^a), 48.1 (A_1^a , $C2$), 47.6 (A_4^a), 46.5 (P_{1-4}^d), 46.2 (A_2^a , P_5^d), 41.8 ($G_{1,2}^a$), 40.3 (R^d), 38.5 (H_2NCH_2), 35.3 (D^b), 34.0 (CH_2CO), 30.9 (V^b), 28.8 (P_{2-4}^b), 28.7 (P_5^b), 28.2 (R^b), 27.8 (P_1^b), 26.7 (H^b), 24.3 (R^y), 24.2 (P_{1-5}^y), 22.7 (CH_3-NHAc), 19.0 (V^{yb}), 18.0 (V^{ya}), 19.6 (T_2^y), 19.4 (T_1^y), 17.9 (T^{*y}), 17.0 (A_4^b), 16.6 (A_{1-3}^b) ppm.

5.6.10 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (67)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-T_{AG}-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplungen von *Fmoc*-T_{AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 88 mg (32%, 0.03 mmol) des Peptids **67** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 14.8$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{115}H_{177}F_2N_{27}O_{48}$ (2743.82 g/mol) [2742.2207].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 915.0802 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 915.0814), 1372.6186 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1372.1182).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 8.95$ (s, 1 H, H^c), 8.91 (d, $J_{A_4NH,A_4\alpha} = 7.0$ Hz, 1 H, A_4^{NH}), 8.26 – 8.06 (m, 4 H, G_1^{NH} {8.20}, A_2^{NH} {8.18}, S_1^{NH} {8.13}, H^{NH} {8.08}), 8.02 – 7.91 (m, 7 H, T^{*NH} {8.00}, A_1^{NH} {7.99}, G_2^{NH} {7.96}, A_3^{NH} , R^{NH} {7.95}, D^{NH} , V^{NH} {7.94}), 7.85 – 7.68 (m, 2 H, S_2^{NH} {7.75}, T_2^{NH} {7.72}), 7.56 – 7.44 (m, 1 H, R^{NH} {7.46}), 7.37 (s, 1 H, H^d), 7.31 – 7.23 (m, 2 H, $NHAc$, T_1^{NH} {7.30}), 5.38 (bs, 1 H, FP_1^y), 5.29 (bs, 2 H, $H4$, FP_2^y), 5.25 – 5.20 (m, 1 H, $H4'$ {5.23}), 5.11 – 4.98 (m, 1 H, $H3'$ {5.08}), 4.87 – 4.80 (m, 2 H, $H2'$ {4.84}, $H1$ {4.82}), 4.76 (d, $J_{H1,H2} = 7.8$ Hz, 1 H, $H1'$), 4.66 – 4.55 (m, 2 H, D^a {4.61}, H^a {4.57}), 4.53 – 4.38 (m, 9 H, V^a {4.51}, P_1^a {4.50}, R^a {4.49}, $H2$, A_2^a {4.45}, $FP_{1,2}^a$ {4.44}, T^{*a} {4.43}, S_2^a {4.41}), 4.37 – 4.32 (m, 1 H, P_3^a {4.34}), 4.32 – 4.23 (m, 3 H, P_2^a {4.30}, S_1^a , A_4^a {4.27}), 4.22 – 4.10 (m, 8 H, $T_{1,2}^a$ {4.20}, A_3^a {4.18}, $H3$, A_1^a , T^{*b} {4.16}, $H5'$, $H6a$ {4.13}), 4.09 – 3.99 (m, 2 H, T_2^b {4.06}, $H6a'$ {4.02}), 3.97 – 3.71 (m, 11 H, $H5$ {3.95}, FP_1^{da} {3.94}, $H6b'$, T_1^b {3.92}, FP_2^{da} {3.87}, G_1^{aa} {3.85}, $H6b$, FP_1^{db} {3.83}, FP_2^{db} {3.78}, $G_{1,2}^{ab}$ {3.77}), 3.69 – 3.43 (m, 23 H, G_2^{aa} {3.65}, S_2^b {3.61}, S_1^b {3.54}, P_3^d {3.63}, $2 \times OCH_2$ {3.59}, $2 \times OCH_2$ {3.54}, P_1^d {3.53}, $2 \times OCH_2$ {3.50}, P_2^d {3.49}, 3.19 – 3.03 (m, 3 H, H^{ba} {3.15}, R^d {3.10}), 3.01 – 2.94 (m, 3 H, H^{bb} {2.98}, H_2NCH_2 {2.97}), 2.71 – 2.31 (m, 6 H, D^{ba} {2.67}, $CH_{2a}CO$ {2.56}, D^{bb} {2.51}, $CH_{2b}CO$ {2.46}, FP_1^{ba} {2.41}, FP_2^{ba} {2.35}), 2.29 – 2.15 (m, 2 H, FP_1^{bb} {2.24}, FP_2^{bb} {2.22}), 2.12 – 2.08 (m, 4 H, P_1^{ba} {2.11}, CH_3-OAc {2.10}), 2.06 – 1.95 (m, 12 H, CH_3-OAc {2.04}, P_3^{ba} {2.03}, CH_3-OAc {2.02}, P_2^{ba} {2.00}, V^b , $2 \times CH_3-OAc$ {1.98}), 1.92 – 1.88 (m, 5 H, P_1^y {1.91}, CH_3-OAc {1.90}), 1.87 – 1.65 (m, 11 H, $P_{2,3}^y$ {1.86}, CH_3-NHAc {1.83}, P_1^{bb} {1.80}, P_2^{bb} {1.78}, P_3^{bb} {1.76}, R^{ba} {1.69}), 1.51 (bs, 3 H, R^y , R^{bb}), 1.33 (d, $J_{A_4\beta,A_4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_4^a), 1.26 (d, $J_{A_3\beta,A_3\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_3^a), 1.23 (d, $J_{A_2\beta,A_2\alpha} = 6.8$ Hz, 3 H, A_2^a), 1.18 (d, $J_{A_1\beta,A_1\alpha} = 7.0$ Hz, 3 H, A_1^a), 1.14 (d, $J_{T^y,T^b} = 5.9$ Hz, 3 H, T^{*y}), 1.05 (d, $J_{T_2^y,T_2^b} = 6.3$ Hz, 3 H, T_2^y), 1.01 (d, $J_{T_1^y,T_1^b} = 6.2$ Hz, 3 H, T_1^y), 0.91 (d, $J_{V^y,V^b} = 6.5$ Hz, 3 H, V^{yb}), 0.83 (d, $J_{V^y,V^b} = 6.5$ Hz, 3 H, V^{ya}) ppm.

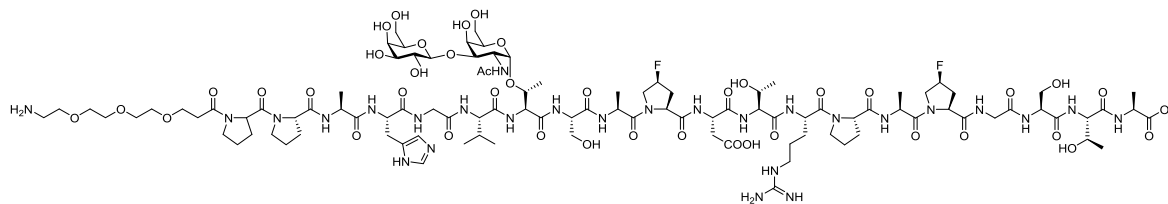
^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ ($A_3^{C=O}$), 173.2 ($A_4^{C=O}$), 172.4 ($A_1^{C=O}$), 172.1 (D^y), 171.7 ($P_2^{C=O}$, $T^{*C=O}$), 171.5 ($A_2^{C=O}$, $R^{C=O}$), 170.7 ($FP_{1,2}^{C=O}$), 170.1 ($D^{C=O}$), 170.0 ($S_2^{C=O}$), 169.9 ($P_3^{C=O}$, $G_1^{C=O}$, $H^{C=O}$, $T_1^{C=O}$, $V^{C=O}$, $3 \times COAc$), 168.9 ($COAc$), 167.7 ($T_2^{C=O}$), 169.6 ($G_2^{C=O}$), 169.5 ($COAc$), 169.4 ($CO-NHAc$, $S_1^{C=O}$),

168.9 ($P_1^{C=O}$), 168.5 (CH_2CO), 156.7 (R^e), 133.7 (H^e), 129.1 (H^y), 117.0 (H^d), 100.1 ($C1'$), 98.5 ($C1$), 93.1 (FP_2^y), 92.0 (FP_1^y), 75.6 (T^{*b}), 74.4 ($C5$), 70.2 ($C3^y$), 69.7 ($C5^y$, $2 \times OCH_2$), 69.6 ($2 \times OCH_2$), 69.4 ($C4$), 68.4 ($C2^y$), 67.2 ($C3$), 66.9 ($C4^y$), 66.7 (T_1^b), 66.6 (OCH_2), 66.2 (T_2^b , OCH_2), 63.1 ($C6$), 61.8 (S_1^b), 61.7 (S_2^b), 60.6 ($C6^y$), 59.2 (P_2^a), 59.1 (P_3^a), 58.6 ($FP_{1,2}^a$), 58.0 ($T_{1,2}^a$), 57.6 (P_1^a), 57.2 (V^a), 56.1 (T^{*a}), 54.8 ($S_{1,2}^a$), 53.1 (FP_1^d), 53.0 (FP_2^d), 51.4 (H^a), 50.0 (R^a), 49.1 (D^a), 48.5 (A_1^a), 47.9 (A_4^a), 47.6 (A_3^a), 46.8 ($P_{1,2}^d$), 46.7 (P_3^d), 46.4 (A_2^a), 46.3 ($C2$), 42.1 (G_2^a), 42.0 (G_1^a), 40.5 (R^d), 38.6 (H_2NCH_2), 35.7 (D^b), 35.4 (FP_1^b), 35.3 (FP_2^b), 34.2 (CH_2CO), 31.0 (V^b), 29.0 (P_3^b), 28.8 (P_2^b), 28.2 (R^b), 28.1 (P_1^b), 26.9 (H^b), 24.5 ($P_{2,3}^y$, R^y), 24.2 (P_1^y), 22.8 (CH_3-NHAc), 20.6, 20.4 ($5 \times CH_3-OAc$), 19.8 (T_2^y), 19.4 (T_1^y), 19.1 (V^{yb}), 18.2 (T^{*y}), 18.1 (V^{ya}), 17.5 (A_1^b), 17.1 (A_3^b), 16.9 (A_4^b), 16.7 (A_2^b) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -173.6 – -174.7 (m, 2 F, $FP_{1,2}^y$) ppm.

5.6.11 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (**72**)

($H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CO$ -Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



88 mg (0.32 μ mol, 1.0 Äquiv.) Glycopeptid **67** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) \rightarrow (40:60) 20 min; (40:60) \rightarrow (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 66 mg (83%, 0.26 μ mol) des Peptids **72** als farbloses Lyophilisat.

R_t = 11.5 min, λ = 214 nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{103}H_{165}F_2N_{27}O_{42}$ (2491.60 g/mol) [2490.1573].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 831.0586 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 831.0602), 1246.0841 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1246.0865).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): δ = 8.93 (s, 1 H, H^e), 8.27 – 8.14 (m, 2 H, G_1^{NH} {8.20}, A_2^{NH} {8.18}), 8.10 – 8.00 (m, 4 H, A_4^{NH} {8.09}, H^{NH} {8.08}, T^{*NH} {8.02}, A_1^{NH} {8.01}), 7.99 – 7.92 (m, 5 H, G_2^{NH} , D^{NH} {7.97}, A_3^{NH} {7.96}, R^{NH} , V^{NH} {7.94}), 7.86 (bs, 5 H, OH), 7.77 – 7.74 (m, 2 H, $S_{1,2}^{NH}$ {7.75}), 7.72 (d, J_{T_2NH,T_2a} = 8.8 Hz, 1 H, T_2^{NH}), 7.66 – 7.57 (m, 1 H, R^{NH} {7.63}), 7.35 (bs, 1 H, H^d), 7.29 (d, J_{T_1NH,T_1a} =

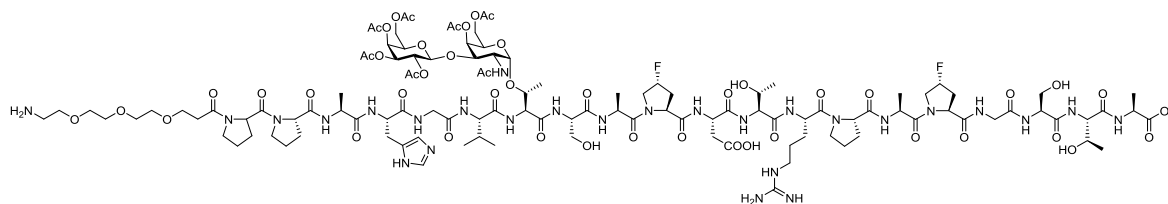
8.2 Hz, 1 H, T_1^{NH}), 7.09 (d, $J_{NH,H2} = 9.2$ Hz, 1 H, $NHAc$), 5.38 (bs, 1 H, FP_1^γ), 5.29 (bs, 1 H, FP_2^γ), 4.84 – 4.73 (m, 1 H, $H1$ {4.79}), 4.64 – 4.54 (m, 2 H, D^a {4.60}, H^a {4.57}), 4.52 – 4.38 (m, 9 H, P_1^a , $P_2^{\delta a}$ {4.49}, R^a , V^a {4.48}, A_2^a {4.45}, $FP_{1,2}^a$, T^{*a} {4.43}, S_2^a {4.40}), 4.32 – 4.27 (m, 4 H, S_1^a , $P_{2,3}^a$ {4.29}, A_4^a {4.28}), 4.23 (d, $J_{H1',H2'} = 7.1$ Hz, 1 H, $H1'$), 4.22 – 4.10 (m, 6 H, $T_{1,2}^a$ {4.19}, A_3^a {4.18}, A_1^a {4.15}, $H2$ {4.13}, $T^{*\beta}$ {4.12}), 4.08 – 4.04 (m, 1 H, T_2^β {4.06}), 3.99 – 3.22 (m, 38 H, $FP_2^{\delta b}$, T_1^β {3.92}, $H4$ {3.91}, G_1^{aa} {3.87}, $FP_1^{\delta a}$ {3.86}, $FP_2^{\delta a}$ {3.79}, $FP_1^{\delta b}$ {3.78}, $G_{1,2}^{ab}$ {3.77}, $H5$ {3.72}, $H3$ {3.68}, G_2^{aa} {3.65}, $H3'$ {3.63}, $P_2^{\delta b}$ {3.62}, $P_3^{\delta b}$, S_2^β {3.61}, OCH_2 {3.60}, OCH_2 {3.59}, $CH_{2a}CO$ {2.56}, S_1^β , $2 \times OCH_2$ {3.55}, $H6a$, $H6a'$ {3.53}, $P_{1,3}^{\delta a}$ {3.52}, $2 \times OCH_2$ {3.50}, $P_1^{\delta b}$ {3.48}, $H6b$, $H6b'$ {3.47}, $H5'$, $H2'$ {3.33}, $H4'$ {3.26}), 3.17 – 3.03 (m, 3 H, $H^{\beta a}$ {3.12}, R^δ {3.09}), 2.02 – 2.93 (m, 3 H, $H^{\beta b}$ {2.98}, H_2NCH_2 {2.97}), 2.69 – 2.30 (m, 6 H, $D^{\beta a}$ {2.66}, $D^{\beta b}$ {2.52}, $CH_{2b}CO$ {2.47}, $FP_2^{\beta a}$ {2.40}, $FP_1^{\beta a}$ {2.34}), 2.28 – 1.65 (m, 20 H, $FP_2^{\beta b}$ {2.22}, $FP_1^{\beta b}$ {2.21}, $P_1^{\beta a}$ {2.11}, $P_3^{\beta a}$ {2.03}, $P_2^{\beta a}$ {2.00}, V^β {1.97}, P_1^γ {1.91}, $P_{2,3}^\gamma$, $R^{\gamma a}$ {1.86}, CH_3NHAc {1.84}, $P_1^{\beta b}$ {1.79}, $P_2^{\beta b}$ {1.77}, $P_3^{\beta b}$ {1.76}, $R^{\beta a}$ {1.69}), 1.57 – 1.46 (m, 2 H, $R^{\gamma b}$, $R^{\beta b}$ {1.52}), 1.26 (d, $J_{A3\beta,A3\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_3^a), 1.22 (d, $J_{A2\beta,A2\alpha} = 6.7$ Hz, 3 H, A_2^a), 1.21 – 1.16 (m, 6 H, $A_{1,4}^a$), 1.14 (d, $J_{T^*\gamma,T\beta} = 5.2$ Hz, 3 H, $T^{*\gamma}$), 1.05 (d, $J_{T_2^\gamma,T_2^\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.01 (d, $J_{T_1^\gamma,T_1^\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.90 (d, $J_{V^{\gamma b},V^\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.85 (d, $J_{V^{\gamma a},V^\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ ($A_3^{C=O}$), 172.4 ($A_1^{C=O}$), 172.0 (D^γ), 171.5 ($P_{2,3}^{C=O}$, $A_2^{C=O}$), 171.3 ($A_4^{C=O}$), 170.7 ($T^{*C=O}$), 170.2 ($V^{C=O}$), 170.1 ($NHAc^{C=O}$, $D^{C=O}$), 170.0 ($S_{1,2}^{C=O}$, $G_1^{C=O}$, $H^{C=O}$), 169.5 ($FP_2^{C=O}$), 168.8 ($P_1^{C=O}$), 168.7 ($FP_1^{C=O}$), 169.5 ($T_{1,2}^{C=O}$), 169.4 ($R^{C=O}$), 168.7 ($G_2^{C=O}$), 168.6 (CH_2CO), 156.7 (R^ϵ), 133.6 (H^ϵ), 129.2 (H^γ), 117.0 (H^δ), 104.6 ($C1'$), 98.5 ($C1$), 93.1 (FP_2^γ), 92.0 (FP_1^γ), 77.8 ($C3$), 75.2 ($C5'$), 75.0 ($T^{*\beta}$), 73.0 ($C4'$), 71.3 ($C5$), 70.6 ($C2'$), 69.6 ($4 \times OCH_2$), 68.0 ($C3'$), 67.7 ($C4$), 66.7 (T_1^β), 66.6 (OCH_2), 66.2 (OCH_2 , T_2^β), 63.1 ($C6$), 61.7 ($S_{1,2}^\beta$), 60.4 ($C6'$), 59.2 ($P_{2,3}^a$), 58.6 ($FP_{1,2}^a$), 57.9 ($T_{1,2}^a$), 57.6 (P_1^a), 57.2 (V^a), 56.0 (T^{*a}), 54.7 ($S_{1,2}^a$), 53.1 (FP_1^δ), 53.0 (FP_2^δ), 51.4 (H^a), 50.0 (R^a), 49.1 (D^a), 48.4 (A_1^a), 48.0 ($C2$), 47.6 (A_3^a), 46.8 (P_1^δ , A_4^a), 46.7 ($P_{2,3}^\delta$), 46.4 (A_2^a), 42.1 (G_2^a), 41.9 (G_1^a), 40.5 (R^δ), 38.5 (H_2NCH_2), 35.6 (D^β), 35.3 (FP_2^β), 35.1 (FP_1^β), 34.1 (CH_2CO), 30.9 (V^β), 29.0 (P_3^β), 28.8 (P_2^β), 28.2 (R^β), 28.0 (P_1^β), 26.9 (H^β), 24.5 ($P_{2,3}^\gamma$, R^γ), 24.1 (P_1^γ), 22.9 (CH_3-NHAc), 19.8 (T_2^γ), 19.4 (T_1^γ), 19.1 ($V^{\gamma b}$), 18.2 ($T^{*\gamma}$, $V^{\gamma a}$), 17.4 ($A_{1,4}^\beta$), 17.1 (A_3^β), 16.7 (A_2^β) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -174.7 – -175.8 (m, 2 F, $FP_{1,2}^\gamma$) ppm.

5.6.12 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-theronyl-L-alanin (68)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*trans*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-T_{AG}-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplungen von *Fmoc*-T_{AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 108 mg (39%, 0.04 mmol) des Peptids **68** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 13.3$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{115}H_{177}F_2N_{27}O_{48}$ (2743.82 g/mol) [2742.2207].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 915.4174 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 915.0814), 1372.6239 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1372.1182).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 8.96$ (s, 1 H, H^e), 8.54 – 8.15 (m, 4 H, G_2^{NH} {8.45}, A_3^{NH} , G_1^{NH} {8.21}, A_2^{NH} {8.19}), 8.15 – 7.32 (m, 13 H, D^{NH} , H^{NH} {8.09}, A_1^{NH} {8.08}, T^{*NH} {8.00}, R^{NH} {7.97}, A_4^{NH} , V^{NH} {7.96}, S_1^{NH} {7.84}, T_2^{NH} {7.71}, S_2^{NH} {7.70}, R^{NH} {7.53}, H^δ , T_1^{NH} {7.37}), 5.41 (bs, 1 H, FP_1^γ), 5.34 (bs, 2 H, FP_2^γ), 5.33 – 4.81 (m, 5 H, H_4 {5.30}, H_4' {5.23}, H_2' {5.07}, H_1 {4.86}, H_5' {4.85}), 4.76 (d, $J_{H_1,H_2} = 8.2$ Hz, 1 H, H_1'), 4.63 – 3.41 (m, 59 H, H^u {4.58}, D^u {4.54}, A_3^u , V^u {4.51}, R^u {4.50}, A_2^u , H_2 {4.47}, T^{*u} {4.44}, $FP_{1,2}^u$ {4.42}, S_1^u {4.38}, $P_{1,2}^u$ {4.33}, S_2^u {4.30}, P_3^u {4.29}, $T_{1,2}^u$ {4.20}, $A_{1,4}^u$ {4.18}, T^{*b} , H_3 {4.16}, H_3' {4.14}, H_6a {4.12}, T_2^b {4.06}, H_6a' {4.02}, $FP_{1,2}^{\delta a}$ {4.01}, T_1^b {3.95}, H_5 {3.93}, H_6b' {3.92}, G_1^{ab} {3.87}, H_6b {3.81}, G_1^{aa} {3.78}, G_2^{ab} {3.74}, G_2^{aa} , $FP_{1,2}^{\delta b}$ {3.72}, $S_{1,2}^{ba}$ {3.65}, $2 \times OCH_2$ {3.59}, $S_{1,2}^{bb}$ {3.57}, OCH_2 {3.56}, OCH_2 , $P_{1,3}^{\delta a}$ {3.53}, $2 \times OCH_2$ {3.50}, $P_{1,3}^{\delta b}$ {3.49}), 3.41 – 2.68 (m, 7 H, H^{ba} {3.13}, R^δ {3.10}, H^{bb} {2.98}, H_2NCH_2 {2.97}, D^{ba} {2.74}), 2.60 – 2.33 (m, 5 H, $CH_{2a}CO$ {2.57}, D^{bb} {2.53}, $CH_{2b}CO$ {2.47}, $FP_{1,2}^{ba}$ {2.41}), 2.14 – 1.63 (m, 37 H, CH_3-OAc {2.09}, $FP_{1,2}^{bb}$ {2.04}, CH_3-OAc {2.03}, CH_3-OAc , $P_{1,3}^{ba}$ {2.01}, V^b {1.99}, $2 \times CH_3-OAc$ {1.98}, $P_{1,3}^{\gamma a}$ {1.92}, CH_3-OAc {1.89}, $P_{1,3}^{\gamma b}$ {1.86}, CH_3-NHAc {1.84}, $P_{1,3}^{bb}$ {1.78}, R^{ba} {1.71}), 1.53 (bs, 3 H, R^γ , R^{bb}), 1.26 (d, $J_{A_4\beta,A\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_4^u), 1.21 (d, $J_{A_3\beta,A_3\alpha} = 6.6$ Hz, 3 H, A_3^u), 1.20 – 1.16 (m, 6 H, $A_{1,2}^u$ {1.18}), 1.15 – 1.08 (m, 3 H, $T^{*\gamma}$ {1.13}), 1.05 (d, $J_{T_2\gamma,T_2\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.01 (d, $J_{T_1\gamma,T_1\beta} = 6.8$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.91 (d, $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{b\gamma}$), 0.84 (d, $J_{V\gamma a,V\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

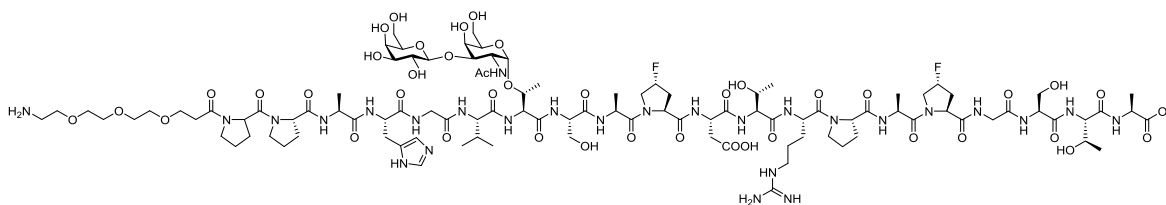
^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ ($A_4^{C=O}$), 172.4 ($A_1^{C=O}$), 171.8 (D^γ), 171.3 ($G_1^{C=O}$), 171.2 ($A_3^{C=O}$, $V^{C=O}$), 171.0 ($A_2^{C=O}$, $R^{C=O}$), 170.1 ($D^{C=O}$), 169.9 ($H^{C=O}$, $4 \times COAc$), 169.8 ($T_2^{C=O}$), 169.6 ($T^{*C=O}$, $T_1^{C=O}$, $COAc$), 169.4 ($S_2^{C=O}$), 169.3 ($CO-NHAc$), 169.0 ($COAc$), 168.7 ($S_1^{C=O}$), 168.6 ($G_2^{C=O}$), 156.6 (R^e), 133.2 (H^e), 129.1 (H^f), 116.7 (H^δ), 100.0 ($C1'$), 98.2 ($C1$), 92.7 (FP_2^γ), 92.0 (FP_1^γ), 74.4 ($C5$), 74.9 (T^{*b}), 70.1 ($C2'$), 69.5 ($3 \times OCH_2$), 69.3 ($C4$, $C3'$), 68.2 ($C5'$), 67.1 ($C3$), 66.7 ($C4'$), 66.6 (T_1^b), 66.3 ($2 \times OCH_2$), 66.1 (OCH_2), 66.0 (T_2^b), 63.0 ($C6$), 61.6 ($S_{1,2}^b$), 60.6 ($C6'$), 59.0 (P_3^u), 58.8 ($P_{1,2}^u$), 58.0 ($FP_{1,2}^u$), 57.7 ($T_{1,2}^u$), 57.3 (V^u), 55.8 (T^{*u}), 54.8 (S_1^u), 54.5 (S_2^u), 53.0 ($FP_{1,2}^{\delta}$), 51.2 (H^u), 49.9 (R^u), 49.3 (D^u), 47.5 ($A_{1,4}^u$), 46.6 ($P_{1,3}^{\delta}$), 46.3 (A_3^u), 46.0 ($C2$, A_2^u), 41.8 ($G_{1,2}^u$), 40.3 (R^δ), 38.6 (H_2NCH_2), 35.4 ($FP_{1,2}^b$), 35.3 (D^b), 34.2

(CH₂CO), 30.9 (V^β), 28.8 (P₁₋₃^β), 28.2 (R^β), 26.7 (H^β), 24.4 (R^γ), 24.1 (P₁₋₃^γ), 22.6 (CH₃-NHAc), 20.5, 20.3, 20.2, 20.1 (6 × CH₃-OAc), 19.6 (T₂^γ), 19.4 (T₁^γ), 19.0 (V^{γb}), 17.9 (V^{γa}), 17.8 (T^{*γ}), 17.0 (A₄^β), 17.2 (A₂^β), 16.7 (A₁^β), 16.3 (A₃^β) ppm.

¹⁹F-NMR (280 MHz, DMSO-D₆): -1.77.6 – 178.3 (m, 2 F, FP_{1,2}^γ) ppm.

5.6.13 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-trans-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-trans-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (73)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-trans-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-trans-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



108 mg (0.39 μmol, 1.0 Äquiv.) Glycopeptid **68** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 89 mg (91%, 0.35 μmol) des Peptids **73** als farbloses Lyophilisat.

R_t = 7.7 min, λ = 214 nm.

Masse/Molekulargewicht: C₁₀₃H₁₆₅F₂N₂₇O₄₂ (2491.60 g/mol) [2490.1573].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 831.3957 ([M+3H]³⁺, ber.: 831.0602), 1246.5913 ([M+2H]²⁺, ber.: 1246.0865).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-D₆): δ = 8.94 (s, 1 H, H^ε), 8.56 – 8.29 (m, 2 H, G₂^{NH} {8.48}, D^{NH} {8.44}), 8.28 – 8.15 (m, 4 H, A₃^{NH} {8.24}, G₁^{NH} {8.22}, A₁^{NH} {8.18}, A₄^{NH} {8.17}), 8.12 – 7.90 (m, 6 H, H^{NH} {8.07}, T^{*NH} {8.04}, A₂^{NH} {8.01}, R^{NH}, V^{NH} {7.94}, S₂^{NH} {7.91}), 7.88 (bs, 5 H, OH), 7.86 – 7.80 (m, 1 H, S₁^{NH} {7.83}), 7.70 (d, J_{T₂NH,T₂α} = 8.5 Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.68 – 7.58 (m, 1 H, R^{NH} {7.67}), 7.46 – 7.27 (m, 2 H, T₁^{NH} {7.37}, H^δ {7.35}), 7.12 (d, J_{NH,H2} = 9.3 Hz, 1 H, NHAc), 5.45 – 5.37 (m, 1 H, FP₁^γ {5.42}), 5.35 – 5.25 (m, 1 H, FP₂^γ {5.33}), 4.87 – 4.71 (m, 1 H, H₁ {4.81}), 4.62 – 4.27 (m, 15 H, H^α {4.57}, D^α {4.53}, P_{2,3}^{δa}, R^α, P₁^α {4.49}, V^α {4.48}, A₁^α {4.47}, T^{*α} {4.42}, FP_{1,2}^α {4.40}, S_{1,2}^α {4.37}, P₃^α {4.33}, P₂^α {4.29}), 4.26 – 4.10 (m, 8 H, H₁^γ, A₂^α {4.23}, T_{1,2}^α {4.19}, A₄^α {4.18}, A₃^α {4.15}, H₂, T^{*β} {4.14}), 4.09 – 3.82 (m, 6 H, T₂^β {4.06}, FP₁^{δa} {4.02}, FP₂^{δa} {3.99}, T₁^β {3.95}, H₄ {3.90}, G₁^{αa} {3.85}), 3.80 – 3.39 (m, 32 H, FP₁^{δb} {3.75}, G₁^{ab}, G₂^α {3.74}, H₅ {3.72}, FP₂^{δb} {3.69}, H₃ {3.67}, S₁^β {3.65}, H₃^γ {3.63}, P_{2,3}^{δb} {3.62}, 2 × OCH₂

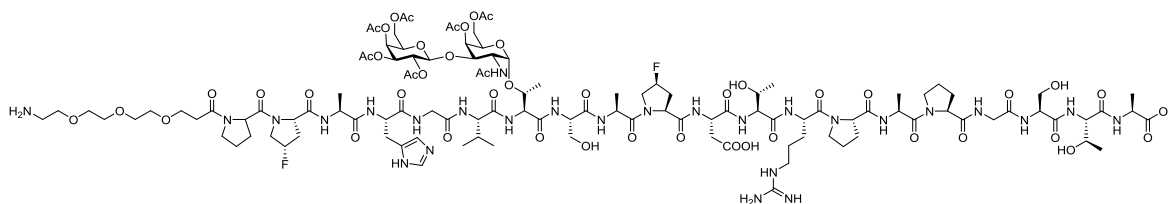
{3.59}, $2 \times \text{OCH}_2$ {3.55}, S_2^β {3.54}, H6b^γ , $\text{P}_1^{\delta\alpha}$ {3.53}, H6b , $2 \times \text{OCH}_2$ {3.49}, $\text{P}_1^{\delta\beta}$ {3.48}, H6a^γ {3.47}, H6a {3.45}), 3.39 – 3.23 (m, 4 H, H5^γ {3.33}, H2^γ {3.32}, H4^γ {3.27}), 3.17 – 2.93 (m, 6 H, $\text{H}^{\beta\alpha}$ {3.15}, R^δ {3.08}, $\text{H}^{\beta\beta}$ {2.98}, H_2NCH_2 {2.97}), 2.79 – 2.69 (m, 1 H, $\text{D}^{\beta\alpha}$ {2.73}), 2.63 – 2.33 (m, 5 H, $\text{CH}_{2\alpha}\text{CO}$ {2.55}, $\text{D}^{\beta\beta}$ {2.52}, $\text{CH}_{2\beta}\text{CO}$ {2.47}, $\text{FP}_1^{\beta\beta}$ {2.41}, $\text{FP}_2^{\beta\beta}$ {2.39}), 2.15 – 1.94 (m, 6 H, $\text{P}_1^{\beta\alpha}$ {2.10}, $\text{FP}_1^{\beta\alpha}$ {2.07}, $\text{P}_3^{\beta\alpha}$ {2.02}, $\text{P}_2^{\beta\alpha}$ {1.99}, $\text{FP}_2^{\beta\alpha}$ {1.98}, V^β {1.97}), 1.93 – 1.64 (m, 14 H, P_1^γ {1.91}, $\text{P}_{2,3}^\gamma$, $\text{R}^{\gamma\alpha}$ {1.86}, CH_3NHAc {1.85}, $\text{P}_1^{\beta\beta}$ {1.79}, $\text{P}_{2,3}^{\beta\beta}$ {1.77}, $\text{R}^{\beta\alpha}$ {1.71}), 1.53 (bs, 2 H, $\text{R}^{\gamma\beta}$, $\text{R}^{\beta\beta}$), 1.26 (d, $J_{\text{A4}\beta,\text{A4}\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_4^α), 1.25 – 1.10 (m, 12 H, A_3^α {1.22}, $\text{A}_{1,2}^\alpha$ {1.18}, $\text{T}^{*\gamma}$ {1.14}), 1.05 (d, $J_{\text{T2}\gamma,\text{T2}\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.02 – 0.98 (m, 3 H, T_1^γ), 0.91 (d, $J_{\text{V}\gamma\beta,\text{V}\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $\text{V}^{\beta\gamma}$), 0.85 (d, $J_{\text{V}\gamma\alpha,\text{V}\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $\text{V}^{\gamma\alpha}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($\text{A}_4^{\text{C=O}}$), 172.8 ($\text{FP}_2^{\text{C=O}}$), 172.5 ($\text{A}_{2,3}^{\text{C=O}}$), 171.9 (D^γ), 171.8 ($\text{P}_2^{\text{C=O}}$, $\text{T}^{*\text{C=O}}$), 171.4 ($\text{P}_3^{\text{C=O}}$, $\text{FP}_1^{\text{C=O}}$, $\text{G}_2^{\text{C=O}}$), 171.2 ($\text{A}_1^{\text{C=O}}$), 170.9 ($\text{NHAc}^{\text{C=O}}$), 170.3 ($\text{V}^{\text{C=O}}$, $\text{D}^{\text{C=O}}$), 170.2 ($\text{S}_{1,2}^{\text{C=O}}$), 170.0 ($\text{G}_1^{\text{C=O}}$, $\text{H}^{\text{C=O}}$), 169.8 ($\text{T}_2^{\text{C=O}}$), 169.6 ($\text{T}_1^{\text{C=O}}$), 169.5 ($\text{P}_1^{\text{C=O}}$, $\text{R}^{\text{C=O}}$), 168.6 (CH_2CO), 156.9 (R^ϵ), 133.7 (H^ϵ), 129.2 (H^γ), 117.1 (H^δ), 104.7 (C1^γ), 98.6 (C1), 93.2 (FP_2^γ), 92.1 (FP_1^γ), 78.0 (C3), 75.3 (C5^γ), 75.1 ($\text{T}^{*\beta}$), 73.1 (C4^γ), 71.4 (C5), 70.8 (C2^γ), 69.7 ($4 \times \text{OCH}_2$), 68.2 (C3^γ), 67.8 (C4), 66.8 (T_1^β), 66.7 (OCH_2), 66.3 (OCH_2 , T_2^β), 61.8 ($\text{S}_{1,2}^\beta$), 60.7 (C6), 60.5 (C6^γ), 59.3 (P_2^α), 59.1 (P_3^α), 58.3 ($\text{FP}_{1,2}^\alpha$), 58.0 ($\text{T}_{1,2}^\alpha$), 57.8 (P_1^α), 57.3 (V^α), 56.2 ($\text{T}^{*\alpha}$), 55.0 ($\text{S}_{1,2}^\alpha$), 53.3 (FP_1^δ), 53.2 (FP_2^δ), 51.5 (H^α), 50.2 (R^α), 49.5 (D^α), 48.5 (A_2^α), 48.4 (A_3^α), 48.2 (C2), 47.7 (A_4^α), 46.9 (P_1^δ), 46.7 ($\text{P}_{2,3}^\delta$), 46.3 (A_1^α), 42.1 (G_2^α), 42.0 (G_1^α), 40.6 (R^δ), 38.6 (H_2NCH_2), 35.7 (FP_1^β), 35.6 (FP_2^β , D^β), 34.2 (CH_2CO), 31.0 (V^β), 29.1 (P_3^β), 28.8 (P_2^β), 28.3 (R^β), 28.1 (P_1^β), 27.0 (H^β), 24.6 ($\text{P}_{2,3}^\gamma$, R^γ), 24.3 (P_1^γ), 23.0 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 19.8 (T_2^γ), 19.6 (T_1^γ), 19.2 ($\text{V}^{\beta\gamma}$), 18.3 ($\text{T}^{*\gamma}$), 18.2 ($\text{V}^{\gamma\alpha}$), 17.8 (A_3^β), 17.5 (A_2^β), 16.5 (A_1^β), 16.2 (A_4^β) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO- D_6): -178.2 – -179.3 (m, 2 F, $\text{FP}_{1,2}^\gamma$) ppm.

5.6.14 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (69)

($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Pro-}i{c}is\text{-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr}(\beta\text{-Ac}_4\text{Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-Ac}_2\text{GalNAc)-Ser-Ala-}i{c}is\text{-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH}$)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone

(NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplungen von *Fmoc*-T_{AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 88 mg (32%, 0.03 mmol) des Peptids **69** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 13.2$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₁₁₅H₁₇₇F₂N₂₇O₄₈ (2743.82 g/mol) [2742.2207].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 915.0831 ([M+3H]³⁺, ber.: 915.0814), 1372.6248 ([M+2H]²⁺, ber.: 1372.1182).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-*D*₆): $\delta = 14.17$ (bs, 1 H, COOH), 8.94 (s, 1 H, H^c), 8.32 – 8.06 (m, 7 H, G₂^{NH} {8.20}, G₁^{NH} {8.18}, H^{NH} {8.16}, S₁^{NH}, T*^{NH}, A₃^{NH} {8.11}, A₂^{NH} {8.09}), 8.04 – 7.91 (m, 4 H, V^{NH} {7.97}, R^{NH} {7.96}, A₄^{NH}, D^{NH} {7.95}), 7.84 – 7.67 (m, 3 H, S₂^{NH} {7.79}, A₁^{NH}, T₂^{NH} {7.70}), 7.50 – 7.45 (m, 1 H,

182

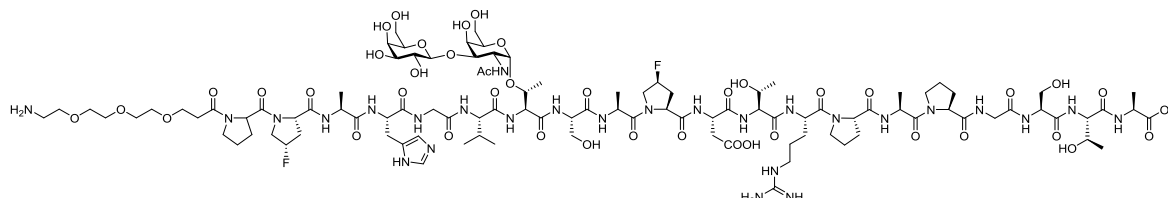
R^{NH} {7.46}), 7.36 (s, 1 H, H^δ), 7.28 (d, $J_{T_1NH, T_1\alpha} = 7.3$ Hz, 1 H, T_1^{NH}), 6.97 (d, $J_{NH, H_2} = 9.1$ Hz, 1 H, $NHAc$), 5.41 – 5.20 (m, 4 H, FP_1^γ {5.37}, FP_2^γ {5.31}, $H5$ {5.28}, $H4'$ {5.21}), 5.11 – 5.04 (m, 1 H, $H3'$ {5.06}), 4.88 – 4.79 (m, 2 H, $H2'$ {4.83}, $H1$ {4.81}), 4.78 – 4.72 (m, 2 H, NH_2), 4.66 – 4.55 (m, 2 H, D^α {4.61}, H^α {4.57}), 4.54 – 4.40 (m, 9 H, V^α {4.51}, R^α {4.49}, P_1^α {4.48}, $H1'$, A_3^α {4.47}, $FP_{1,2}^\alpha$ {4.46}, A_2^α {4.45}, $T^{*\alpha}$ {4.43}), 4.40 – 4.36 (m, 1 H, S_2^α {4.38}), 4.34 – 4.30 (m, 1 H, P_2^α {4.32}), 4.30 – 4.22 (m, 3 H, S_1^α {4.27}, P_3^α {4.26}, A_1^α {4.23}), 4.22 – 4.09 (m, 8 H, $T_{1,2}^\alpha$ {4.20}, A_4^α {4.17}, $T^{*\beta}$ {4.15}, $H2$, $H3$, $H5'$ {4.13}, $H6a$ {4.12}), 4.07 – 4.04 (m, 1 H, T_2^β {4.05}), 4.04 – 3.99 (m, 2 H, $FP_1^{\delta\beta}$ {4.02}, $H6a'$ {4.01}), 3.99 – 3.89 (m, 4 H, $FP_2^{\delta\beta}$ {3.96}, $H5$ {3.93}, $H6b'$ {3.92}, T_1^β {3.91}), 3.88 – 3.80 (m, 5 H, G_1^α {3.86}, $FP_1^{\delta\alpha}$ {3.85}, $H6b$, $FP_2^{\delta\alpha}$ {3.82}), 3.80 – 3.68 (m, 2 H, G_2^α {3.70}), 3.67 – 3.43 (m, 22 H, S_2^β {3.64}, OCH_2 {3.58}, $P_{2,3}^\delta$ {3.55}, $2 \times OCH_2$, S_1^β {3.54}, OCH_2 {3.53}, P_1^δ {3.51}, $2 \times OCH_2$ {3.49}), 3.17 – 3.03 (m, 3 H, $H^{\beta\beta}$ {3.11}, R^δ {3.08}), 3.02 – 2.79 (m, 3 H, H_2NCH_2 , $H^{\beta\alpha}$ {2.97}), 2.76 – 2.29 (m, 8 H, $D^{\beta\alpha}$ {2.66}, CH_2CO {2.56}, $D^{\beta\beta}$ {2.49}, CH_2CO {2.48}, $FP_1^{\beta\beta}$ {2.39}, $FP_2^{\beta\beta}$ {2.35}), 2.29 – 2.14 (m, 3 H, $FP_1^{\beta\alpha}$ {2.21}, $FP_2^{\beta\alpha}$ {2.19}, $P_1^{\beta\beta}$ {2.15}), 2.14 – 1.66 (m, 31 H, CH_3-OAc {2.09}, CH_3-OAc , $P_{2,3}^{\beta\beta}$ {2.03}, CH_3-OAc {2.01}, CH_3-OAc , V^β {1.98}, $P_{1,3}^\gamma$ {1.96}, CH_3-OAc {1.89}, $P_{1,3}^{\beta\alpha}$ {1.87}, P_2^γ {1.85}, CH_3-NHAc {1.82}, $R^{\beta\beta}$ {1.71}), 1.52 (bs, 3 H, R^γ , $R^{\beta\alpha}$), 1.32 – 1.09 (m, 15 H, A_4^β {1.27}, A_3^β {1.25}, A_2^β {1.19}, A_1^β {1.17}, $T^{*\gamma}$ {1.14}), 1.05 (d, $J_{T_2^\gamma, T_2^\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.01 (d, $J_{T_1^\gamma, T_1^\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.91 (d, $J_{V^\gamma, V^\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, $V^{\gamma\alpha}$), 0.83 (d, $J_{V^\gamma, V^\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma\beta}$) ppm.

$^{13}C-NMR$ (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($A_4^{C=O}$), 172.4 ($T^{*C=O}$), 172.3 ($A_1^{C=O}$), 172.1 (D^γ), 171.6 ($A_3^{C=O}$), 170.9 ($A_2^{C=O}$), 171.2 ($P_1^{C=O}$), 171.0 ($V^{C=O}$), 170.9 ($P_{2,3}^{C=O}$), 170.8 ($FP_1^{C=O}$), 170.4 ($FP_2^{C=O}$), 170.1 ($D^{C=O}$), 170.0 ($S_2^{C=O}$, $T_1^{C=O}$), 169.9 ($3 \times COAc$, $T_2^{C=O}$), 169.8 ($H^{C=O}$), 169.3 ($S_1^{C=O}$), 169.5 ($COAc$), 169.3 ($CO-NHAc$), 169.2 ($R^{C=O}$), 168.9 ($COAc$, $G_2^{C=O}$), 168.8 ($G_1^{C=O}$), 168.6 (CH_2CO), 156.8 (R^c), 133.5 (H^c), 129.0 (H^f), 116.9 (H^d), 100.0 ($C1'$), 98.5 ($C1$), 93.1 (FP_2^γ), 92.2 (FP_1^γ), 75.6 ($T^{*\beta}$), 74.4 ($C5$), 70.2 ($C3'$), 69.6 ($4 \times OCH_2$), 69.5 ($C3$, $C5'$), 69.4 ($C4$), 68.4 ($C2'$), 66.8 (T_1^β), 66.9 ($C4'$), 66.6 (OCH_2), 66.3 (OCH_2), 66.2 (T_2^β), 63.1 ($C6$), 61.7 (S_1^β), 61.6 (S_2^β), 60.5 ($C6'$), 59.7 (P_3^α), 59.1 (P_2^α), 58.3 ($FP_{1,2}^\alpha$), 58.0 ($T_{1,2}^\alpha$), 57.1 (P_1^α , V^α), 56.1 ($T^{*\alpha}$), 54.8 ($S_{1,2}^\alpha$), 53.3 (FP_1^δ), 53.2 (FP_1^δ), 51.4 (H^α), 50.0 (R^α), 49.1 (D^α), 48.1 (A_1^α), 47.7 ($C2$), 47.6 (A_4^α), 46.8 ($P_{1,2}^\delta$), 46.7 (P_1^δ), 46.3 ($A_{2,3}^\alpha$), 42.0 (G_1^α), 41.9 (G_2^α), 40.5 (R^δ), 38.6 (H_2NCH_2), 35.7 (D^β), 35.2 ($FP_{1,2}^\beta$), 34.2 (CH_2CO), 31.0 (V^β), 29.1 ($P_{2,3}^\beta$), 28.3 (P_1^β , R^β), 26.9 (H^β), 24.4 ($P_{1,3}^\gamma$, R^γ), 22.8 (CH_3-NHAc), 22.3, 20.6, 20.5, 20.4 ($5 \times CH_3-OAc$), 19.8 (T_2^γ), 19.4 (T_1^γ), 19.1 ($V^{\gamma\alpha}$), 18.1 ($T^{*\gamma}$, $V^{\gamma\beta}$), 17.9 (A_1^β), 17.1 (A_4^β), 16.6 ($A_{2,3}^\beta$) ppm.

$^{19}F-NMR$ (280 MHz, DMSO- D_6): -174.1 – -174.6 (m, 1 F, FP_1^γ), -174.8 – -175.4 (m, 1 F, FP_2^γ) ppm.

5.6.15 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-propyl-cis-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-3-O-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-cis-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (74)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



88 mg (32 μmol, 1.0 Äquiv.) Glycopeptid **69** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 31 mg (39%, 12 μmol) des Peptids **74** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 8.6$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₁₀₃H₁₆₅F₂N₂₇O₄₂ (2491.60 g/mol) [2490.1573].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 831.0604 ([M+3H]³⁺, ber.: 831.0602), 1246.5879 ([M+2H]²⁺, ber.: 1246.0865).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 8.91$ (s, 1 H, H^c), 8.28 – 8.17 (m, 3 H, G₂^{NH} {8.21}, A₃^{NH} {8.19}, G₁^{NH} {8.18}), 8.14 (d, $J_{\text{HNH,H}\alpha} = 8.0$ Hz, 1 H, H^{NH}), 8.12 – 7.91 (m, 6 H, A₂^{NH} {8.08}, S₂^{NH} {8.04}, D^{NH} {7.96}, R^{NH}, V^{NH} {7.95}, A₄^{NH} {7.94}), 7.81 – 7.67 (m, 4 H, S₁^{NH} {7.78}, NHAc {7.77}, A₁^{NH}, T₂^{NH} {7.70}), 7.65 – 7.58 (m, 1 H, T^{*NH} {7.60}), 7.51 – 7.43 (m, 1 H, R^{NH} {7.45}), 7.35 (bs, 1 H, H^δ), 7.28 (d, $J_{\text{TINH,T1}\alpha} = 8.2$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 5.40 – 5.34 (m, 1 H, FP₁^γ), 5.34 – 5.27 (m, 1 H, FP₂^γ), 4.79 (bs, 1 H, H₁), 4.65 – 4.53 (m, 2 H, D^α {4.59}, H^α {4.57}), 4.52 – 4.40 (m, 8 H, R^α {4.49}, V^α {4.48}, P₃^α {4.46}, FP_{1,2}^α {4.45}, A_{2,3}^α {4.44}, T^{*α} {4.43}), 4.40 – 4.35 (m, 1 H, S₁^α {4.38}), 4.34 – 4.29 (m, 2 H, P₂^α {4.32}, S₂^α {4.30}), 4.28 – 4.25 (m, 1 H, P₁^α {4.27}), 4.25 – 4.22 (m, 2 H, H₁^γ {4.23}, A₁^α {4.22}), 4.21 – 4.15 (m, 3 H, T_{1,2}^α {4.19}, A₄^α {4.16}), 4.15 – 4.09 (m, 2 H, H₂ {4.13}, T^{*β} {4.11}), 4.08 – 4.03 (m, 1 H, T₂^β {4.04}), 4.03 – 3.78 (m, 7 H, FP₁^{δa} {4.00}, T₁^β {3.91}, H₄ {3.90}, G₁^α {3.87}, FP₁^{δb} {3.83}, FP₂^{δa} {3.81}), 3.77 – 3.24 (m, 29 H, G₂^α, H₅ {3.72}, H₃ {3.67}, S₁^β {3.64}, P₂^δ {3.63}, H₃^γ {3.62}, 2 × OCH₂ {3.58}, P₁^δ, S₂^β, 2 × OCH₂ {3.55}, H_{6a}, H_{6a}^γ {3.53}, P₃^δ {3.51}, 3 × OCH₂ {3.49}, H_{6b}, H_{6b}^γ {3.46}, H₂^γ, H₅^γ {3.33}, H₄^γ {3.26}), 3.15 – 3.04 (m, 3 H, H^{βa} {3.11}, R^δ {3.09}), 3.01 – 2.94 (m, 3 H, H^{βb} {2.98}, H₂NCH₂ {2.97}), 2.68 – 2.63 (m, 1 H, D^{βa} {2.66}), 2.60 – 2.40 (m, 5 H, CH_{2a}CO {2.56}, D^{βb} {2.52}, CH_{2b}CO {2.48}, FP₁^{βa} {2.38}, FP₂^{βa} {2.33}), 2.16 – 2.12 (m, 3 H, FP₁^{βb} {2.20}, FP₂^{βb} {2.18}, P₃^{βa} {2.16}), 2.09 – 1.92 (m, 5 H, P_{1,2}^{βa} {2.04}, V^β, P₃^γ

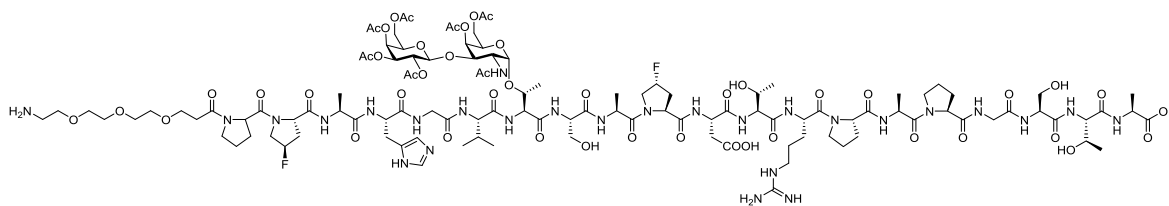
{1.97}), 1.90 – 1.65 (m, 12 H, P₃^{βb} {1.87}, P₁^{βb}, P_{1,2}^γ, R^{γa}, CH₃NHAc {1.84}, P₂^{βb} {1.77}, R^{βa} {1.70}), 1.52 (bs, 2 H, R^{γb}, R^{βb}), 1.26 (d, $J_{A4\beta, A4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄^α), 1.23 (d, $J_{A3\beta, A3\alpha} = 7.0$ Hz, 3 H, A₃^α), 1.19 (d, $J_{A2\gamma, A2\alpha} = 7.0$ Hz, 3 H, A₂^α), 1.17 (d, $J_{A1\beta, A1\alpha} = 6.9$ Hz, 3 H, A₁^α), 1.14 (d, $J_{T^*\gamma, T\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, T^{*γ}), 1.05 (d, $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.01 (d, $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.90 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γb}), 0.85 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.8$ Hz, 3 H, V^{γa}) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 173.9$ (A₄^{C=O}), 172.3 (A₁^{C=O}), 172.2 (A₃^{C=O}, D^γ), 171.3 (V^{C=O}), 171.1 (FP_{1,2}^{C=O}, P₃^{C=O}), 170.9 (A₂^{C=O}, R^{C=O}), 170.8 (NHAc^{C=O}), 170.2 (D^{C=O}), 170.1 (S₁^{C=O}), 170.0 (H^{C=O}), 169.9 (S₂^{C=O}, T^{*C=O}), 168.8 (CH₂CO), 169.7 (T_{1,2}^{C=O}), 169.6 (P_{1,2}^{C=O}), 169.0 (G₁^{C=O}), 168.9 (G₂^{C=O}), 156.8 (R^ε), 133.6 (H^ε), 129.1 (H^γ), 117.0 (H^δ), 104.7 (C1^γ), 98.5 (C1), 93.1 (FP₂^γ), 92.2 (FP₁^γ), 77.8 (C3), 75.3 (C5^γ), 75.1 (T^{*β}), 73.1 (C4^γ), 71.5 (C5), 70.7 (C2^γ), 69.7 (4 × OCH₂), 68.1 (C3^γ), 67.8 (C4), 66.9 (T₁^β), 66.6 (OCH₂), 66.3 (T₂^β), 61.7 (S_{1,2}^β), 60.5 (C6, C6^γ), 59.8 (P₁^α), 59.1 (P₂^α), 58.2 (FP_{1,2}^α), 58.0 (T_{1,2}^α), 57.4 (P₃^α, V^α), 56.1 (T^{*α}), 54.9 (S₁^α), 54.8 (S₂), 53.3 (FP_{1,2}^δ), 51.5 (H^α), 49.2 (D^α), 50.0 (R^α), 48.2 (A₁^α), 48.1 (C2), 47.7 (A₄^α), 46.8 (P_{1,2}^δ), 46.5 (P₃^δ), 46.4 (A_{2,3}^α), 42.1 (G₂^α), 42.0 (G₁^α), 40.6 (R^δ), 38.7 (H₂NCH₂), 35.7 (D^β), 35.2 (FP₁^β), 35.1 (FP₂^β), 34.2 (CH₂CO), 31.0 (V^β), 29.1 (P_{1,2}^β), 28.4 (P₃^β), 28.3 (R^β), 27.0 (H^β), 24.5 (P_{1,3}^γ, R^γ), 23.0 (CH₃-NHAc), 19.9 (T₂^γ), 19.5 (T₁^γ), 19.3 (V^{γb}), 18.3 (T^{*γ}), 18.2 (V^{γa}), 17.9 (A₁^β), 17.2 (A₄^β), 16.7 (A₃^β), 16.6 (A₂^β) ppm.

¹⁹F-NMR (280 MHz, DMSO-D₆): -177.8 – -178.4 (m, 1 F, FP₁^γ), -178.8 – -179.4 (m, 1 F, FP₂^γ) ppm.

5.6.16 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-propyl-trans-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-trans-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (70)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*trans*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell

erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplungen von *Fmoc*-T_{AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 63 mg (23%, 0.02 mmol) des Peptids **70** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 14.7$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₁₁₅H₁₇₇F₂N₂₇O₄₈ (2743.82 g/mol) [2742.2207].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 915.0811 ([M+3H]³⁺, ber.: 915.0814), 1372.1211 ([M+2H]²⁺, ber.: 1372.1182).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 14.22$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^c), 8.46 – 8.32 (m, 1 H, D^{NH} {8.42}), 8.31 – 8.16 (m, 4 H, A₃^{NH} {8.21}, G_{1,2}^{NH} {8.20}, A₁^{NH} {8.18}), 8.12 – 8.05 (m, 2 H, A₂^{NH} {8.11}, H^{NH} {8.10}), 8.03 – 7.84 (m, 4 H, S₁^{NH} {7.99}, V^{NH} {7.96}, A₄^{NH}, R^{NH}, T*^{NH} {7.95}), 7.82 – 7.65 (m, 2 H, S₂^{NH} {7.78}, T₂^{NH} {7.71}), 7.53 – 7.15 (m, 3 H, R^{NH} {7.49}, T₁^{NH} {7.37}, H ^{δ} {7.36}), 7.03 (bs, 1 H, NHAc), 5.45 – 5.35 (m, 1 H, FP₁ ^{γ} {5.39}), 5.35 – 5.25 (m, 2 H, FP₂ ^{γ} {5.33}, H₄ {5.30}), 5.25 – 5.20 (m, 1 H, H₄['] {5.23}), 5.10 – 5.01 (m, 1 H, H₃['] {5.07}), 4.91 – 4.82 (m, 2 H, H₁ {4.86}, H₂['] {4.85}), 4.77 (d, J_{H1',H2'}} = 186

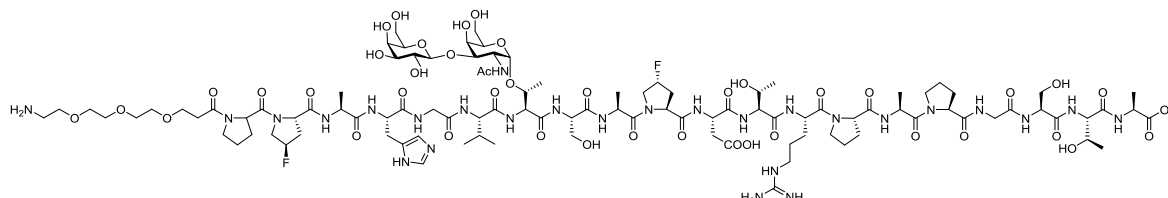
8.0 Hz, 1 H, **H1'**), 4.63 – 4.35 (m, 11 H, **H^α** {4.57}, **P₁^α** {4.55}, **D^α** {4.54}, **A₃^α** {4.51}, **V^α**, **R^α** {4.50}, **A₂^α** {4.46}, **T*^α** {4.44}, **FP_{1,2}^α** {4.40}, **S₁^α** {4.38}), 4.35 – 4.24 (m, 4 H, **P₂^α** {4.32}, **S₂^α** {4.31}, **H₂** {4.28}, **P₃^α** {4.27}), 4.23 – 4.10 (m, 8 H, **T_{1,2}^α** {4.20}, **A₄^α** {4.18}, **H₃**, **A₁^α** {4.17}, **T*^β** {4.15}, **H₅'** {4.14}, **H_{6a}** {4.13}), 4.09 – 3.99 (m, 4 H, **T₂^β**, **FP₁^{δb}** {4.06}, **FP₂^{δb}** {4.04}, **H_{6a}'** {4.02}), 3.98 – 3.43 (m, 30 H, **T₁^β** {3.95}, **H₅** {3.93}, **H_{6b}'** {3.92}, **G₁^α** {3.86}, **H_{6b}** {3.81}, **FP₁^{δa}**, **G₂^α** {3.71}, **FP₂^{δa}** {3.66}, **S₂^β** {3.65}, 2 × **OCH₂** {3.59}, **P₃^δ** {3.58}, **S₁^β**, **OCH₂** {3.56}, **OCH₂** {3.55}, **OCH₂** {3.54}, **P₂^δ** {3.53}, **P₁^δ** {3.48}), 3.18 – 3.04 (m, 3 H, **H^{βb}** {3.12}, **R^δ** {3.09}), 3.02 – 2.86 (m, 3 H, **H₂NCH₂** {2.98}, **H^{βa}** {2.97}), 2.79 – 2.70 (m, 1 H, **D^{βa}** {2.73}), 3.61 – 2.31 (m, 9 H, **CH_{2a}CO** {2.57}, **D^{βb}** {2.53}, **CH_{2b}CO** {2.47}, **FP₁^β** {2.37}, **FP₂^β** {2.35}), 2.14 – 1.66 (m, 32 H, **CH₃-OAc** {2.10}, **P₁^{βb}** {2.07}, **CH₃-OAc**, **P₃^{βb}** {2.04}, **P₂^{βb}** {2.03}, **CH₃-OAc** {2.01}, **V^β** {2.00}, **P₃^γ** {1.95}, **CH₃-OAc** {1.93}, **CH₃-OAc** {1.90}, **CH₃-NHAc**, **P_{1,2}^γ**, **P₃^{βa}** {1.84}, **P_{1,2}^{βa}** {1.77}, **R^{βb}** {1.70}), 1.52 (bs, 3 H, **R^γ**, **R^{βa}** {1.52}), 1.32 – 1.09 (m, 15 H, **A₄^β** {1.27}, **A₃^β** {1.21}, **A_{1,2}^β** {1.19}, **T*^γ** {1.14}), 1.05 (d, $J_{T2\gamma,T2\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, **T₂^γ**), 1.01 (d, $J_{T1\gamma,T1\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, **T₁^γ**), 0.91 (d, $J_{V\gamma a,V\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, **V^{γa}**), 0.83 (d, $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, **V^{γb}**) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 173.8$ (**A₄^{C=O}**), 173.1 (**P₃^{C=O}**), 172.2 (**A₁^{C=O}**, **T*^{C=O}**), 171.7 (**D^γ**), 171.2 (**A₃^{C=O}**), 171.1 (**P₂^{C=O}**), 171.0 (**V^{C=O}**), 170.9 (**FP_{1,2}^{C=O}**), 170.8 (**A₂^{C=O}**), 170.1 (**P₁^{C=O}**, **D^{C=O}**), 170.0 (**S₂^{C=O}**), 169.9 (2 × **COAc**, **S₁^{C=O}**), 169.8 (**COAc**, **H^{C=O}**), 169.5 (**COAc**, **T_{1,2}^{C=O}**), 169.3 (**CO-NHAc**), 169.2 (**R^{C=O}**), 168.9 (**COAc**), 168.8 (**G₁^{C=O}**), 168.7 (**G₂^{C=O}**), 168.4 (**CH₂CO**), 156.6 (**R^ε**), 133.5 (**H^ε**), 129.0 (**H^γ**), 116.9 (**H^δ**), 100.1 (**C1'**), 98.3 (**C1**), 92.9 (**FP₂^γ**), 92.1 (**FP₁^γ**), 75.3 (**T*^β**), 74.4 (**C5**), 70.2 (**C3'**), 69.6 (4 × **OCH₂**), 69.4 (**C4**), 69.3 (**C5'**), 68.3 (**C2'**), 67.2 (**C3**), 66.9 (**C4'**), 66.7 (**T₁^β**), 66.6 (**OCH₂**), 66.3 (**OCH₂**), 66.2 (**T₂^β**), 63.1 (**C6**), 61.7 (**S_{1,2}^β**), 60.6 (**C6'**), 59.7 (**P₃^α**), 59.0 (**P₂^α**), 57.9 (**T_{1,2}^α**), 57.8 (**FP_{1,2}^α**), 57.5 (**P₁^α**), 57.2 (**V^α**), 56.0 (**T*^α**), 54.8 (**S₁^α**), 54.7 (**S₂^α**), 53.1 (**FP_{1,2}^δ**), 51.4 (**H^α**), 49.9 (**R^α**), 49.5 (**D^α**), 48.5 (**A₁^α**), 47.9 (**C2**), 47.6 (**A₄^α**), 46.7 (**P_{1,2}^δ**), 46.6 (**P₃^δ**), 46.5 (**A₃^α**), 46.2 (**A₂^α**), 42.0 (**G₁^α**), 41.9 (**G₂^α**), 40.5 (**R^δ**), 38.6 (**H₂NCH₂**), 35.5 (**FP_{1,2}^β**, **D^β**), 34.2 (**CH₂CO**), 30.9 (**V^β**), 29.0 (**P_{2,3}^β**), 28.3 (**R^β**), 27.9 (**P₁^β**), 27.0 (**H^β**), 24.5 (**P₃^γ**), 24.4 (**P_{1,2}^γ**, **R^γ**), 22.8 (**CH₃-NHAc**), 20.6, 20.4, 20.3 (5 × **CH₃-OAc**), 19.7 (**T₂^γ**), 19.6 (**T₁^γ**), 19.1 (**V^{γa}**), 18.1 (**V^{γb}**), 17.8 (**T*^γ**), 17.4 (**A₁^β**), 17.1 (**A₄^β**), 16.6 (**A₂^β**), 16.4 (**A₃^β**) ppm.

¹⁹F-NMR (280 MHz, DMSO-D₆): -177.6 – -178.1 (m, 1 F, **FP₁^γ**), -178.3 – -178.9 (m, 1 F, **FP₂^γ**) ppm.

5.6.17 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanylamido-*N*-L-propyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (75**)**

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*trans*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



63 mg (23 μ mol, 1.0 Äquiv.) Glycopeptid **70** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) \rightarrow (40:60) 20 min; (40:60) \rightarrow (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 36 mg (63%, 14 μ mol) des Peptids **75** als farbloses Lyophilisat.

R_t = 8.7 min, λ = 214 nm.

Masse/Molekulargewicht: C₁₀₃H₁₆₅F₂N₂₇O₄₂ (2491.60 g/mol) [2490.1573].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 831.0603 ([M+3H]³⁺, ber.: 831.0602), 1246.5886 ([M+2H]²⁺, ber.: 1246.0865).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 8.91 (s, 1 H, H^c), 8.42 (bs, 1 H, D^{NH}), 8.29 – 8.15 (m, 2 H, G₁^{NH} {8.19}, A₃^{NH} {8.17}), 8.14 – 7.88 (m, 7 H, A_{1,2}^{NH} {8.10}, H^{NH} {8.07}, G₂^{NH} {8.06}, V^{NH} {7.98}, R^{NH} {7.96}, A₄^{NH} {7.94}), 7.83 – 7.68 (m, 4 H, T*^{NH} {7.79}, S_{1,2}^{NH} {7.78}, T₂^{NH} {7.70}), 7.51 – 7.32 (m, 3 H, R^{NH} {7.41}, H^δ, T₁^{NH} {7.35}), 7.08 (bs, 1 H, NHAc), 5.40 (bs, 1 H, FP₁^γ), 5.33 (bs, 1 H, FP₂^γ), 4.86 – 4.72 (m, 1 H, H₁ {4.82}), 4.64 – 4.36 (m, 11 H, P₃^α {4.57}, H^α {4.55}, D^α {4.53}, R^α {4.50}, V^α {4.48}, A_{1,2}^α {4.46}, T*^α {4.44}, FP_{1,2}^α {4.39}, S₁^α {4.38}), 4.36 – 4.10 (m, 10 H, S₂^α {4.34}, P₂^α {4.32}, P₁^α {4.28}, H₁' {4.23}, T_{1,2}^α {4.20}, A₄^α {4.18}, A₃^α, H₂ {4.16}, T*^β {4.13}), 4.10 – 3.83 (m, 7 H, T₂^β {4.06}, FP₂^{δa} {4.04}, FP₁^{δa} {4.03}, T₁^β {3.95}, H₄ {3.90}, G₂^α {3.86}), 3.78 – 3.23 (m, 36 H, G₁^α, H₅ {3.72}, FP₁^{δb} {3.69}, FP₂^{δa}, H₃ {3.67}, S₁^β {3.65}, P₁^δ {3.63}, H₃' {3.62}, 2 \times OCH₂ {3.59}, S₂^β, 2 \times OCH₂ {3.56}, OCH₂ {3.54}, H_{6a}, H_{6a}', P₂^δ {3.53}, 2 \times OCH₂ {3.50}, P₃^δ {3.48}, H_{6b}, H_{6b}' {3.47}, H₂' {3.33}, H₅' {3.33}, H₄' {3.26}), 3.16 – 3.04 (m, 3 H, H^{βa} {3.12}, R^δ {3.09}), 2.97 (bs, 3 H, H₂NCH₂ {2.98}, H^{βb} {2.97}), 2.76 – 2.70 (m, 1 H, D^{βa} {2.73}), 2.60 – 2.30 (m, 7 H, CH_{2a}CO {2.57}, D^{βb} {2.51}, CH_{2b}CO {2.47}, FP₁^β {2.37}, FP₂^β {2.35}), 2.11 – 1.64 (m, 17 H, P₃^{βa} {2.07}, P_{1,2}^{βa} {2.03}, V^β {1.98}, P₁^γ {1.95}, P₁^{βb}, P_{2,3}^γ, CH₃NHAc {1.84}, P_{3,4}^{βb} {1.77}, R^{βa} {1.70}), 1.53 (bs, 2 H, R^γ, R^{βb}), 1.27 (d, J_{A4β,A4α} = 7.3 Hz, 3 H, A₄^α), 1.21 – 1.16 (m, 9 H, A₁₋₃^α), 1.14 (d,

$J_{T^*\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, $T^{*\gamma}$), 1.05 (d, $J_{T2\gamma, T2\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.01 (d, $J_{T1\gamma, T1\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.91 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.85 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

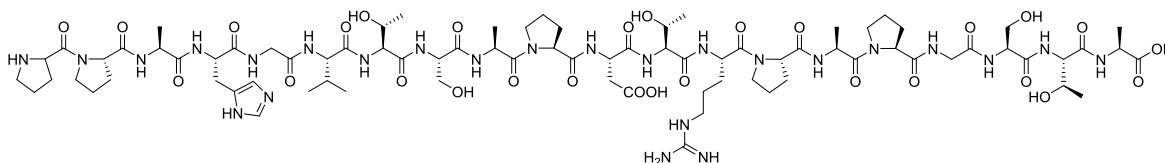
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.7$ ($\text{A}_4^{\text{C=O}}$, $\text{T}_2^{\text{C=O}}$), 172.2 ($\text{A}_3^{\text{C=O}}$, D^γ), 171.1 ($\text{FP}_{1,2}^{\text{C=O}}$, $\text{P}_3^{\text{C=O}}$), 170.9 ($\text{A}_{1,2}^{\text{C=O}}$, $\text{R}^{\text{C=O}}$, $\text{T}^{*\text{C=O}}$, $\text{V}^{\text{C=O}}$), 170.7 ($\text{NHAc}^{\text{C=O}}$), 170.2 ($\text{D}^{\text{C=O}}$), 170.1 ($\text{H}^{\text{C=O}}$, $\text{S}_1^{\text{C=O}}$), 169.9 ($\text{S}_2^{\text{C=O}}$), 168.8 (CH_2CO), 169.6 ($\text{P}_{1,2}^{\text{C=O}}$, $\text{T}_1^{\text{C=O}}$), 169.0 ($\text{G}_1^{\text{C=O}}$), 168.9 ($\text{G}_2^{\text{C=O}}$), 156.8 (R^ϵ), 133.7 (H^ϵ), 129.1 (H^γ), 117.0 (H^δ), 104.6 ($\text{C1}'$), 98.4 (C1), 92.9 (FP_2^γ), 92.1 (FP_1^γ), 77.9 (C3), 75.2 ($\text{C5}'$), 75.0 ($\text{T}^{*\beta}$), 73.0 ($\text{C4}'$), 71.3 (C5), 70.6 ($\text{C2}'$), 69.6 ($2 \times \text{OCH}_2$), 69.5 ($2 \times \text{OCH}_2$), 68.0 ($\text{C3}'$), 67.7 (C4), 66.7 (T_1^β), 66.5 (OCH_2), 66.2 (T_2^β , OCH_2), 61.7 (S_2^β), 61.6 (S_1^β), 60.4 (C6 , $\text{C6}'$), 59.6 (P_1^a), 59.0 (P_2^a), 57.8 ($\text{FP}_{1,2}^a$, $\text{T}_{1,2}^a$), 57.4 (P_3^a), 57.1 (V^a), 55.9 (T^{*a}), 54.7 (S_1^a), 54.6 (S_2^a), 53.2 ($\text{FP}_{1,2}^\delta$), 51.4 (H^a), 49.9 (R^a), 49.4 (D^a), 48.3 (A_3^a , C2), 47.5 (A_4^a), 46.7 ($\text{P}_{1,3}^\delta$), 46.2 ($\text{A}_{1,2}^a$), 41.9 ($\text{G}_{1,2}^a$), 40.5 (R^δ), 38.5 (H_2NCH_2), 35.5 (D^β , $\text{FP}_{1,2}^\beta$), 34.1 (CH_2CO), 30.9 (V^β), 29.0 ($\text{P}_{1,3}^\beta$), 28.3 (R^β), 27.0 (H^β), 24.4 (P_1^γ , R^γ), 24.3 ($\text{P}_{2,3}^\gamma$), 22.9 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 19.7 (T_2^γ), 19.5 (T_1^γ), 19.1 ($\text{V}^{\gamma b}$), 18.1 ($\text{V}^{\gamma a}$), 18.0 ($\text{T}^{*\gamma}$), 17.4 (A_3^β), 17.1 (A_4^β), 16.5 ($\text{A}_{1,2}^\beta$) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO- D_6): -174.7 – -175.8 (m, 2 F, $\text{FP}_{1,2}^\gamma$) ppm.

5.7 Synthesevorschriften der Peptide für Abbaustudien

5.7.1 Synthese von *N*-L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (78)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*)

(Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 125 mg (66%, 0.06 mmol) des Peptids **78** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.1$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{127}N_{25}O_{28}$ (1887.04 g/mol) [1885.9282].

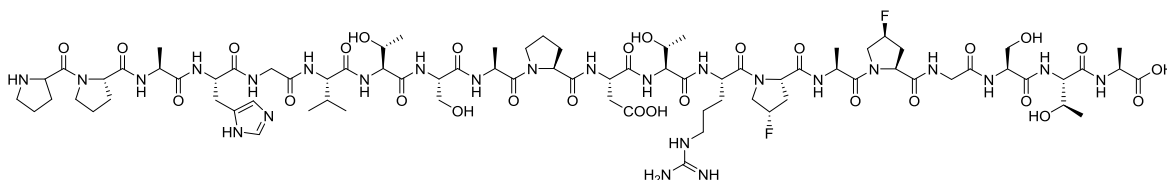
HR ESI-MS (positiv), m/z: 629.6499 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 629.6500), 944.4723 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 943.9714).

1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.24$ (bs, 1 H, COOH), 8.97 (s, 1 H, H^F), 8.51 – 8.41 (m, 1 H, P^{NH}), 8.31 – 8.20 (m, 5 H, G₁^{NH} {8.27}, D^{NH}, H^{NH} {8.24}, G₂^{NH} {8.23}, A₂^{NH} {8.22}), 8.14 – 8.08 (m, 3 H, H^{NH}, A_{3,4}^{NH} {8.10}), 8.05 (d, $J_{VNH,V\alpha} = 8.5$ Hz, 1 H, V^{NH}), 7.98 – 7.94 (m, 2 H, R^{NH}, A₁^{NH} {7.95}), 7.88 (d, $J_{TNH,T2\alpha} = 7.9$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.82 – 7.77 (m, 2 H, S_{1,2}^{NH} {7.79}), 7.71 (d, $J_{TNH,T3\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₃^{NH}), 7.52 (t, $J_{RCqNH,R\delta} = 5.5$ Hz, 1 H, R^{CqNH}), 7.38 (s, 1 H, H^{\delta}), 7.32 (d, $J_{TNH,T1\alpha} = 8.4$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 4.61 – 4.51 (m, 3 H, H^{\alpha} {4.58}, D^{\alpha}, A₄^{\alpha} {4.54}), 4.50 – 4.43 (m, 3 H, R^{\alpha} {4.49}, P₁^{\alpha}, A₃^{\alpha} {4.46}), 4.42 – 4.35 (m, 2 H, P₂^{\alpha} {4.39}, S₁^{\alpha} {4.37}), 4.34 – 4.24 (m, 7 H, P₃^{\alpha} {4.32}, V^{\alpha}, S₂^{\alpha}, T₁^{\alpha}, T₂^{\alpha} {4.30}, P_{4,5}^{\alpha} {4.27}), 4.22 – 4.15 (m, 3 H, A₂^{\alpha}, T₃^{\alpha} {4.19}, A₁^{\alpha} {4.17}), 4.09 – 4.03 (m, 1 H, T₃^{\beta} {4.06}), 4.00 – 3.92 (m, 2 H, T₂^{\beta} {3.97}, T₁^{\beta} {3.94}), 3.90 (d, $J_{G1\alpha\beta,G1NH} = 5.1$ Hz, 1 H, G₁^{\alpha\beta}), 3.87 (d, $J_{G1\alpha\beta,G1NH} = 5.4$ Hz, 1 H, G₁^{\alpha\alpha}), 3.77 – 3.68 (m, 2 H, G₂^{\alpha} {3.71}), 3.67 – 3.59 (m, 5 H, S₁^{\beta} {3.64}, P₃^{\delta\alpha} {3.62}, S₂^{\beta} {3.60}), 3.58 – 3.48 (m, 10 H, P_{2,4,5}^{\delta\alpha} {3.57}, P_{2,4,5}^{\delta\beta} {3.52}), 3.45 – 3.40 (m, 1 H, P₃^{\delta\beta} {3.42}), 3.25 – 3.21 (m, 1 H, P₁^{\delta\alpha} {3.23}), 3.19 – 3.14 (m, 1 H, P₁^{\delta\beta} {3.17}), 3.13 – 3.05 (m, 3 H, H^{\beta\beta} {3.11}, R^{\delta} {3.09}), 2.98 (dd, $J_{H\beta\alpha,H\beta\beta} = 15.1$ Hz, $J_{H\beta\alpha,H\alpha} = 7.3$ Hz, 1 H, H^{\beta\alpha}), 2.74 (dd, $J_{D\beta\alpha,D\beta\beta} = 16.4$ Hz, $J_{D\beta\alpha,D\alpha} = 5.8$ Hz, 1 H, D^{\beta\alpha}), 2.52 – 2.48 (m, 1 H, D^{\beta\beta} {2.50}), 2.44 – 2.37 (m, 1 H, P₁^{\beta\alpha} {2.41}), 2.14 – 2.07 (m, 1 H, P₂^{\beta\alpha} {2.09}), 2.05 – 1.98 (m, 4 H, P₃₋₅^{\beta\alpha} {2.03}, V^{\beta} {2.00}), 1.96 – 1.66 (m, 16 H, P₁^{\gamma\alpha} {1.92}, P₂₋₅^{\gamma\alpha} {1.91}, P₁^{\gamma\beta} {1.85}, P₂₋₅^{\gamma\beta} {1.84}, P₃₋₅^{\beta\beta} {1.83}, P₁^{\beta\beta} {1.81}, P₂^{\beta\beta} {1.77}, R^{\beta\alpha} {1.70}), 1.57 – 1.42 (m, 3 H, R^{\beta\beta}, R^{\gamma\beta} {1.52}, R^{\gamma\alpha} {1.45}), 1.26 (d, $J_{A1\beta,A1\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₁^{\beta}), 1.21 – 1.15 (m, 9 H, A₂₋₄^{\beta} {1.18}), 1.05 (d, $J_{T3\gamma,T\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₃^{\gamma}), 1.02 (d, $J_{T2\gamma,T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T₂^{\gamma}), 1.00 (d, $J_{T1\gamma,T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T₁^{\gamma}), 0.86 (d, $J_{V\gamma\beta,V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^{\gamma\beta}), 0.82 (d, $J_{V\gamma\alpha,V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^{\gamma\alpha}) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ (A₁^{C=O}), 172.3 (A₄^{C=O}), 172.1 (P^{C=O}), 171.9 (D^{\gamma}), 171.7 (P^{C=O}), 171.1 (A₃^{C=O}), 170.9 (P^{C=O}, V^{C=O}), 170.6 (S₂^{C=O}), 170.4 (D^{C=O}), 170.1 (P^{C=O}), 170.0 (H^{C=O}, S₁^{C=O}), 169.7 (T₃^{C=O}), 169.6 (T_{2,1}^{C=O}), 169.4 (P^{C=O}), 168.9 (S_{1,2}^{C=O}), 166.5 (P₁^{C=O}), 158.5 (q, TFA), 156.8 (R^{\epsilon}), 133.7 (H^{\epsilon}), 129.0 (H^{\gamma}), 117.1 (H^{\delta}), 66.9 (T₁^{\beta}), 66.6 (T₂^{\beta}), 66.3 (T₃^{\beta}), 61.8 (S₁^{\beta}), 61.7 (S₂^{\beta}), 59.8 (P₅^{\alpha}), 59.7 (P₄^{\alpha}), 59.4 (P₂^{\alpha}), 59.1 (P₃^{\alpha}), 58.4 (P₁^{\alpha}), 58.1 (T₃^{\alpha}), 57.8 (V^{\alpha}, T₁^{\alpha}, T₂^{\alpha}), 55.0 (S₁^{\alpha}), 54.8 (S₂^{\alpha}), 51.4 (H^{\alpha}), 50.1 (R^{\alpha}), 49.5 (D^{\alpha}), 48.5 (A₂^{\alpha}), 47.7 (A₁^{\alpha}), 46.8 (P_{2,4,5}^{\delta}), 46.7 (P₃^{\delta}), 46.6 (A₄^{\alpha}), 46.3 (A₃^{\alpha}), 45.9 (P₁^{\delta}), 42.1 (G₂^{\alpha}), 41.9 (G₁^{\alpha}), 40.6 (R^{\delta}), 35.6 (D^{\beta}), 30.7 (V^{\beta}), 29.1 (P₂₋₅^{\beta}), 28.3 (R^{\beta}), 27.9 (P₁^{\beta}), 27.1 (H^{\beta}), 24.5 (P₂₋₅^{\gamma}, R^{\gamma}), 23.6 (P₁^{\gamma}), 19.9 (T₃^{\gamma}), 19.6 (T₁^{\gamma}), 19.3 (V^{\gamma\beta}), 19.1 (T₂^{\gamma}), 18.0 (V^{\gamma\alpha}), 17.7 (A₂^{\beta}), 17.2 (A₁^{\beta}), 16.9 (A₃^{\beta}), 16.6 (A₄^{\beta}) ppm.

5.7.2 Synthese von *N*-L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (79)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-*cis*-4-F-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im

Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 113 mg (59%, 0.06 mmol) des Peptids **79** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.3$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{125}F_2N_{25}O_{28}$ (1923.00 g/mol) [1921.9094].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 641.6438 ($[M+3H]^+$, ber.: 641.6443), 961.9616 ($[M+2H]^+$, ber.: 961.9625).

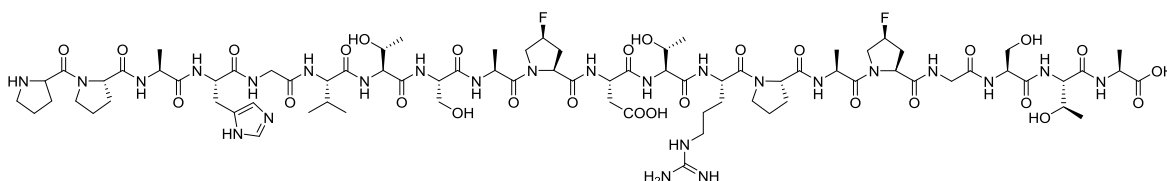
1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.37$ (bs, 1 H, COOH), 8.96 (s, 1 H, H^c), 8.51 – 8.43 (m, 1 H, P^{NH} {8.48}), 8.30 – 8.19 (m, 5 H, G₁^{NH} {8.27}, D^{NH} {8.25}, H^{NH} {8.24}, A₄^{NH} {8.22}), 8.11 (s, 1 H, A₂^{NH}), 8.10 (s, 1 H, H^{NH}), 8.05 (d, $J_{VNH,V\alpha} = 8.6$ Hz, 1 H, V^{NH}), 8.03 – 7.94 (m, 4 H, G₂^{NH} {8.01}, A₃^{NH} {8.00}, R^{NH} {7.97}, A₁^{NH} {7.96}), 7.89 (d, $J_{TNH,T2\alpha} = 8.1$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.80 (d, $J_{TNH,S1\alpha} = 7.8$ Hz, 1 H, S₂^{NH}), 7.74 – 7.70 (m, 2 H, T₃^{NH} {7.73}, S₁^{NH} {7.71}), 7.57 – 7.53 (m, 1 H, R^{NH} {7.55}), 7.38 (s, 1 H, H^δ), 7.33 (bs, 1 H, T₁^{NH}), 5.32 (bs, 1 H, FP₁^γ), 5.26 (bs, 1 H, FP₂^γ), 4.62 – 4.51 (m, 3 H, H^α {4.58}, D^α, A₂^α {4.53}), 4.50 – 4.37 (m, 7 H, R^α {4.47}, P₁^α {4.46}, FP_{1,2}^α {4.43}, S₁^α {4.41}, P₂^α {4.39}), 4.34 – 4.24 (m, 5 H, A₄^α, T₂^α, V^α {4.31}, S₂^α {4.30}), 4.21 – 4.14 (m, 5 H, P₃^α, T_{1,3}^α {4.19}, A_{1,3}^α {4.18}), 4.09 – 4.04 (m, 1 H, T₃^β {4.07}), 3.99 – 3.92 (m, 2 H, T_{1,2}^β {3.97}), 3.92 – 3.85 (m, 1 H, G₁^{αα} {3.89}), 3.82 – 3.70 (m, 6 H, FP₁^δ {3.79}, G₂^{αα} {3.76}, FP₂^δ, G₁^{αβ} {3.74}), 3.67 (d, $J_{G2\alpha b,G1NH} = 4.7$ Hz, 1 H, G₂^{αβ}), 3.64 – 3.58 (m, 4 H, P₂^{δa} {3.63}, S₁^β {3.61}, P₂^{δb} {3.60}), 3.57 – 3.49 (m, 4 H, S₂^β {3.54}, P₃^{δa} {3.51}), 3.45 – 3.40 (m, 1 H, P₃^{δa} {3.42}), 3.27 – 3.20 (m, 1 H, P₁^{δa} {3.23}), 3.19 – 3.13 (m, 1 H, P₁^{δb} {3.17}), 3.14 – 3.04 (m, 3 H, R^δ, H^{βb} {3.10}), 2.98 (dd, $J_{H\beta a,H\beta b} = 15.6$ Hz, $J_{H\beta a,H\alpha} = 7.6$ Hz, 1 H, H^{βa}), 2.74 (dd, $J_{D\beta a,D\beta b} = 16.6$ Hz, $J_{D\beta a,D\alpha} = 6.3$ Hz, 1 H, D^{βa}), 2.54 – 2.45 (m, 1 H, D^{βb} {2.50}), 2.44 – 2.35 (m, 1 H, P₁^{βa} {2.41}), 2.28 – 2.13 (m, 4 H, FP₁^β {2.24}, FP₂^β {2.21}), 2.11 – 2.07 (m, 1 H, P₂^{βa} {2.10}), 2.04 – 1.97 (m, 2 H, P₃^{βa} {2.01}, V^β {2.00}), 1.94 – 1.74 (m, 10 H, P₂^{γa} {1.91}, P₁^γ, P₃^{γa} {1.89}, P₃^{γb} {1.85}, P₃^{βb}, P₂^{γb} {1.83}, P₁^{βb} {1.81}, P₂^{βb} {1.77}, R^{βb} {1.71}), 1.53 (bs, 3 H, R^{βa}, R^γ), 1.26 (d, $J_{A1\beta,A1\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₁^β), 1.22 – 1.10 (m, 9 H, A₂₋₄^β {1.19}), 1.05 (d, $J_{T3\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₃^γ), 1.02 (d, $J_{T2\gamma,T\beta} = 5.9$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.01 (d, $J_{T1\gamma,T\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.86 (d, $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γb}), 0.82 (d, $J_{V\gamma a,V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γa}) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ (A₁^{C=O}), 172.3 (A₂^{C=O}), 171.8 (D^γ), 171.1 (A₃^{C=O}), 170.9 (P^{C=O}), 170.8 (V^{C=O}), 170.5 (A₄^{C=O}), 170.1 (FP^{C=O}), 170.0 (D^{C=O}, H^{C=O}), 169.9 (R^{C=O}), 169.7 (T₃^{C=O}), 169.5 (T_{1,2}^{C=O}, S₂^{C=O}), 168.9 (P^{C=O}, G₂^{C=O}), 168.8 (FP^{C=O}, P^{C=O}, G₁^{C=O}), 166.5 (P₁^{C=O}), 158.4 (q, TFA), 156.8 (R^c), 133.7 (H^c), 129.0 (H^γ), 117.1 (H^δ), 93.5 (FP₂^γ), 91.8 (FP₁^γ), 66.8 (T₁^β), 66.6 (T₂^β), 66.2 (T₃^β), 61.8 {S₁^β}, 61.7 {S₂^β}, 59.3 (P₁^α), 58.8 (FP_{1,2}^α), 58.3 (P₂^α), 58.1 (T_{1,3}^γ), 57.8 (P₃^α, T₂^γ, V^α), 54.7 (S_{1,2}^α), 53.0 (FP_{1,2}^δ), 51.4 (H^α), 50.2 (R^α), 49.6 (D^α), 48.5 (A_{3,4}^α), 47.7 (A₁^α), 46.8 (P_{2,3}^δ), 46.3 (A₂^α), 45.9 (P₁^δ), 42.1 (G₂^α), 41.9 (G₁^α), 40.7 (R^δ), 35.5 (D^β), 35.3 (FP_{1,2}^β), 30.7 (V^β), 29.1 (P_{2,3}^β), 28.2 (R^β), 27.9 (P₁^β), 27.1 (H^β), 24.6 (R^γ), 24.4 (P_{2,3}^γ), 23.6 (P₁^γ), 19.9 (T₃^γ), 19.8 (T₁^γ), 19.3 (V^{γb}), 19.1 (T₂^γ), 18.0 (A₄^β, V^{γa}), 17.7 (A₃^β), 17.2 (A₁^β), 16.8 (A₂^β) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -174.1 – -175.1 (m, 2 F, $\text{FP}_{1,2}^{\gamma}$) ppm.

5.7.3 Synthese von *N*-L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (80)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-*cis*-4-F-Pro- Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc*-Ala-Wang vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL

Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 113 mg (59%, 0.06 mmol) des Peptids **80** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 10.6$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{125}F_2N_{25}O_{28}$ (1923.00 g/mol) [1921.9094].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 641.6434 ($[M+3H]^+$, ber.: 641.6443), 961.9616 ($[M+2H]^+$, ber.: 961.9625).

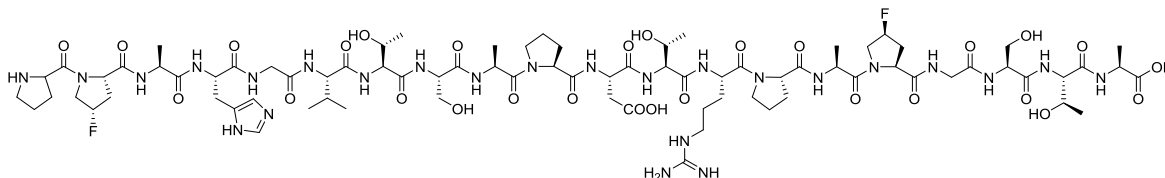
1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 8.96$ (s, 1 H, H^c), 8.52 – 8.42 (m, 1 H, P^{NH} {8.48}), 8.31 – 8.24 (m, 2 H, G_1^{NH} {8.27}, H^{NH} {8.25}), 8.22 (d, $J_{A_1NH, A_{1\alpha}} = 7.0$ Hz, 1 H, A_1^{NH}), 8.19 – 8.13 (m, 2 H, A_3^{NH} {8.19}, A_2^{NH} {8.16}), 8.11 (s, 1 H, H^{NH}), 8.10 – 8.03 (m, 1 H, V^{NH} {8.05}), 8.02 – 7.92 (m, 4 H, D^{NH} {8.01}, R^{NH} {7.97}, A_4^{NH} , G_2^{NH} {7.96}), 7.91 – 7.85 (m, 2 H, $T_{1,2}^{NH}$ {7.88}), 7.84 – 7.80 (m, 1 H, S_1^{NH} {7.82}), 7.79 – 7.70 (m, 2 H, S_2^{NH} {7.76}, T_3^{NH} {7.73}), 7.57 – 7.51 (m, 1 H, R^{NH} {7.54}), 7.38 (s, 1 H, H^d), 5.43 – 5.33 (m, 1 H, FP_1^{γ} {5.36}), 5.30 – 5.20 (m, 1 H, FP_2^{γ} {5.27}), 4.67 – 4.52 (m, 3 H, D^{α} {4.62}, H^{α} {4.58}, A_3^{α} {4.57}), 4.51 – 4.36 (m, 7 H, R^{α} {4.48}, A_2^{α} {4.47}, FP_2^{α} {4.44}, FP_1^{α} , S_2^{α} {4.41}, $P_{2,3}^{\alpha}$ {4.39}), 4.34 – 4.24 (m, 5 H, $T_{1,2}^{\alpha}$, V^{α} {4.31}, P_1^{α} {4.30}, S_1^{α} {4.28}), 4.23 – 4.14 (m, 3 H, $A_{1,4}^{\alpha}$, T_3^{α} {4.19}), 4.13 – 3.82 (m, 8 H, T_3^{β} {4.05}, T_2^{β} {3.97}, FP_1^{δ} {3.93}, T_1^{β} {3.91}, FP_2^{δ} , G_1^{aa} {3.87}), 4.78 – 3.67 (m, 3 H, G_2^{aa} {3.77}, G_1^{ab} {3.75}, G_2^{ab} {3.67}), 3.66 – 3.37 (m, 8 H, $P_3^{\delta a}$ {3.62}, S_2^{β} {3.61}, S_1^{β} {3.54}, $P_2^{\delta a}$ {3.49}, $P_{2,3}^{\delta b}$ {3.43}), 3.28 – 3.04 (m, 5 H, $P_1^{\delta a}$ {3.23}, $P_1^{\delta b}$ {3.17}, $H^{\beta b}$ {3.10}, R^{δ} {3.08}), 3.02 – 2.90 (m, 1 H, $H^{\beta a}$ {2.98}), 2.69 (dd, $J_{D^{\beta a}, D^{\beta b}} = 16.1$ Hz, $J_{D^{\beta a}, D^{\alpha}} = 5.4$ Hz, 1 H, $D^{\beta a}$), 2.47 – 2.35 (m, 3 H, $D^{\beta b}$ {2.46}, FP_1^{β} {2.40}), 2.34 – 2.14 (m, 2 H, FP_2^{β} {2.33}), 2.13 – 1.95 (m, 3 H, $P_{2,3}^{\beta b}$, V^{β} {2.00}), 1.93 – 1.63 (m, 11 H, $P_1^{\gamma b}$ {1.90}, $P_1^{\gamma a}$ {1.87}, $P_{2,3}^{\gamma}$ {1.85}, P_1^{β} {1.81}, $P_{2,3}^{\beta a}$ {1.76}, $R^{\beta a}$ {1.69}), 1.51 (bs, 3 H, $R^{\beta b}$, R^{γ} {1.51}), 1.31 – 1.11 (m, 12 H, A_4^{β} {1.26}, A_3^{β} {1.23}, A_2^{β} {1.20}, A_1^{β} {1.19}), 1.09 – 0.95 (m, 9 H, T_3^{γ} {1.05}, T_2^{γ} {1.02}, T_1^{γ} {1.01}), 0.86 (d, $J_{V^{\gamma b}, V^{\beta}} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.83 (d, $J_{V^{\gamma a}, V^{\beta}} = 6.8$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($A_4^{C=O}$), 172.3 ($A^{C=O}$), 172.0 (D^{γ}), 171.5 ($A^{C=O}$), 171.4 ($A^{C=O}$), 171.2 ($P_{2,3}^{C=O}$, $V^{C=O}$, $FP_2^{C=O}$), 170.9 ($G_2^{C=O}$), 170.1 ($S_2^{C=O}$, $D^{C=O}$, $H^{C=O}$, $G_1^{C=O}$, $FP_1^{C=O}$), 170.0 ($G_1^{C=O}$), 169.7 ($T_3^{C=O}$), 169.6 ($T_2^{C=O}$, $R^{C=O}$), 169.5 ($S_1^{C=O}$), 168.7 ($T_1^{C=O}$), 166.5 ($P_1^{C=O}$), 156.8 (R^e), 133.7 (H^e), 129.0 (H^{γ}), 117.1 (H^{δ}), 93.5 (FP_2^{γ}), 91.6 (FP_1^{γ}), 66.9 (T_1^{β}), 66.6 (T_2^{β}), 66.2 (T_3^{β}), 61.8 (S_2^{β}), 61.5 (S_1^{β}), 59.3 ($P_{2,3}^{\alpha}$), 59.2 (P_1^{α}), 58.7 ($FP_{1,2}^{\alpha}$), 58.0 (T_3^{α}), 57.7 ($T_{1,2}^{\alpha}$, V^{α}), 54.9 (S_2^{α}), 54.8 (S_1^{α}), 53.2 (FP_1^{δ}), 53.0 (FP_2^{δ}), 51.4 (H^{α}), 50.1 (R^{α}), 49.2 (D^{α}), 48.4 (A_1^{α}), 47.6 (A_4^{α}), 46.8 ($P_{2,3}^{\delta}$), 46.6 (A_2^{α}), 46.4 (A_3^{α}), 45.9 (P_1^{δ}), 42.1 (G_2^{α}), 41.9 (G_1^{α}), 40.6 (R^{δ}), 35.7 (D^{β}), 35.4 (FP_1^{β}), 35.2 (FP_2^{β}), 30.7 (V^{β}), 29.1 ($P_{2,3}^{\beta}$), 28.2 (R^{β}), 27.9 (P_1^{β}), 27.1 (H^{β}), 24.5 ($P_{2,3}^{\gamma}$, R^{γ}), 23.6 (P_1^{γ}), 19.9 (T_3^{γ}), 19.4 (T_1^{γ}), 19.3 ($V^{\gamma b}$), 19.1 (T_2^{γ}), 17.7 (A_1^{β} , $V^{\gamma a}$), 17.2 (A_4^{β}), 16.8 ($A_{2,3}^{\beta}$) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -173.6 – -175.7 (m, 2 F, $FP_{1,2}^{\gamma}$) ppm.

5.7.4 Synthese von *N*-L-Propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (81)

(Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-*cis*-4-F-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im

Vakuum eingeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 82 mg (43%, 0.04 mmol) des Peptids **81** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 11.1$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{125}F_2N_{25}O_{28}$ (1923.00 g/mol) [1921.9094].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 641.6433 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 641.6443), 961.9614 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 961.9625).

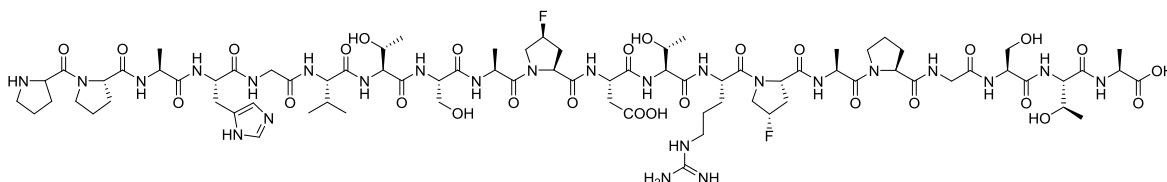
1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 8.94$ (s, 1 H, H^c), 8.79 – 8.73 (m, 1 H, P^{NH} {8.76}), 8.38 – 8.32 (m, 1 H, H^{NH} {8.33}), 8.28 – 8.22 (m, 2 H, G_1^{NH} {8.25}, D^{NH} {8.24}), 8.21 – 8.15 (m, 2 H, A_2^{NH} {8.19}, H^{NH} {8.18}), 8.12 – 8.00 (m, 3 H, A_3^{NH} {8.10}, V^{NH} {8.04}, A_4^{NH} {8.02}), 7.99 – 7.93 (m, 3 H, G_2^{NH} {7.96}, A_1^{NH} {7.96}, R^{NH} {7.95}), 7.92 – 7.85 (m, 1 H, T_2^{NH} {7.88}), 7.82 – 7.69 (m, 3 H, S_1^{NH} , T_1^{NH} {7.80}, S_2^{NH} {7.75}), 7.60 – 7.55 (m, 1 H, R^{NH} {7.57}), 7.36 (s, 1 H, H^d), 7.35 – 7.28 (m, 1 H, T_3^{NH} {7.32}), 5.43 – 5.37 (m, 1 H, $FP_1^{\gamma K1}$ {5.40}, $FP_1^{\gamma K2}$ {5.38}), 5.34 – 5.27 (m, 1 H, $FP_2^{\gamma K1}$ {5.31}, $FP_2^{\gamma K2}$ {5.29}), 4.63 – 4.51 (m, 5 H, H^a {4.58}, FP_1^a {4.57}, FP_2^a {4.56}, D^a , A_3^a {4.55}), 4.51 – 4.38 (m, 4 H, R^a {4.49}, A_2^a {4.47}, P_1^a {4.43}, S_1^a {4.41}), 4.34 – 4.23 (m, 7 H, V^a , $T_{1,2}^a$ {4.31}, P_2^a {4.30}, S_2^a {4.29}, P_3^a {4.27}, A_4^a {4.24}), 4.21 – 4.14 (m, 2 H, T_3^a {4.19}, A_1^a {4.16}), 4.09 – 4.03 (m, 1 H, T_3^b {4.06}), 4.00 – 3.82 (m, 7 H, $FP_1^{\delta a}$, T_2^b {3.97}, T_1^b {3.94}, $FP_1^{\delta b}$ {3.93}, $FP_2^{\delta a}$ {3.92}, G_1^{ab} {3.89}, $FP_2^{\delta b}$ {3.87}), 3.82 – 3.66 (m, 2 H, G_2^{aa} {3.77}, G_1^{aa} {3.73}), 3.66 – 3.45 (m, 9 H, G_2^{ab} {3.65}, $P_3^{\delta a}$ {3.62}, S_2^b {3.60}, $P_2^{\delta a}$ {3.56}, S_1^b {3.54}, $P_2^{\delta b}$ {3.51}, $P_3^{\delta b}$ {3.49}), 3.24 (bs, 1 H, $P_1^{\delta b}$), 3.19 (bs, 1 H, $P_1^{\delta a}$), 3.14 – 3.04 (m, 2 H, $H^{\beta b}$ {3.10}, R^{δ} {3.09}), 3.01 – 2.94 (m, 1 H, $H^{\beta a}$ {2.98}), 2.77 – 2.70 (m, 2 H, $D_{K1}^{\beta a}$ {2.75}, $D_{K2}^{\beta a}$ {2.73}), 2.54 – 2.31 (m, 6 H, $D^{\beta b}$, $FP_1^{\beta a}$ {2.49}, $P_1^{\beta a}$ {2.47}, $FP_1^{\beta b}$ {2.46}, $FP_2^{\beta a}$ {2.43}, $FP_2^{\beta b}$ {2.40}), 2.06 – 1.96 (m, 3 H, $P_{2,3}^{\beta a}$ {2.02}, V^{β} {2.00}), 1.93 – 1.79 (m, 6 H, $P_1^{\gamma, \beta b}$ {1.90}, $P_2^{\beta b}$ {1.84}, $P_{2,3}^{\gamma b}$ {1.83}), 1.78 – 1.66 (m, 2 H, $P_3^{\beta b}$ {1.75}, $R^{\beta a}$ {1.69}), 1.51 (bs, 3 H, R^{γ} {1.52}, $R^{\beta b}$ {1.51}), 1.26 (d, $J_{A1\beta, A1\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_1^{β}), 1.24 – 1.21 (m, 3 H, A_2^{β} {1.23}), 1.21 – 1.14 (m, 6 H, $A_{3,4}^{\beta}$ {1.18}), 1.05 (d, $J_{T3\gamma, T\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T_3^{γ}), 1.03 (d, $J_{T2\gamma, T\beta} = 6.0$ Hz, 3 H, T_2^{γ}), 1.00 (d, $J_{T1\gamma, T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T_1^{γ}), 0.86 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.82 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($A_1^{C=O}$), 172.3 ($A_4^{C=O}$), 171.9 (D^{γ}), 171.5 ($P_3^{C=O}$, $A_2^{C=O}$), 170.9 ($G_2^{C=O}$), 170.7 ($V^{C=O}$), 170.5 ($A_3^{C=O}$), 170.3 ($D^{C=O}$), 170.1 ($S_2^{C=O}$, $G_1^{C=O}$), 169.9 ($R^{C=O}$, $H^{C=O}$), 169.7 ($T_3^{C=O}$), 169.5 ($T_{1,2}^{C=O}$, $P^{C=O}$, $FP_2^{C=O}$), 169.4 ($S_2^{C=O}$), 168.9 ($FP_2^{C=O}$), 167.4 ($FP_1^{C=O}$, $P_1^{C=O}$), 156.8 (R^c), 133.8 (H^c), 129.0 (H^{γ}), 117.2 (H^{δ}), 93.6 ($FP_2^{\gamma K1}$), 93.0 ($FP_2^{\gamma K2}$), 91.8 ($FP_1^{\gamma K1}$), 91.2 ($FP_1^{\gamma K2}$), 66.8 (T_1^{β}), 66.6 (T_2^{β}), 66.2 (T_3^{β}), 61.8 (S_1^{β}), 61.6 (S_2^{β}), 59.7 (P_3^a), 59.2 (P_2^a), 58.7 (FP_1^a), 58.2 (FP_2^a , P_1^a), 58.1 (T_3^a), 57.8 (V^a , $T_{1,2}^a$), 54.8 ($S_{1,2}^a$), 53.1 ($FP_{1,2}^{\delta}$), 51.5 (H^a), 50.1 (R^a), 49.5 (D^a), 48.3 (A_4^a), 47.7 (A_1^a), 46.8 (P_3^{δ}), 46.7 (P_2^{δ}), 46.6 (A_3^a), 46.4 (A_2^a), 46.0 (P_1^{δ}), 42.1 (G_2^a), 41.9 (G_1^a), 40.6 (R^{δ}), 35.6 (D^{β} , FP_1^{β}), 35.4 (FP_2^{β}), 30.7 (V^{β}), 29.1 ($P_{2,3}^{\beta}$), 28.3 (R^{β}), 28.2 (P_1^{β}), 27.0 (H^{β}), 24.5 (R^{γ}), 24.3 ($P_{2,3}^{\gamma}$), 23.6 (P_1^{γ}), 19.9 (T_3^{γ}), 19.6 (T_1^{γ}), 19.3 ($V^{\gamma b}$), 19.1 (T_2^{γ}), 18.0 ($V^{\gamma a}$), 17.9 (A_4^{β}), 17.2 (A_1^{β}), 16.8 ($A_{2,3}^{\beta}$) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -173.6 – -175.7 (m, 2 F, $\text{FP}_{1,2}$) ppm.

5.7.5 Synthese von *N*-L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (82)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBt H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL

Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 69 mg (36%, 0.04 mmol) des Peptids **82** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.5$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{125}F_2N_{25}O_{28}$ (1923.00 g/mol) [1921.9094].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 641.6446 ($[M+3H]^+$, ber.: 641.6443), 961.9629 ($[M+2H]^+$, ber.: 961.9625).

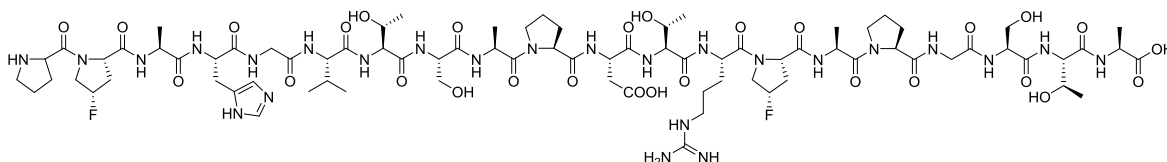
1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 8.94$ (s, 1 H, H^e), 8.29 – 8.24 (m, 2 H, $G_{1,2}^{NH}$ {8.26}), 8.24 – 8.17 (m, 2 H, H^{NH} {8.24}, A_2^{NH} {8.22}), 8.17 – 8.12 (m, 1 H, A_3^{NH} {8.15}), 8.12 – 8.08 (m, 1 H, H^{NH} {8.10}), 8.08 – 8.02 (m, 1 H, V^{NH} {8.05}), 8.02 – 7.97 (m, 2 H, D^{NH} , R^{NH} {8.00}), 7.97 – 7.93 (m, 1 H, A_4^{NH} {7.96}), 7.93 – 7.89 (m, 1 H, A_1^{NH} {7.91}), 7.89 – 7.84 (m, 2 H, $T_{1,2}^{NH}$ {7.88}), 7.84 – 7.76 (m, 2 H, S_2^{NH} {7.81}, S_1^{NH} {7.80}), 7.76 – 7.68 (m, 1 H, T_3^{NH} {7.72}), 7.54 – 7.50 (m, 1 H, R^{NH} {7.53}), 7.37 (s, 1 H, H^d), 5.34 (bs, 1 H, FP_1^y), 5.25 (bs, 1 H, FP_2^y), 4.64 – 4.50 (m, 4 H, D^a {4.62}, H^a {4.58}, A_3^a {4.54}, A_1^a {4.52}), 4.94 – 4.42 (m, 3 H, P_1^a {4.46}, R^a {4.45}, FP_1^a {4.44}), 4.42 – 4.36 (m, 4 H, FP_2^a {4.41}, P_3^a {4.39}, S_2^a {4.37}), 4.33 – 4.24 (m, 5 H, T_2^a , V^a {4.31}, S_1^a {4.28}, P_2^a {4.26}), 4.21 – 4.15 (m, 4 H, T_3^a {4.20}, T_1^a {4.19}, A_2^a {4.18}), 4.08 – 4.03 (m, 1 H, T_3^b {4.06}), 4.01 – 3.85 (m, 6 H, T_2^b {3.98}, FP_1^b {3.93}, T_1^b {3.92}, G_1^{aa} {3.90}, G_1^{ab} {3.87}), 3.78 – 3.69 (m, 4 H, FP_2^b {3.77}, G_2^{aa} {3.75}, G_2^{ab} {3.72}), 3.67 – 3.51 (m, 6 H, S_2^b {3.63}, $P_3^{\delta a}$ {3.62}, $P_2^{\delta b}$, S_1^b {3.60}, $P_3^{\delta b}$ {3.56}, $P_2^{\delta a}$ {3.55}), 3.27 – 3.21 (m, 1 H, $P_1^{\delta b}$ {3.24}), 3.20 – 3.08 (m, 4 H, $P_1^{\delta a}$ {3.17}, R^{δ} , $H^{\delta b}$ {3.11}), 3.01 – 2.95 (m, 1 H, $H^{\delta a}$ {2.98}), 2.72 – 2.66 (m, 1 H, $D^{\delta a}$ {2.70}), 2.48 – 2.37 (m, 6 H, $D^{\delta b}$ {2.44}, FP_2^b {2.43}, $P_1^{\delta a}$, FP_1^b {2.41}), 2.13 – 1.97 (m, 3 H, $P_3^{\delta a}$ {2.10}, $P_2^{\delta a}$ {2.04}, V^b {2.00}), 1.94 – 1.72 (m, 12 H, $P_1^{\gamma a}$ {1.90}, $P_{2,3}^{\gamma a}$, $R^{\gamma b}$ {1.89}, $P_1^{\gamma b}$ {1.87}, $P_{2,3}^{\gamma b}$, $P_2^{\delta b}$, $R^{\gamma a}$ {1.84}, $P_1^{\delta b}$ {1.81}, $P_3^{\delta b}$ {1.78}, $R^{\delta b}$ {1.73}), 1.55 (bs, 1 H, $R^{\delta a}$), 1.26 (d, $J_{A_4\beta, A_4\alpha} = 6.8$ Hz, 3 H, A_4^{β}), 1.24 – 1.19 (m, 6 H, A_3^{β} {1.20}, A_2^{β} {1.19}), 1.16 (d, $J_{A_1\beta, A_1\alpha} = 6.8$ Hz, 3 H, A_1^{β}), 1.05 (d, $J_{T_3\gamma, T_3\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T_3^{γ}), 1.04 – 1.00 (m, 6 H, T_2^{γ} {1.02}, T_1^{γ} {1.01}), 0.86 (d, $J_{V^{\gamma b}, V^{\beta}} = 6.7$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.83 (d, $J_{V^{\gamma a}, V^{\beta}} = 6.8$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ ($A_4^{C=O}$), 172.4 ($A_2^{C=O}$), 172.1 ($P_2^{C=O}$), 172.0 (D^y), 171.2 ($A_3^{C=O}$), 170.9 ($P_3^{C=O}$, $V^{C=O}$), 170.7 ($A_1^{C=O}$), 170.5 ($FP_2^{C=O}$), 170.3 ($D^{C=O}$), 170.2 ($S_1^{C=O}$), 170.1 ($G_{1,2}^{C=O}$, $H^{C=O}$), 170.0 ($T_1^{C=O}$), 169.8 ($P_1^{C=O}$, $FP_1^{C=O}$, $R^{C=O}$, $T_3^{C=O}$), 169.6 ($S_2^{C=O}$, $T_2^{C=O}$), 156.8 (R^e), 133.7 (H^e), 129.0 (H^y), 117.1 (H^d), 93.0 (FP_2^y), 91.9 (FP_1^y), 66.8 (T_1^b), 66.6 (T_2^b), 66.2 (T_3^b), 61.8 (S_2^b), 61.5 (S_1^b), 59.9 (P_2^a), 59.3 (P_3^a), 58.8 (FP_2^a), 58.6 (FP_1^a), 58.3 (P_1^a), 58.1 (T_1^a), 58.0 (T_3^a), 57.7 (T_2^a , V^a), 54.9 (S_1^a), 54.8 (S_2^a), 53.2 (FP_2^b), 53.1 (FP_1^b), 51.4 (H^a), 50.2 (R^a), 49.3 (D^a), 48.5 (A_2^a), 47.7 (A_4^a), 46.8 (P_2^b), 46.7 (P_3^b , A_3^a), 46.3 (A_1^a), 45.9 (P_1^b), 42.0 (G_2^a), 41.9 (G_1^a), 40.6 (R^b), 35.7 (D^b), 35.6 ($FP_{1,2}^b$), 30.6 (V^b), 29.1 ($P_{2,3}^b$), 28.2 (R^b), 27.9 (P_1^b), 27.1 (H^b), 24.5 ($P_{2,3}^y$, R^y), 23.6 (P_1^y), 19.8 (T_3^y), 19.6 (T_1^y), 19.3 ($V^{\gamma b}$), 19.1 (T_2^y), 18.0 ($V^{\gamma a}$), 17.7 (A_2^b), 17.2 (A_4^b), 16.9 (A_1^b), 16.8 (A_3^b) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -174.1 – -175.1 (m, 1 F, FP_1^y), -175.2 – -176.2 (m, 1 F, FP_2^y) ppm.

5.7.6 Synthese von *N*-L-Propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (83)

(Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im

Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 123 mg (64%, 0.06 mmol) des Peptids **83** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.5$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{125}F_2N_{25}O_{28}$ (1923.00 g/mol) [1921.9094].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 641.6446 ($[M+3H]^+$, ber.: 641.6443), 961.9629 ($[M+2H]^+$, ber.: 961.9625).

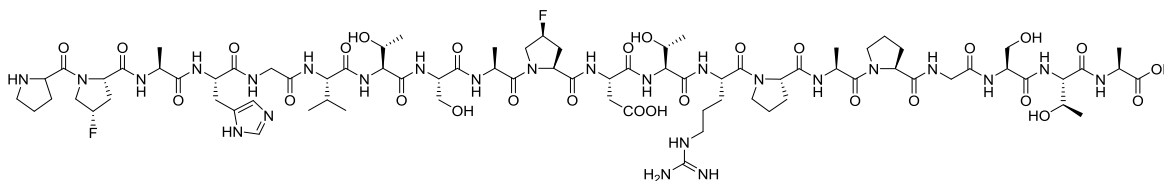
1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 8.94$ (s, 1 H, H^c), 8.37 – 8.30 (m, 2 H, A_3^{NH} {8.36}, H^{NH} {8.34}), 8.29 – 8.15 (m, 4 H, G_2^{NH} {8.27}, D^{NH} {8.25}, G_1^{NH} {8.22}, H^{NH} {8.20}), 8.14 – 7.85 (m, 6 H, V^{NH} {8.06}, A_2^{NH} {8.02}, R^{NH} {8.01}), A_4^{NH} {7.97}, A_1^{NH} {7.93}, T_2^{NH} {7.91}), 7.82 – 7.68 (m, 2 H, $S_{1,2}^{NH}$ {7.80}), 7.55 – 7.47 (m, 1 H, R^{NH} {7.53}), 7.41 – 7.28 (m, 2 H, H^d {7.37}, T_1^{NH} {7.33}), 5.46 – 5.33 (m, 2 H, FP_2^γ {5.40}, FP_2^γ {5.35}), 5.32 – 5.19 (m, 2 H, FP_1^γ {5.32}, FP_1^γ {5.26}), 4.63 – 4.36 (m, 8 H, H_1^α {4.58}, $FP_{1,2}^\alpha$ {3.56}, D^α , A_1^α {4.55}, R^α {4.47}, P_1^α {4.44}, S_1^α {4.39}), 4.36 – 4.23 (m, 7 H, A_3^α {4.35}, V^α , T_2^α {4.32}, S_2^α {4.31}, P_2^α {4.28}, P_3^α {4.27}, A_2^α {4.26}), 4.22 – 4.13 (m, 3 H, T_3^α {4.21}, T_1^α {4.18}, A_4^α {4.17}), 4.12 – 3.81 (m, 7 H, T_3^β {4.07}, $FP_2^{\delta a}$ {3.98}, T_2^β {3.97}, T_1^β {3.95}, $FP_1^{\delta a}$ {3.39}, G_2^{aa} {3.91}, G_2^{ab} {3.89}), 3.79 – 3.44 (m, 11 H, $FP_2^{\delta b}$ {3.76}, $FP_1^{\delta b}$, G_1^α {3.73}, $S_1^{\beta a}$ {3.64}, $S_2^{\beta a}$ {3.60}, $P_{2,3}^{\delta a}$ {3.58}, $S_1^{\beta a}$ {3.56}, $S_2^{\beta b}$ {3.55}, $P_{2,3}^{\delta b}$ {3.52}), 3.20 (bs, 1 H, $P_1^{\delta a}$ {3.20}), 3.16 – 3.03 (m, 3 H, D^δ {3.12}, $H^{\beta b}$ {3.11}), 3.03 – 2.91 (m, 1 H, $H^{\beta a}$ {3.00}), 2.79 – 2.68 (m, 1 H, $D^{\beta a}$ {2.76}), 2.56 – 2.25 (m, 7 H, $D^{\beta b}$ {2.51}, $P_1^{\beta b}$ {2.48}, FP_2^β {2.47}, FP_1^β {2.41}, $P_1^{\delta b}$ {2.26}), 2.11 – 1.67 (m, 14 H, $P_{2,3}^{\beta a}$ {2.04}, V^β {2.01}, P_2^γ {1.93}, $R^{\gamma b}$ {1.92}, $P_1^{\beta a}$, P_1^γ {1.91}, P_3^γ , $P_{2,3}^{\beta b}$ {1.84}, $R^{\beta b}$ {1.74}), 1.55 (bs, 2 H, $R^{\gamma a}$, $R^{\beta a}$ {1.55}), 1.26 (d, $J_{A4\beta, A4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_4^β), 1.24 – 1.10 (m, 9 H, A_3^β {1.24}, A_2^β {1.19}, A_1^β {1.18}), 1.07 – 0.96 (m, 9 H, T_3^γ {1.06}, T_2^γ {1.04}, T_1^γ {1.01}), 0.87 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$), 0.83 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 174.3$ ($A_4^{C=O}$), 172.7 ($A_{2,3}^{C=O}$), 172.5 ($P_{2,3}^{C=O}$), 172.3 (D^γ), 172.0 ($R^{C=O}$), 171.3 ($V^{C=O}$), 171.0 ($A_1^{C=O}$), 170.9 ($D^{C=O}$), 170.6 ($S_1^{C=O}$), 170.4 ($G_2^{C=O}$, $H^{C=O}$), 170.1 ($T_1^{C=O}$), 170.1 ($T_3^{C=O}$), 170.0 ($FP_{1,2}^{C=O}$, $T_2^{C=O}$), 169.8 ($S_2^{C=O}$), 169.4 ($G_1^{C=O}$), 167.8 ($P_1^{C=O}$), 157.2 (R^ϵ), 134.1 (H^ϵ), 129.3 (H^γ), 117.5 (H^δ), 93.1 (FP_1^γ), 91.8 (FP_2^γ), 67.2 (T_1^β), 67.0 (T_2^β), 66.7 (T_3^β), 62.2 (S_2^β), 62.1 (S_1^β), 60.3 ($P_{2,3}^\alpha$), 58.6 (P_1^α , $FP_{1,2}^\alpha$), 58.5 (T_3^α), 58.3 (T_1^α), 58.2 (V^α , T_2^α), 55.3 (S_1^α), 55.2 (S_2^α), 53.5 ($FP_{1,2}^\delta$), 51.9 (H^α), 50.6 (R^α), 49.9 (D^α , A_1^α), 49.3 (A_3^α), 48.7 (A_2^α), 48.1 (A_4^α), 47.1 ($P_{2,3}^\delta$), 46.5 (P_1^δ), 42.4 (G_1^α), 42.3 (G_2^α), 41.1 (R^δ), 36.0 ($FP_{1,2}^\beta$, D^β), 31.1 (V^β), 29.5 ($P_{2,3}^\beta$), 28.7 (R^β), 28.6 (P_1^β), 27.5 (H^β), 25.0 (R^γ), 24.9 (P_2^γ), 24.8 (P_3^γ), 24.1 (P_1^γ), 20.3 (T_3^γ), 20.1 (T_1^γ), 19.7 ($V^{\gamma a}$), 19.5 (T_2^γ), 18.4 ($V^{\gamma b}$, A_2^β), 18.3 (A_3^β), 17.6 (A_4^β), 17.3 (A_1^β) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -173.4 – -174.8 (m, 2 F, $FP_{1,2}^\gamma$) ppm.

5.7.7 Synthese von *N*-L-Propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (84)

(Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBt H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden um

Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 163 mg (85%, 0.08 mmol) des Peptids **84** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.4$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{125}F_2N_{25}O_{28}$ (1923.00 g/mol) [1921.9094].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 641.6435 ($[M+3H]^+$, ber.: 641.6443), 961.9617 ($[M+2H]^+$, ber.: 961.9625).

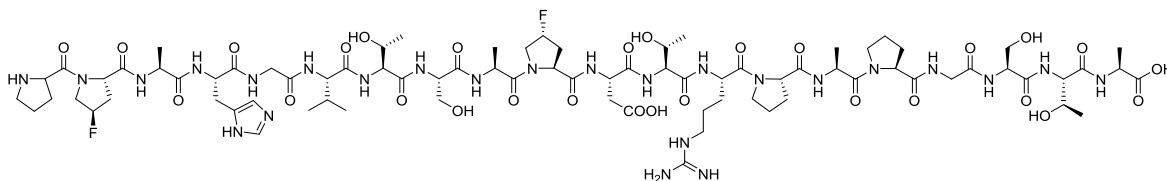
1H -NMR (600 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.31$ (bs, 1 H, COOH), 8.94 (s, 1 H, H^c), 8.78 – 8.74 (m, 1 H, A₃^{NH} {8.76}), 8.56 – 7.67 (m, 14 H, H^{NH} {8.33}, G₁^{NH} {8.25}, G₂^{NH} {8.24}, H^{NH} {8.18}, A₂^{NH} {8.11}, V^{NH} {8.04}, A₁^{NH} {8.02}, D^{NH} {8.01}, R^{NH} {7.97}, A₄^{NH} {7.96}, T₂^{NH} {7.88}, S₁^{NH} {7.82}, S₂^{NH} {7.81}, T₃^{NH} {7.71}), 7.64 – 7.51 (m, 1 H, R^{NH} {7.57}), 7.36 (s, 1 H, H^d), 7.26 (bs, 1 H, T₁^{NH}), 5.45 – 5.20 (m, 2 H, FP₁^γ {5.40}, FP₂^γ {5.31}), 4.67 – 4.52 (m, 4 H, D^α {4.61}, H₁^α {4.58}, FP_{1,2}^α {4.55}), 4.51 – 4.39 (m, 3 H, R^α {4.48}, A₂^α {4.45}, P₁^α {4.43}), 4.38 – 4.13 (m, 11 H, A₃^α {4.36}, S₂^α {4.35}, T_{1,2}^α, V^α {4.31}, S₁^α {4.28}, P_{2,3}^α {4.27}, A₁^α {4.25}, T₃^α {4.19}, A₄^α {4.17}), 4.09 – 3.84 (m, 7 H, T₃^β {4.06}, T₂^β {3.98}, FP₁^{δβ} {3.97}, FP₂^{δβ}, T₁^β {3.91}, G₁^α {3.88}), 3.79 – 3.68 (m, 4 H, FP₁^{δa} {3.76}, FP₂^{δa}, G₂^α {3.71}), 3.67 – 3.42 (m, 8 H, S₁^β {3.61}, S₂^β {3.56}, P_{2,3}^δ {3.53}), 3.25 – 3.16 (m, 2 H, P₁^{δβ} {3.25}, P₁^{δa} {3.19}), 3.15 – 3.03 (m, 3 H, H^{ββ} {3.12}, R^δ {3.08}), 3.01 – 2.90 (m, 1 H, H^{βa} {2.97}), 2.79 – 2.55 (m, 3 H, FP₁^{ββ} {2.71}, D^{βa} {2.70}, FP₂^{ββ} {2.64}), 2.43 – 2.30 (m, 2 H, P₁^{βa} {2.47}, D^{ββ} {2.46}), 2.26 – 2.13 (m, 2 H, FP₁^{βa} {2.21}, FP₂^{βa} {2.17}), 2.10 – 1.67 (m, 14 H, P_{2,3}^{βa} {2.04}, V^β {2.00}, P_{2,3}^γ {1.95}, P₁^γ, P₁^{ββ} {1.90}, R^{γb} {1.84}, P_{2,3}^{ββ} {1.83}, R^{ββ} {1.70}), 1.53 (bs, 2 H, R^{γa} {1.53}, R^{βa} {1.52}), 1.37 – 1.10 (m, 12 H, A₄^β {1.27}, A₃^β {1.22}, A₂^β {1.19}, A₁^β {1.18}), 1.08 – 0.98 (m, 9 H, T₃^γ {1.05}, T₂^γ {1.03}, T₁^γ {1.01}), 0.86 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^{γa}), 0.83 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.9$ Hz, 3 H, V^{γb}) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.9$ (A₄^{C=O}), 172.3 (A₁^{C=O}), 172.0 (R^{C=O}, D^γ), 171.8 (A₃^{C=O}), 171.2 (FP^{C=O}), 171.1 (P₁^{C=O}, A₂^{C=O}), 170.9 (V^{C=O}), 170.2 (S₂^{C=O}, D^{C=O}), 170.0 (H^{C=O}, G₂^{C=O}, T₁^{C=O}), 169.7 (T₃^{C=O}), 169.6 (P_{2,3}^{C=O}), 169.5 (S₁^{C=O}, T₂^{C=O}), 169.3 (G₁^{C=O}), 167.5 (FP^{C=O}), 156.9 (R^ε), 133.7 (H^ε), 129.0 (H^γ), 117.1 (H^δ), 92.7 (FP₂^γ), 91.5 (FP₁^γ), 66.8 (T₁^β), 66.6 (T₂^β), 66.3 (T₃^β), 61.6 (S_{1,2}^β), 59.8 (P_{2,3}^α), 58.2 (P₁^α, FP_{1,2}^α), 58.0 (T₃^α), 57.8 (T_{1,2}^α, V^α), 54.9 (S_{1,2}^α), 53.2 (FP₁^δ), 53.0 (FP₁^δ), 51.6 (H^α), 50.6 (R^α), 49.2 (D^α), 48.8 (A₃^α), 48.3 (A₁^α), 47.7 (A₄^α), 46.7 (P_{2,3}^δ), 46.3 (A₂^α), 46.0 (P₁^δ), 42.0 (G₂^α), 41.9 (G₁^α), 40.5 (R^δ), 36.9 (FP₁^β), 36.7 (FP₂^β), 35.7 (D^β), 30.7 (V^β), 29.1 (P_{2,3}^β), 28.3 (R^β), 28.2 (P₁^β), 27.1 (H^β), 24.6 (R^γ), 24.5 (P_{2,3}^γ), 23.6 (P₁^γ), 19.8 (T₃^γ), 19.4 (T₁^γ), 19.3 (V^{γb}), 19.1 (T₂^γ), 18.0 (V^{γa}), 17.9 (A₁^β), 17.8 (A₃^β), 17.1 (A₄^β), 16.7 (A₂^β) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -173.2 – -175.4 (m, 2 F, FP_{1,2}^γ) ppm.

5.7.8 Synthese von *N*-L-Propyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl- L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*trans*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (85)

(Pro-*trans*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBt H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im

Vakuum eingeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 136 mg (71%, 0.07 mmol) des Peptids **85** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.6$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{125}F_2N_{25}O_{28}$ (1923.00 g/mol) [1921.9094].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 641.6437 ($[M+3H]^+$, ber.: 641.6443), 961.9611 ($[M+2H]^+$, ber.: 961.9625).

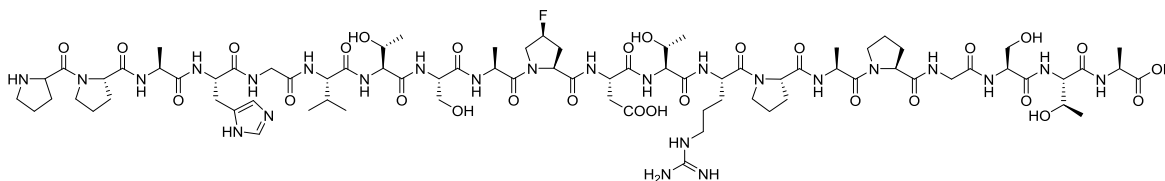
1H -NMR (800 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.31$ (bs, 1 H, COOH), 8.96 (d, $J_{He,HNH} = 7.3$ Hz, 1 H, H^e), 8.77 (d, $J_{A3NH,A3\alpha} = 6.9$ Hz, 1 H, A₃^{NH}), 8.42 (d, $J_{DNH,D\alpha} = 7.5$ Hz, 1 H, D^{NH}), 8.37 (d, $J_{A2NH,A2\alpha} = 6.8$ Hz, 1 H, A₂^{NH}), 8.32 (d, $J_{HNH,H\alpha} = 8.0$ Hz, 1 H, H^{NH}), 8.29 – 8.17 (m, 2 H, G₁^{NH} {8.23}, G₂^{NH} {8.21}), 8.17 – 8.08 (m, 2 H, H^{NH} {8.14}, A₁^{NH} {8.12}), 8.07 – 8.02 (m, 1 H, V^{NH} {8.04}), 7.99 – 7.85 (m, 3 H, A₄^{NH}, R^{NH} {7.96}, T₂^{NH} {7.89}), 7.83 – 7.74 (m, 2 H, S₁^{NH} {7.79}, S₂^{NH} {7.78}), 7.70 (d, $J_{T3NH,T3\alpha} = 8.6$ Hz, 1 H, T₃^{NH}), 7.51 (s, 1 H, R^{NH}), 7.43 – 7.34 (m, 2 H, H^δ, T₁^{NH} {7.36}), 5.52 – 5.28 (m, 2 H, FP₁^γ {5.44}, FP₂^γ {5.38}), 4.63 – 4.36 (m, 8 H, FP₁^α, P₁^α {4.60}, H^α {4.58}, D^α {4.55}, FP₂^α {4.53}, R^α {4.50}, A₁^α {4.45}, S₁^α {4.38}), 4.35 – 4.24 (m, 6 H, A₃^α {4.33}, P₂^α {4.32}, S₂^α, T₂^α, V^α {4.31}, P₃^α {4.27}), 4.23 – 4.14 (m, 4 H, A₂^α, T_{1,3}^α {4.20}, A₄^α {4.18}), 4.10 – 3.42 (m, 19 H, T₃^β {4.06}, T₂^β {3.98}, T₁^β {3.96}, G₁^{αα} {3.88}, G₁^{αβ} {3.75}, G₂^α {3.71}, S₁^{βa} {3.65}, P₂^{βa} {3.63}, FP₂^δ {3.60}, S₂^{βa} {3.58}, FP₁^δ, P₃^{βa} {3.57}, S₁^{βb} {3.56}, P₃^{δb}, S₂^{βb} {3.54}, P₂^{δb} {3.49}), 3.27 – 3.03 (m, 5 H, P₁^{βa} {3.23}, P₁^{βb} {3.16}, H^{βb} {3.12}, R^δ {3.09}), 3.01 – 2.93 (m, 1 H, H^{βa} {2.97}), 2.77 – 2.70 (m, 1 H, D^{βa} {2.73}), 2.64 – 2.33 (m, 6 H, FP₂^β {2.61}, D^{βb} {2.51}, FP₁^β {2.44}, P₁^{βa} {2.36}), 2.11 – 1.64 (m, 13 H, P₃^{βa} {2.04}, P₂^{βa} {2.02}, V^β {2.01}, P₃^γ {1.95}, P₁^γ {1.90}, P₃^{βb}, P₂^γ {1.84}, P₁^{βb} {1.78}, P₂^{βb} {1.77}, R^{βb} {1.70}), 1.52 (bs, 3 H, R^{βa} {1.53}, R^γ {1.52}), 1.26 (d, $J_{A4\beta,A4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄^β), 1.23 (d, $J_{A3\beta,A3\alpha} = 7.0$ Hz, 3 H, A₃^β), 1.22 – 1.14 (m, 6 H, A₂^β {1.20}, A₁^β {1.19}), 1.05 (d, $J_{T3\gamma,T3\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₃^γ), 1.04 (d, $J_{T2\gamma,T2\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.00 (d, $J_{T1\gamma,T1\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.87 (d, $J_{V\gamma a,V\beta} = 6.8$ Hz, 3 H, V^{γa}), 0.83 (d, $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.8$ Hz, 3 H, V^{γb}) ppm.

^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ (A₄^{C=O}), 172.2 (A₂^{C=O}), 172.0 (G₂^{C=O}, P₃^{C=O}), 171.8 (D^γ), 171.7 (FP₂^{C=O}), 171.6 (A₃^{C=O}, FP₁^{C=O}), 171.0 (P₂^{C=O}), 170.9 (V^{C=O}), 170.8 (A₁^{C=O}, R^{C=O}), 170.2 (D^{C=O}), 170.1 (S₁^{C=O}), 169.9 (G₁^{C=O}, H^{C=O}), 169.7 (T₃^{C=O}), 169.6 (T_{1,2}^{C=O}), 169.4 (S₂^{C=O}), 166.8 (P₁^{C=O}), 156.7 (R^e), 133.6 (H^e), 129.0 (H^γ), 116.9 (H^δ), 93.1 (FP₂^γ), 92.2 (FP₁^γ), 66.7 (T₁^β), 66.6 (T₂^β), 66.1 (T₃^β), 61.7 (S₁^β), 61.6 (S₂^β), 59.7 (P₃^α), 59.0 (P₂^α), 58.4 (FP₁^α, P₁^α), 57.8 (T_{1,2}^α), 57.7 (FP₂^α, T₃^α, V^α), 54.8 (S₁^α), 54.6 (S₂^α), 53.6 (FP₂^δ), 51.8 (FP₁^δ), 51.4 (H^α), 50.0 (R^α), 49.5 (D^α), 48.7 (A₃^α), 48.5 (A₂^α), 47.6 (A₄^α), 46.7 (P₂^δ), 46.6 (P₃^δ), 46.2 (A₁^α), 45.6 (P₁^δ), 42.0 (G₂^α), 41.8 (G₁^α), 40.5 (R^δ), 36.5 (FP₂^β), 35.6 (FP₁^β), 35.5 (D^β), 30.5 (V^β), 29.0 (P_{2,3}^β), 28.3 (R^β), 27.4 (P₁^β), 27.0 (H^β), 24.4 (P_{2,3}^γ, R^γ), 23.4 (P₁^γ), 17.9 (V^{γa}), 19.7 (T₃^γ), 19.5 (T₁^γ), 19.2 (T₂^γ, V^{γb}), 17.8 (A₃^β), 17.7 (A₂^β), 17.1 (A₄^β), 16.6 (A₁^β) ppm.

^{19}F -NMR (280 MHz, DMSO- D_6): -177.4 – -178.0 (m, 1 F, FP₁^γ), -178.4 – -179.0 (m, 1 F, FP₂^γ) ppm.

5.7.9 Synthese von *N*-L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (86)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBt H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im

Vakuum eingeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 66 mg (35%, 0.04 mmol) des Peptids **86** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.2$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{80}H_{126}FN_{25}O_{28}$ (1905.03 g/mol) [1903.9188].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 635.6472 ($[M+3H]^+$, ber.: 635.6474), 952.9665 ($[M+2H]^+$, ber.: 952.9672).

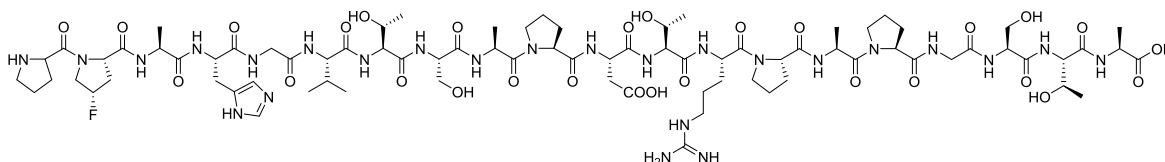
1H -NMR (800 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.25$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^c), 8.28 – 8.23 (m, 2 H, G₁^{NH} {8.25}, H^{NH} {8.24}), 8.23 – 8.18 (m, 1 H, G₂^{NH} {8.20}), 8.15 (d, $J_{A_3NH,A_3\alpha} = 7.4$ Hz, 1 H, A₃^{NH}), 8.12 – 8.08 (m, 2 H, A₁^{NH}, H^{NH} {8.10}), 8.04 (d, $J_{VNH,V\alpha} = 8.6$ Hz, 1 H, V^{NH}), 8.00 (d, $J_{DNH,D\alpha} = 8.2$ Hz, 1 H, D^{NH}), 7.97 (d, $J_{RNH,R\alpha} = 7.1$ Hz, 1 H, R^{NH}), 7.95 (d, $J_{A_4NH,A_4\alpha} = 7.1$ Hz, 1 H, A₄^{NH}), 7.87 (d, $J_{T_2NH,T_2\alpha} = 7.9$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.81 (d, $J_{S_2NH,S_2\alpha} = 7.4$ Hz, 1 H, S₂^{NH}), 7.79 (d, $J_{S_1NH,S_1\alpha} = 7.4$ Hz, 1 H, S₁^{NH}), 7.70 (d, $J_{T_3NH,T_3\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₃^{NH}), 7.52 – 7.48 (m, 1 H, R^{NH} {7.50}), 7.38 (s, 2 H, A₂^{NH}, H^δ), 7.25 (d, $J_{T_1NH,T_1\alpha} = 8.3$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 5.33, 5.26 (2 × bs, 1 H, FP^γ), 4.64 – 4.52 (m, 3 H, D^α {4.62}, H^α {4.58}, A₃^α {4.55}), 4.51 – 4.36 (m, 6 H, R^α {4.48}, P₁^α {4.46}, A₁^α {4.45}, P₃^α {4.40}, FP₁^α {4.39}, S₁^α {4.38}), 4.53 – 4.25 (m, 5 H, P₄^α {4.32}, T₂^α, V^α {4.31}, P₂^α, S₂^α {4.28}), 4.22 – 4.15 (m, 4 H, T_{1,3}^α {4.19}, A_{2,4}^α {4.18}), 4.08 – 4.04 (m, 1 H, T₃^β {4.06}), 4.01 – 3.37 (m, 18 H, T₂^β {3.97}, FP^{δa} {3.92}, T₁^β {3.91}, G₁^α {3.89}, FP^{δb} {3.77}, G₂^α {3.71}, S₁^{βa} {3.64}, P₄^{δa} {3.62}, P₂^{δa} {3.61}, S₂^{βa} {3.60}, P₂^{δb}, S₁^{βb} {3.57}, S₂^{βb} {3.56}, P₄^{δb} {3.49}, P₃^δ {3.43}), 3.27 – 3.21 (m, 1 H, P₁^{δb} {3.23}), 3.21 – 3.14 (m, 1 H, P₁^{δa} {3.16}), 3.14 – 3.03 (m, 3 H, H^{βb} {3.12}, R^δ {3.09}), 3.00 – 2.95 (m, 1 H, H^{βa} {2.97}), 2.69 (dd, $J_{D\beta a, D\beta b} = 16.6$ Hz, $J_{D\beta a, D\alpha} = 6.4$ Hz, 1 H, D^{βa}), 2.54 – 2.37 (m, 3 H, D^{βb} {2.46}, P₁^{βa} {2.41}, FP^{βa} {2.39}), 2.24 – 2.17 (m, 1 H, FP^{βb} {2.22}), 2.13 – 1.73 (m, 17 H, P₃^{βa} {2.10}, P_{2,4}^{βa} {2.03}, V^β {2.00}, P₂^γ {1.95}, P₁^{γa} {1.91}, P₃^{γa} {1.90}, P_{1,4}^{γb} {1.86}, P₃^{γb} {1.85}, P₂^{βb}, R^{γb} {1.84}, P₄^{γa} {1.83}, P₁^{βb} {1.81}, P_{3,4}^{βb} {1.78}), 1.70 (bs, 1 H, R^{βb}), 1.52 (bs, 2 H, R^{γa}, R^{βa}), 1.26 (d, $J_{A_4\beta, A_4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄^β), 1.24 – 1.12 (m, 9 H, A₃^β {1.20}, A_{1,2}^β {1.19}), 1.05 (d, $J_{T_3\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₃^γ), 1.02 (d, $J_{T_2\gamma, T\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.01 (d, $J_{T_1\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.86 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^{γa}), 0.83 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^{γb}) ppm.

^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ (A₄^{C=O}), 172.3 (A₂^{C=O}), 172.1 (A₃^{C=O}), 171.9 (D^γ), 171.0 (A₁^{C=O}, FP^{C=O}), 170.9 (P₁^{C=O}), 170.8 (P₃^{C=O}), 170.2 (D^{C=O}), 170.1 (S₁^{C=O}), 170.0 (H^{C=O}), 169.8 (T₁^{C=O}), 169.5 (P₂^{C=O}, T_{2,3}^{C=O}), 169.4 (P₄^{C=O}, S₂^{C=O}), 169.3 (R^{C=O}, V^{C=O}), 168.9 (G₂^{C=O}), 168.8 (G₁^{C=O}), 156.6 (R^c), 133.4 (H^c), 129.0 (H^γ), 116.9 (H^δ), 92.3 (FP^γ), 66.8 (T₁^β), 66.5 (T₂^β), 66.1 (T₃^β), 61.7 (S₁^β), 61.5 (S₂^β), 59.2 (FP^α, P₃^α), 59.0 (P₄^α), 58.3 (P₁^α), 58.0 (T_{1,3}^α), 57.7 (P₂^α, T₂^α, V^α), 54.9 (S₂^α), 54.8 (S₁^α), 53.0 (FP^δ), 51.3 (H^α), 50.0 (R^α), 49.1 (D^α), 48.3 (A₂^α), 47.6 (A₄^α), 46.7 (P_{2,4}^α), 46.6 (A₃^α), 46.2 (A₁^α), 45.8 (P₁^δ), 41.9 (G₂^α), 41.8 (G₁^α), 40.5 (R^δ), 35.7 (D^β), 35.4 (FP^β), 30.5 (V^β), 29.1 (P₃^β), 29.0 (P_{2,4}^β), 28.2 (R^β), 27.8 (P₁^β), 27.1 (H^β), 24.5 (P_{2,4}^γ, R^γ), 23.5 (P₁^γ), 19.3 (V^{γb}), 19.8 (T₃^γ), 19.4 (T₁^γ), 19.1 (T₂^γ), 18.0 (V^{γa}), 17.7 (A₂^β), 17.2 (A₄^β), 16.8 (A₃^β), 16.7 (A₁^β) ppm.

^{19}F -NMR (380 MHz, DMSO- D_6): -174.8 – -175.4 (m, 1 F, FP 7) ppm.

5.7.10 Synthese von *N*-L-Propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (87)

(Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene

Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 77 mg (40%, 0.04 mmol) des Peptids **87** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.2$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₈₀H₁₂₆F₁N₂₅O₂₈ (1905.03 g/mol) [1903.9188].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 635.6473 ([M+3H]³⁺, ber.: 635.6474), 952.9666 ([M+2H]²⁺, ber.: 952.9672).

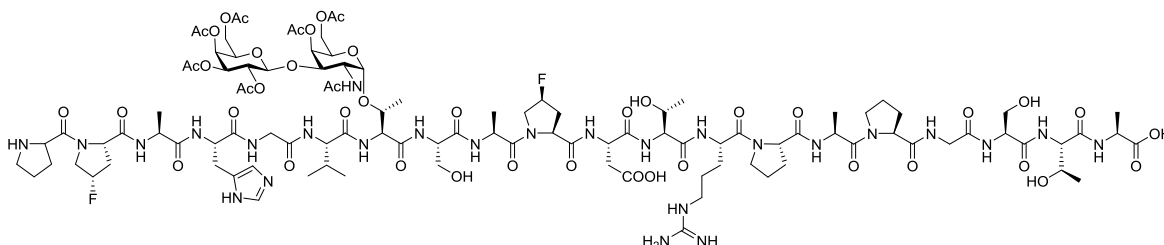
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 14.23$ (bs, 1 H, COOH), 8.94 (s, 1 H, H^c), 8.77 – 8.74 (m, 1 H, A₃^{NH}), 8.33 (d, $J_{\text{HNH,H}\alpha} = 7.9$ Hz, 1 H, H^{NH}), 8.27 – 8.19 (m, 2 H, D^{NH}, G^{NH}), 8.19 – 8.16 (m, 1 H, G^{NH}, H^{NH}), 8.13 – 8.07 (m, 1 H, A₂^{NH}), 8.06 – 8.03 (m, 1 H, V^{NH}), 8.01 (d, $J_{\text{A1NH,A1}\alpha} = 7.1$ Hz, 1 H, A₁^{NH}), 7.97 – 7.93 (m, 2 H, A₄^{NH}, R^{NH}), 7.91 – 7.84 (m, 1 H, T₂^{NH}), 7.82 – 7.77 (m, 2 H, S_{1,2}^{NH}), 7.70 (d, $J_{\text{T3NH,T3}\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₃^{NH}), 7.57 – 7.50 (m, 1 H, R^{NH}), 7.36 (s, 1 H, H^δ), 7.31 (d, $J_{\text{T1NH,T1}\alpha} = 7.7$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 5.42 – 5.29 (4 × bs, 1 H, FP^γ), 4.64 – 4.41 (m, 6 H, H^α {4.59}, D^α {4.54}, R^α {4.49}, FP₁^α {4.47}, A₂^α {4.45}, P₁^α {4.43}), 4.40 – 4.24 (m, 9 H, S₁^α {4.38}, A₃^α {4.37}, P_{3,4}^α, T₂^α {4.32}, V^α {4.31}, S₂^α {4.30}, P₂^α {4.27}, A₁^α {4.25}), 4.23 – 4.14 (m, 3 H, T_{1,3}^α {4.20}, A₄^α {4.18}), 4.08 – 4.04 (m, 1 H, T₃^β {4.06}), 4.00 – 3.85 (m, 5 H, T₂^β {3.97}, T₁^β {3.94}, G₁^α {3.89}, FP^{δa} {3.85}), 3.78 – 3.40 (m, 13 H, G₂^α {3.72}, S₁^{βa} {3.64}, P_{2,4}^{δa} {3.63}, S₂^{βa} {3.59}, S₁^{βb} {3.57}, S₂^{βb} {3.54}, FP^{δb}, P_{2,4}^{δb} {3.53}), 3.28 – 3.16 (m, 2 H, P₁^{δb} {3.25}, P₁^{δa} {3.19}), 3.14 – 3.04 (m, 3 H, H^{βb} {3.10}, R^δ {3.09}), 3.02 – 2.94 (m, 1 H, H^{βa} {2.98}), 2.78 – 2.71 (m, 1 H, D^{βa} {2.75}), 2.54 – 2.39 (m, 3 H, D^{βb} {2.51}, P₁^{βa} {2.47}, FP^{βb} {2.42}), 2.25 – 2.15 (m, 1 H, FP^{βa} {2.19}), 2.09 – 1.97 (m, 6 H, P_{2,4}^{βa} {2.03}, V^β {2.01}, P₂^γ {1.95}), 1.97 – 1.73 (m, 11 H, P₁^γ {1.91}, P₁^{βb} {1.90}, P₂^{βb}, P_{3,4}^γ, R^{γb} {1.84}, P_{3,4}^{βb} {1.77}), 1.70 (bs, 1 H, R^{βb}), 1.52 (bs, 2 H, R^{γa}, R^{βa}), 1.26 (d, $J_{\text{A4}\beta,\text{A4}\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄^β), 1.24 (d, $J_{\text{A3}\beta,\text{A3}\alpha} = 7.0$ Hz, 3 H, A₃^β), 1.21 – 1.13 (m, 6 H, A₂^β {1.19}, A₁^β {1.18}), 1.05 (d, $J_{\text{T3}\gamma,\text{T3}\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₃^γ), 1.03 (d, $J_{\text{T2}\gamma,\text{T3}\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.00 (d, $J_{\text{T1}\gamma,\text{T3}\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.86 (d, $J_{\text{V}\gamma a,\text{V}\beta} = 6.5$ Hz, 3 H, V^{γa}), 0.83 (d, $J_{\text{V}\gamma b,\text{V}\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γb}) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 173.9$ (A₄^{C=O}), 172.7 (A₂^{C=O}), 172.2 (A₁^{C=O}), 171.9 (D^γ), 171.7 (A₃^{C=O}, FP^{C=O}), 171.0 (P₁^{C=O}), 170.9 (P_{3,4}^{C=O}, V^{C=O}), 170.3 (D^{C=O}), 170.1 (G^{C=O}, S₁^{C=O}), 170.0 (H^{C=O}), 169.7 (T₃^{C=O}), 169.5 (T_{1,2}^{C=O}), 169.4 (P₂^{C=O}, R^{C=O}, S₂^{C=O}), 168.9 (G^{C=O}), 156.8 (R^ε), 133.6 (H^ε), 128.8 (H^γ), 117.0 (H^δ), 91.9 (FP^γ), 66.8 (T₁^β), 66.6 (T₂^β), 66.2 (T₃^β), 61.7 (S₁^β), 61.6 (S₂^β), 59.7 (P₂^α), 59.1 (P_{3,4}^α), 58.2 (FP^α, P₁^α), 57.9 (T_{1,3}^α), 57.7 (T₂^α, V^α), 54.9 (S₁^α), 54.8 (S₂^α), 52.5 (FP^δ), 51.5 (H^α), 50.0 (R^α), 49.5 (D^α), 48.8 (A₃^α), 48.3 (A₁^α), 47.6 (A₄^α), 46.7 (P_{2,4}^δ), 46.2 (A₂^α), 46.0 (P₁^δ), 41.9 (G_{1,2}^α), 40.5 (R^δ), 35.6 (D^β), 35.5 (FP^β), 30.6 (V^β), 29.1 (P_{3,4}^β), 29.0 (P₂^β), 28.3 (R^β), 28.1 (P₁^β), 27.0 (H^β), 24.5 (P_{2,4}^γ, R^γ), 23.6 (P₁^γ), 19.7 (T₃^γ), 19.5 (T₁^γ), 19.2 (V^{γb}), 19.1 (T₂^γ), 18.0 (V^{γa}), 17.9 (A_{1,3}^β), 17.2 (A₄^β), 16.7 (A₂^β) ppm.

¹⁹F-NMR (380 MHz, DMSO-D₆): -174.3 – -175.8 (m, 1 F, FP^γ) ppm.

5.7.11 Synthese von *N*-L-Propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (88)

(Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBt H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-FPro-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplungen von *Fmoc*-T_{AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *Fmoc*-FPro-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL

Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 142 mg (56%, 0.06 mmol) des Peptids **88** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 13.4$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{106}H_{160}F_2N_{26}O_{44}$ (2540.58 g/mol) [2539.1050].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 847.3644 ($[M+3H]^+$, ber.: 847.3761), 1270.5634 ($[M+2H]^2+$, ber.: 1270.5603).

1H -NMR (800 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.31$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^c), 8.47 – 7.90 (m, 11 H, G₁^{NH} {8.24}, H^{NH} {8.22}, G₂^{NH} {8.21}, A₃^{NH} {8.13}, T^{*NH} {8.12}, A₂^{NH} {8.11}, A₁^{NH}, V^{NH} {7.99}, R^{NH} {7.97}, A₄^{NH}, D^{NH} {7.96}), 7.85 – 7.78 (m, 2 H, S₁^{NH} {7.80}, S₂^{NH} {7.79}), 7.71 (d, $J_{T_2NH,T_2\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.50 (bs, 1 H, R^{NH}), 7.35 (s, 1 H, H^δ), 7.29 (d, $J_{T_1NH,T_1\alpha} = 8.1$ Hz, 1 H, T₁^{NH}), 5.43 – 5.21 (m, 3 H, FP₁^γ {5.38}, FP₂^γ {5.32}, H^{4'} {5.23}), 5.10 – 5.02 (m, 1 H, H^{3'} {5.07}), 4.88 – 4.71 (m, 3 H, H^{2'} {4.84}, H¹ {4.82}, H^{1'} {4.76}), 4.66 – 3.44 (m, 46 H, D^α {4.61}, H^α {4.59}, FP_{1,2}^α {4.55}, V^α {4.53}, A₃^α, R^α {4.49}, A₂^α {4.46}, T^{*α} {4.44}, P₁^α {4.43}, S₁^α {4.38}, P₂^α {4.32}, S₂^α {4.28}, P₃^α {4.27}, A₁^α {4.25}, T_{1,2}^α {4.20}, A₄^α {4.18}, T^{*β} {4.16}, H², H^{5'} {4.13}, H³ {4.18}, H^{5''}, H^{6a} {4.13}, T₂^β {4.05}, H^{6a'} {4.02}, FP₁^{δb} {3.96}, H⁵ {3.94}, FP₂^{δb} {3.93}, H^{6b'}, H^{6b}, T₁^β {3.92}, G₁^{aa} {3.87}, G₂^α {3.71}, G₁^{ab} {3.77}, FP₁^{δa} {3.74}, FP₂^{δa} {3.72}, S₁^{βa} {3.65}, P₂^{δa} {3.62}, S₁^{βb} {3.56}, P₃^δ {3.55}, S₂^β {3.54}, P₂^{δb} {3.51}), 3.33 – 2.94 (m, 6 H, P₁^{δa} {3.25}, P₁^{δb} {3.20}, H^{βb} {3.11}, R^δ {3.10}, H^{βa} {2.97}), 2.74 – 2.14 (m, 7 H, D^{βa} {2.67}, D^{βb} {2.48}, P₁^{βb} {2.47}, FP₁^{βb} {2.46}, FP₂^{βb} {2.42}, FP₁^{βa} {2.20}, FP₂^{βa} {2.18}), 2.14 – 1.65 (m, 36 H, P_{2,3}^{βb} {2.04}, CH₃-OAc {2.10}, CH₃-OAc {2.04}, CH₃-OAc {2.01}, V^β {1.99}, 2 × CH₃-OAc {1.98}, P₁^{βa}, P_{1,3}^γ, CH₃-OAc {1.90}, P_{2,3}^{βa} {1.87}, P_{2,3}^γ {1.84}, CH₃-NHAc {1.83}, R^{βb} {1.70}), 1.52 (bs, 3 H, R^γ, R^{βa}), 1.26 (d, $J_{A_4\beta,A_4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄^β), 1.24 – 1.16 (m, 9 H, A₃^β {1.25}, A₂^β {1.19}, A₁^β {1.18}), 1.14 (d, $J_{T^*\gamma,T^*\beta} = 5.9$ Hz, 3 H, T^{*γ}), 1.05 (d, $J_{T_2\gamma,T_2\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.01 (d, $J_{T_1\gamma,T_1\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.91 (d, $J_{V\gamma\alpha,V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γa}), 0.83 (d, $J_{V\gamma\beta,V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γb}) ppm.

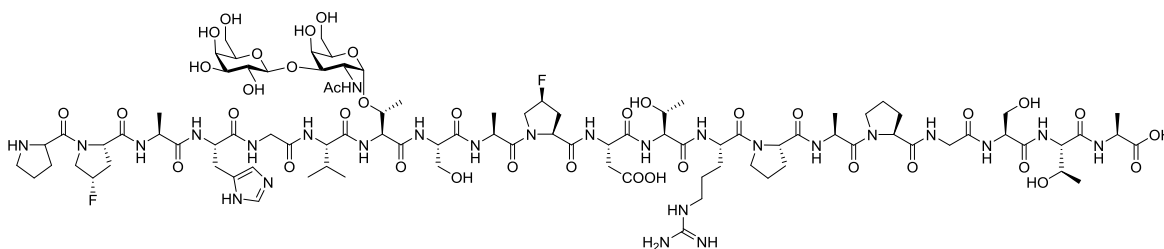
^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ (A₄^{C=O}), 173.3 (T^{*C=O}), 172.2 (A₁^{C=O}), 172.1 (D^γ), 171.7 (A₃^{C=O}), 171.2 (V^{C=O}), 170.8 (A₂^{C=O}), 170.1 (D^{C=O}), 170.0 (S_{1,2}^{C=O}, T₁^{C=O}), 169.9 (4 × COAc, T₂^{C=O}), 169.8 (H^{C=O}), 169.5 (COAc), 169.3 (CO-NHAc), 169.1 (R^{C=O}), 168.9 (COAc), 168.8 (G_{1,2}^{C=O}), 156.7 (R^c), 133.4 (H^c), 129.0 (H^b), 116.7 (H^δ), 99.9 (C^{1'}), 98.3 (C¹), 92.3 (FP₂^γ), 91.4 (FP₁^γ), 75.4 (T^{*β}), 74.2 (C⁵), 70.0 (C^{3'}), 69.3 (C^{5'}), 69.2 (C⁴), 68.3 (C^{2'}), 67.1 (C³), 66.7 (C^{4'}), 66.6 (T₁^β), 65.9 (T₂^β), 63.0 (C⁶), 61.5 (S_{1,2}^β), 60.3 (C^{6'}), 59.5 (P₃^α), 58.9 (P₂^α), 58.3 (FP_{1,2}^α), 58.0 (P₁^α), 57.7 (T_{1,2}^α), 56.9 (V^α), 55.9 (T^{*α}), 54.7 (S₁^α), 54.6 (S₂^α), 52.8 (FP₁^δ), 52.7 (FP₁^δ), 51.2 (H^α), 49.8 (R^α), 48.9 (D^α), 48.0 (A₁^α), 47.5 (C²), 47.4 (A₄^α), 46.5 (P_{2,3}^δ), 46.1 (A_{2,3}^α), 45.8 (P₁^δ), 41.8 (G₂^α), 41.7 (G₁^α), 40.3 (R^δ), 35.5 (D^β), 35.2 (FP_{1,2}^β), 30.9 (V^β), 28.8 (P_{2,3}^β), 28.1 (R^β),

27.9 (P₁^β), 26.8 (H^β), 24.3 (P_{2,3}^γ, R^γ), 23.4 (P₁^γ), 22.6 (CH₃-NHAc), 20.4, 20.3, 20.2, 20.1 (5 × CH₃-OAc), 19.6 (T₂^γ), 19.2 (T₁^γ), 19.0 (V^{γa}), 17.9 (T^{*γ}, V^{γb}), 17.7 (A₁^β), 17.6 (A₃^β), 16.9 (A₄^β), 16.3 (A₂^β) ppm.

¹⁹F-NMR (280 MHz, DMSO-D₆): -174.3 – -174.4 (m, 1 F, FP₁^γ), -174.3 – -175.1 (m, 1 F, FP₂^γ) ppm.

5.7.12 Synthese von *N*-L-Propyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3-*O*-[β-D-galactopyranosyl]-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-*cis*-4-fluor-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (**89**)

(Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



142 mg (56 μmol, 1.0 Äquiv.) Glycopeptid **88** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 61 mg (47%, 27 μmol) des Peptids **89** als farbloses Lyophilisat.

R_t = 7.0 min, λ = 214 nm.

Masse/Molekulargewicht: C₉₄H₁₄₈F₂N₂₆O₃₈ (2288.36 g/mol) [2287.0416].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 1144.5308 ([M+2H]²⁺, ber.: 1144.5286).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): δ = 8.94 (s, 1 H, H^ε), 8.31 – 7.89 (m, 11 H, G₁^{NH} {8.25}, G₂^{NH} {8.22}, A₃^{NH}, H^{NH} {8.21}, A₂^{NH} {8.11}, T^{*NH} {8.05}, A₁^{NH} {8.01}, V^{NH} {7.98}, A₄^{NH}, D^{NH} {7.97}, R^{NH} {7.96}), 7.82 – 7.77 (m, 2 H, S_{1,2}^{NH} {7.79}), 7.71 (d, J_{T₂NH,T₂α} = 8.8 Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.55 (bs, 1 H, R^{NH}), 7.35 (bs, 1 H, H^δ), 7.32 – 7.22 (m, 1 H, T₁^{NH} {7.28}), 5.40 – 5.22 (m, 2 H, FP_{1,2}^γ), 4.79 (bs, 1 H, **H1**), 4.82 – 3.83 (m, 27 H, D^α {4.60}, H^α {4.58}, FP_{1,2}^α {4.55}, V^α {4.50}, R^α {4.49}, A_{2,3}^α {4.46}, P₁^α, T^{*α} {4.44}, S₁^α {4.37}, P₂^α {4.32}, S₂^α {4.30}, P₃^α {4.27}, A₁^α {4.25}, **H1**' {4.23}, T_{1,2}^α {4.20}, A₄^α {4.18}, **H2** {4.14}, T^{*β} {4.13}, T₂^β {4.06}, FP₁^{δa} {3.97}, FP₂^{δa} {3.93}, T₁^β {3.92}, **H4** {3.90}, G₁^α {3.87}), 3.79 – 3.42 (m, 19 H, FP₁^{δb} {3.74}, FP₂^{δa} {3.73}, G₂^α, **H5** {3.72}, **H3** {3.67}, S₁^β {3.65}, **H3**' {3.62}, S₂^β, P_{2,3}^δ {3.55}, **H6a**, **H6a**' {3.54}, **H6b**, **H6b**' {3.47}), 3.38 – 2.93 (m, 9 H, **H2**' , **H5**' {3.33}, **H4**' {3.26}, P₁^{δb} {3.25}, P₁^{δa} {3.20}, H^{βa} {3.11}, R^δ {3.09}, H^{βb} {2.97}), 2.68 – 2.32 (m, 5 H, D^{βa} {2.66}, D^{βb} {2.52}, FP₁^{βa}, P₁^{βb} {2.47}, FP₂^{βa} {2.42}), 2.26 – 2.15 (m, 2 H, FP₁^{βb} {2.20}, FP₂^{βb} {2.18}), 2.07 – 1.66 (m, 16 H, P_{2,3}^{βa} {2.04}, V^β {1.98}, P₃^γ {1.95}, P₁^γ

{1.91}, P₁^{βb} {1.90}, CH₃NHAc, P₃^{βb}, P₂^γ {1.84}, P₂^{βb} {1.77}, R^{βa} {1.70}, 1.52 (bs, 2 H, R^γ, R^{βb}), 1.26 (d, J_{A4β,A4α} = 7.2 Hz, 3 H, A₄^α), 1.23 (d, J_{A3β,A3α} = 6.3 Hz, 3 H, A₃^α), 1.20 – 1.16 (m, 6 H, A₂^α {1.19}, A₁^α {1.18}), 1.14 (d, J_{T*γ,Tβ} = 6.1 Hz, 3 H, T*^γ), 1.05 (d, J_{T2γ,T2β} = 6.3 Hz, 3 H, T₂^γ), 1.01 (d, J_{T1γ,T1β} = 6.3 Hz, 3 H, T₁^γ), 0.90 (d, J_{Vγb,Vβ} = 6.6 Hz, 3 H, V^{γb}), 0.85 (d, J_{Vγa,Vβ} = 6.6 Hz, 3 H, V^{γa}) ppm.

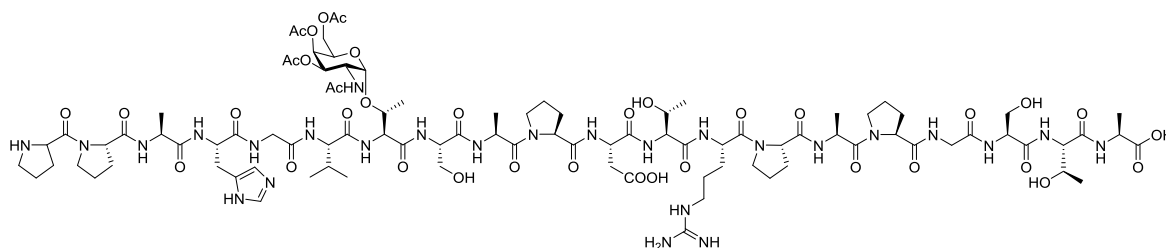
¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-D₆): δ = 173.9 (A₄^{C=O}), 172.2 (A₁^{C=O}), 172.1 (D^γ), 171.8 (A₃^{C=O}), 171.3 (V^{C=O}), 171.0 (T*^{C=O}), 170.9 (A₂^{C=O}), 170.8 (NHAc^{C=O}), 170.2 (D^{C=O}), 170.1 (S₁^{C=O}), 170.0 (S₂^{C=O}, H^{C=O}), 169.7 (T₂^{C=O}), 169.4 (R^{C=O}, T₁^{C=O}), 168.9 (G₂^{C=O}), 168.7 (G₁^{C=O}), 156.7 (R^ε), 133.3 (H^ε), 129.0 (H^γ), 116.7 (H^δ), 104.4 (C1'), 98.2 (C1), 92.3 (FP₂^γ), 91.5 (FP₁^γ), 77.6 (C3), 75.1 (C5'), 74.8 (T*^β), 72.8 (C4'), 71.2 (C5), 70.4 (C2'), 67.9 (C3'), 67.6 (C4), 66.6 (T₁^β), 66.0 (T₂^β), 61.5 (S_{1,2}^β), 60.2 (C6, C6'), 59.5 (P₃^α), 58.8 (P₂^α), 58.0 (FP_{1,2}^α P₃^α), 57.7 (T_{1,2}^α), 56.9 (V^α), 55.8 (T*^α), 54.6 (S₁^α), 54.5 (S₂), 52.7 (FP_{1,2}^δ), 51.2 (H^α), 49.8 (R^α), 48.9 (D^α), 48.0 (A₁^α), 47.8 (C2), 47.4 (A₄^α), 46.4 (P_{2,3}^δ), 46.1 (A_{2,3}^α), 45.7 (P₁^δ), 41.7 (G_{1,2}^α), 40.3 (R^δ), 35.4 (D^β), 35.2 (FP_{1,2}^β), 30.8 (V^β), 28.8 (P_{2,3}^β), 28.0 (R^β), 27.9 (P₁^β), 26.7 (H^β), P₃^γ {24.3}, 24.2 (P₂^γ, R^γ), P₁^γ {23.3}, 22.7 (CH₃-NHAc), 19.6 (T₂^γ), 19.2 (T₁^γ), 18.9 (V^{γb}), 18.0 (T*^γ), 17.9 (V^{γa}), 17.7 (A₁^β), 16.8 (A₄^β), 16.4 (A₃^β), 16.3 (A₂^β) ppm.

¹⁹F-NMR (280 MHz, DMSO-D₆): -174.2 – -175.1 (m, 2 F, FP_{1,2}^γ), ppm.

5.8 Synthesevorschriften der Peptide unter Verwendung des α -AA-T_N-Mimetikum-Bausteins

5.8.1 Synthese von L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (90)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-T_{AG}-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-T_{N-AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschätzung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 87 mg (39%, 0.04 mmol) des Peptids **90** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.8$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{94}H_{146}N_{26}O_{36}$ (2216.35 g/mol) [2215.0393].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 739.6894 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 739.3542), 1108.5293 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1108.5257).

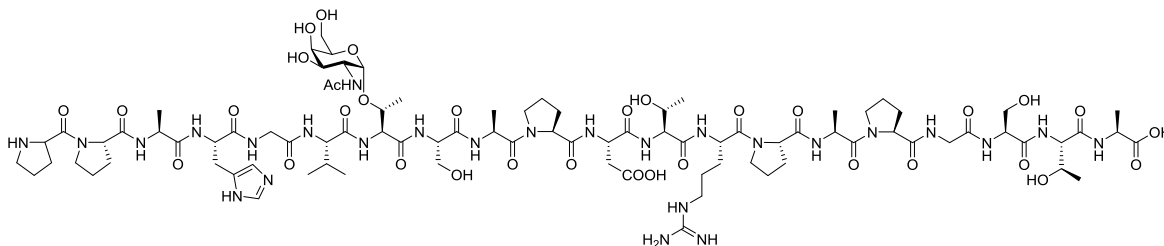
1H -NMR (800 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.26$ (bs, 1 H, COOH), 8.96 (s, 1 H, H^e), 8.32 – 8.20 (m, 3 H, G₁^{NH} {8.26}, A₁^{NH} {8.23}, G₂^{NH} {8.22}), 8.15 – 8.07 (m, 4 H, D^{NH}, H^{NH} {8.13}, A_{2,3}^{NH} {8.12}), 8.03 (d, $J_{VNH,V\alpha} = 8.4$ Hz, 1 H, V^{NH}), 7.98 – 7.95 (m, 2 H, A₄^{NH}, R^{NH} {7.96}), 7.812 – 7.78 (m, 2 H, S_{1,2}^{NH} {7.80}), 7.71 (d, $J_{TNH,T2\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.55 (bs, 1 H, R^{CqNH}), 7.37 (s, 1 H, H^δ), 7.36 – 7.32 (m, 1 H, T₁^{NH} {7.35}), 7.14 (d, $J_{TNH,TNa} = 9.5$ Hz, 1 H, T_N^{NH}), 5.31 (d, $J_{H4^*,H3} = 3.1$ Hz, 1 H, H₄^{*}), 5.28 (d, $J_{H4,H3} = 3.1$ Hz, 1 H, H₄), 4.98 (dd, $J_{H3,H2} = 11.4$ Hz, $J_{H3,H4} = 3.3$ Hz, 1 H, H₃), 4.96 – 4.91 (m, 2 H, H₃^{*} {4.93}, H₁ {4.91}), 4.84 – 4.78 (m, 1 H, H₁^{*} {4.81}), 4.63 – 4.56 (m, 1 H, H^α {4.59}), 4.56 – 4.52 (m, 1 H, D^α {4.54}), 4.52 – 4.43 (m, 5 H, R^α {4.50}, A₃^α, P₄^α {4.47}, A₂^α, V^α {4.45}), 4.41 – 4.36 (m, 4 H, P_{3,5}^α {4.39}, S_{1,2}^α {4.39}), 4.34 – 4.25 (m, 2 H, P₂^α {4.30}, P₁^α {4.27}), 4.24 – 4.15 (m, 8 H, H₅ {4.23}, T₁^α, T_N^α, T_N^β {4.21}, H₂, T₂^α {4.20}, A₁^α {4.19}, A₄^α {4.18}), 4.14 – 3.80 (m, 5 H, T₂^β {4.06}, H_{6a} {4.03}, H_{6b} {3.99}, T₁^β {3.95}, G₁^{ab} {3.88}), 3.79 – 3.46 (m, 13 H, G₁^{aa} {3.77}, G₂^{ab} {3.72}, G₂^{aa} {3.70}, S₂^β {3.65}, P₃^{db} {3.57}, S₁^β {3.55}, P_{1,5}^δ, P₃^{da} {3.53}), 3.45 – 3.30 (m, 2 H, P₂^δ {3.43}), 3.27 – 3.21 (m, 1 H, P₄^{db} {3.23}), 3.21 – 3.14 (m, 1 H, P₄^{da} {3.17}), 3.13 – 3.04 (m, 3 H, H^{bb} {3.12}, R^δ {3.11}), 2.98 (dd, $J_{H\beta a, H\beta b} = 15.4$ Hz, $J_{H\beta a, H\alpha} = 7.8$ Hz, 1 H, H^{βa}), 2.76 – 2.71 (m, 1 H, D^{βa}), 2.55 – 2.46 (m, 1 H, D^{βb} {2.53}), 2.44 – 2.37 (m, 1 H, P₄^{βb} {2.41}), 2.13 – 1.66 (m, 34 H, CH₃-OAc {2.10}, P₃^{βb} {2.09}, P_{1,5}^β {2.04}, CH₃-OAc {1.98}, V^β {1.97}, P₁^{γa} {1.94}, P_{3,4}^{γa} {1.91}, CH₃-OAc, P_{3,4}^{γb} {1.87}, P₂^β, P₁^{γb}, P_{2,5}^γ, R^{γa} {1.85}, CH₃-NHAc {1.83}, P₄^{βa} {1.81}, P₃^{βa} {1.77}, R^{βa} {1.71}), 1.53 (bs, 2 H, R^{βb}, R^{γb}), 1.26 (d, $J_{A4\beta, A4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A₄^β), 1.22 – 1.17 (m, 9 H, A₁₋₃^β {1.19}), 1.13 (d, $J_{TN\gamma, T\beta} = 6.0$ Hz, 3 H, T_N^γ), 1.05 (d, $J_{T2\gamma, T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.00 (d, $J_{T1\gamma, T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.90 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, V^{γb}), 0.84 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.9$ Hz, 3 H, V^{γa}) ppm.

^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.7$ (A₄^{C=O}), 172.1 (A^{C=O}), 171.9 (2 × P^{C=O}), 171.7 (D^γ, P^{C=O}), 170.9 (A₃^{C=O}), 170.7 (A^{C=O}), 170.2 (D^{C=O}), 169.9 (C=O-OAc, H^{C=O}, S_{1,2}^{C=O}), 169.8 (2 × C=O-OAc, P^{C=O}, V^{C=O}), 169.7 (P^{C=O}), 169.6 (T_N^{C=O}), 169.5 (T₂^{C=O}), 169.4 (3 × C=O-OAc, C=O-NHAc, T₁^{C=O}), 169.3 (C=O-NHAc), 156.6 (R^e), 133.4 (H^e), 128.9 (H^γ), 116.8 (H^δ), 98.2 (C₁), 75.6 (T_N^β), 68.4 (C₃), 67.1 (C₄), 66.9 (C₄^{*}), 66.7 (T₁^β), 66.1 (C₅, T₂^β), 61.8 (C₆), 61.6 (S_{1,2}^β), 59.6 (P₁^α), 59.4 (P₂^α), 59.1 (P_{3,5}^α), 58.1 (P₄^α), 57.7 (T_{1,2}^α, T_N^α), 216

57.1 (V^{α}), 54.7 ($S_{1,2}^{\alpha}$), 51.2 (H^{α}), 49.9 (R^{α}), 49.3 (D^{α}), 48.3 (A_1^{α}), 47.4 (A_4^{α}), 46.6 (P_2^{δ}), 46.5 ($P_{1,3,5}^{\delta}$), 46.3 (A_3^{α}), 46.1 (C_2 , A_2^{α}), 45.6 (P_4^{δ}), 41.9 (G_2^{α}), 41.7 (G_1^{α}), 40.6 (R^{δ}), 35.3 (D^{β}), 30.8 (V^{β}), 28.9 ($P_{1-3,5}^{\beta}$), 28.1 (R^{β}), 27.6 (P_4^{β}), 26.9 (H^{β}), 24.3 (R^{γ}), 24.2 ($P_{1,2,5}^{\gamma}$), 23.4 ($P_{3,4}^{\gamma}$), 22.6 (CH_3-NHAc), 20.4, 20.3 ($3 \times CH_3-OAc$), 19.6 (T_2^{γ}), 19.4 (T_1^{γ}), 19.2 (T_N^{γ}), 19.0 ($V^{\gamma b}$), 18.0 ($V^{\gamma a}$), 17.5 (A_1^{β}), 17.0 (A_4^{β}), 16.4 (A_2^{β}), 16.3 (A_3^{β}) ppm.

5.8.2 Synthese von L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (**94**)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



87 mg (39 μ mol) Glycopeptid **90** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich eine pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) \rightarrow (40:60) 20 min; (40:60) \rightarrow (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 43 mg (53%, 21 μ mol) des Peptids **94** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 7.3$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{88}H_{140}N_{26}O_{33}$ (2090.24 g/mol) [2089.0079].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 697.3442 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 697.3438), 1045.5136 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1045.5118).

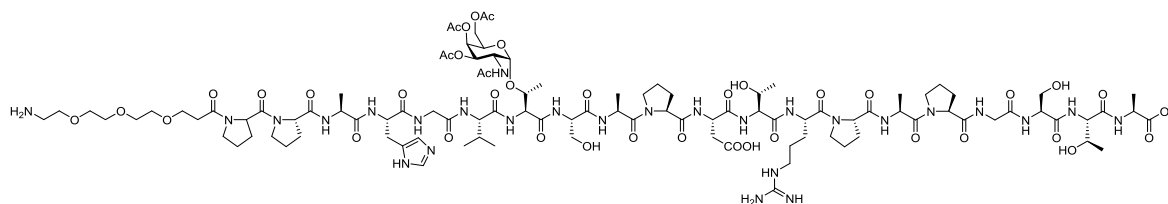
1H -NMR (800 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.33$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^c), 8.30 – 8.18 (m, 4 H, G_1^{NH} {8.26}, D^{NH} , G_2^{NH} {8.22}, A_1^{NH} {8.21}), 8.15 – 8.09 (m, 3 H, $A_{2,3}^{NH}$ {8.12}, H^{NH} {8.11}), 8.06 – 8.00 (m, 2 H, V^{NH} , S_2^{NH} {8.02}), 7.98 – 7.88 (m, 2 H, A_4^{NH} {7.95}, R^{NH} {7.93}), 7.79 (d, $J_{SINH,S1\alpha} = 7.5$ Hz, 1 H, S_1^{NH}), 7.71 (d, $J_{TNH,T2\alpha} = 8.7$ Hz, 1 H, T_2^{NH}), 7.58 – 7.52 (m, 1 H, R^{CqNH} {7.54}), 7.37 (s, 1 H, H^{δ}), 7.33 (d, $J_{TNH,T1\alpha} = 8.5$ Hz, 1 H, T_1^{NH}), 7.12 (d, $J_{TNH,TN\alpha} = 8.5$ Hz, 1 H, T_N^{NH}), 4.73 (d, $J_{H1,H2} = 3.7$ Hz, 1 H, **H1**), 4.61 – 4.41 (m, 8 H, H^{α} {4.58}, D^{α} {4.52}, A_3^{α} , R^{α} {4.48}, P_1^{α} {4.46}, T_N^{α} , V^{α} {4.45}, A_2^{α} {4.43}), 4.40 – 4.34 (m, 2 H, P_2^{α} {4.38}, S_1^{α} {4.37}), 4.33 – 4.24 (m, 4 H, P_3^{α} {4.31}, S_2^{α} {4.29}, P_4^{α} {4.28}, P_5^{α} {4.26}), 4.22 – 4.14 (m, 4 H, $T_{1,2}^{\alpha}$ {4.20}, A_1^{α} {4.18}, A_4^{α} {4.17}), 4.13 – 4.02 (m, 2 H, T_N^{β} {4.10}, T_2^{β} {4.05}), 3.99 – 3.82 (m, 3 H, **H2** {3.97}, T_1^{β} {3.94}, G_1^{ab} {3.86}), 3.77 – 3.38 (m, 20 H, G_1^{aa} {3.74}, G_2^{ab} {3.71}, **H4**, G_2^{aa} {3.69}, **H5** {3.65}, $S_2^{\beta a}$ {3.64}, **H3** {3.61}, $P_2^{\delta a}$ {3.60}, P_5^{δ} {3.57}, $S_2^{\beta b}$ {3.56}, P_3^{δ} , S_1^{β} {3.52}, **H6a** {3.50}, P_4^{δ} {3.49}, **H6b** {3.44}, $P_2^{\delta b}$ {3.42}), 3.27 – 3.03 (m, 5 H, $P_1^{\delta a}$ {3.23}, $P_1^{\delta b}$ {3.16}, $H^{\beta b}$ {3.10}, $R^{\delta a}$ {3.09}, $R^{\delta b}$

{3.06}), 2.97 (dd, $J_{H\beta a, H\beta b} = 15.3$ Hz, $J_{H\beta a, H\alpha} = 7.8$ Hz, 1 H, $H^{\beta a}$), 2.73 (dd, $J_{D\beta a, D\beta b} = 16.5$ Hz, $J_{D\beta a, D\alpha} = 6.0$ Hz, 1 H, $D^{\beta a}$), 2.54 – 2.44 (m, 1 H, $D^{\beta b}$ {2.51}), 2.43 – 2.36 (m, 1 H, $P_1^{\beta a}$ {2.41}), 2.13 – 1.65 (m, 24 H, $P_2^{\beta a}$ {2.08}, $P_{4,5}^{\beta b}$ {2.03}, P_3^{β} {2.02}, V^{β} {1.98}, $P_5^{\gamma b}$ {1.95}, $P_1^{\gamma a}$ {1.90}, $P_2^{\gamma a}$, P_4^{γ} {1.89}, $P_1^{\gamma b}$ {1.87}, CH_3-NHAc {1.85}, $P_{4,5}^{\beta a}$, $P_{2,5}^{\gamma a}$, P_3^{γ} {1.84}, $P_1^{\beta b}$ {1.81}, $P_2^{\beta b}$ {1.76}, $R^{\beta a}$ {1.69}), 1.52 (bs, 3 H, $R^{\beta b}$, R^{γ}), 1.26 (d, $J_{A4\beta, A4\alpha} = 7.3$ Hz, 3 H, A_4^{β}), 1.22 – 1.16 (m, 9 H, $A_{1,3}^{\beta}$ {1.18}), 1.10 (d, $J_{T_N\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, $T_N\gamma$), 1.05 (d, $J_{T_2\gamma, T\beta} = 6.3$ Hz, 3 H, $T_2\gamma$), 1.00 (d, $J_{T_1\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, $T_1\gamma$), 0.90 (d, $J_{V\gamma b, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, $V^{\gamma b}$), 0.84 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.7$ Hz, 3 H, $V^{\gamma a}$) ppm.

^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.3$ ($A_4^{C=O}$), 172.1 ($A_1^{C=O}$), 171.7 (D^{γ} , $P_3^{C=O}$), 171.1 ($P_{4,5}^{C=O}$), 171.0 ($V^{C=O}$), 170.7 ($A_{2,3}^{C=O}$), 170.6 ($P_2^{C=O}$), 170.1 ($D^{C=O}$), 170.0 ($C=O-NHAc$), 169.9 ($S_1^{C=O}$), 169.8 ($H^{C=O}$), 169.7 ($T_N^{C=O}$), 169.4 ($T_{1,2}^{C=O}$), 169.1 ($S_2^{C=O}$), 168.7 ($G^{C=O}$), 168.5 ($G^{C=O}$), 166.3 ($P_1^{C=O}$), 156.5 (R^{ϵ}), 133.3 (H^{ϵ}), 128.9 (H^{γ}), 116.7 (H^{δ}), 98.3 ($C1$), 74.7 (T_N^{β}), 71.3 ($C5$), 68.5 ($C3$), 67.9 ($C4$), 66.5 (T_1^{β}), 66.0 (T_2^{β}), 61.5 ($S_{1,2}^{\beta}$), 60.4 ($C6$), 59.5 (P_5^{α}), 59.3 (P_4^{α}), 59.0 (P_2^{α}), 58.9 (P_3^{α}), 58.0 (P_1^{α}), 57.6 ($T_{1,2}^{\alpha}$), 57.1 (V^{α}), 55.6 (T_N^{α}), 54.6 (S_1^{α}), 54.5 (S_2^{α}), 51.7 (H^{α}), 49.8 (R^{α}), 49.2 ($C2$, D^{α}), 48.1 (A_1^{α}), 47.4 (A_4^{α}), 46.5 (P_2^{δ}), 46.4 ($P_{3,5}^{\delta}$), 46.1 (A_3^{α}), 46.0 (A_2^{α}), 45.5 (P_1^{δ}), 41.8 (G_2^{α}), 41.6 (G_1^{α}), 40.2 (R^{δ}), 35.3 (D^{β}), 30.7 (V^{β}), 28.8 ($P_{2,5}^{\beta}$), 28.0 (R^{β}), 27.8 (P_1^{β}), 26.8 (H^{β}), 24.2 (P_5^{γ} , R^{γ}), 24.1 ($P_{2,4}^{\gamma}$), 23.3 (P_1^{γ}), 22.8 (CH_3-NHAc), 19.8 (T_2^{γ}), 19.3 (T_1^{γ}), 19.0 ($V^{\gamma b}$), 18.1 (T_N^{γ}), 17.9 ($V^{\gamma a}$), 17.4 (A_1^{β}), 16.9 (A_4^{β}), 16.4 ($A_{2,3}^{\beta}$) ppm.

5.8.3 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (91)

($H_2N(CH_2CH_2O)_3CH_2CH_2CO$ -Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Ac $_3$ GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H_2O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-T $_{AG}$ -OH wurde für alle

Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht. Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-T_{N-AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingeeengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 131 mg (54%, 0.05 mmol) des Peptids **91** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 9.0$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₁₀₃H₁₆₃N₂₇O₄₀ (2419.59 g/mol) [2418.1551].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 807.0605 ([M+3H]³⁺, ber.: 807.0595), 1210.0887 ([M+2H]²⁺, ber.: 1210.0854).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-*D*₆): $\delta = 14.19$ (bs, 1 H, COOH), 8.95 (s, 1 H, H^f), 8.31 – 7.88 (m, 12 H, D^{NH}, G₂^{NH} {8.21}, G₁^{NH} {8.20}, S₂^{NH} {8.12}, A₂^{NH} {8.11}, A₃^{NH} {8.10}, H^{NH} {8.07}, T_N^{NH} {8.02}, V^{NH}, A₁^{NH} {8.00}, A₄^{NH}, R^{NH} {7.95}), 7.83 – 7.67 (m, 2 H, S₁^{NH} {7.77}, T₂^{NH} {7.70}), 7.54 – 7.07 (m, 3 H, R^{CqNH} {7.49}, 7.37 (s, 1 H, H^δ), T₁^{NH} {7.33}), 5.28 (s, 1 H, **H4**), 4.97 (d, $J_{H3,H2} = 11.9$ Hz, 1 H, **H3**), 4.92 (ps, 1 H, **H1**), 4.63 – 3.25 (m, 53 H, H^α {4.58}, D^α {4.54}, P₁^α {4.50}, R^α {4.49}, T_N^α {4.48}, A₃^α {4.47}, A₂^α {4.45}, V^α {4.44}, S₁^α {4.38}, P_{2,3}^α {4.31}, P₄^α {4.29}, S₂^α {4.27}, P₅^α {4.26}, **H5** {4.22}, T_N^β {4.20}, **H2**, T_{1,2}^α {4.19}, A₄^α {4.17}, A₁^α {4.15}, T₂^β {4.06}, **H6a** {4.03}, **H6b** {3.99}, T₁^β {3.94}, G₁^{αα} {3.87}, G₁^{αβ} {3.77}, G₂^{αα} {3.74}, G₂^{αβ} {3.71}, S₁^{βa} {3.64}, P_{2,4}^δ {3.63}, S₁^{βb}, 2 × OCH₂ {3.58}, 2 × OCH₂ {3.55}, P₅^δ {3.52}, S₂^β {3.51}, 2 × OCH₂ {3.49}, P₁^δ {3.48}), 3.15 – 3.03 (m, 3 H, H^{βa} {3.13}, R^δ {3.09}), 3.03 – 2.03 (m, 3 H, H^{βb} {2.98}, H₂NCH₂ {2.97}), 2.77 – 2.69 (m, 1 H, D^{βa} {2.74}), 2.62 – 2.37 (m, 3 H, CH_{2a}CO {2.57}, D^{βb} {2.52}, CH_{2b}CO {2.46}), 2.13 – 1.64 (m, 34 H, P₁^{βa} {2.10}, CH₃-OAc {2.03}, P_{2,3}^{βa} {2.01}, CH₃-OAc {1.98}, V^β

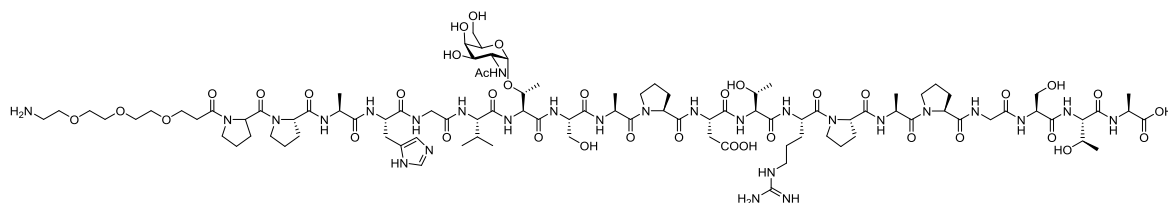
{1.96}, P₅^γ {1.93}, P₁^{γa} {1.81}, CH₃-OAc {1.87}, P₅^{βb} {1.86}, P₂₋₄^γ {1.84}, CH₃-NHAc {1.83}, P₁^{βb}, P₁^{γb} {1.79}, P_{2,3}^{βb}, P₄^β {1.77}, R^{βa} {1.69}), 1.52 (bs, 3 H, R^{βb}, R^γ), 1.26 (d, $J_{A4\beta, A4\alpha} = 6.9$ Hz, 3 H, A₄^β), 1.23 – 1.15 (m, 9 H, A₁^β {1.20}, A₂^β {1.18}, A₁^β {1.17}), 1.15 – 1.09 {m, 3 H, T_N^γ}, 1.05 (d, $J_{T2\gamma, T\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.00 (d, $J_{T1\gamma, T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T₁^γ), 0.92 – 0.87 (m, 1 H, V^{γb} {0.90}), 0.84 (d, $J_{V\gamma a, V\beta} = 6.6$ Hz, 3 H, V^{γa}) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 173.7$ (A₄^{C=O}), 172.2 (A₁^{C=O}), 171.7 (D^γ), 170.9 (A₃^{C=O}), 170.7 (A₂^{C=O}), 170.1 (D^{C=O}), 169.9 (2 × C=O-OAc, V^{C=O}), 169.8 (C=O-OAc), 169.4 (C=O-NHAc), 133.4 (H^c), 128.9 (H^γ), 116.8 (H^δ), 98.2 (C1), 75.7 (T_N^β), 69.5 (4 × OCH₂), 69.4 (2 × OCH₂), 68.4 (C3), 67.1 (C4), 66.6 (T₁^β), 66.1 (C5, T₂^β), 61.8 (C6), 61.6 (S_{1,2}^β), 59.5 (P₅^α), 59.1 (P₄^α), 58.9 (P_{2,3}^α), 57.7 (T_{1,2}^α), 57.4 (P₁^α), 57.1 (V^α), 55.7 (T_N^α), 54.7 (S_{1,2}^α), 51.2 (H^α), 49.8 (R^α), 49.3 (D^α), 48.2 (A₁^α), 47.5 (A₄^α), 46.5 (P₁₋₅^δ), 46.2 (A_{2,3}^α), 46.1 (C2), 41.8 (G₂^α), 41.7 (G₁^α), 40.4 (R^δ), 38.4 (H₂NCH₂), 35.3 (D^β), 34.0 (CH₂CO), 30.8 (V^β), 28.8 (P₂₋₅^β), 28.2 (R^β), 27.8 (P₁^β), 26.8 (H^β), 24.3 (R^γ), 24.2 (P₁₋₅^γ), 22.6 (CH₃-NHAc), 20.4, 20.3 (3 × CH₃-OAc), 19.6 (T₂^γ), 19.4 (T₁^γ), 19.0 (V^{γb}), 18.1 (T_N^γ), 18.0 (V^{γa}), 17.4 (A₁^β), 17.0 (A₄^β), 16.5 (A₂^β), 16.2 (A₃^β) ppm.

Da die Auflösung des aufgenommenen zweidimensionalen HMBC-NMR-Spektrum zum Teil nicht ausreichend war, fehlt die Zuordnung verschiedener quartärer Kohlenstoffe.

5.8.4 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (**95**)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



131 mg (0.05 mmol) Glycopeptid **91** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 93 mg (76%, 41 μ mol) des Peptids **95** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 8.0$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₉₇H₁₅₇N₂₇O₃₇ (2293.48 g/mol) [2292.1234].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 765.0497 ([M+3H]³⁺, ber.: 765.0489), 1147.0716 ([M+2H]²⁺, ber.: 1147.0695).

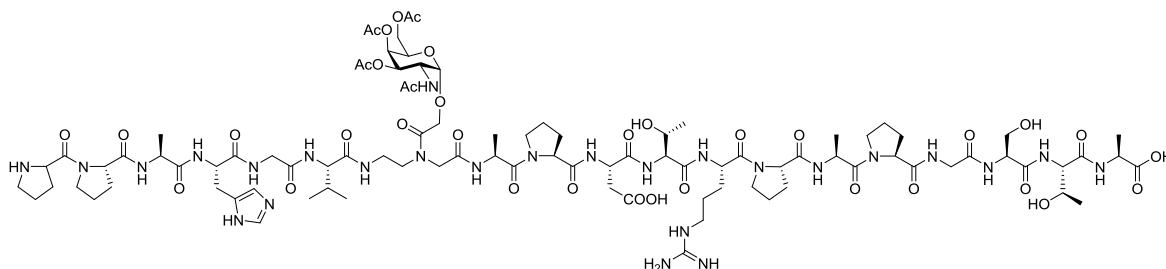
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 8.59 - 7.23$ (m, 15 H, G₁^{NH} {8.52}, V^{NH} {8.34}, G₂^{NH} {8.28}, S₁^{NH} {8.21}, S₂^{NH}, T₂^{NH} {8.19}, 2 × A^{NH} {8.18}, R^{NH} {7.98}, D^{NH} {7.97}, T_N^{NH} {7.96}, H^{NH} {7.95}, A^{NH} {7.86}, T₁^{NH} {7.70}, H^ε {7.55}), 6.79 (s, 1 H, H^δ), 4.79 – 4.75 (m, 1 H, P₁^α {4.77}), 4.73 (d, J_{H1,H2} = 3.7 Hz, 1 H, H₁), 4.55 – 3.91 (m, 20 H, P₂^α {4.49}, 2 × A^α {4.46}, D^α {4.44}, H^α {4.39}, S₁^α {4.36}, V^α {4.34}, P_{3,4}^α {4.33}, P₅^α {4.29}, S₂^α {4.28}, T₁^α, T₁^β {4.25}, R^α {4.20}, A^α {4.15}, T_N^β {4.11}, T₂^α, T₂^β {4.10}, T_N^α {4.09}, H₂ {3.96}), 3.84 – 3.29 (m, 36 H, A^α {3.80}, G₂^{αα} {3.79}, G₁^{αα} {3.76}, H₄ {3.72}, G₁^{αβ} {3.71}, G₂^{αβ}, P₃^δ {3.69}, H₅ {3.68}, S₁^{βa} {3.66}, H₃ {3.64}, S₂^{βa}, P₄^δ {3.62}, S₁^{βb} {3.60}, OCH₂ {3.59}, S₂^{βa} {3.55}, P_{2,5}^δ {3.53}, OCH₂ {3.52}, H_{6b} {3.51}, 2 × OCH₂ {3.49}, H_{6a} {3.43}, 2 × OCH₂ {3.38}, P₁^δ {3.36}), 3.16 – 2.83 (m, 6 H, R^{δa} {3.12}, R^{δb}, H₂NCH₂ {3.00}, H^{βb} {2.92}, H^{βa} {2.89}), 2.70 – 2.39 (m, 4 H, D^β {2.60}, CH_{2a}CO {2.57}, CH_{2b}CO {2.46}), 2.14 – 1.48 (m, 24 H, P₂^{βa} {2.09}, P_{1,3,4}^β, V^β {2.02}, P₅^γ {2.01}, P₁^γ {1.96}, P₂^γ {1.92}, CH₃-NHAc, P_{3,4}^γ {1.85}, P₅^{βa} {1.84}, P₁^{βb} {1.80}, R^{βa} {1.71}), 1.56 (bs, 3 H, R^{βb}, R^γ), 1.27 – 1.13 (m, 12 H, 2 × A^β {1.18}, 2 × A^β {1.17}), 1.10 (d, J_{T_Nγ,T_β} = 6.1 Hz, 3 H, T_N^γ), 1.02 (d, J_{T₂γ,T_β} = 6.2 Hz, 3 H, T₂^γ), 1.01 (d, J_{T₁γ,T_β} = 6.1 Hz, 3 H, T₁^γ), 0.89 (d, J_{V_γb,v_β} = 6.6 Hz, 3 H, V^{γb}), 0.84 (d, J_{V_γa,v_β} = 6.4 Hz, 3 H, V^{γa}) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-D₆): $\delta = 168.6$ (D^{C=O}), 134.8 (H^c), 98.5 (C₁), 74.8 (T_N^β), 72.0 (2 × OCH₂), 71.4 (C₅), 70.5 (2 × OCH₂), 68.2 (C₃), 68.0 (C₄), 66.3 (OCH₂), 66.1 (OCH₂), 65.0 (T₁^β), 65.9 (T₂^β), 61.5 (S_{1,2}^β), 60.4 (C₆), 59.3 (P₅^α, T₁^α), 58.9 (P_{3,4}^α), 57.8 (P₁^α), 58.6 (T₂^α, T_N^α), 57.7 (V^α), 57.4 (P₂^α), 55.4 (S₁^α), 54.8 (S₂^α), 52.6 (H^α), 50.1 (D^α), 50.0 (A^α), 51.2 (R^α), 49.4 (C₂), 48.4 (A^α), 46.5 (P_{2,5}^δ), 46.4 (P₄^δ), 46.3 (P₃^δ), 46.2 (P₁^δ), 46.1 (2 × A^α), 41.9 (G_{1,2}^α), 40.4 (R^δ, H₂NCH₂), 34.1 (D^β), 34.0 (CH₂CO), 29.9 (V^β), 29.0 (H^β), 28.8 (P_{1,5}^β), 27.1 (R^β), 24.3 (P₁₋₅^γ), 23.5 (R^γ), 22.7 (CH₃-NHAc), 19.8 (T_{1,2}^γ), 19.1 (V^{γb}), 18.8 (A^β), 18.2 (V^{γa}), 18.1 (T_N^γ), 17.3 (A^β), 16.7 (A^β), 16.5 (A^β) ppm.

Da die Auflösung des aufgenommenen zweidimensionalen HMBC-NMR-Spektrum zum Teil nicht ausreichend war, fehlt die Zuordnung verschiedener quartärer Kohlenstoffe. Desweiteren konnten manche Aminosäuren, welche mehrfach im Peptid enthalten sind nicht konkret unterschieden werden.

5.8.5 Synthese von *N*-L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(*N*-(2-aminoethyl)-*N*-(*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyacetamido))-glycyl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-thronyl-L-alanin (92)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(α -AAT_NAc₃)Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-T_{AG}-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Argenin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-AAT_{N-AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL

Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 114 mg (52%, 0.05 mmol) des Peptids **92** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 10.5$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{93}H_{144}N_{26}O_{35}$ (2186.62 g/mol) [2185.0287].

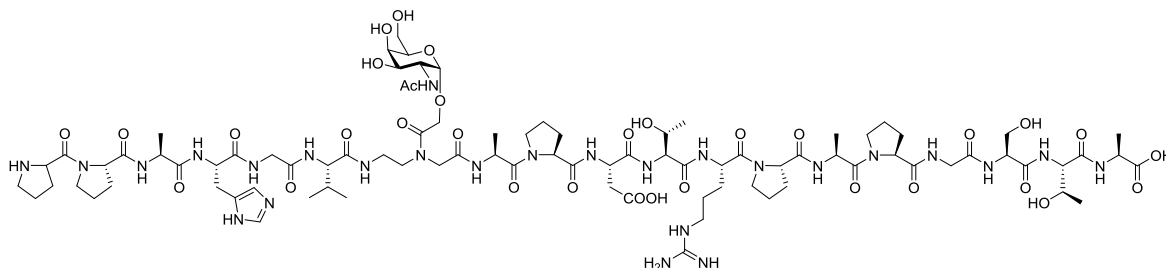
HR ESI-MS (positiv), m/z: 729.3513 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 729.3507), 1193.5239 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1093.5222).

1H -NMR (800 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.25$ (bs, 1 H, COOH), 8.97 (s, 1 H, H^e), 8.31 – 7.91 (m, 11 H, D^{NH} {8.27}, A₂^{NH}, G₂^{NH} {8.21}, A₁^{NH}, H^{NH} {8.11}, G₁^{NH} {8.09}, V^{NH} {8.05}, R^{NH} {7.97}, A_{3,4}^{NH} {7.96}), 7.80 (d, $J_{SNH,S\alpha} = 7.7$ Hz, 1 H, S^{NH}), 7.75 – 7.67 (m, 1 H, T₂^{NH} {7.71}), 7.42 – 7.30 (m, 3 H, R^{CqNH} {7.48}), H^δ {7.38}, T₁^{NH} {7.33}), 5.32 (s, 1 H, H₄), 5.08 – 5.01 (m, 1 H, H₃ {5.06}), 4.97 – 4.88 (m, 2 H, H₁*{4.93}, H₁ {4.91}), 4.67 – 3.82 (m, 31 H, H^α {4.58}, H₂, D^α {4.55}, R^α {4.49}, A₁^α; P₄^α {4.46}, P_{2,3}^α, O-CH_{2a} {4.39}, S^α {4.38}, P₄^α {4.32}, P₅^α {4.27}, O-CH_{2a} {4.24}, T₁^α {4.21}, A₂^α {4.19}, A_{3,4}^α, T₂^α {4.18}, V^α {4.10}, H₅, T₂^β {4.06}, H_{6a} {4.04}, NCH₂CO {3.98}, NHCH₂CH_{2b} {3.97}, H_{6b} {3.96}, T₁^β {3.94}, NHCH₂CH_{2a} {3.89}, G_{1,2}^{ab} {3.88}, G₁^{aa} {3.84}), 3.79 – 2.94 (m, 20 H, G₂^{ab} {3.71}, P_{2,3}^{δa}, S^{βa} {3.64}, P₄^δ {3.63}, P₅^{δa} {3.58}, P_{2,3}^{δb}, S^{βb} {3.56}, P₅^{δb} {3.53}, NHCH_{2a}CH₂ {3.30}, P₁^{δa} {3.23}, NHCH_{2a}CH₂ {3.18}, P₁^{δb} {3.17}, H^{βb} {3.11}, R^δ {3.09}, H^{βa} {2.98}), 2.78 – 2.70 (m, 1 H, D^{βb} {2.74}), 2.55 – 2.37 (m, 2 H, D^{βa} {2.48}, P₁^{βb} {2.41}), 2.14 – 1.66 (m, 32 H, CH₃-OAc, P_{2,3}^{βa} {2.09}, P_{4,5}^{βb} {2.03}, CH₃-OAc {1.98}, V^β {1.95}, P_{1,5}^{γa} {1.93}, P_{2,4}^{γa} {1.91}, CH₃-OAc {1.89}, P₄^{βa}, P_{1,4}^{γb} {1.84}, CH₃-NHAc {1.82}, P₁^{βa} {1.81}, P_{2,4}^{βb} {1.77}, R^{βa} {1.70}), 1.52 (bs, 3 H, R^{βb}, R^γ), 1.32 – 1.12 (m, 12 H, A_{1,2}^β {1.19}, A_{3,4}^β {1.26}), 1.05 (d, $J_{T2\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.02 – 0.95 (m, 3 H, T₁^γ), 0.86 – 0.76 (m, 6 H, V^{γb} {0.82}, V^{γa} {0.81}) ppm.

^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ (A_{1,2}^{C=O}), 172.3 (A₄^{C=O}), 171.8 (D^γ), 170.8 (A₃^{C=O}), 170.2 (D^{C=O}), 170.0 (C=O-NHAc, S^{C=O}), 169.9 (C=O-NHAc, H^{C=O}, T₁^{C=O}, V^{C=O}), 169.8 (T₂^{C=O}), 169.7 (C=O-OAc, C=O-NHAc), 169.2 (R^{C=O}), 169.0 (G₁^{C=O}), 168.9 (G₂^{C=O}), 156.6 (R^e), 133.4 (H^e), 129.0 (H^γ), 116.8 (H^δ), 97.3 (C₁), 97.0 (C₁*), 67.2 (C₃), 66.8 (T₁^β), 66.7 (C₄), 66.2 (T₂^β), 66.0 (C₅), 64.8 (O-CH₂), 61.5 (S^β), 61.2 (C₆), 59.5 (P₅^α), 59.1 (P_{2,3}^α), 59.0 (P₄^α), 58.1 (P₁^α), 58.0 (T₂^α), 57.7 (V^α), 57.6 (T₁^α), 54.7 (S^α), 51.1 (H^α), 49.8 (R^α), 49.2 (D^α), 49.1 (NCH₂-CO), 48.2 (A₂^α), 48.0 (NHCH₂CH₂), 47.4 (A_{3,4}^α), 46.5 (P_{2,5}^δ), 46.1 (C₂, A₁^α), 45.6 (P₁^δ), 41.8 (G₂^α), 41.7 (G₁^α), 40.3 (R^δ), 36.6 (NHCH₂CH₂), 35.3 (D^β), 30.2 (V^β), 28.8 (P_{2,5}^β), 28.1 (R^β), 27.7 (P₁^β), 26.9 (H^β), 24.3 (R^γ), 24.2 (P_{1,5}^γ), 23.4 (P_{2,4}^γ), 22.3 (CH₃-NHAc), 20.4, 20.3 20.2 (3 × CH₃-OAc), 19.6 (T₂^γ), 19.3 (T₁^γ), 19.0 (V^{γb}), 17.8 (V^{γa}), 17.5 (A₂^β), 16.5 (A₁^β), 16.9 (A_{3,4}^β) ppm.

5.8.6 Synthese von *N*-L-Propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(*N*-(2-aminoethyl)-*N*-(*O*-(2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyacetamido))-glycyl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (**96**)

(Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(α -AAT_N)Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



114 mg (52 μ mol) Glycopeptid **92** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich ein pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) \rightarrow (40:60) 20 min; (40:60) \rightarrow (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 57 mg (54%, 28 μ mol) des Peptids **96** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 7.0$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: C₈₇H₁₃₈N₂₆O₃₂ (2060.21 g/mol) [2058.9970].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 687.6753 ([M+3H]³⁺, ber.: 687.3401), 1030.5083 ([M+2H]²⁺, ber.: 1030.5063).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-*D*₆): $\delta = 9.49$ (s, 1 H, H ^{ϵ}), 8.72 – 7.38 (m, 12 H, A₄^{NH} {8.52}, G_{1,2}^{NH} {8.49}, A₂^{NH} {8.28}, T₁^{NH} {8.24}, V^{NH} {8.09}, R^{NH} {7.97}, S^{NH} {7.87}, A₁^{NH} {7.77}, H ^{δ} {7.54}, A₃^{NH} {7.41}, T₂^{NH} {7.08}, 4.78 – 2.77 (m, 57 H, H₁ {4.76}, A₄ ^{α} {4.52}, A₁ ^{α} {4.43}, P_{1,2} ^{α} {4.35}, S ^{α} {4.32}, P₃ ^{α} {4.31}, P₄ ^{α} {4.30}, T₂ ^{β} {4.26}, P₅ ^{α} {4.25}, R ^{α} {4.19}, A₂ ^{α} , O-CH_{2a} {4.13}, T₁ ^{β} {4.09}, T₁ ^{α} {4.07}, O-CH_{2a}, V ^{α} {4.06}, T₂ ^{α} {4.04}, H₂ {4.03}, NCH₂CO {3.93}, NCH₂CO {3.88}, G_{1,2}^{ub} {3.79}, A₃ ^{α} {3.76}, H₄ {3.75}, G_{1,2}^{aa} {3.71}, P₅ ^{δa} {3.70}, S ^{βa} {3.66}, H₅, P₅ ^{δb} {3.63}, P₁ ^{δ} {3.61}, S ^{βb} {3.60}, P₂ ^{δ} , P₃ ^{δa} {3.58}, H₃ {3.54}, H_{6a} {3.52}, H_{6b}, P_{3,4} ^{δb} {3.44}, P₄ ^{δa} {3.36}, NHCH₂CH_{2b} {3.28}, NHCH_{2a}CH₂ {3.18}, NHCH₂CH_{2a} {3.16}, NHCH_{2a}CH₂ {3.12}, R ^{δa} {3.11}, P₁₋₅ ^{γb} , R ^{δb} {3.00}, P₃₋₅ ^{βb} {2.85}, 2.08 – 1.46 (m, 19 H, P₃₋₅ ^{βa} {2.02}, P_{1,2} ^{β} {1.98}, V ^{β} {1.97}, P₁₋₅ ^{γa} , R ^{γa} {1.87}, CH₃-NHAc {1.84}, R ^{γa} {1.82}, R ^{βa} {1.74}, R ^{βb} {1.57}, 1.27 – 1.10 (m, 12 H, A₄ ^{β} {1.22}, A₂ ^{β} {1.18}, A₁ ^{β} {1.17}, A₃ ^{β} {1.16}), 1.02 (d, $J_{T_2\gamma, T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T₂ ^{γ}), 1.02 – 0.95 (d, $J_{T_1\gamma, T\beta} = 6.1$ Hz, 3 H, T₁ ^{γ}), 0.84 – 0.76 (m, 6 H, V ^{γb} {0.81}, V ^{γa} {0.80}) ppm.

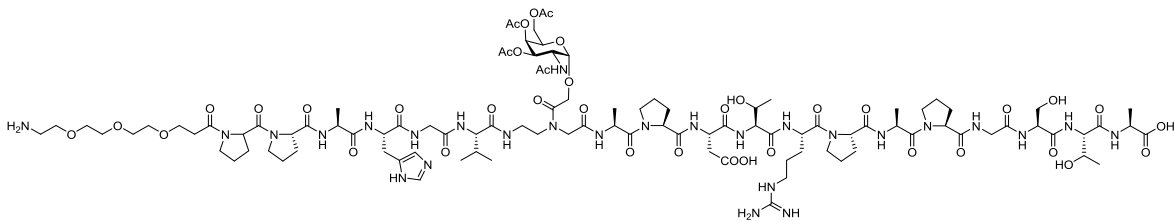
¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-*D*₆): $\delta = 175.2$ (A₃^{C=O}), 174.9 (T₁^{C=O}), 172.1 (A₂^{C=O}), 170.3 (A_{1,4}^{C=O}), 170.0 (C=O-NHAc), 97.6 (C₁), 71.8 (C₃), 71.6 (C₅), 67.7 (C₄), 65.9 (T₁ ^{β}), 65.2 (O-CH₂), 65.0 (T₂ ^{β}), 61.5 (S ^{β}), 60.3 (C₆), 59.4 (P_{4,5} ^{α}), 59.2 (P₃ ^{α}), 58.9 (P_{1,2} ^{α}), 58.7 (T_{1,2} ^{α}), 58.3 (V ^{α}), 55.5 (S ^{α}), 51.3 (R ^{α}), 50.1 (A₁ ^{α}), 50.0 (A₃ ^{α}), 49.8 (C₂), 48.5 (A₂ ^{α}), 48.1 (NCH₂-CO), 46.4 (P₁₋₅ ^{δ}), 46.2 (NHCH₂CH₂), 46.0 (A₁ ^{α}), 41.8 (G_{1,2} ^{α}), 40.5

(R^δ), 36.1 (NHCH₂CH₂), 29.8 (V^β), 28.8 (P₁₋₅^β), 27.2 (R^β), 24.2 (P₁₋₅^γ, R^γ), 22.6 (CH₃-NHAc), 19.9 (T₂^γ), 19.8 (T₁^γ), 19.1 (V^{γb}), 17.9 (V^{γa}), 18.9 (A₃^β), 17.4 (A₂^β), 16.6 (A₁^β), 16.8 (A₄^β) ppm.

Da die Auflösung des aufgenommenen zweidimensionalen HMBC-NMR-Spektrum zum Teil nicht ausreichend war, fehlt die Zuordnung verschiedener quartärer Kohlenstoffe. Desweiteren konnten die Aminosäuren Histidin und Arginin nicht zugeordnet werden.

5.8.7 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-*N*-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(*N*-(2-aminoethyl)-*N*-(*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyacetamido))-glycyl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (93)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(α -AAT_NAc₃)Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



Die mikrowellenunterstützten Peptidsynthese an der Festphase erfolgte automatisiert nach einem einprogrammierten Standardprotokoll. Zunächst wurden 286 mg (0.10 mmol) eines mit *Fmoc-Ala-Wang* vorbeladenes Harzes (Beladung 0.35 mmol/g) über Nacht in 5 mL DMF zum quellen gebracht. Um die *Fmoc*-Schutzgruppe während der Peptidsynthese abzuspalten wurde das Harz zunächst 40 s unter 26 W und einer maximalen Temperatur von 40 °C initial unter Verwendung von Piperidin in *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP) (20% v/v, 7 mL) behandelt. Im Anschluss wurde erneut mit 30 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C noch einmal 3 min entschützt. Alle Kupplungsschritte wurden unter Mikrowellenbestrahlung mit maximal 23 W und einer Temperatur von maximal 80 °C durchgeführt. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Aminosäuren (je 1 mmol, 10 Äquiv.) sowie der Spacer (0.4 mmol, 4.0 Äquiv.) unter 23 W bei einer maximalen Temperatur von 80 °C zusammen mit den Kupplungsreagenzien 0.5 M HBTU, HOBT H₂O (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) und 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) mit dem wachsenden Peptid 5 min zur Reaktion gebracht. Nach dem Einbau von *Fmoc*-T_{AG}-OH wurde für alle Aminosäuren eine Doppelkupplung durchgeführt. Dafür wurde die Kupplung zweimal hintereinander durchgeführt. Zwischenzeitlich wird das Peptid von nicht gebundenen Aminosäuren und Kupplungsreagenzien. Für die Aminosäure *Fmoc*-Arg(Pbf)-OH und *Fmoc*-His(Trt)-OH wurden andere Kupplungsbedingungen herangezogen. So erfolgte bei Arginin eine Doppelkupplung. Dabei wurde zunächst das wachsende Peptid zusammen mit den Kupplungsreagenzien sowie der Aminosäure 30 min ohne Mikrowellenbestrahlung und im Anschluss 5 min mit 23 W und einer maximalen Temperatur von 80 °C zur Reaktion gebracht Die Aminosäure Histidin dagegen wurde zusammen mit den Kupplungsreagenzien ohne Mikrowellenstrahlung und einer maximalen Temperatur von 50 °C ans wachsende Peptid gekuppelt. Für die Kupplung von *Fmoc*-AAT_{N-AG}-OH (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) an das wachsende Peptid, wurden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU, HOAt (0.15 mmol, 1.5 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) eingesetzt. Hierbei wurde keine Mikrowellenstrahlung eingesetzt und die

Kupplungszeit auf 35 min eingestellt. Nach der Kupplung aller Aminosäuren wird abschließend die *N*-terminale *Fmoc*-Schutzgruppe vom Peptid analog der *Fmoc*-Aminosäuren Entschützung mit Piperidin in NMP durchgeführt.

Nach beendeter Synthese wurde das Peptid in einen Merrifield-Reaktor überführt und mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde das Peptid zur Abspaltung vom Harz in einer Mischung aus 10 mL Trifluoressigsäure und 1 mL Triisopropylsilan 2 h geschüttelt. Danach wurde das vom Harz abgespaltene Peptid filtriert und das Harz zweimal mit je 5 mL Trifluoressigsäure gewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum eingengt und dann dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohpeptid wurde im Anschluss in eiskaltem Diethyleter gefällt und im Anschluss zentrifugiert, um die löslichen Seitenkettenschutzgruppen vom Peptid zu trennen. Daraufhin wurde das Peptid mit 10 mL Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Rohpeptid wurde durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 80 mg (33%, 0.03 mmol) des Peptids **93** als farbloses Lyophilisat.

$R_t = 11.6$ min, $\lambda = 214$ nm.

Masse/Molekulargewicht: $C_{102}H_{161}N_{27}O_{39}$ (2389.56 g/mol) [2388.1445].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 797.0569 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 797.0560), 1195.5844 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1195.0801).

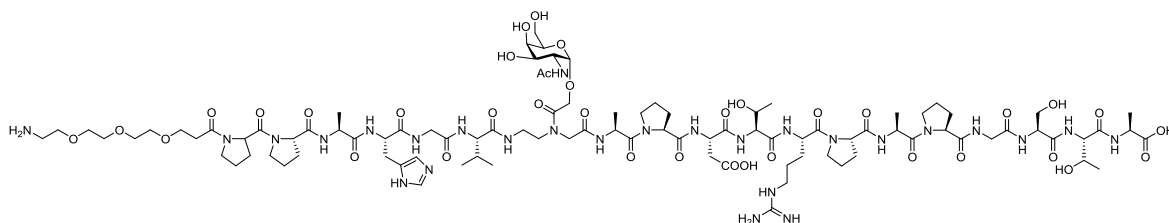
1H -NMR (800 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 14.24$ (bs, 1 H, COOH), 8.96 (s, 1 H, H^c), 8.49 – 7.93 (m, 10 H, A₃^{NH} {8.44}, D^{NH} {8.25}, G₂^{NH} {8.22}, G₁^{NH} {8.20}, A₂^{NH} {8.11}, H^{NH} {8.07}, V^{NH} {8.02}, A₁^{NH} {8.01}, R^{NH} {7.97}, A₄^{NH} {7.96}), 7.80 (d, $J_{SNH,S\alpha} = 7.7$ Hz, 1 H, S^{NH}), 7.71 (d, $J_{TNH,T\alpha} = 7.7$ Hz, 1 H, T₂^{NH}), 7.53 (bs, 1 H, R^{CqNH}), 7.43 – 7.28 (m, 2 H, H^δ {7.37}, T₁^{NH} {7.34}), 5.32 (s, 1 H, H₄), 5.15 – 5.03 (m, 1 H, H₃ {5.06}), 4.98 – 4.90 (m, 1 H, H₁ {4.96}), 4.62 – 3.82 (m, 28 H, H^α {4.57}, D^α, A₃^α {4.56}, P₁^α {4.50}, R^α {4.49}, A₂^α {4.45}, O-CH_{2a} {4.39}, S^α {4.38}, P₂^α {4.32}, P_{3,4}^α {4.31}, H₂ {4.30}, P₅^α {4.27}, O-CH_{2a} {4.24}, T₂^α {4.20}, H₅ {4.19}, A₄^α {4.18}, A₁^α {4.16}, T₁^α, V^α {4.09}, T₂^β {4.06}, H_{6a} {4.04}, NCH_{2a}CO {3.98}, H_{6b} {3.96}, NHCH₂CH_{2b} {3.95}, T₁^β {3.94}, NHCH₂CH_{2a} {3.90}, G₁^{ab} {3.87}), 3.80 – 3.42 (m, 18 H, G₁^{aa} {3.76}, G₂^α {3.70}, S^{βa} {3.64}, 3 × OCH₂ {3.59}, P₅^{δa} {3.57}, S^{βb}, OCH₂ {3.56}, P₁^{δb}, P₄^δ {3.53}, OCH₂ {3.50}, P₁^{δa} {3.49}), 3.40 – 3.04 (m, 9 H, P_{2,3}^δ {3.36}, NHCH_{2a}CH₂ {3.30}, NHCH_{2a}CH₂ {3.18}, H^{βa} {3.12}, R^δ {3.10}), 3.02 – 2.95 (m, 3 H, H^{βa} {2.99}, H₂NCH₂ {2.98}), 2.77 – 2.69 (m, 1 H, D^{βb} {2.74}), 2.61 – 2.39 (m, 5 H, CH_{2a}CO {2.57}, OCH₂ {2.54}, D^{βa} {2.49}, CH_{2b}CO {2.47}), 2.15 – 1.65 (m, 34 H, P₁^{βb}, CH₃-OAc {2.10}, P_{2,5}^{βb}, P_{4,5}^{βa} {2.03}, CH₃-OAc {1.98}, V^β {1.95}, P_{1,5}^{γa} {1.92}, CH₃-OAc {1.89}, P_{1,5}^{γa} {1.86}, CH₃-NHAc {1.81}, P₁^{βa} {1.80}, P_{2,3}^{βa} {1.78}, R^{βa} {1.71}), 1.52 (bs, 3 H, R^{βb}, R^γ), 1.30 – 1.15 (m, 12 H, A₄^β {1.27}, A₃^β {1.22}, A₂^β {1.19}, A₁^β {1.18}), 1.05 (d, $J_{T_2\gamma,T\beta} = 6.4$ Hz, 3 H, T₂^γ), 1.01 – 0.97 (m, 3 H, T₁^γ), 0.85 – 0.79 (m, 6 H, V^{γb} {0.83}, V^{γa} {0.81}) ppm.

^{13}C -NMR (200 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 173.8$ (A₄^{C=O}), 172.4 (A₁^{C=O}), 171.9 (D^γ), 170.8 (A₂^{C=O}), 170.5 (A₃^{C=O}), 170.2 (D^{C=O}), 170.1 (S^{C=O}), 170.0 (C=O-NHAc), 169.9 (C=O-NHAc, H^{C=O}, T₁^{C=O}), 169.8 (T₂^{C=O}), 169.7 (C=O-OAc, C=O-NHAc), 169.3 (R^{C=O}), 168.8 (G₂^{C=O}, V^{C=O}), 168.6 (G₁^{C=O}), 156.7 (R^c), 133.4 (H^c), 129.1 (H^γ), 116.8 (H^δ), 97.4 (C1), 69.5 (OCH₂), 69.4 (2 × OCH₂), 67.3 (C3), 66.8 (C4), 66.6 (T₁^β), 66.4 (3 ×

OCH₂), 66.1 (C₅), 66.0 (T₂^β), 64.9 (O-CH₂), 61.5 (S^β), 61.2 (C₆), 59.5 (P₅^α), 59.1 (P₄^α), 58.9 (P_{2,3}^α), 57.8 (T₂^α, V^α), 57.7 (T₁^α), 57.4 (P₁^α), 54.7 (S^α), 51.2 (H^α), 49.8 (R^α), 49.2 (D^α), 49.1 (NCH₂-CO), 48.1 (A₁^α), 48.0 (A₂^α), 47.9 (NHCH₂CH₂), 46.5 (P_{1,5}^δ), 46.3 (C₂), 46.1 (A₃^α), 47.4 (A₄^α), 41.7 (G_{1,2}^α), 40.3 (R^δ), 38.3 (H₂NCH₂), 36.6 (NHCH₂CH₂), 35.4 (D^β), 34.0 (CH₂CO), 30.2 (V^β), 28.8 (P_{2,5}^β), 28.1 (R^β), 27.9 (P₁^β), 26.8 (H^β), 24.3 (R^γ), 24.1 (P_{1,5}^γ), 22.3 (CH₃-NHAc), 20.4, 20.3, 20.2 (3 × CH₃-OAc), 19.6 (T₂^γ), 19.3 (T₁^γ), 19.0 (V^{γb}), 17.8 (V^{γa}), 17.3 (A₁^β), 17.0 (A₄^β), 16.7 (A₃^β), 16.5 (A₂^β) ppm.

5.8.8 Synthese von Amino-4,7,10-trioxa-dodecanyl-amido-N-L-propyl-L-propyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-(N-(2-aminoethyl)-N-(O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-2-hydroxyacetamido))-glycyl-L-alanyl-L-propyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-propyl-L-alanyl-L-propyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanin (**97**)

(H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(α-AAT_N)Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH)



80 mg (33 μmol) Glycopeptid **93** werden in 5 mL Wasser gelöst und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (pH-Wert 11) so lange versetzt bis sich eine pH-Wert von maximal 9 eingestellt hat. Nach wiederholter pH-Wert Regulierung wird das Peptid nach einer Woche mit 1 M Essigsäure neutralisiert, lyophilisiert und im Anschluss durch semipräparative RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) (Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, Gradient: (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min) gereinigt.

Man erhielt 37 mg (50%, 16 μmol) des Peptids **97** als farbloses Lyophilisat.

R_t = 8.8 min, λ = 214 nm.

Masse/Molekulargewicht: C₉₆H₁₅₅N₂₇O₃₆ (2263.45 g/mol) [2262.1128].

HR ESI-MS (positiv), m/z: 755.0462 ([M+3H]³⁺, ber.: 755.0454), 1132.0670 ([M+2H]²⁺, ber.: 1132.0642).

¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆): δ = 8.58 – 7.35 (m, 11 H, A₄^{NH} {8.52}, G_{1,2}^{NH} {8.49}, S^{NH} {8.27}, A₃^{NH} {8.26}, T₁^{NH} {8.21}, V^{NH} {8.18}, R^{NH} {7.96}, A₁^{NH} {7.81}, T₁^{NH} {7.68}, A₂^{NH} {7.45}), 4.79 – 3.99 (m, 20 H, H₁ {4.76}, A₄^α {4.54}, P₁^α {4.50}, A₁^α {4.45}, P₂^α, S^α {4.35}, P_{3,4}^α {4.29}, T₁^α, T₁^β {4.25}, R^α {4.19}, A₃^α {4.15}, O-CH_{2a} {4.14}, T₂^β {4.10}, T₂^α {4.08}, O-CH_{2a} {4.07}, V^α {4.06}, P₅^α {4.05}, H₂, NCH_{2a}CO {4.04}), 3.95 – 2.84 (m, 38 H, NHCH₂CH_{2b} {3.94}, NHCH₂CH_{2a} {3.90}, A₂^α {3.78}, G_{1,2}^{αb} {3.77}, H₄ {3.75}, G_{1,2}^{αa} {3.71}, P₂^{δa}, P₅^{δa} {3.69}, S^{βa} {3.66}, H₃ {3.65}, H₅, P_{2,3}^{δa}, P₅^{δb} {3.62}, S^{βb} {3.60}, OCH₂ {3.59}, P₃^{δb} {3.58}, H_{6a}, P₁^{δb} {3.53}, OCH₂ {3.52}, 2 × OCH₂ {3.50}, P₁^{δa} {3.49}, H_{6b} {3.45}, P₄^{δa} {3.44}, OCH₂ {3.37}, P₄^{δb} {3.29}, NHCH_{2a}CH₂ {3.19}, R^{δa}, NHCH_{2a}CH₂ {3.12}, R^{δb} {3.00}), 2.72 – 1.66 (m, 30 H,

H_2NCH_2 {2.67}, $\text{CH}_{2\text{a}}\text{CO}$ {2.56}, $\text{CH}_{2\text{b}}\text{CO}$ {2.46}, $\text{P}_1^{\beta\text{a}}$ {2.10}, $\text{P}_{2-4}^{\beta\text{a}}$ {2.02}, V^β {1.98}, P_{1-5}^γ {1.86}, $\text{P}_5^{\beta\text{b}}$ {1.85}, $\text{P}_1^{\beta\text{b}}$ {1.80}, $\text{P}_{2-4}^{\beta\text{b}}$ {1.77}, $\text{P}_5^{\beta\text{a}}$ {1.73}, $\text{R}^{\beta\text{a}}$, $\text{CH}_3\text{-NHAc}$ {1.71}), 1.57 (bs, 3 H, $\text{R}^{\beta\text{b}}$, R^γ), 1.25 – 1.13 (m, 12 H, A_4^β {1.22}, A_3^β {1.18}, $\text{A}_{1,2}^\beta$ {1.17}), 1.02 (d, $J_{\text{T}2\gamma, \text{T}\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T_2^γ), 1.00 (d, $J_{\text{T}1\gamma, \text{T}\beta} = 6.2$ Hz, 3 H, T_1^γ), 0.84 – 0.75 (m, 6 H, $\text{V}^{\gamma\text{b}}$ {0.81}, $\text{V}^{\gamma\text{a}}$ {0.80}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, DMSO-D_6): $\delta = 175.4$ ($\text{A}_1^{\text{C=O}}$), 174.5 (C=O-NHAc), 172.1 ($\text{A}_3^{\text{C=O}}$), 170.7 ($\text{S}^{\text{C=O}}$), 170.4 ($\text{A}_2^{\text{C=O}}$), 170.3 ($\text{A}_4^{\text{C=O}}$), 168.8 ($\text{G}_{1,2}^{\text{C=O}}$, $\text{V}^{\text{C=O}}$), 97.6 (C1), 72.1 (OCH_2), 71.6 (C5), 69.5 ($2 \times \text{OCH}_2$), 67.4 (C3), 67.4 (C4), 66.3 (OCH_2), 66.1 (OCH_2), 65.9 (T_2^β), 65.0 (T_1^β , O-CH_2), 61.6 (S^β), 60.3 (C6), 59.5 (P_5^α), 59.3 ($\text{P}_{3,2}^\alpha$, T_1^α), 58.9 (P_2^α), 58.7 (T_2^α), 58.3 (V^α), 57.4 (P_1^α), 55.5 (S^α), 51.3 (R^α), 49.9 (A_2^α), 49.8 (C2), 49.1 ($\text{NCH}_2\text{-CO}$), 48.4 (A_3^α), 48.1 (NHCH_2CH_2), 46.6 (P_1^δ), 46.4 (P_{2-5}^δ), 46.1 (A_4^α), 46.0 (A_1^α), 41.8 ($\text{G}_{1,2}^\alpha$), 40.7 (H_2NCH_2), 40.4 (R^δ), 36.1 (NHCH_2CH_2), 34.0 (CH_2CO), 29.7 (V^β), 28.7 (P_{2-5}^β), 27.8 (P_1^β), 27.2 (R^β), 24.2 (P_{1-5}^γ), 24.1 ($\text{CH}_3\text{-NHAc}$), 23.5 (R^γ), 19.9 ($\text{T}_{1,2}^\gamma$), 19.1 ($\text{V}^{\gamma\text{b}}$), 18.9 (A_2^β), 17.9 ($\text{V}^{\gamma\text{a}}$), 17.4 (A_3^β), 16.8 (A_4^β), 16.6 (A_1^β) ppm.

Da die Auflösung des aufgenommenen zweidimensionalen HMBC-NMR-Spektrum zum Teil nicht ausreichend war, fehlt die Zuordnung verschiedener quartärer Kohlenstoffe. Desweiteren konnten die Aminosäuren Histidin und Arginin nicht zugeordnet werden.

5.9 HPLC-Daten der Kalibrationsmessungen und Abbaustudien

5.9.1 Generelle Durchführung zur Erstellung der Kalibrationsgeraden

Zur Aufnahme der Kalibrationsgeraden wurde eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Peptide hergestellt. Die Verdünnungsreihe bestand jeweils aus folgenden Konzentrationen: 5.00, 4.50, 4.00, 3.50, 3.00, 2.50, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25 und 0 mg/mL. Desweiteren wurden weitere Verdünnungsreihen von höheren Konzentrationen gemessen. Diese dienten der Detektion einer Sättigungskurve. Folgende weitere Konzentrationen wurden gemessen: 10.00, 9.50, 9.00, 8.50, 8.00, 7.50, 7.00, 6.50, 6.00, 5.50 mg/mL. Gelöst wurden die Peptide in einem 50 mM Trizma Puffer mit 5 mM CaCl₂ und 25% iger Essigsäure. Die Proben wurden jeweils einzeln mittels analytischer RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) mit einem Fluss von 1.0 mL/min vermessen. Der Gradient wurde wie folgt gefahren: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min. Gemessen wurde bei 214 nm. Nach einer Basislinienkorrektur wurden die Absorptionsflächen bzw. deren Integrale gemittelt und gegen die Konzentration aufgetragen.

Folgende Rohdaten wurden erhalten:

Tabelle 5.1: Rohdaten des Peptids **78**.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Ø (n=4)	Ø (n=2)
0	0	0	0	0	0	0
0.25	46.8	63.2	81.4	66.2	64.4	73.8
0.50	85.3	122.5	151.0	134.9	123.4	143.0
0.75	129.7	174.6	217.4	210.2	183.0	213.8
1.00	182.6	242.8	289.4	264.5	244.8	277.0
1.50	239.4	331.1	402.5	383.0	339.0	392.8
2.00	333.5	424.1	523.1	499.6	445.1	511.4
2.50	456.1	530.9	628.1	609.7	556.2	618.9
3.00	518.0	619.1	714.1	730.8	645.5	722.5
3.50	571.8	697.1	794.0	780.8	710.9	787.4
4.00	648.1	761.9	869.2	886.9	791.5	878.1
4.50	707.7	816.4	944.7	974.6	860.9	959.7
5.00	751.4	858.3	1004.9	1027.7	910.6	1016.3
5.50			1040.7	1118.7		1079.7
6.00			1077.8	1162.4		1120.1
6.50			1156.9	1213.0		1185.0
7.00			1197.4	1247.9		1222.7
7.50			1230.3	1334.6		1282.5
8.00			1310.3	1331.3		1320.8
8.50			1375.9	1393.1		1384.5
9.00			1408.9	1473.8		1441.4
9.50			1448.6	1518.3		1483.5
10.00			1505.6	1615.8		1560.7

Tabelle 5.2: Rohdaten des Peptids **79**.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Ø (n= 3)	Ø (n= 2)
0	0	0	0	0	0
0.25	55.1	71.7	45.4	57.4	58.6
0.50	103.7	130.7	129.2	121.2	130.0
0.75	149.0	190.6	177.4	172.3	184.0
1.00	194.8	242.5	223.3	220.2	232.9
1.50	278.0	345.0	358.6	327.2	351.8
2.00	374.7	445.2	439.0	419.6	442.1
2.50	467.5	538.5	506.0	504.0	522.3
3.00	640.8	635.5	638.2	638.2	636.9
3.50	646.0	703.6	652.0	667.2	677.8
4.00	727.0	798.6	745.1	756.9	771.9
4.50	810.9	861.8	864.9	845.9	863.4
5.00	868.6	893.0	889.2	883.6	891.1
5.50		1001.0	944.8		972.9
6.00		1057.2	1000.6		1028.9
6.50		1094.0	1025.4		1059.7
7.00		1136.6	1106.4		1121.5
7.50		1209.9	1221.3		1215.6
8.00		1237.9	1291.5		1264.7
8.50		1305.5	1340.2		1322.9
9.00		1328.8	1382.9		1355.9
9.50		1361.6	1409.3		1385.5
10.00		1401.6	1563.8		1482.7

Tabelle 5.3: Rohdaten des Peptids **80**.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Ø (n= 3)	Ø (n= 2)
0	0	0	0	0	0
0.25	51.1	86.9	92.2	76.7	89.5
0.50	98.5	153.8	146.7	133.0	150.2
0.75	140.1	218.8	206.7	188.5	212.7
1.00	196.9	276.0	263.0	245.3	269.5
1.50	281.2	391.1	387.9	353.4	389.5
2.00	383.7	502	499.8	461.8	500.9
2.50	470.9	602.7	591.6	555.1	597.1
3.00	552.3	758.1	682.0	664.1	720.0
3.50	578.6	839.5	770.2	729.4	804.8
4.00	589.9	930.5	854.9	791.8	892.7
4.50	714.3	1034.0	958.4	902.2	996.2
5.00	742.5	1064.7	1033.9	947.0	1049.3

5.50		1171.9	1106.9		1139.4
6.00		1260.3	1144.3		1202.3
6.50		1327.1	1240.3		1283.7
7.00		1416.8	1337.3		1377.0
7.50		1469.0	1366.2		1417.6
8.00		1445.8	1380.0		1412.9
8.50		1585.4	1426.2		1505.8
9.00		1635.1	1513.4		1574.2
9.50		1747.9	1625.3		1686.6
10.00		1793.2	1534.5		1663.8

Tabelle 5.4: Rohdaten des Peptids 81.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Ø (n= 3)	Ø (n= 2)
0	0	0	0	0	0
0.25	53.5	69.1	65.7	62.8	67.4
0.50	99.7	120.0	124.5	114.7	122.3
0.75	159.6	174.8	175.2	169.9	175.0
1.00	191.2	211.9	228	210.4	220.0
1.50	303.3	307.6	332	314.3	319.8
2.00	419.3	410.6	423.1	417.7	416.9
2.50	439.6	488.8	506.5	478.3	497.7
3.00	582.6	595.5	605.6	594.6	600.6
3.50	684.7	698.5	675.6	686.3	687.1
4.00	750.4	795.8	772.5	772.9	784.2
4.50	869.2	827.0	798.6	831.6	812.8
5.00	983.4	971.0	927.3	960.6	949.2
5.50		1056.8	1054.1		1055.5
6.00		1091.4	1127.5		1109.5
6.50		1229.0	1198.8		1213.9
7.00		1305.0	1307.3		1306.2
7.50		1392.0	1284.3		1338.2
8.00		1405.0	1406.7		1405.9
8.50		1373.8	1515.4		1444.6
9.00		1413.7	1545.4		1479.6
9.50		1538.7	1598.1		1568.4
10.00		1522.5	1678.3		1600.4

Tabelle 5.5: Rohdaten des Peptids 82.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Ø (n= 3)	Ø (n= 2)
0	0	0	0	0	0
0.25	66.6	64.8	59.7	63.7	62.3
0.50	131.9	140.3	127.3	133.2	133.8

5. EXPERIMENTELLER TEIL

0.75	193.8	196.9	181.9	190.9	189.4
1.00	254.1	258.4	241.4	251.3	249.9
1.50	380.9	379.7	346.0	368.9	362.9
2.00	468.3	481.5	455.5	468.4	468.5
2.50	580.2	596.3	559.0	578.5	577.7
3.00	704.4	695.1	620.2	673.2	657.7
3.50	830.0	791.6	712.3	778.0	752.0
4.00	874.8	879.6	826.6	860.3	853.1
4.50	982.2	962.0	901.5	948.6	931.8
5.00	1034.8	1047.4	977.1	1019.8	1012.3
5.50		1146.7	1052.3		1099.5
6.00		1227.7	1117.1		1172.4
6.50		1271.5	1099.0		1185.3
7.00		1345.2	1173.5		1259.4
7.50		1385.2	1266.6		1325.9
8.00		1439.4	1358.6		1399.0
8.50		1450.0	1402.9		1426.5
9.00		1489.7	1401.1		1445.4
9.50		1625.0	1408.7		1516.9
10.00		1671.5	1552.4		1612.0

Tabelle 5.6: Rohdaten des Peptids **83**.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Ø (n= 3)	Ø (n= 2)
0	0	0	0	0	0
0.25	47.6	64.2	74.1	62.0	69.1
0.50	98.3	117.2	127.5	114.3	122.3
0.75	149.2	180.5	179.2	169.6	179.8
1.00	172.4	231.6	235.8	213.3	233.7
1.50	255.1	334.9	352.2	314.1	343.5
2.00	392.8	424.0	454.5	423.8	439.2
2.50	487.7	585.4	571.9	548.3	578.6
3.00	578.1	620.5	667.3	622.0	643.9
3.50	726.5	691.2	738.9	718.9	715.0
4.00	771.3	763.4	824.2	786.3	793.8
4.50	858.0	800.8	883.0	847.3	841.9
5.00	778.4	902.9	953.5	878.3	928.2
5.50		962.6	999.4		981.0
6.00		1037.9	1042.7		1040.3
6.50		1096.1	1111.2		1103.6
7.00		1136.6	1084.6		1110.6
7.50		1088.4	1109		1098.7
8.00		1115.9	1157.6		1136.7
8.50		1183.8	1231.0		1207.4

9.00		1195.6	1250.8		1223.2
9.50		1257.5	1296.9		1277.2
10.00		1304.5	1301.7		1303.1

Tabelle 5.7: Rohdaten des Peptids **84**.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4	Ø (n= 4)	Ø (n= 2)
0	0	0	0	0	0	0
0.25	54.9	46.6	67.7	75.9	61.3	71.8
0.50	102.2	88.2	60.4	131.3	95.5	95.9
0.75	151.9	127.8	182.3	193.1	163.8	187.7
1.00	191.5	166.0	237.9	239.7	208.8	238.8
1.50	278.6	244.0	349.0	352.3	306.0	350.7
2.00	361.5	315.9	477.3	486.5	410.3	481.9
2.50	448.5	383.9	558.0	583.6	493.5	570.8
3.00	532.8	459.7	662.8	624.7	570.0	643.8
3.50	588.8	509.7	756.5	795.4	662.6	776.0
4.00	650.2	542.0	857.9	897.6	736.9	877.8
4.50	731.5	599.7	958.5	980.9	817.7	969.7
5.00	760.4	650.4	1023.4	1056.4	872.7	1039.9
5.50			1107.0	1145.3		1126.2
6.00			1161.4	1216.2		1188.8
6.50			1244.8	1304.9		1274.9
7.00			1358.2	1340.5		1349.4
7.50			1358.0	1426.5		1392.3
8.00			1391.5	1491.3		1441.4
8.50			1472.5	1454.3		1463.4
9.00			1527.9	1531.1		1529.5
9.50			1563.5	1631.6		1597.6
10.00			1577.7	1720.8		1649.3

Tabelle 5.8: Rohdaten des Peptids **85**.

mg/mL	Lauf 1	Lauf 2	Ø (n= 2)
0	0	0	0
0.25	60.7	51.6	56.1
0.50	117.8	104.0	110.9
0.75	176.2	173.6	174.9
1.00	224.1	217.2	220.6
1.50	343.4	349.9	346.6
2.00	448.5	426.8	437.6
2.50	544.2	517.4	530.8
3.00	646.0	629.2	637.6
3.50	722.8	702.4	712.6

4.00	806.7	775.0	790.8
4.50	894.6	841.3	867.9
5.00	984.8	979.6	982.2
5.50	1058.6	965.1	1011.8
6.00	1157.5	1019.2	1088.3
6.50	1223.5	1105.7	1164.6
7.00	1254.4	1162.0	1208.2
7.50	1323.0	1247.0	1285.0
8.00	1324.3	1285.6	1304.9
8.50	1359.4	1342.4	1350.9
9.00	1411.1	1399.9	1405.5
9.50	1450.9	1426.9	1438.9
10.00	1588.4	1394.5	1491.4

5.9.2 Generelle Durchführung zum enzymatischen Abbau mit Protinase K auf Eupergit® C

Zunächst wurden ein Trizma Puffer pH = 7.8 hergestellt. Dazu wurden 319 mg Trizma® Puffer (Sigma Aldrich, 93778) und 49 mg Calciumchlorid Hexahydrat (Sigma Aldrich, 21108) in 45.00 mL Reinstwasser gelöst.

Aus einer Stammlösung von 30 mg Peptid in 1.0 mL des beschriebenen Trizma® Puffers wurden 50 µL und zu einer Suspension von 1 mg Proteinase K auf Eupergit® C (Sigma Aldrich, 82452) in 500 µL Trizma® Puffer gegeben. Die Suspension wurde bei 37 °C für einen definierten Zeitraum in einer beheizbaren Thermomixer inkubiert. Um Proteinase K zu inhibieren, wurden 100 µL einer 25%igen Essigsäure zu einem definierten Zeitpunkt der Suspension hinzugegeben. Während der Messungen zeigte sich, dass eine rasche Messung notwendig ist, da die Ergebnisse andernfalls verfälscht werden. Die Proben wurden im Anschluss mittels analytischer RP-HPLC (*Phenomenex LUNA*) mit einem Fluss von 1.0 mL/min vermessen. Der Gradient wurde wie folgt gefahren: Acetonitril/Wasser mit 0.1% TFA, (5:95) → (40:60) 20 min; (40:60) → (100:0) 40 min; (100:0) 60 min). Gemessen wurde bei 214 nm. Nach einer Basislinienkorrektur wurden die Absorptionsflächen bzw. deren Integrale normiert und in % gegen die Zeit aufgetragen, wobei 100% der Anfangskonzentration bei 0 min entspricht.

Folgende Rohdaten wurden erhalten:

Tabelle 5.9: Rohdaten des Peptids 78.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Lauf 4	%	Lauf 5	%	Ø (n= 5) %
0	393.1	100.0	525.3	100.0	468.3	100.0	541.2	100.0	446.5	100.0	100.0
1	358.5	91.2	480.4	91.5	465.5	99.4	470.2	86.9	468.3	104.9	94.8
2	318.0	80.9	485.0	92.3	452.1	96.5	437.3	80.8	488.2	109.3	92.0
3	362.3	92.2	449.6	85.6	427.1	91.2	466.1	86.1	475.5	106.5	92.3
4	252.5	64.2	482.0	91.8	424.5	90.6	427.1	78.9	445.5	99.8	85.1
5	251.0	63.9	462.3	88.0	401.4	85.7	482.8	89.2	418.0	93.6	84.1
7	161.3	41.0	451.9	86.0	407.2	87.0	435.7	80.5	459.7	103.0	79.5

10	137.3	34.9	466.6	88.8	353.6	75.5	315.5	58.3	390.0	87.3	69.0
15	82.7	21.0	419.4	79.8	304.4	65.0	310.0	57.3	331.0	74.1	59.5
20	63.2	16.1	277.2	52.8	252.3	53.9	349.8	64.6	382.4	85.6	54.6
30	24.5	6.2	281.7	53.6	226.2	48.3	283.4	52.4	183.7	41.1	40.3
40	25.2	6.4	296.9	56.5	176.9	37.8	197.9	36.6	226.5	50.7	37.6
60	17.5	4.5	253.5	48.3	90.0	19.2	71.1	13.1	122.6	27.5	22.5
120	16.8	4.3	235.2	44.8	37.9	8.1	93.9	17.4	51.4	11.5	17.2

Tabelle 5.10: Rohdaten des Peptids 79.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	491.4	100.0	507.4	100.0	471.0	100.0	100.0
1	466.4	94.9	498.7	98.3	466.3	99.0	97.4
2	465.6	94.7	439.2	86.6	429.6	91.2	90.8
3	447.9	91.1	417.6	82.3	405.2	86.0	86.5
4	390.2	79.4	404.5	79.7	363.6	77.2	78.8
5	399.8	81.4	353.5	69.7	322.5	68.5	73.2
7	347.7	70.8	348.2	68.6	314.5	66.8	68.7
10	343.2	69.8	303.3	59.8	235.5	50.0	59.9
15	248.2	50.5	275	54.2	140.1	29.7	44.8
20	239.1	48.7	204.3	40.3	150.8	32.0	40.3
30	154.3	31.4	141.6	27.9	76.1	16.2	25.2
40	105.1	21.4	122.3	24.1	41.4	8.8	18.1
60	74.1	15.1	60.9	12.0	36.7	7.8	11.6
120	26.1	5.3	52.8	10.4	11.9	2.5	6.1

Tabelle 5.11: Rohdaten des Peptids 80.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	384.6	100.0	449.2	100.0	472.5	100.0	100.0
1	346.3	90.0	425.5	94.7	394.2	83.4	89.4
2	359.0	93.3	387.1	86.2	389.6	82.5	87.3
3	306.6	79.7	333.0	74.1	325.7	68.9	74.3
4	288.0	74.9	331.3	73.8	330.5	69.9	72.9
5	214.5	55.8	284.4	63.3	296.4	62.7	60.6
7	189.4	49.2	310.7	69.2	292.5	61.9	60.1
10	163.7	42.6	258.7	57.6	315.9	66.9	55.7
15	67.3	17.5	237.3	52.8	247.5	52.4	40.9
20	90.4	23.5	194.4	43.3	197.7	41.8	36.2
30	57.5	15.0	191.7	42.7	188.6	39.9	32.5
40	48.0	12.5	137.8	30.7	166.4	35.2	26.1
60	25.9	6.7	149.2	33.2	164.1	34.7	24.9
120	29.1	7.6	127.6	28.4	136.1	28.8	21.6

Tabelle 5.12 Rohdaten des Peptids **81**.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	437.2	100.0	428	100.0	418.3	100.0	100.0
1	389.6	89.1	407.7	95.3	375.0	89.6	91.3
2	396.6	90.7	356.8	83.4	393.0	94.0	89.3
3	370.8	84.8	340.1	79.5	342.9	82.0	82.1
4	336.1	76.9	320.8	75.0	297.5	71.1	74.3
5	295.4	67.6	302.8	70.7	281.6	67.3	68.5
7	258.1	59.0	258.8	60.5	307.8	73.6	64.4
10	192.7	44.1	209.1	48.9	349.2	83.5	58.8
15	172.4	39.4	181.1	42.3	223.5	53.4	45.1
20	106	24.2	194.8	45.5	324.6	77.6	49.1
30	55.2	12.6	162.2	37.9	287.6	68.8	39.8
40	65.4	15.0	105.5	24.6	114.3	27.3	22.3
60	27	6.2	69.7	16.3	73.9	17.7	13.4
120	18.6	4.3	39.2	9.2	43.1	10.3	7.9

Tabelle 5.13: Rohdaten des Peptids **82**.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	503.5	100.0	488.3	100.0	426.3	100.0	100.0
1	493.2	98.0	483.1	98.9	347.0	81.4	92.8
2	416.4	82.7	506.7	103.8	327.6	76.8	87.8
3	441.9	87.8	447.6	91.7	277.2	65.0	81.5
4	383.9	76.2	431.8	88.4	218.3	51.2	72.0
5	334.7	66.5	461.7	94.6	250.7	58.8	73.3
7	329.2	65.4	389.3	79.7	202.1	47.4	64.2
10	295.1	58.6	328.8	67.3	177.0	41.5	55.8
15	290.8	57.8	352.6	72.2	144.8	34.0	54.6
20	120.0	23.8	236.4	48.4	108.6	25.5	32.6
30	83.4	16.6	139.2	28.5	91.3	21.4	22.2
40	57.4	11.4	118.6	24.3	69.7	16.3	17.3
60	56.6	11.2	88.8	18.2	51.9	12.2	13.9
120	38.6	7.7	57.5	11.8	41.7	9.8	9.7

Tabelle 5.14 Rohdaten des Peptids **83**.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0.0	380.2	100.0	547.9	100.0	528.7	100.0	100.0
1.0	368.8	97.0	480.9	87.8	485.2	91.8	92.2
2.0	378.4	99.5	444.2	81.1	470.3	89.0	89.9
3.0	352.2	92.6	396.5	72.4	445.1	84.2	83.1
4.0	346.3	91.1	398.9	72.8	417.3	78.9	80.9
5.0	372.0	97.8	350.6	64.0	354.6	67.1	76.3

7.0	361.2	95.0	353.6	64.5	313.1	59.2	72.9
10.0	333.1	87.6	236.4	43.1	246.0	46.5	59.1
15.0	312.5	82.2	252.1	46.0	213.2	40.3	56.2
20.0	276.4	72.7	170.7	31.2	143.1	27.1	43.6
30.0	195.1	51.3	87.5	16.0	96.2	18.2	28.5
40.0	151.2	39.8	69.6	12.7	41.8	7.9	20.1
60.0	65.2	17.1	24.4	4.5	30.7	5.8	9.1
120.0	66.8	17.6	16.0	2.9	15.1	2.9	7.8

Tabelle 5.15: Rohdaten des Peptids 84.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	392.6	100.0	426.1	100.0	356.5	100.0	100.0
1	391.2	99.6	386.0	90.6	368.2	103.3	97.8
2	385.2	98.1	380.4	89.3	402.3	112.8	100.1
3	389.2	99.1	394.1	92.5	396.1	111.1	100.9
4	391.6	99.7	366.6	86.0	411.0	115.3	100.4
5	406.9	103.6	383.9	90.1	403.9	113.3	102.3
7	398.5	101.5	385.9	90.6	424.0	118.9	103.7
10	389.8	99.3	369.3	86.7	400.1	112.2	99.4
15	382.4	97.4	359.1	84.3	410.1	115.0	98.9
20	372.5	94.9	345.2	81.0	374.4	105.0	93.6
30	380.1	96.8	343.3	80.6	401.9	112.7	96.7
40	379.4	96.6	387.6	91.0	355.1	99.6	95.7
60	381.0	97.0	334.5	78.5	358.2	100.5	92.0
120	344.4	87.7	263.0	61.7	313.1	87.8	79.1

Tabelle 5.16: Rohdaten des Peptids 85.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Ø (n= 2) %
0	304.3	100.0	309.5	100.0	100.0
60	252.6	83.0	272.3	88.0	81.5
90	216.5	71.1	243.8	78.8	61.7
120	126.5	41.6	193.9	62.6	59.3
150	89.8	29.5	162.3	52.4	32.4
180	77.6	25.5	148.2	47.9	29.6
210	59.4	19.5	143.8	46.5	25.4
240	60.7	19.9	123.9	40.0	22.5
270	36.1	11.9	169.9	54.9	23.9
300	29.1	9.6	92.4	29.9	15.4

Tabelle 5.17: Rohdaten des Peptids **85**.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Lauf 4	min	Ø (n= 4) %
0	397.5	100.0	335.4	100.0	341.2	100.0	470.7	100.0	100.0
1	294.7	74.1	299.3	89.2	348.4	102.1	441.2	93.7	89.8
2	260.9	65.6	248.1	74.0	269.4	79.0	381.5	81.0	74.9
3	202.7	51.0	268.6	80.1	215.1	63.0	387.4	82.3	69.1
4	158.1	39.8	184.8	55.1	183.5	53.8	397.1	84.4	58.3
5	136.8	34.4	161.2	48.1	137.7	40.4	349.4	74.2	49.3
7	147	37.0	162.5	48.4	166.9	48.9	317.9	67.5	50.5
10	81.5	20.5	111.9	33.4	103.7	30.4	238.0	50.6	33.7
15	60.2	15.1	36.7	10.9	37.2	10.9	147.8	31.4	17.1
20	46.5	11.7	32.1	9.6	32.6	9.6	189.3	40.2	17.8
30	36.2	9.1	45.3	13.5	42.3	12.4	55.5	11.8	11.7
40	9.8	2.5	11.6	3.5	25.3	7.4	73.4	15.6	7.2
60	22.5	5.7	15.6	4.7	16.3	4.8	38.4	8.2	5.8
120	25.9	6.5	12.2	3.6	7.9	2.3	21.7	4.6	4.3

Tabelle 5.18: Rohdaten des Peptids **86**.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	493.6	100.0	447.5	100.0	438.6	100.0	100.0
1	453.0	91.8	462.8	103.4	438.7	100.0	98.4
2	482.1	97.7	454.7	101.6	429.2	97.9	99.0
3	474.1	96.0	457.1	102.1	408.8	93.2	97.1
4	426.4	86.4	425.1	95.0	374.8	85.5	88.9
5	400.5	81.1	390.7	87.3	353.5	80.6	83.0
7	385.1	78.0	340.9	76.2	358.6	81.8	78.7
10	351.3	71.2	337.2	75.4	331.5	75.6	74.0
15	266.2	53.9	326.9	73.1	272.4	62.1	63.0
20	202.7	41.1	222.8	49.8	214.1	48.8	46.6
30	173.2	35.1	165.7	37.0	162.3	37.0	36.4
40	107.1	21.7	118.2	26.4	109.4	24.9	24.4
60	62.6	12.7	71.5	16.0	46.9	10.7	13.1
120	27.8	5.6	25.7	5.7	19.0	4.3	5.2

Tabelle 5.19: Rohdaten des Peptids **87**.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	478.4	100.0	482.0	100.0	415.2	100.0	100.0
1	443.6	92.7	460.0	95.4	403.9	97.3	95.1
2	438.3	91.6	445.5	92.4	441.2	106.3	96.8
3	444.6	92.9	424.8	88.1	416.8	100.4	93.8
4	387.8	81.1	347.4	72.1	420.1	101.2	84.8
5	420.4	87.9	372.5	77.3	398.0	95.9	87.0
7	365.6	76.4	299.2	62.1	379.5	91.4	76.6

10	301.7	63.1	307.5	63.8	409.1	98.5	75.1
15	248.6	52.0	269.4	55.9	311.4	75.0	61.0
20	197.2	41.2	165.6	34.4	306.4	73.8	49.8
30	119.8	25.0	156.0	32.4	257.5	62.0	39.8
40	126.9	26.5	145.0	30.1	220.2	53.0	36.5
60	72.9	15.2	63.0	13.1	123.9	29.8	19.4
120	21.9	4.6	42.5	8.8	51.0	12.3	8.6

Tabelle 5.20: Rohdaten des Peptids 61.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	531.9	100.0	540.0	100.0	538.8	100.0	100.0
1	460.5	86.6	450.8	83.5	490.1	91.0	87.0
2	463.9	87.2	417.7	77.4	407.9	75.7	80.1
3	399.7	75.1	386.5	71.6	370.2	68.7	71.8
4	388.0	72.9	349.4	64.7	378.9	70.3	69.3
5	322.0	60.5	323.2	59.9	303.4	56.3	58.9
7	307.3	57.8	341.2	63.2	280.5	52.1	57.7
10	257.8	48.5	271.4	50.3	226.9	42.1	46.9
15	201.0	37.8	203.4	37.7	154.3	28.6	34.7
20	174.9	32.9	120.7	22.4	174.0	32.3	29.2
30	103.9	19.5	39.3	7.3	108.1	20.1	15.6
40	95.5	18.0	47.0	8.7	71.9	13.3	13.3
60	23.1	4.3	25.2	4.7	59.5	11.0	6.7
120	17.1	3.2	17.6	3.3	24.8	4.6	3.7

Tabelle 5.21: Rohdaten des Peptids 64.

min	Lauf 1	%	Lauf 2	%	Lauf 3	%	Ø (n= 3) %
0	499.6	100.0	503.0	100.0	425.5	100.0	100.0
1	494.3	98.9	484.4	96.3	407.7	95.8	97.0
2	492.6	98.6	453.6	90.2	430.5	101.2	96.7
3	481.7	96.4	455.7	90.6	445.5	104.7	97.2
4	473.8	94.8	478.2	95.1	456.2	107.2	99.0
5	473.9	94.9	407.5	81.0	424.2	99.7	91.9
7	454.2	90.9	409.8	81.5	322.6	75.8	82.7
10	408.1	81.7	390.1	77.6	306.8	72.1	77.1
15	369.5	74.0	338.3	67.3	257.7	60.6	67.3
20	343.8	68.8	346.6	68.9	262.9	61.8	66.5
30	290.4	58.1	248.8	49.5	210.4	49.4	52.3
40	250.4	50.1	245.5	48.8	161.4	37.9	45.6
60	229.6	46.0	224.0	44.5	151.2	35.5	42.0
120	214.4	42.9	216.1	43.0	143.2	33.7	39.8

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Krebs in Deutschland für 2015/2016, Vol. 12*, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft für epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, **2019**.
- [2] L. Wayteck, K. Breckpot, J. Demeester, S. C. De Smedt, K. Raemdonck; *A personalized view on cancer immunotherapy*; *Cancer Lett.* **2014**, 352, 113-125.
- [3] M. Vanneman, G. Dranoff; *Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment*; *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12, 237-251.
- [4] W. J. Lesterhuis, J. B. A. G. Haanen, C. J. A. Punt; *Cancer immunotherapy – revisited*; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 591.
- [5] H. zur Hausen; *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*; *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 342.
- [6] A. Kudrin, J. M. G. Hanna; *Overview of the cancer vaccine field*; *Hum. Vaccines* **2012**, 8, 1135-1140.
- [7] S. L. Topalian, F. S. Hodi, J. R. Brahmer, S. N. Gettinger, D. C. Smith, D. F. McDermott, J. D. Powderly, R. D. Carvajal, J. A. Sosman, M. B. Atkins, P. D. Leming, D. R. Spigel, S. J. Antonia, L. Horn, C. G. Drake, D. M. Pardoll, L. Chen, W. H. Sharfman, R. A. Anders, J. M. Taube, T. L. McMiller, H. Xu, A. J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G. D. Kollia, A. Gupta, J. M. Wigginton, M. Sznol; *Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer*; *N. Engl. J. Med.* **2012**, 366, 2443-2454.
- [8] A. Gros, P. F. Robbins, X. Yao, Y. F. Li, S. Turcotte, E. Tran, J. R. Wunderlich, A. Mixon, S. Farid, M. E. Dudley, K.-i. Hanada, J. R. Almeida, S. Darko, D. C. Douek, J. C. Yang, S. A. Rosenberg; *PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors*; *The Journal of Clinical Investigation* **2014**, 124, 2246-2259.
- [9] A. Chawla, A. V. Philips, G. Alatrash, E. Mittendorf; *Immune checkpoints*; *OncoImmunology* **2014**, 3, e28325.
- [10] J. Fu, I.-J. Malm, D. K. Kadayakkara, H. Levitsky, D. Pardoll, Y. J. Kim; *Preclinical Evidence That PD1 Blockade Cooperates with Cancer Vaccine TEGVAX to Elicit Regression of Established Tumors*; *Cancer Res.* **2014**, 74, 4042-4052.
- [11] A. Girling, J. Bartkova, J. Burchell, S. Gendler, C. Gillett, J. Taylor-Papadimitriou; *A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas*; *Int. J. Cancer* **1989**, 43, 1072-1076.
- [12] N. Remmers, J. M. Anderson, E. M. Linde, D. J. DiMaio, A. J. Lazenby, H. H. Wandall, U. Mandel, H. Clausen, F. Yu, M. A. Hollingsworth; *Aberrant Expression of Mucin Core Proteins and O-Linked Glycans Associated with Progression of Pancreatic Cancer*; *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 1981-1993.
- [13] S. J. Gendler, A. P. Spicer; *Epithelial Mucin Genes*; *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 607-634.
- [14] S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, D. Wilson; *Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin*; *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15286-15293.
- [15] S. J. Gendler, J. M. Burchell, T. Duhig, D. Lamport, R. White, M. Parker, J. Taylor-Papadimitriou; *Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium*; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84, 6060-6064.
- [16] L. Stern, M. Palatsides, T. De Kretser, M. Ford; *Expression of the tumor-associated mucin MUC1 in an ovarian tumor cell line*; *Int. J. Cancer* **1992**, 50, 783-790.
- [17] M. S. Lan, S. K. Batra, W. N. Qi, R. S. Metzgar, M. A. Hollingsworth; *Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA*; *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15294-15299.
- [18] M. Shimizu, K. Yamauchi; *Isolation and Characterization of Mucin-Like Glycoprotein in Human Milk Fat Globule Membrane*; *J. Biochem. (Tokyo, Jpn.)* **1982**, 91, 515-524.
- [19] M. S. Lan, R. S. Metzgar, R. C. Bast, M. I. Colnaghi, R. C. Knapp, D. Colcher, J. Schlom; *Co-expression of human cancer-associated epitopes on mucin molecules*; *Int. J. Cancer* **1987**, 39, 68-72.
- [20] D. Kufe, G. Inghirami, M. Abe, D. Hayes, H. Justi-Wheeler, J. Schlom; *Differential Reactivity of a Novel Monoclonal Antibody (DF3) with Human Malignant versus Benign Breast Tumors*; *Hybridoma* **1984**, 3, 223-232.
- [21] M. J. Ligtenberg, L. Kruijshaar, F. Buijs, M. van Meijer, S. V. Litvinov, J. Hilken; *Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor*; *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 6171-6177.

- [22] F. Levitin, O. Stern, M. Weiss, C. Gil-Henn, R. Ziv, Z. Prokocimer, N. I. Smorodinsky, D. B. Rubinstein, D. H. Wreschner; *The MUC1 SEA Module Is a Self-cleaving Domain*; *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33374-33386.
- [23] B. Macao, D. G. A. Johansson, G. C. Hansson, T. Hard; *Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin*; *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 71-76.
- [24] D. W. Kufe; *Mucins in cancer: function, prognosis and therapy*; *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 874-885.
- [25] R. Bansil, B. S. Turner; *Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications*; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2006**, *11*, 164-170.
- [26] J. Siddiqui, M. Abe, D. Hayes, E. Shani, E. Yunis, D. Kufe; *Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen*; *P. Natl. A. Sci.* **1988**, *85*, 2320-2323.
- [27] S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard, J. Burchell; *A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats*; *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12820-12823.
- [28] V. Debailleul, A. Laine, G. Huet, P. Mathon, M. C. d'Hooghe, J. P. Aubert, N. Porchet; *Human Mucin Genes MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 Express Stable and Extremely Large mRNAs and Exhibit a Variable Length Polymorphism: an Improved Method to Analyze Large mRNAs*; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 881-890.
- [29] D. Roulois, M. Grégoire, J.-F. Fonteneau; *MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer therapy: induction and challenge*; *BioMed research international* **2013**, *2013*, 871936-871936.
- [30] J. D. Fontenot, N. Tjandra, D. Bu, C. Ho, R. C. Montelaro, O. J. Finn; *Biophysical Characterization of One-, Two-, and Three-Tandem Repeats of Human Mucin (muc-1) Protein Core*; *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5386-5394.
- [31] N. Jentoft; *Why are proteins O-glycosylated?*; *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 291-294.
- [32] D. W. Kufe; *Targeting the human MUC1 oncoprotein: A tale of two proteins*; *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 81-84.
- [33] P. D. Vermeer, L. A. Einwalter, T. O. Moninger, T. Rokhlina, J. A. Kern, J. Zabner, M. J. Welsh; *Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor*; *Nature* **2003**, *422*, 322-326.
- [34] K. Ichige, L. Perey, C. A. Vogel, F. Buchegger, D. Kufe; *Expression of the DF3-P epitope in human ovarian carcinomas*; *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 565-571.
- [35] O. J. Finn; *Immunological Weapons Acquired Early in Life Win Battles with Cancer Late in Life*; *J. Immunol.* **2008**, *181*, 1589-1592.
- [36] Y. Zhao, Y. Sato, T. Isaji, T. Fukuda, A. Matsumoto, E. Miyoshi, J. Gu, N. Taniguchi; *Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins*; *FEBS J.* **2008**, *275*, 1939-1948.
- [37] S. S. Pinho, J. Figueiredo, J. Cabral, S. Carvalho, J. Dourado, A. Magalhães, F. Gärtner, A. M. Mendonça, T. Isaji, J. Gu, F. Carneiro, R. Seruca, N. Taniguchi, C. A. Reis; *E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: Functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V*; *BBA-Gen. Subjects* **2013**, *1830*, 2690-2700.
- [38] S. S. Pinho, C. A. Reis, J. Paredes, A. M. Magalhães, A. C. Ferreira, J. Figueiredo, W. Xiaogang, F. Carneiro, F. Gärtner, R. Seruca; *The role of N-acetylglucosaminyltransferase III and V in the post-transcriptional modifications of E-cadherin*; *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 2599-2608.
- [39] H. Takeuchi, R. S. Haltiwanger; *Significance of glycosylation in Notch signaling*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 235-242.
- [40] C. Boscher, J. W. Dennis, I. R. Nabi; *Glycosylation, galectins and cellular signaling*; *Curr. Opin. Cell Biol.* **2011**, *23*, 383-392.
- [41] J. C. M. de-Freitas-Junior, S. Carvalho, A. M. Dias, P. Oliveira, J. Cabral, R. Seruca, C. Oliveira, J. A. Morgado-Díaz, C. A. Reis, S. S. Pinho; *Insulin/IGF-I Signaling Pathways Enhances Tumor Cell Invasion through Bisecting GlcNAc N-glycans Modulation. An Interplay with E-Cadherin*; *PLoS One* **2013**, *8*, e81579.
- [42] C. Gomes, H. Osório, M. T. Pinto, D. Campos, M. J. Oliveira, C. A. Reis; *Expression of ST3GAL4 Leads to SLe^x Expression and Induces c-Met Activation and an Invasive Phenotype in Gastric Carcinoma Cells*; *PLoS One* **2013**, *8*, e66737.
- [43] S. S. Pinho, C. A. Reis; *Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications*; *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 540-555.
- [44] J. W. Dennis, I. R. Nabi, M. Demetriou; *Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease*; *Cell* **2009**, *139*, 1229-1241.
- [45] S. Bassagañas, S. Carvalho, A. M. Dias, M. Pérez-Garay, M. R. Ortiz, J. Figueras, C. A. Reis, S. S. Pinho, R. Peracaula; *Pancreatic Cancer Cell Glycosylation Regulates Cell Adhesion and Invasion through the Modulation of $\alpha 2\beta 1$ Integrin and E-Cadherin Function*; *PLoS One* **2014**, *9*, e98595.

- [46] R. P. Ladenson, S. O. Schwartz, A. C. Ivy; *Incidence of the blood groups and the secretor factor in patients with pernicious anemia and stomach carcinoma*; *Am. J. Med. Sci.* **1949**, 217, 194-197.
- [47] S. I. Hakomori, W. T. Murakami; *Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines*; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, 59, 254-261.
- [48] T. Feizi; *Carbohydrate antigens in human cancer*; *Cancer Surv.* **1985**, 4, 245-269.
- [49] E. H. Holmes, G. K. Ostrander, H. Clausen, N. Graem; *Oncofetal expression of Lex carbohydrate antigens in human colonic adenocarcinomas. Regulation through type 2 core chain synthesis rather than fucosylation*; *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 11331-11338.
- [50] S. Hakomori, R. Kannagi; *Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers*; *Anglais* **1983**, 71, 231-251.
- [51] N. T. Marcos, E. P. Bennett, J. Gomes, A. Magalhaes, C. Gomes, L. David; *ST6GalNAc-I controls expression of sialyl-Tn antigen in gastrointestinal tissues.*; *Frontiers in bioscience* **2011**, 3, 1443 - 1455.
- [52] S. Julien, E. Adriaenssens, K. Ottenberg, A. Furlan, G. Courtand, A.-S. Vercoutter-Edouart, F.-G. Hanisch, P. Delannoy, X. Le Bourhis; *ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity*; *Glycobiology* **2006**, 16, 54-64.
- [53] R. Kannagi, J. Yin, K. Miyazaki, M. Izawa; *Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants—Hakomori's concepts revisited*; *BBA-Gen. Subjects* **2008**, 1780, 525-531.
- [54] A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, in *Advances in Immunology*, Vol. 82, Academic Press, **2004**, pp. 249-293.
- [55] S. J. Gendler, J. M. Burchell, T. Duhig, D. Lamport, R. White, M. Parker, J. Taylor-Papadimitriou; *Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium*; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, 84, 6060-6064.
- [56] C. S. Timpte, A. E. Eckhardt, J. L. Abernethy, R. L. Hill; *Porcine submaxillary gland apomucin contains tandemly repeated, identical sequences of 81 residues*; *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1081-1088.
- [57] R. Gupta, N. Jentoft; *Subunit structure of porcine submaxillary mucin*; *Biochemistry* **1989**, 28, 6114-6121.
- [58] M. C. Rose, J. A. Voynow, *Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease*, Vol. 86, **2006**.
- [59] P. Stanley; *Golgi Glycosylation*; *Cold Spring Harb. Pers.* **2011**, 3.
- [60] P. V. d. Steen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Odenakker; *Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation*; *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 33, 151-208.
- [61] A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler, *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2009**.
- [62] J. D. Marth; *Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*; *Glycobiology* **1996**, 6, 701-705.
- [63] E. P. Bennett, U. Mandel, H. Clausen, T. A. Gerken, T. A. Fritz, L. A. Tabak; *Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family*; *Glycobiology* **2012**, 22, 736-756.
- [64] H. Clausen, E. P. Bennett; *A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation*; *Glycobiology* **1996**, 6, 635-646.
- [65] I. B. J. Yang, M. Lehotay, S. Ogata, S. Itzkowitz, in *Biol. Chem.*, Vol. 382, **2001**, p. 219.
- [66] T. Ju, V. I. Otto, R. D. Cummings; *The Tn Antigen—Structural Simplicity and Biological Complexity*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, 50, 1770-1791.
- [67] K. W. Moremen, M. Tiemeyer, A. V. Nairn; *Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function*; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, 13, 448-462.
- [68] J. Ma, G. Hart; *O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes*; *Clin. Proteomics* **2014**, 11, 8.
- [69] D. T. Tran, K. G. Ten Hagen; *Mucin-type O-Glycosylation during Development*; *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 6921-6929.
- [70] M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson; *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*; *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 45-60.
- [71] D. M. Swallow, S. Gendler, B. Griffiths, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, M. E. Bramwell; *The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM*; *Nature* **1987**, 328, 82-84.

- [72] M. A. Tarp, H. Clausen; *Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development*; *BBA-Gen. Subjects* **2008**, 1780, 546-563.
- [73] F.-G. Hanisch, T. Ninkovic; *Immunology of O-Glycosylated Proteins: Approaches to the Design of a MUC1 Glycopeptide-Based Tumor Vaccine*; *Curr. Protein Pept. Sci.* **2006**, 7, 307-315.
- [74] S. Bafna, S. Kaur, S. K. Batra; *Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells*; *Oncogene* **2010**, 29, 2893-2904.
- [75] S. Pan, R. Chen, Y. Tamura, D. A. Crispin, L. A. Lai, D. H. May, M. W. McIntosh, D. R. Goodlett, T. A. Brentnall; *Quantitative Glycoproteomics Analysis Reveals Changes in N-Glycosylation Level Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*; *J. Proteome Res.* **2014**, 13, 1293-1306.
- [76] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz; *Synthetic Vaccines Consisting of Tumor-Associated MUC1 Glycopeptide Antigens and Bovine Serum Albumin*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, 44, 7624-7630.
- [77] I. Brockhausen; *Sulphotransferases acting on mucin-type oligosaccharides*; *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 318-325.
- [78] J. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou; *O-Linked Glycosylation in the Mammary Gland: Changes that Occur During Malignancy*; *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2001**, 6, 355-364.
- [79] G. Springer; *T and Tn, general carcinoma autoantigens*; *Science* **1984**, 224, 1198-1206.
- [80] T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz; *Synthetic Glycopeptides from the Mucin Family as Potential Tools in Cancer Immunotherapy*; *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, 6, 491-517.
- [81] S. Hakomori; *Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle*; *P. Natl. A. Sci.* **2002**, 99, 10231-10233.
- [82] J. Guthridge, A. M Kaplan, D. A Cohen, *Regulation of B Cell:T Cell Interactions: Potential Involvement of an Endogenous B Cell Sialidase, Vol. 23*, **1994**.
- [83] T. Ju, R. D. Cummings, W. M. Canfield; *Purification, characterization and subunit structure of rat core 1 beta 1,3 galactosyltransferase*; *J. Biol. Chem.* **2001**.
- [84] K. Kumamoto, Y. Goto, K. Sekikawa, S. Takenoshita, N. Ishida, M. Kawakita, R. Kannagi; *Increased Expression of UDP-Galactose Transporter Messenger RNA in Human Colon Cancer Tissues and Its Implication in Synthesis of Thomsen-Friedenreich Antigen and Sialyl Lewis A/X Determinants*; *Cancer Res.* **2001**, 61, 4620-4627.
- [85] A. Fonseca, C. Reis, F. Carvalho, F. Santos-Silva, L. David, M. A. Hollingsworth, P. Mesquita, R. Almeida, T. Caffrey; *Thomsen-Friedenreich antigen expression in gastric carcinomas is associated with MUC1 mucin VNTR polymorphism*; *Glycobiology* **2004**, 15, 511-517.
- [86] S. von Mensdorff-Pouilly, E. Petrakou, P. Kenemans, K. van Uffelen, A. A. Verstraeten, F. G. M. Snijdewint, G. J. van Kamp, D. J. Schol, C. A. Reis, M. R. Price, P. O. Livingston, J. Hilgers; *Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides*; *Int. J. Cancer* **2000**, 86, 702-712.
- [87] C. R. L. Graves, J. F. R. Robertson, A. Murray, M. R. Price, C. J. Chapman; *Malignancy-induced autoimmunity to MUC1: initial antibody characterization*; *J. Pept. Res.* **2005**, 66, 357-363.
- [88] P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. B. Tandler, H. Kunz; *Effects of glycosylation on fragments of tumour associated human epithelial mucin MUC1*; *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1531-1545.
- [89] J. Schuman, A. P. Campbell, R. R. Koganty, B. M. Longenecker; *Probing the conformational and dynamical effects of O-glycosylation within the immunodominant region of a MUC1 peptide tumor antigen*; *J. Pept. Res.* **2003**, 61, 91-108.
- [90] D. M. Coltart, A. K. Royyuru, L. J. Williams, P. W. Glunz, D. Sames, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X.-T. Chen, S. J. Danishefsky, D. H. Live; *Principles of Mucin Architecture: Structural Studies on Synthetic Glycopeptides Bearing Clustered Mono-, Di-, Tri-, and Hexasaccharide Glycodomains*; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9833-9844.
- [91] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid; *Synthesis and Structural Model of an $\alpha(2,6)$ -Sialyl-T Glycosylated MUC1 Eicosapeptide under Physiological Conditions*; *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4981-4993.
- [92] L. Morelli, L. Poletti, L. Lay; *Carbohydrates and Immunology: Synthetic Oligosaccharide Antigens for Vaccine Formulation*; *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 5723-5777.
- [93] J. M. Blander, L. E. Sander; *Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat*; *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, 12, 215-225.
- [94] P. Matzinger; *The Danger Model: A Renewed Sense of Self*; *Science* **2002**, 296, 301-305.
- [95] C. Leclerc, G. Przewlocki, M.-P. Schutze, L. Chedid; *A synthetic vaccine constructed by copolymerization of B and T cell determinants*; *Eur. J. Immunol.* **1987**, 17, 269-273.
- [96] B. Agrawal, M. J. Krantz, M. A. Reddish, B. M. Longenecker; *Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2*; *Nat. Med.* **1998**, 4, 43-49.

- [97] A. K. Chan, D. C. Lockhart, W. v. Bernstorff, R. A. Spanjaard, H.-G. Joo, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure; *Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation*; *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 721-726.
- [98] 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. Edit.* **2005**, *44*, 5985-5988.
- [99] T. F. Ørntoft, N. Harving, N. C. Langkilde; *O-linked mucin-type glycoproteins in normal and malignant colon mucosa: Lack of T-antigen expression and accumulation of tn and sialosyl-Tn antigens in carcinomas*; *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 666-672.
- [100] T. Kjeldsen, H. Clausen, S. Hirohashi, T. Ogawa, H. Iijima, S.-i. Hakomori; *Preparation and Characterization of Monoclonal Antibodies Directed to the Tumor-associated O-linked Sialosyl-2→6 α-N-Acetylgalactosaminyl (Sialosyl-Tn) Epitope*; *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2214-2220.
- [101] F. G. M. Snijdwint, S. von Mensdorff-Pouilly, A. H. Karuntu-Wanamarta, A. A. Verstraeten, I. van Zanten-Przybysz, P. Hummel, H. W. Nijman, P. Kenemans, J. Hilgers; *Cellular and humoral immune responses to MUC1 mucin and tandem-repeat peptides in ovarian cancer patients and controls*; *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, *48*, 47-55.
- [102] S. M. Barratt-Boyes, A. Vlad, O. J. Finn; *Immunization of Chimpanzees with Tumor Antigen MUC1 Mucin Tandem Repeat Peptide Elicits Both Helper and Cytotoxic T-Cell Responses*; *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1918-1924.
- [103] A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen; *Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance*; *Glycobiology* **2006**, *16*, 96-107.
- [104] M. A. Cheever, J. P. Allison, A. S. Ferris, O. J. Finn, B. M. Hastings, T. T. Hecht, I. Mellman, S. A. Prindiville, J. L. Viner, L. M. Weiner, L. M. Matrisian; *The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research*; *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5323-5337.
- [105] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel; *MUC1 and cancer*; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1999**, *1455*, 301-313.
- [106] F.-G. Hanisch, in *Biol. Chem., Vol. 382*, **2001**, p. 143.
- [107] 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.
- [108] F.-G. Hanisch, T. R. E. Stadie, F. Deutzmann, J. Peter-Katalinic; *MUC1 Glycoforms in Breast Cancer*; *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236*, 318-327.
- [109] C. Whitehouse, J. Burchell, S. Gschmeissner, I. Brockhausen, K. O. Lloyd, J. Taylor-Papadimitriou; *A Transfected Sialyltransferase That Is Elevated in Breast Cancer and Localizes to the medial/trans-Golgi Apparatus Inhibits the Development of core-2-based O-Glycans*; *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 1229-1241.
- [110] T. Ju, R. D. Cummings; *A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 β3-galactosyltransferase*; *P. Natl. A. Sci.* **2002**, *99*, 16613-16618.
- [111] T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons; *Glycopeptides as versatile tools for glycobiology*; *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R-136R.
- [112] H. J. Jennings, R. K. Sood, in *Neoglycoconjugates* (Ed.: Y. C. L. T. Lee), Academic Press, Boston, **1994**, pp. 325-371.
- [113] C. H. Chen, T. C. Wu; *Experimental Vaccine Strategies for Cancer Immunotherapy*; *J. Biomed. Sci.* **1998**, *5*, 231-252.
- [114] A. F. Ochsenbein, P. Klenerman, U. Karrer, B. Ludewig, M. Pericin, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel; *Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance*; *P. Natl. A. Sci.* **1999**, *96*, 2233-2238.
- [115] R. M. Zinkernagel; *Localization dose and time of antigens determine immune reactivity*; *Semin. immunol.* **2000**, *12*, 163-171.
- [116] P. O. Livingston; *Approaches to Augmenting the Immunogenicity of Melanoma Gangliosides: From Whole Melanoma Cells to Ganglioside-KLH Conjugate Vaccines*; *Immunol. Rev.* **1995**, *145*, 147-166.
- [117] K. Pobre, M. Tashani, I. Ridda, H. Rashid, M. Wong, R. Booy; *Carrier priming or suppression: Understanding carrier priming enhancement of anti-polysaccharide antibody response to conjugate vaccines*; *Vaccine* **2014**, *32*, 1423-1430.
- [118] E. M. Pöllabauer, R. Petermann, H. J. Ehrlich; *The influence of carrier protein on the immunogenicity of simultaneously administered conjugate vaccines in infants*; *Vaccine* **2009**, *27*, 1674-1679.

- [119] O. T. Avery, W. F. Goebel; *Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: V. the immunological specificity of an antigen prepared by combining the capsular polysaccharide of type III pneumococcus with foreign protein*; *J. Exp. Med.* **1931**, *54*, 437-447.
- [120] Z. Guo, Q. Wang; *Recent development in carbohydrate-based cancer vaccines*; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 608-617.
- [121] F. Helling, A. Shang, M. Calves, S. Zhang, S. Ren, R. K. Yu, H. F. Oettgen, P. O. Livingston; *GD3 Vaccines for Melanoma: Superior Immunogenicity of Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccines*; *Cancer Res.* **1994**, *54*, 197-203.
- [122] R. Rappuoli, E. De Gregorio; *A sweet T cell response*; *Nat. Med. (N. Y., NY, U. S.)* **2011**, *17*, 1551-1552.
- [123] E. Kagan, G. Ragupathi, S. Yi, C. Reis, J. Gildersleeve, D. Kahne, H. Clausen, S. Danishefsky, P. Livingston; *Comparison of antigen constructs and carrier molecules for augmenting the immunogenicity of the monosaccharide epithelial cancer antigen Tn*; *Cancer Immunol. Immunother.* **2005**, *54*, 424-430.
- [124] D. Miles, K. Papazisis; *Rationale for the Clinical Development of STn-KLH (Theratope®) and Anti-MUC-1 Vaccines in Breast Cancer*; *Clin. Breast Cancer* **2003**, *3*, Supplement 4, S134-S138.
- [125] N. K. Ibrahim, J. L. Murray; *Clinical Development of the STn-KLH Vaccine (Theratope®)*; *Clin. Breast Cancer* **2003**, *3*, Supplement 4, S139-S143.
- [126] L. A. Holmberg, D. V. Oparin, T. Gooley, B. M. Sandmaier; *The Role of Cancer Vaccines Following Autologous Stem Cell Rescue in Breast and Ovarian Cancer Patients: Experience with the STn-KLH Vaccine (Theratope®)*; *Clin. Breast Cancer* **2003**, *3*, Supplement 4, S144-S151.
- [127] Y. Zhang, F. Wang; *Carbohydrate drugs: current status and development prospect*; *Drug Discovery Therap.* **2015**, *9*, 79-87.
- [128] L. A. Holmberg, B. M. Sandmaier; *Theratope® vaccine (STn-KLH)*; *Expert Opin. Biol. Ther.* **2001**, *1*, 881-891.
- [129] *Cancer Vaccine THERATOPE® — Biomira; Drugs R&D* **2003**, *4*, 236-240.
- [130] L. A. Holmberg, B. M. Sandmaier; *Vaccination with Theratope® (STn-KLH) as treatment for breast cancer*; *Expert Rev. Vacc.* **2004**, *3*, 655-663.
- [131] T. A. Gilewski, G. Ragupathi, M. Dickler, S. Powell, S. Bhuta, K. Panageas, R. R. Koganty, J. Chin-Eng, C. Hudis, L. Norton, A. N. Houghton, P. O. Livingston; *Immunization of High-Risk Breast Cancer Patients with Clustered sTn-KLH Conjugate plus the Immunologic Adjuvant QS-21*; *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2977-2985.
- [132] M. P. Schutze, C. Leclerc, M. Jolivet, F. Audibert, L. Chedid; *Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines*; *J. Immunol.* **1985**, *135*, 2319-2322.
- [133] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons; *The Immunogenicity of the Tumor-Associated Antigen Lewisy May Be Suppressed by a Bifunctional Cross-Linker Required for Coupling to a Carrier Protein*; *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3517-3524.
- [134] D. Kozbor; *Cancer vaccine with mimotopes of tumor-associated carbohydrate antigens*; *Immunologic Research* **2010**, *46*, 23-31.
- [135] C.-C. Liu, X.-S. Ye; *Carbohydrate-based cancer vaccines: target cancer with sugar bullets*; *Glycoconjugate J.* **2012**, *29*, 259-271.
- [136] L. F. Hutchins, I. Makhoul, P. D. Emanuel, A. Pennisi, E. R. Siegel, F. Jousheghany, X. Guo, A. D. Pashov, B. Monzavi-Karbassi, T. Kieber-Emmons; *Targeting tumor-associated carbohydrate antigens: a phase I study of a carbohydrate mimetic-peptide vaccine in stage IV breast cancer subjects*; *Oncotarget* **2017**, *8*.
- [137] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li; *Synthesis of Tn/T Antigen MUC1 Glycopeptide BSA Conjugates and Their Evaluation as Vaccines*; *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3685-3689.
- [138] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li; *Variation of the Glycosylation Pattern in MUC1 Glycopeptide BSA Vaccines and Its Influence on the Immune Response*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2012**, *51*, 1719-1723.
- [139] H. Cai, M.-S. Chen, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li; *Self-Adjuvanting Synthetic Antitumor Vaccines from MUC1 Glycopeptides Conjugated to T-Cell Epitopes from Tetanus Toxoid*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2013**, *52*, 6106-6110.
- [140] J. R. Broderick; *A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant*; *Lab Anim Sci* **1989**, *39*, 400-405.
- [141] A. Hoffmann-Röder, M. Johannes; *Synthesis of a MUC1-glycopeptide-BSA conjugate vaccine bearing the 3[prime or minute]-deoxy-3[prime or minute]-fluoro-Thomsen-Friedenreich antigen*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011**, *47*, 9903-9905.
- [142] 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. Edit.* **2010**, *49*, 8498-8503.
- [143] 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.
- [144] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz; *A Synthetic Vaccine Consisting of a Tumor-Associated Sialyl-TN-MUC1 Tandem-Repeat Glycopeptide and Tetanus Toxoid: Induction of a Strong and Highly Selective Immune Response*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48*, 7551-7555.
- [145] B. Palitzsch, N. Gaidzik, N. Stergiou, S. Stahn, S. Hartmann, B. Gerlitzki, N. Teusch, P. Flemming, E. Schmitt, H. Kunz; *A Synthetic Glycopeptide Vaccine for the Induction of a Monoclonal Antibody that Differentiates between Normal and Tumor Mammary Cells and Enables the Diagnosis of Human Pancreatic Cancer*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2016**, *55*, 2894-2898.
- [146] 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.
- [147] 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*; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9298-9303.
- [148] J. Ni, H. Song, Y. Wang, N. M. Stamatou, L.-X. Wang; *Toward a Carbohydrate-Based HIV-1 Vaccine: Synthesis and Immunological Studies of Oligomannose-Containing Glycoconjugates*; *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 493-500.
- [149] L. A. Herzenberg, T. Tokuhisa, L. A. Herzenberg; *Carrier-priming leads to hapten-specific suppression*; *Nature* **1980**, *285*, 664-667.
- [150] Q. Wang, Z. Zhou, S. Tang, Z. Guo; *Carbohydrate-Monophosphoryl Lipid A Conjugates Are Fully Synthetic Self-Adjuvanting Cancer Vaccines Eliciting Robust Immune Responses in the Mouse*; *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 235-240.
- [151] X.-G. Yin, X.-Z. Chen, W.-M. Sun, X.-S. Geng, X.-K. Zhang, J. Wang, P.-P. Ji, Z.-Y. Zhou, D. J. Baek, G.-F. Yang, Z. Liu, J. Guo; *IgG Antibody Response Elicited by a Fully Synthetic Two-Component Carbohydrate-Based Cancer Vaccine Candidate with α -Galactosylceramide as Built-in Adjuvant*; *Org. Lett.* **2017**, *19*, 456-459.
- [152] F. Broecker, S. Götze, J. Hudon, D. C. K. Rathwell, C. L. Pereira, P. Stallforth, C. Anish, P. H. Seeberger; *Synthesis, Liposomal Formulation, and Immunological Evaluation of a Minimalistic Carbohydrate- α -GalCer Vaccine Candidate*; *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4918-4927.
- [153] C. Anish, B. Schumann, Claney L. Pereira, Peter H. Seeberger; *Chemical Biology Approaches to Designing Defined Carbohydrate Vaccines*; *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 38-50.
- [154] S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X.-T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky; *Synthetic and Immunological Studies on Clustered Modes of Mucin-Related Tn and TF O-Linked Antigens: The Preparation of a Glycopeptide-Based Vaccine for Clinical Trials against Prostate Cancer*; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12474-12485.
- [155] Z. Zhou, S. S. Mandal, G. Liao, J. Guo, Z. Guo; *Synthesis and Evaluation of GM2-Monophosphoryl Lipid A Conjugate as a Fully Synthetic Self-Adjuvant Cancer Vaccine*; *Scientific Reports* **2017**, *7*, 11403.
- [156] 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. Edit.* **2008**, *47*, 7551-7556.
- [157] 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. Edit.* **2014**, *53*, 1699-1703.
- [158] C. Geraci, G. M. L. Consoli, G. Granata, E. Galante, A. Palmigiano, M. Pappalardo, S. D. Di Puma, A. Spadaro; *First Self-Adjuvant Multicomponent Potential Vaccine Candidates by Tethering of Four or Eight MUC1 Antigenic Immunodominant PDTRP Units on a Calixarene Platform: Synthesis and Biological Evaluation*; *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1710-1720.
- [159] D. M. McDonald, B. L. Wilkinson, L. Corcilius, M. Thaysen-Andersen, S. N. Byrne, R. J. Payne; *Synthesis and immunological evaluation of self-adjuvanting MUC1-macrophage activating lipopeptide 2 conjugate vaccine candidates*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2014**, *50*, 10273-10276.

- [160] S. Borsutzky, K. Kretschmer, P. D. Becker, P. F. Mühlradt, C. J. Kirschning, S. Weiss, C. A. Guzmán; *The Mucosal Adjuvant Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Directly Stimulates B Lymphocytes via the TLR2 without the Need of Accessory Cells*; *J. Immunol.* **2005**, *174*, 6308-6313.
- [161] E. F. Nicholls, L. Madera, R. E. W. Hancock; *Immunomodulators as adjuvants for vaccines and antimicrobial therapy*; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1213*, 46-61.
- [162] K. Smith Korsholm, E. M. Agger, C. Foged, D. Christensen, J. Dietrich, C. S. Andersen, C. Geisler, P. Andersen; *The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes*; *Immunology* **2007**, *121*, 216-226.
- [163] D. H. Persing, R. N. Coler, M. J. Lacy, D. A. Johnson, J. R. Baldrige, R. M. Hershberg, S. G. Reed; *Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators*; *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, s32-s37.
- [164] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira; *Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components*; *Immunity* **1999**, *11*, 443-451.
- [165] V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. M. Bradley, L. B. Pathangey, C. S. Madsen, P. A. Cohen, S. J. Gendler, G.-J. Boons; *Immune recognition of tumor-associated mucin MUC1 is achieved by a fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccine*; *P. Natl. A. Sci.* **2012**, *109*, 261-266.
- [166] P. Thompson, V. Lakshminarayanan, N. T. Supekar, J. M. Bradley, P. A. Cohen, M. A. Wolfert, S. J. Gendler, G.-J. Boons; *Linear synthesis and immunological properties of a fully synthetic vaccine candidate containing a sialylated MUC1 glycopeptide*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2015**, *51*, 10214-10217.
- [167] H. Cai, F. Degliangeli, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, H. Kunz, E. Schmitt, R. Fiammengio, U. Westerlind; *Glycopeptide-functionalized gold nanoparticles for antibody induction against the tumor associated mucin-1 glycoprotein*; *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 1132-1135.
- [168] 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. Edit.* **2013**, *52*, 10652-10656.
- [169] M. Glaffig, B. Palitzsch, N. Stergiou, C. Schüll, D. Straßburger, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz; *Enhanced immunogenicity of multivalent MUC1 glycopeptide antitumor vaccines based on hyperbranched polymers*; *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10150-10154.
- [170] B. Palitzsch, S. Hartmann, N. Stergiou, M. Glaffig, E. Schmitt, H. Kunz; *A Fully Synthetic Four-Component Antitumor Vaccine Consisting of a Mucin Glycopeptide Antigen Combined with Three Different T-Helper-Cell Epitopes*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2014**, *53*, 14245-14249.
- [171] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatisky; *Synthetic therapeutic peptides: science and market*; *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 40-56.
- [172] B. Richichi, B. Thomas, M. Fiore, R. Bosco, H. Qureshi, C. Nativi, O. Renaudet, L. BenMohamed; *A Cancer Therapeutic Vaccine based on Clustered Tn-Antigen Mimetics Induces Strong Antibody-Mediated Protective Immunity*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2014**, *53*, 11917-11920.
- [173] 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.* **2011**, *6*, 252-259.
- [174] Z. Yin, X. Huang; *Recent Development in Carbohydrate Based Anticancer Vaccines*; *J. Carbohydr. Chem.* **2012**, *31*, 143-186.
- [175] S. Wagner, *Synthese und biologische Evaluierung von fluorierten und carbaanalogen Glycopeptiden für die Entwicklung von tumorselektiven Vakzinen*, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2012**.
- [176] E. M. S. Fernández, C. D. Navo, N. Martínez-Sáez, R. Gonçalves-Pereira, V. J. Somovilla, A. Avenoza, J. H. Busto, G. J. L. Bernardes, G. Jiménez-Osés, F. Corzana, J. M. G. Fernández, C. O. Mellet, J. M. Peregrina; *Tn Antigen Mimics Based on sp2-Iminosugars with Affinity for an anti-MUC1 Antibody*; *Org. Lett.* **2016**, *18*, 3890-3893.
- [177] C. D. Navo, I. A. Bermejo, P. Oroz, P. Tovillas, I. Compañón, C. Matías, A. Avenoza, J. H. Busto, M. M. Zurbano, G. Jiménez-Osés, F. Corzana, J. M. Peregrina; *Oxygen by Carbon Replacement at the Glycosidic Linkage Modulates the Sugar Conformation in Tn Antigen Mimics*; *ACS Omega* **2018**, *3*, 18142-18152.
- [178] Y.-D. Wu, S. Gellman; *Peptidomimetics*; *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1231-1232.
- [179] C. M. Goodman, S. Choi, S. Shandler, W. F. DeGrado; *Foldamers as versatile frameworks for the design and evolution of function*; *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 252.
- [180] X. Li, Y.-D. Wu, D. Yang; *α -Aminoxy Acids: New Possibilities from Foldamers to Anion Receptors and Channels*; *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1428-1438.

- [181] H.-J. Lee, J.-W. Song, Y.-S. Choi, H.-M. Park, K.-B. Lee; *A Theoretical Study of Conformational Properties of N-Methyl Azapeptide Derivatives*; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11881-11893.
- [182] T. L. Graybill, M. J. Ross, B. R. Gauvin, J. S. Gregory, A. L. Harris, M. A. Ator, J. M. Rinker, R. E. Dolle; *Synthesis and evaluation of azapeptide-derived inhibitors of serine and cysteine proteases*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1375-1380.
- [183] D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer; *Probing the Helical Secondary Structure of Short-Chain β -Peptides*; *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 2043-2066.
- [184] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado; *β -Peptides: From Structure to Function*; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.
- [185] J. A. Kritzer, O. M. Stephens, D. A. Guarracino, S. K. Reznik, A. Schepartz; *beta-Peptides as inhibitors of protein-protein interactions*; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 11-16.
- [186] H.-D. Arndt, B. Ziemer, U. Koert; *Folding Propensity of Cyclohexylether- δ -peptides*; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3269-3272.
- [187] M. D. P. Risseuw, J. Mazurek, A. van Langenvelde, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, M. Overhand; *Synthesis of alkylated sugar amino acids: conformationally restricted l-Xaa-l-Ser/Thr mimics*; *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2311-2314.
- [188] M. D. P. Risseuw, M. Overhand, G. W. J. Fleet, M. I. Simone; *A compendium of sugar amino acids (SAA): scaffolds, peptide- and glyco-mimetics*; *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2001-2010.
- [189] D. Tuwalska, J. Sienkiewicz, B. Liberek; *Synthesis and conformational analysis of methyl 3-amino-2,3-dideoxyhexopyranosiduronic acids, new sugar amino acids, and their diglycotides*; *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1142-1152.
- [190] R. J. Simon, R. S. Kania, R. N. Zuckermann, V. D. Huebner, D. A. Jewell, S. Banville, S. Ng, L. Wang, S. Rosenberg, C. K. Marlowe; *Peptoids: a modular approach to drug discovery*; *P. Natl. A. Sci.* **1992**, *89*, 9367-9371.
- [191] A. Boeijen, J. van Ameijde, R. M. J. Liskamp; *Solid-Phase Synthesis of Oligoureic Peptidomimetics Employing the Fmoc Protection Strategy*; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8454-8462.
- [192] J. Fremaux, B. Kauffmann, G. Guichard; *Synthesis and Folding Propensity of Aliphatic Oligoureas Containing Repeats of Proline-Type Units*; *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5494-5502.
- [193] F. Karch, A. Hoffmann-Röder; *Synthesis of glycosylated β 3-homo-threonine conjugates for mucin-like glycopeptide antigen analogues*; *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 47.
- [194] N. Winssinger, R. Damoiseaux, D. C. Tully, B. H. Geierstanger, K. Burdick, J. L. Harris; *PNA-Encoded Protease Substrate Microarrays*; *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1351-1360.
- [195] A. Dragulescu-Andrasi, S. Rapireddy, B. M. Frezza, C. Gayathri, R. R. Gil, D. H. Ly; *A Simple γ -Backbone Modification Preorganizes Peptide Nucleic Acid into a Helical Structure*; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10258-10267.
- [196] F. Debaene, J. A. Da Silva, Z. Pianowski, F. J. Duran, N. Winssinger; *Expanding the scope of PNA-encoded libraries: divergent synthesis of libraries targeting cysteine, serine and metallo-proteases as well as tyrosine phosphatases*; *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6577-6586.
- [197] Y. Hu, X. Li, S. M. Sebti, J. Chen, J. Cai; *Design and synthesis of AApeptides: A new class of peptide mimics*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1469-1471.
- [198] Y. Niu, S. Padhee, H. Wu, G. Bai, Q. Qiao, Y. Hu, L. Harrington, W. N. Burda, L. N. Shaw, C. Cao, J. Cai; *Lipo- γ -AApeptides as a New Class of Potent and Broad-Spectrum Antimicrobial Agents*; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4003-4009.
- [199] S. Padhee, Y. Li, J. Cai; *Activity of lipo-cyclic γ -AApeptides against biofilms of Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2565-2569.
- [200] Y. Niu, Y. Hu, X. Li, J. Chen, J. Cai; *γ -AApeptides: design, synthesis and evaluation*; *New J. Chem.* **2011**, *35*, 542-545.
- [201] Y. Yang, Y. Niu, H. Hong, H. Wu, Y. Zhang, J. W. Engle, T. E. Barnhart, J. Cai, W. Cai; *Radiolabeled γ -AApeptides: a new class of tracers for positron emission tomography*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2012**, *48*, 7850-7852.
- [202] Y. Niu, G. Bai, H. Wu, R. E. Wang, Q. Qiao, S. Padhee, R. Buzzeo, C. Cao, J. Cai; *Cellular Translocation of a γ -AApeptide Mimetic of Tat Peptide*; *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1529-1534.
- [203] H. Wu, P. Teng, J. Cai; *Rapid Access to Multiple Classes of Peptidomimetics from Common γ -AApeptide Building Blocks*; *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 1760-1765.
- [204] D. O'Hagan, D. B. Harper; *Fluorine-containing natural products*; *J. Fluorine Chem.* **1999**, *100*, 127-133.
- [205] H. Deng, D. O'Hagan, C. Schaffrath; *Fluorometabolite biosynthesis and the fluorinase from Streptomyces cattleya*; *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 773-784.
- [206] D. B. Harper, D. O'Hagan; *The fluorinated natural products*; *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 123-133.

- [207] J. Rosén, J. Gottfries, S. Muresan, A. Backlund, T. I. Oprea; *Novel Chemical Space Exploration via Natural Products*; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1953-1962.
- [208] D. O'Hagan, H. Deng; *Enzymatic Fluorination and Biotechnological Developments of the Fluorinase*; *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 634-649.
- [209] C. S. Neumann, D. G. Fujimori, C. T. Walsh; *Halogenation Strategies In Natural Product Biosynthesis*; *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 99-109.
- [210] D. O'Hagan, C. Schaffrath, S. L. Cobb, J. T. G. Hamilton, C. D. Murphy; *Biochemistry: Biosynthesis of an organofluorine molecule*; *Nature* **2002**, *416*, 279-279.
- [211] H. Deng, S. M. Cross, R. P. McGlinchey, J. T. G. Hamilton, D. O'Hagan; *In Vitro Reconstituted Biotransformation of 4-Fluorothreonine from Fluoride Ion: Application of the Fluorinase*; *Chemistry and Biology* **2008**, *15*, 1268-1276.
- [212] M. R. Amin, D. B. Harper, J. M. Moloney, C. D. Murphy, J. A. K. Howard, D. O'Hagan; *A short highly stereoselective synthesis of the fluorinated natural product (2S,3S)-4-fluorothreonine*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **1997**, 1471-1472.
- [213] M. Shimizu, T. Yokota, K. Fujimori, T. Fujisawa; *Stereodivergent synthesis of fluorinated threonine derivatives in high optical purity*; *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 835-838.
- [214] C. Scolastico, E. Conca, L. Prati, G. Guanti, L. Banfi, A. Berti, P. Farina, U. Valcavi; *Diastereo- and Enantioselective Synthesis of Fluorinated Threonines*; *Synthesis* **1985**, 1985, 850-855.
- [215] H. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl; *Fluorine in medicinal chemistry.*; *Chembiochem* **2004**, *3*, 637-643.
- [216] D. O'Hagan; *Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond*; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 308-319.
- [217] L. Hunter; *The C-F bond as a conformational tool in organic and biological chemistry*; *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 38.
- [218] L. E. Zimmer, C. Sparr, R. Gilmour; *Fluorine Conformational Effects in Organocatalysis: An Emerging Strategy for Molecular Design*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, *50*, 11860-11871.
- [219] D. Y. Buissonneaud, T. van Mourik, D. O'Hagan; *A DFT study on the origin of the fluorine gauche effect in substituted fluoroethanes*; *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2196-2202.
- [220] R. J. Abraham, E. J. Chambers, W. A. Thomas; *Conformational analysis. Part 22. An NMR and theoretical investigation of the gauche effect in fluoroethanols*; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 949-955.
- [221] Y. Zhou, J. Wang, Z. Gu, S. Wang, W. Zhu, J. L. Aceña, V. A. Soloshonok, K. Izawa, H. Liu; *Next Generation of Fluorine-Containing Pharmaceuticals, Compounds Currently in Phase II-III Clinical Trials of Major Pharmaceutical Companies: New Structural Trends and Therapeutic Areas*; *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 422-518.
- [222] C. Isanbor, D. O'Hagan; *Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents*; *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 303-319.
- [223] K. Müller, C. Faeh, F. Diederich; *Fluorine in Pharmaceuticals: Looking Beyond Intuition*; *Science* **2007**, *317*, 1881-1886.
- [224] R. Filler, R. Saha; *Fluorine in medicinal chemistry: a century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights*; *Future Medicinal Chemistry* **2009**, *1*, 777-791.
- [225] T. Yamazaki, T. Taguchi, I. Ojima, in *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Ltd, **2009**, pp. 1-46.
- [226] B. Bilgiçer, A. Fichera, K. Kumar; *A Coiled Coil with a Fluorous Core*; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4393-4399.
- [227] A. Niemcz, D. A. Tirrell; *Self-Association and Membrane-Binding Behavior of Melittins Containing Trifluoroisoleucine*; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7407-7413.
- [228] P. Wang, Y. Tang, D. A. Tirrell; *Incorporation of Trifluoroisoleucine into Proteins in Vivo*; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6900-6906.
- [229] S. K. Holmgren, K. M. Taylor, L. E. Bretscher, R. T. Raines; *Code for collagen's stability deciphered*; *Nature* **1998**, *392*, 666-667.
- [230] M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, Y. Kobayashi; *Characterization of Collagen Model Peptides Containing 4-Fluoroproline; (4S)-Fluoroproline-Pro-Gly)10 Forms a Triple Helix, but (4R)-Fluoroproline-Pro-Gly)10 Does Not*; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9922-9923.
- [231] R. Improta, F. Mele, O. Crescenzi, C. Benzi, V. Barone; *Understanding the Role of Stereoelectronic Effects in Determining Collagen Stability. 2. A Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study of (Proline-Proline-Glycine)_n Polypeptides*; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7857-7865.
- [232] M. P. Hinderaker, R. T. Raines; *An electronic effect on protein structure*; *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1188-1194.

- [233] S. Park, R. J. Radmer, T. E. Klein, V. S. Pande; *A new set of molecular mechanics parameters for hydroxyproline and its use in molecular dynamics simulations of collagen-like peptides*; *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1612-1616.
- [234] C. L. Jenkins, R. T. Raines; *Insights on the conformational stability of collagen*; *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 49-59.
- [235] M. D. Shoulders, K. J. Kamer, R. T. Raines; *Origin of the stability conferred upon collagen by fluorination*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3859-3862.
- [236] M. L. DeRider, S. J. Wilkens, M. J. Waddell, L. E. Bretscher, F. Weinhold, R. T. Raines, J. L. Markley; *Collagen Stability: Insights from NMR Spectroscopic and Hybrid Density Functional Computational Investigations of the Effect of Electronegative Substituents on Prolyl Ring Conformations*; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2497-2505.
- [237] J. A. Hodges, R. T. Raines; *Stereoelectronic and Steric Effects in the Collagen Triple Helix: Toward a Code for Strand Association*; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15923-15932.
- [238] L. E. Bretscher, C. L. Jenkins, K. M. Taylor, M. L. DeRider, R. T. Raines; *Conformational Stability of Collagen Relies on a Stereoelectronic Effect*; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 777-778.
- [239] J. A. Hodges, R. T. Raines; *Stereoelectronic Effects on Collagen Stability: The Dichotomy of 4-Fluoroproline Diastereomers*; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9262-9263.
- [240] M. Doi, Y. Nishi, N. Kiritoshi, T. Iwata, M. Nago, H. Nakano, S. Uchiyama, T. Nakazawa, T. Wakamiya, Y. Kobayashi; *Simple and efficient syntheses of Boc- and Fmoc-protected 4(R)- and 4(S)-fluoroproline solely from 4(R)-hydroxyproline*; *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8453-8459.
- [241] R. T. Raines; *2005 Emil Thomas Kaiser Award*; *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1219-1225.
- [242] S. Sakakibara, K. Inouye, K. Shudo, Y. Kishida, Y. Kobayashi, D. J. Prockop; *Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of defined molecular weights Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxyproline*; *BBA-Protein Struct. M.* **1973**, *303*, 198-202.
- [243] E. S. Eberhardt, N. Panasik, R. T. Raines; *Inductive Effects on the Energetics of Prolyl Peptide Bond Isomerization: Implications for Collagen Folding and Stability*; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12261-12266.
- [244] D. O'Hagan, C. Bilton, J. A. K. Howard, L. Knight, D. J. Tozer; *The preferred conformation of N-[small beta]-fluoroethylamides. Observation of the fluorine amide gauche effect*; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 605-607.
- [245] S. D. Mooney, P. A. Kollman, T. E. Klein; *Conformational preferences of substituted prolines in the collagen triple helix*; *Biopolymers* **2002**, *64*, 63-71.
- [246] J. T. Gerig, R. S. McLeod; *Conformations of cis- and trans-4-fluoro-yl-proline in aqueous solution*; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5725-5729.
- [247] A. Choudhary, R. W. Newberry, R. T. Raines; *n→π* Interactions Engender Chirality in Carbonyl Groups*; *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3421-3423.
- [248] G.-J. Hofman, E. Ottoy, M. E. Light, B. Kieffer, I. Kuprov, J. C. Martins, D. Sinnaeve, B. Linclau; *Minimising conformational bias in fluoroprolines through vicinal difluorination*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2018**, *54*, 5118-5121.
- [249] G.-J. Hofman, E. Ottoy, M. E. Light, B. Kieffer, J. C. Martins, I. Kuprov, D. Sinnaeve, B. Linclau; *Synthesis and Conformational Properties of 3,4-Difluoro-l-prolines*; *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 3100-3120.
- [250] S. J. M. Verhoorck, P. M. Killoran, C. R. Coxon; *Fluorinated Prolines as Conformational Tools and Reporters for Peptide and Protein Chemistry*; *Biochemistry* **2018**, *57*, 6132-6143.
- [251] N. A. Meanwell; *Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Biososteres for Drug Design*; *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5822-5880.
- [252] E. P. Gillis, K. J. Eastman, M. D. Hill, D. J. Donnelly, N. A. Meanwell; *Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry*; *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8315-8359.
- [253] A. K. Pandey, D. Naduthambi, K. M. Thomas, N. J. Zondlo; *Proline Editing: A General and Practical Approach to the Synthesis of Functionally and Structurally Diverse Peptides. Analysis of Steric versus Stereoelectronic Effects of 4-Substituted Prolines on Conformation within Peptides*; *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4333-4363.
- [254] P. W. Chia, M. R. Livesey, A. M. Z. Slawin, T. van Mourik, D. J. A. Wyllie, D. O'Hagan; *3-Fluoro-N-methyl-D-aspartic acid (3F-NMDA) Stereoisomers as Conformational Probes for Exploring Agonist Binding at NMDA Receptors*; *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8813-8819.
- [255] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur; *Fluorine in medicinal chemistry*; *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330.
- [256] C. Siebler, B. Maryasin, M. Kuemin, R. S. Erdmann, C. Rigling, C. Grünenfelder, C. Ochsenfeld, H. Wennemers; *Importance of dipole moments and ambient polarity for the conformation of Xaa-Pro moieties – a combined experimental and theoretical study*; *Chemical Science* **2015**, *6*, 6725-6730.

- [257] C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder; *Fluoroprolines as Tools for Protein Design and Engineering*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, *40*, 923-925.
- [258] K. Jansen, L. Heirbaut, R. Verkerk, J. D. Cheng, J. Joossens, P. Cos, L. Maes, A.-M. Lambeir, I. De Meester, K. Augustyns, P. Van der Veken; *Extended Structure–Activity Relationship and Pharmacokinetic Investigation of (4-Quinolinoyl)glycyl-2-cyanopyrrolidine Inhibitors of Fibroblast Activation Protein (FAP)*; *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3053-3074.
- [259] D. D. Staas, K. L. Savage, V. L. Sherman, H. L. Shimp, T. A. Lyle, L. O. Tran, C. M. Wiscount, D. R. McMasters, P. E. J. Sanderson, P. D. Williams, B. J. Lucas, J. A. Krueger, S. D. Lewis, R. B. White, S. Yu, B. K. Wong, C. J. Kochansky, M. R. Anari, Y. Yan, J. P. Vacca; *Discovery of potent, selective 4-fluoroproline-based thrombin inhibitors with improved metabolic stability*; *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6900-6916.
- [260] C. Jansen, *Synthese von Analoga des MUC1 Glycopeptids unter Verwendung von fluorierten Prolinen*, Master Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München (München), **2012**.
- [261] V. J. Somovilla, I. A. Bermejo, I. S. Albuquerque, N. Martínez-Sáez, J. Castro-López, F. García-Martín, I. Compañón, H. Hinou, S.-I. Nishimura, J. Jiménez-Barbero, J. L. Asensio, A. Avenoza, J. H. Busto, R. Hurtado-Guerrero, J. M. Peregrina, G. J. L. Bernardes, F. Corzana; *The Use of Fluoroproline in MUC1 Antigen Enables Efficient Detection of Antibodies in Patients with Prostate Cancer*; *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18255-18261.
- [262] O. Blixt, D. Bueti, B. Burford, D. Allen, S. Julien, M. Hollingsworth, A. Gammerman, I. Fentiman, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell; *Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis*; *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R25.
- [263] Y. Hamanaka, Y. Suehiro, M. Fukui, K. Shikichi, K. Imai, Y. Hinoda; *Circulating anti-MUC1 IgG antibodies as a favorable prognostic factor for pancreatic cancer*; *Int. J. Cancer* **2003**, *103*, 97-100.
- [264] S. von Mensdorff-Pouilly, A. A. Verstraeten, P. Kenemans, F. G. M. Snijdwint, A. Kok, G. J. Van Kamp, M. A. Paul, P. J. Van Diest, S. Meijer, J. Hilgers; *Survival in Early Breast Cancer Patients Is Favorably Influenced by a Natural Humoral Immune Response to Polymorphic Epithelial Mucin*; *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 574.
- [265] Z.-M. Tang, Z.-G. Ling, C.-M. Wang, Y.-B. Wu, J.-L. Kong; *Serum tumor-associated autoantibodies as diagnostic biomarkers for lung cancer: A systematic review and meta-analysis*; *PLoS One* **2017**, *12*, e0182117.
- [266] H. Chen, S. Werner, S. Tao, I. Zörnig, H. Brenner; *Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer*; *Cancer Lett.* **2014**, *346*, 178-187.
- [267] Y. Tang, X. Cui, H. Xiao, S. Qi, X. Hu, Q. Yu, G. Shi, X. Zhang, J. Gu, Y. Yu, L. Wang, Y. Li; *Binding of circulating anti-MUC1 antibody and serum MUC1 antigen in stage IV breast cancer*; *Molecular Medicine Reports* **2017**, *15*, 2659-2664.
- [268] Y. Tang, L. Wang, P. Zhang, H. Wei, R. Gao, X. Liu, Y. Yu, L. Wang; *Detection of Circulating Anti-Mucin 1 (MUC1) Antibodies in Breast Tumor Patients by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Recombinant MUC1 Protein Containing Six Tandem Repeats and Expressed in *Escherichia coli**; *Clin. Vaccine Immunol.* **2010**, *17*, 1903-1908.
- [269] E. Gheybi, J. Amani, A. H. Salmanian, F. Mashayekhi, S. Khodi; *Designing a recombinant chimeric construct contain MUC1 and HER2 extracellular domain for prediagnostic breast cancer*; *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 11489-11497.
- [270] U. Karsten, N. Serttas, H. Paulsen, A. Danielczyk, S. Goletz; *Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumor-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1)*; *Glycobiology* **2004**, *14*, 681-692.
- [271] N. Martínez-Sáez, J. Castro-López, J. Valero-González, D. Madariaga, I. Compañón, V. J. Somovilla, M. Salvadó, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, A. Avenoza, J. H. Busto, G. J. L. Bernardes, J. M. Peregrina, R. Hurtado-Guerrero, F. Corzana; *Deciphering the Non-Equivalence of Serine and Threonine O-Glycosylation Points: Implications for Molecular Recognition of the Tn Antigen by an anti-MUC1 Antibody*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2015**, *54*, 9830-9834.
- [272] L. Demange, J. Cluzeau, A. Ménez, C. Dugave; *Synthesis of optically pure N-Boc-protected (2R,3R)- and (2R,3S)-3-fluoroprolines*; *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 651-653.
- [273] B. C. Kim, K.-Y. Kim, H. B. Lee, H. Shin; *Development of a Kilogram-Scale Synthesis of cis-LC15-0133 Tartrate, a Potent Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor*; *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 626-631.
- [274] K. Hamacher; *Synthesis of N.C.A. cis- and trans-4-[18F]fluoro-l-proline, radiotracers for PET-investigation of disordered matrix protein synthesis*; *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1999**, *42*, 1135-1144.
- [275] A. Suzuki, M. Mae, H. Amii, K. Uneyama; *Catalytic Route to the Synthesis of Optically Active β,β -Difluoroglutamic Acid and β,β -Difluoroproline Derivatives*; *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5132-5134.

- [276] L. Demange, A. Ménez, C. Dugave; *Practical synthesis of Boc and Fmoc protected 4-fluoro and 4-difluoroprolines from trans-4-hydroxyproline*; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1169-1172.
- [277] F.-G. Hanisch, S. Müller; *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*; *Glycobiology* **2000**, 10, 439-449.
- [278] T. Ninkovic, L. Kinarsky, K. Engelmann, V. Pisarev, S. Sherman, O. J. Finn, F.-G. Hanisch; *Identification of O-glycosylated decapeptides within the MUC1 repeat domain as potential MHC class I (A2) binding epitopes*; *Mol. Immunol.* **2009**, 47, 131-140.
- [279] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings; *Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc*; *J. Cell Biol.* **2008**, 182, 531-542.
- [280] T. Becker, *Synthese tumorassoziiertes Glycopeptidkonjugate basierend auf den epithelialen Mucinen MUC1 und MUC4 als potentielle Antitumorvakzine*, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2006**.
- [281] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz; *Synthesis of Glycopeptides Containing Carbohydrate and Peptide Recognition Motifs*; *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4495-4538.
- [282] S. J. Danishefsky, J. R. Allen; *From the Laboratory to the Clinic: A Retrospective on Fully Synthetic Carbohydrate-Based Anticancer Vaccines*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2000**, 39, 836-863.
- [283] Z. Guo, G.-J. Boons, *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies, Vol. 1*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2009**.
- [284] V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, I. F. McKenzie; *MUC1 and breast cancer*; *Curr Opin Mol Ther* **1999**, 1, 98-103.
- [285] V. Apostolopoulos, G. A. Pietersz, A. Tsibanis, A. Tsikkinis, H. Drakaki, B. E. Loveland, S. J. Piddlesden, M. Plebanski, D. S. Pouniotis, M. N. Alexis, I. F. McKenzie, S. Vassilaros; *Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]*; *Breast Cancer Res* **2006**, 8, R27.
- [286] T. Peters Jr, in *Adv. Protein Chem., Vol. Volume 37* (Eds.: J. T. E. C.B. Anfinsen, M. R. Frederic), Academic Press, **1985**, pp. 161-245.
- [287] H. Kunz, S. Birnbach; *Synthesis of O-Glycopeptides of the Tumor-Associated TN- and T-Antigen Type and Their Binding to Bovine Serum Albumin*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **1986**, 25, 360-362.
- [288] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz; *Eine vollsynthetische Vakzine aus einem tumorassoziierten Glycopeptid-Antigen und einem T-Zell-Epitop zur Induktion einer hochspezifischen humoralen Immunantwort*; *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803-7808.
- [289] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz; *Synthetische Vakzine aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptidantigenen und einem T-Zellepitop für die Induzierung einer hochspezifischen humoralen Immunantwort*; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7662-7667.
- [290] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz; *Ein synthetischer Impfstoff aus einem tumorassoziierten Sialyl-TN-MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptid und Tetanustoxoid zur Induktion einer starken, hochselektiven Immunantwort*; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7688-7692.
- [291] S. Wagner, C. Mersch, A. Hoffmann-Röder; *Fluorinated Glycosyl Amino Acids for Mucin-Like Glycopeptide Antigen Analogues*; *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 7319-7330.
- [292] R. B. Merrifield; *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [293] R. B. Merrifield; *Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin**; *Biochemistry* **1964**, 3, 1385-1390.
- [294] C.-D. Chang, J. Meienhofer; *Solid-phase Peptide Synthesis using mild base cleavage of N- α -Fluorenylmethoxycarbonylamino acids, exemplified by a Synthesis of Dihydrosomatostatin*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, 11, 246-249.
- [295] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams; *A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids*; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 537-539.
- [296] L. A. Carpino, G. Y. Han; *9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group*; *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404-3409.
- [297] R. A. Houghten; *General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids*; *P. Natl. A. Sci.* **1985**, 82, 5131-5135.
- [298] A. Dryland, R. C. Sheppard; *Peptide synthesis. Part 8. A system for solid-phase synthesis under low pressure continuous flow conditions*; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 125-137.
- [299] L. R. Cameron, J. L. Holder, M. Meldal, R. C. Sheppard; *Peptide synthesis. Part 13. Feedback control in solid phase synthesis. Use of fluorenylmethoxycarbonyl amino acid 3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl esters in a fully automated system*; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 2895-2901.

- [300] P. W. Small, D. C. Sherrington; *Design and application of a new rigid support for high efficiency continuous-flow peptide synthesis*; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1589-1591.
- [301] H. M. Yu, S. T. Chen, K. T. Wang; *Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation*; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4781-4784.
- [302] S. Fekete, J.-L. Veuthey, D. Guillarme; *New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: Theory and applications*; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *69*, 9-27.
- [303] T. Katsila, A. P. Siskos, C. Tamvakopoulos; *Peptide and protein drugs: The study of their metabolism and catabolism by mass spectrometry*; *Mass Spectrom. Rev.* **2012**, *31*, 110-133.
- [304] L. A. Carpino; *Oxidative Reactions of Hydrazines. IV. Elimination of Nitrogen from 1,1-Disubstituted-2-arenesulfonylhydrazides 1-4*; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4427-4431.
- [305] L. A. Carpino, G. Y. Han; *9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group*; *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [306] M. Pennington, in *Peptide Synthesis Protocols*, Vol. 35 (Eds.: M. Pennington, B. Dunn), Humana Press, **1995**, pp. 41-62.
- [307] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimre, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C.-D. Chang; *Solid Phase Synthesis without Repetitive Acidolysis*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35-42.
- [308] G. W. Anderson, F. M. Callahan; *t-Butyl Esters of Amino Acids and Peptides and their Use in Peptide Synthesis I*; *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3359-3363.
- [309] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug; *Preparation and Properties of N^α-9-Fluorenylmethoxycarbonylamino Acids bearing tert-Butyl Side Chain Protection* *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.
- [310] G. Barany, R. B. Merrifield; *A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function*; *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7363-7365.
- [311] K.-H. Hsieh, M. M. Demaine, S. Gurusidaiah; *Side reactions in solid-phase peptide synthesis and their applications*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *48*, 292-298.
- [312] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone; *A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptides*; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778-779.
- [313] S. Matysiak, T. Böldicke, W. Tegge, R. Frank; *Evaluation of monomethoxytrityl and dimethoxytrityl as orthogonal amino protecting groups in Fmoc solid phase peptide synthesis*; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1733-1734.
- [314] A. Loffet, H. X. Zhang; *Allyl-based groups for side-chain protection of amino-acids*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 346-351.
- [315] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward; *Photosensitive protecting groups*; *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333-6335.
- [316] R. B. Merrifield; *Solid Phase Synthesis (Nobel Lecture)*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **1985**, *24*, 799-810.
- [317] R. B. Merrifield; *Automated Synthesis of Peptides*; *Science* **1965**, *150*, 178-185.
- [318] E. Bayer, M. Dengler, B. Hemmasi; *Peptide synthesis on the new polyoxyethylene-polystyrene graft copolymer, synthesis of insulin B 21-30*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, *25*, 178-186.
- [319] E. Bayer; *Towards the Chemical Synthesis of Proteins*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **1991**, *30*, 113-129.
- [320] M. Meldal; *Pega: a flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis*; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- [321] F. García-Martín, M. Quintanar-Audelo, Y. García-Ramos, L. J. Cruz, C. Gravel, R. Furic, S. Côté, J. Tulla-Puche, F. Albericio; *ChemMatrix, a Poly(ethylene glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides*; *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213-220.
- [322] S.-S. Wang; *p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments*; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [323] R. C. Sheppard, B. J. Williams; *Acid-labile resin linkage agents for use in solid phase peptide synthesis*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451-454.
- [324] H. Rink; *Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin*; *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [325] F. Albericio, N. Kneib-Cordonier, S. Biancalana, L. Gera, R. I. Masada, D. Hudson, G. Barany; *Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions*; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3730-3743.
- [326] J. A. N. Izdebski, A. Orłowska, R. Anulewicz, E. W. A. Witkowska, D. Fierstek; *Reinvestigation of the reactions of carbodiimides with alkoxy-carbonylamino acid symmetrical anhydrides*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 184-189.
- [327] S. Els, A. G. Beck-Sickinger, C. Chollet, in *Methods Enzymol.*, Vol. Volume 485 (Ed.: P. M. Conn), Academic Press, **2010**, pp. 103-121.

- [328] W. König, R. Geiger; *Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen*; *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [329] L. A. Carpino; *1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive*; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [330] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen; *New coupling reagents in peptide chemistry*; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- [331] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro; *PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product*; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [332] M. Itoh; *Peptides. IV. Racemization Suppression by the Use of Ethyl 2-Hydroximino-2-cyanoacetate and Its Amide*; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 2219-2221.
- [333] R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham, F. Albericio; *Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion[1]*; *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394-9403.
- [334] A. El-Faham, R. S. Funosas, R. Prohens, F. Albericio; *COMU: A Safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents*; *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404-9416.
- [335] S. Abu-Baker, P. Garber, B. Hina, T. Reed, G. Shahrokh, M. Al-Saghir, G. Lorigan; *Microwave Assisted Peptide Synthesis as a New Gold Standard in Solid Phase Peptide Synthesis: Phospholamban as an Example*; *J. Synth. Theory Appl.* **2014**, *3*, 1-4.
- [336] J. O. Y. Bedford, C. Hyde, T. Johnson, W. E. N. Jun, D. Owen, M. Quibell, R. C. Sheppard; *Amino acid structure and "difficult sequences" in solid phase peptide synthesis*; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 300-307.
- [337] T. Haack, M. Mutter; *Serine derived oxazolidines as secondary structure disrupting, solubilizing building blocks in peptide synthesis*; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589-1592.
- [338] M. Mutter, A. Nefzi, T. Sato, X. Sun, F. Wahl, T. Wöhr; *Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing "inaccessible" peptides*; *Pept Res* **1995**, *8*, 145-153.
- [339] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter; *Pseudo-Prolines as a Solubilizing, Structure-Disrupting Protection Technique in Peptide Synthesis*; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218-9227.
- [340] J. Lauer, C. Fields, G. Fields; *Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis*; *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 197-205.
- [341] R. M. Valerio, P. F. Alewood, R. B. Johns; *Synthesis of Optically Active 2-(tert-Butyloxycarbonylamino)-4-dialkoxyphosphorylbutanoate Protected Isosteres of O-Phosphoserine for Peptide Synthesis*; *Synthesis* **1988**, 1988, 786-789.
- [342] P. Sjölin, M. Elofsson, J. Kihlberg; *Removal of Acyl Protective Groups from Glycopeptides: Base Does Not Epimerize Peptide Stereocenters, and β -Elimination Is Slow*; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 560-565.
- [343] J. Kihlberg, T. Vuljanic; *Piperidine is preferable to morpholine for Fmoc cleavage in solid phase synthesis of O-linked glycopeptides*; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6135-6138.
- [344] T. Vuljanic, K.-E. Bergquist, H. Clausen, S. Roy, J. Kihlberg; *Piperidine is preferred to morpholine for Fmoc cleavage in solid phase glycopeptide synthesis as exemplified by preparation of glycopeptides related to HIV gp120 and mucins*; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7983-8000.
- [345] L. A. Carpino, B. J. Cohen, K. E. Stephens, S. Y. Sadat-Aalae, J. H. Tien, D. C. Langridge; *(Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl (Fmoc) amino acid chlorides. Synthesis, characterization, and application to the rapid synthesis of short peptide segments*; *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732-3734.
- [346] C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, R. L. Noble; *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*; *Pept Res* **1991**, *4*, 95-101.
- [347] A. Speicher, T. Klaus, T. Eicher; *O-(1-Benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphat (HBTU) und O-(7-Aza-1-benzotriazolyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphat (HATU) – Two Modern Peptide Coupling Reagents*; *J. Prakt. Chem.* **1998**, *340*, 581-583.
- [348] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham; *Peptide Coupling in the Presence of Highly Hindered Tertiary Amines*; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2460-2465.
- [349] R. Kaifu, T. Osawa; *Syntheses of O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O-(2-acetamido-2-deoxy- α (and - β)-D-galactopyranosyl)-N-tosyl-L-serine and their interaction with d-galactose-binding lectins*; *Carbohydr. Res.* **1979**, *69*, 79-88.
- [350] R. M. Ratcliffe, D. A. Baker, R. U. Lemieux; *Synthesis of the T [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc]-antigenic determinant in a form useful for the preparation of an effective artificial antigen and the corresponding immunoadsorbent*; *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, 35-41.

- [351] H. Paulsen, J.-P. Hölck; *Synthese der glycopeptide O- β -d-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O-(2-acetamido-2-desoxy- α -d-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-l-serin und -l-threonin*; *Carbohydr. Res.* **1982**, 109, 89-107.
- [352] H. Paulsen, M. Schultz; *Bausteine von Oligosacchariden, LXXIII. Synthese der Tetrapeptidsequenz 12 bis 15 des Asialoglycophorin A mit vier Disaccharid-Seitenketten*; *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 1986, 1435-1447.
- [353] C. Plattner, M. Höfener, N. Sewald; *One-Pot Azidochlorination of Glycals*; *Org. Lett.* **2011**, 13, 545-547.
- [354] N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock; *Synthesis of glycopeptide sequences of repeating units of the mucins MUC 2 and MUC 3 containing oligosaccharide side-chains with core 1, core 2, core 3, core 4 and core 6 structure*; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2359-2368.
- [355] H. Paulsen, K. Adermann; *Synthese von O-Glycopeptid-Sequenzen des N-Terminus von Interleukin-2*; *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1989, 751-769.
- [356] B. Helferich, K.-F. Wedemeyer; *Zur Darstellung von Glucosiden aus Acetobromglucose*; *Liebigs. Ann. Chem.* **1949**, 563, 139-145.
- [357] B. Helferich, K. Weis; *Zur Synthese von Glucosiden und von nicht-reduzierenden Disacchariden*; *Chem. Ber.* **1956**, 89, 314-321.
- [358] 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.
- [359] S. Hanessian, *Preparative Carbohydrate Chemistry*, Marcel Dekker Inc, New York, **1997**.
- [360] B. Liebe, H. Kunz; *Solid-Phase Synthesis of a Tumor-Associated Sialyl-TN Antigen Glycopeptide with a Partial Sequence of the "Tandem Repeat" of the MUC-1 Mucin*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **1997**, 36, 618-621.
- [361] C. Mersch, *Synthese von MUC1-Glycopeptid-Konjugaten mit fluorierten Analoga des Thomsen-Friedenreich Antigens, Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2011**.
- [362] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 3. Auflage*, Wiley-VCH, Weinheim Verlags GmbH, **2007**.
- [363] A. Pathigoola, R. G. Gonnade, K. M. Sureshan; *Topochemical Click Reaction: Spontaneous Self-Stitching of a Monosaccharide to Linear Oligomers through Lattice-Controlled Azide-Alkyne Cycloaddition*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2012**, 51, 4362-4366.
- [364] G. Zemplén, E. Pacsu; *Über die Verseifung acetylierter Zucker und verwandter Substanzen*; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, 62, 1613-1614.
- [365] R. Orth, M. Pitscheider, S. A. Sieber; *Chemical Probes for Labeling of the Bacterial Glucosaminidase NagZ via the Huisgen Cycloaddition*; *Synthesis* **2010**, 2010, 2201-2206.
- [366] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe; *The azidonitration of tri-O-acetyl-D-galactal*; *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244-1251.
- [367] B. Liebe, H. Kunz; *Solid-Phase Synthesis of a Sialyl-Tn-Glycoundecapeptide of the MUC1 Repeating Unit*; *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473-1482.
- [368] S. Dziadek, *Entwicklung synthetischer Antitumorvakzine basierend auf komplexen tumorassoziierten Glycopeptidkonjugaten aus dem epithelialen Mucin MUC1, Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2004**.
- [369] Z. Wu, X. Guo, Z. Guo; *Chemoenzymatic synthesis of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycopeptides*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2010**, 46, 5773-5774.
- [370] C. Brocke, H. Kunz; *Synthetic Glycopeptides of the Tandem Repeat Sequence of the Epithelial Mucin MUC4 with Tumour-associated Carbohydrate Antigens*; *Synlett* **2003**, 2003, 2052-2056.
- [371] G. Zemplén, A. Kunz; *Über die Natriumverbindungen der Glucose und die Verseifung der acylierten Zucker*; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1923**, 56, 1705-1710.
- [372] B. Liebe, H. Kunz; *Synthesis of sialyl-Tn antigen. Regioselective sialylation of a galactosamine threonine conjugate unblocked in the carbohydrate portion*; *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8777-8778.
- [373] C. Brocke, H. Kunz; *Synthetic Tumor-Associated Glycopeptide Antigens from the Tandem Repeat Sequence of the Epithelial Mucin MUC4*; *Synthesis* **2004**, 2004, 525,542.
- [374] C. Brocke, H. Kunz; *Synthetic Tumor-Associated Glycopeptide Antigens from the Tandem Repeat Sequence of the Epithelial Mucin MUC4*; *Synthesis* **2004**, 2004, 525-542.
- [375] E. Müller, H. Huber-Emden; *Untersuchungen an Diazomethanen, XVII. Darstellung und Reaktionen von Diazoessigsäure-tert.-butylester*; *Liebigs. Ann. Chem.* **1962**, 660, 54-59.
- [376] M. Karplus; *Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance*; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870-2871.
- [377] J. Renkel, *Synthese von fluorierten Aminosäurebausteinen für MUC1-Glycopeptidanaloga, Diplomarbeit*, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **2010**.

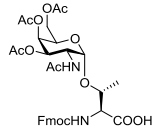
- [378] H. Ding, A. Shigenaga, K. Sato, K. Morishita, A. Otaka; *Dual Kinetically Controlled Native Chemical Ligation Using a Combination of Sulfanylproline and Sulfanylethylanilide Peptide*; *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5588-5591.
- [379] J. Watts, L. Luu, V. McKee, E. Carey, F. Kelleher; *Structure-Reactivity Studies of Simple 4-Hydroxyprolinamide Organocatalysts in the Asymmetric Michael Addition Reaction of Aldehydes to Nitroolefins*; *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1035-1042.
- [380] B. Amgarten, R. Rajan, N. Martinez-Saez, B. L. Oliveira, I. S. Albuquerque, R. A. Brooks, D. G. Reid, M. J. Duer, G. J. L. Bernardes; *Collagen labelling with an azide-proline chemical reporter in live cells*; *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2015**, *51*, 5250-5252.
- [381] P. Barraclough, C. A. Spray, D. W. Young; *Synthesis of (2S,3R)- and (2S,3S)-[3-2H1]-proline via highly stereoselective hydrolysis of a silyl enol ether*; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4653-4655.
- [382] C. Loenarz, J. Mecinović, R. Chowdhury, L. A. McNeill, E. Flashman, C. J. Schofield; *Evidence for a Stereoelectronic Effect in Human Oxygen Sensing*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48*, 1784-1787.
- [383] 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*; *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 366-369.
- [384] K. Murphy, A. Heimberger, D. Loh; *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+ CD8+ TCRlo thymocytes in vivo*; *Science* **1990**, *250*, 1720-1723.
- [385] 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.
- [386] O. Seitz, H. Kunz; *Ein neuer allylischer Anker für die Festphasensynthese – Synthese von geschützten und ungeschützten O-Glycopeptiden des Mucintyps*; *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901-904.
- [387] M. Gewehr, H. Kunz; *Comparative Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Ethylene Glycol Derived Esters. The 2-Methoxyethyl Ester as a Protective Group in Peptide and Glycopeptide Synthesis*; *Synthesis* **1997**, *1997*, 1499-1511.
- [388] K. E. van Holde, K. I. Miller, in *Adv. Protein Chem., Vol. Volume 47* (Eds.: F. M. R. J. T. E. C.B. Anfinsen, S. E. David), Academic Press, **1995**, pp. 1-81.
- [389] A. Barra, C. Cordonnier, M.-P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J.-L. Preud'homme; *Immunogenicity of Haemophilus influenzae Type b Conjugate Vaccine in Allogeneic Bone Marrow Recipients*; *J. Infect. Dis.* **1992**, *166*, 1021-1028.
- [390] D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thippawong, S. Wiltsey; *Evaluation of booster doses of Haemophilus influenzae type b-tetanus toxoid conjugate vaccine in 18-month-old children*; *Vaccine* **1995**, *13*, 104-108.
- [391] R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Käyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K. P. Klugman; *Dose response of CRM197 and tetanus toxoid-conjugated Haemophilus influenzae type b vaccines*; *Vaccine* **2004**, *23*, 802-806.
- [392] T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau; *A novel combined Haemophilus influenzae type b-Neisseria meningitidis serogroups C and Y-tetanus-toxoid conjugate vaccine is immunogenic and induces immune memory when co-administered with DTPa-HBV-IPV and conjugate pneumococcal vaccines in infants*; *Vaccine* **2007**, *25*, 8487-8499.
- [393] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach, Vol. 1*, Oxford University Press, **2000**.
- [394] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques, Vol. 3*, Elsevier Inc., San Diego, **2013**.
- [395] 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.
- [396] 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.
- [397] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axén, *Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent, Vol. 173*, **1978**.
- [398] E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer; *Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential*; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 157-176.
- [399] D. F. Hook, F. Gessier, C. Noti, P. Kast, D. Seebach; *Probing the Proteolytic Stability of β -Peptides Containing α -Fluoro- and α -Hydroxy- β -Amino Acids*; *ChemBioChem* **2004**, *5*, 691-706.
- [400] G. Lippke, H. Thaler; *Die spezifische Drehung des Sorbits und des Sorbit-Molybdat-Komplexes*; *Starch - Stärke* **1970**, *22*, 344-351.
- [401] *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983*; *Biochem. J.* **1984**, *219*, 345-373.

- [402] W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Vol. 6, Elsevier, Oxford, **2009**.
- [403] M. M. Palian, R. Polt; *Lipo α -Amino- β -hydroxy Acids and O-Linked Glycosides: Building Blocks for Ceramyl and Glycosphingoyl Peptides*; *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 7178-7183.
- [404] S. Nowshuddin, M. N. A. Rao, A. R. Reddy; *Efficient Procedure for the Preparation of Oligomer-Free N α -Fmoc Amino Acids*; *Synth. Commun.* **2009**, 39, 2022-2031.
- [405] V. Pozsgay, H. J. Jennings; *Stereoselective Synthesis of trans-1,2-Di-O-acetyl Glycoses*; *Synthesis* **1990**, 1990, 724-726.
- [406] 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.
- [407] P. K. Bose, P. L. Polavarapu; *Acetate groups as probes of the stereochemistry of carbohydrates: a vibrational circular dichroism study*; *Carbohydr. Res.* **1999**, 322, 135-141.
- [408] B. Capon, P. M. Collins, A. A. Levy, W. G. Overend; *617. Reactions at position 1 of carbohydrates. Part V. Nucleophilic displacement reactions of acetylglycosyl halides*; *J. Chem. Soc.* **1964**, 3242-3254.
- [409] W. T. Haskins, R. M. Hann, C. S. Hudson; *Syntheses of Epi-lactose and Lactose*; *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 1852-1856.
- [410] N. Floyd, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe, B. G. Davis; *Thiyl Glycosylation of Olefinic Proteins: S-Linked Glycoconjugate Synthesis*; *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, 48, 7798-7802.
- [411] P. A. Levene, R. S. Tipson; *The Action of Benzoic Peracid on Substituted Glucals. II*; *J. Biol. Chem.* **1931**, 93, 631-644.
- [412] C. Tamm, T. Reichstein; *Synthese des 2-Desoxy-D-fucose-3-methyläthers und seine Identifizierung mit D-Diginose. Desoxyzucker, 17. Mitteilung*; *Helv. Chim. Acta* **1948**, 31, 1630-1644.
- [413] J. Zhang, B. Zhang, J. Zhou, J. Li, C. Shi, T. Huang, Z. Wang, J. Tang; *H 2 SO 4 -SiO 2 : Highly Efficient and Reusable Catalyst for per- O -Acetylation of Carbohydrates Under Solvent-Free Conditions*; *J. Carbohydr. Chem.* **2011**, 30, 165-177.
- [414] R. Bukowski, Laura M. Morris, Robert J. Woods, T. Weimar; *Synthesis and Conformational Analysis of the T-Antigen Disaccharide (β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc-OMe)*; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2001, 2697-2705.
- [415] M. P. Khare, O. Schindler, T. Reichstein; *2,3-Di-O-methyl-D-fucose. Desoxyzucker, 36. Mitteilung*; *Helv. Chim. Acta* **1962**, 45, 1547-1551.
- [416] H. Paulsen, A. Richter, V. Sinnwell, W. Stenzel; *Darstellung selektiv blockierter 2-azido-2-desoxy-D-gluco- und -D-galactopyranosylhalogenide: reaktivität und ¹³C-NMR-spektren*; *Carbohydr. Res.* **1978**, 64, 339-362.
- [417] Y. Saito, T. Watanabe, H. Hashimoto, J. Yoshimura; *Synthesis of N1-(p-glycosyloxycinnamoyl)spermidines*; *Carbohydr. Res.* **1987**, 169, 171-188.
- [418] R. Szweda, U. Spohr, R. U. Lemieux, D. Schindler, D. F. Bishop, R. J. Desnick; *Synthesis of 4-methylumbelliferyl glycosides for the detection of α - and β -D-galactopyranosaminidases*; *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 1388-1391.
- [419] M. Leuck, H. Kunz; *Synthesis of TN and T Antigen Glycopeptide Sequences of tumor-associated MUC-1 using S-pent-4-enyl thioglycosides*; *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 322-334.
- [420] 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.
- [421] H. R. Kricheldorf, J. Kaschig; *Depsipeptide und Polyesteramide, I. Synthese von ω -Hydroxy- und Mercaptocarbonsäure-tert-butylestern*; *Liebigs. Ann. Chem.* **1976**, 1976, 882-890.
- [422] J. Jurajj, M. Cushman; *Approaches to the synthesis of endothiopeptides: Synthesis of a thioamide-containing C-terminal bombesin nonapeptide*; *Tetrahedron* **1992**, 48, 8601-8614.
- [423] M. Biel, P. Deck, A. Giannis, H. Waldmann; *Synthesis and Evaluation of Acyl Protein Thioesterase I (APT1) Inhibitors*; *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4121-4143.
- [424] K.-i. Tanaka, H. Sawanishi; *An efficient and stereospecific synthesis of (2S,4S)-2,4-diaminoglutaric acid*; *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 71-77.
- [425] M. Tamaki, G. Han, V. J. Hruby; *Synthesis of 4-cis-Phenyl-l-proline via Hydrogenolysis*; *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3593-3596.
- [426] P. Barraclough, P. Hudhomme, C. A. Spray, D. W. Young; *Synthesis of kainoid analogues*; *Tetrahedron* **1995**, 51, 4195-4212.
- [427] P. Barraclough, P. Dieterich, C. A. Spray, D. W. Young; *Two separate and distinct syntheses of stereospecifically deuteriated samples of (2S)-proline*; *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1483-1491.

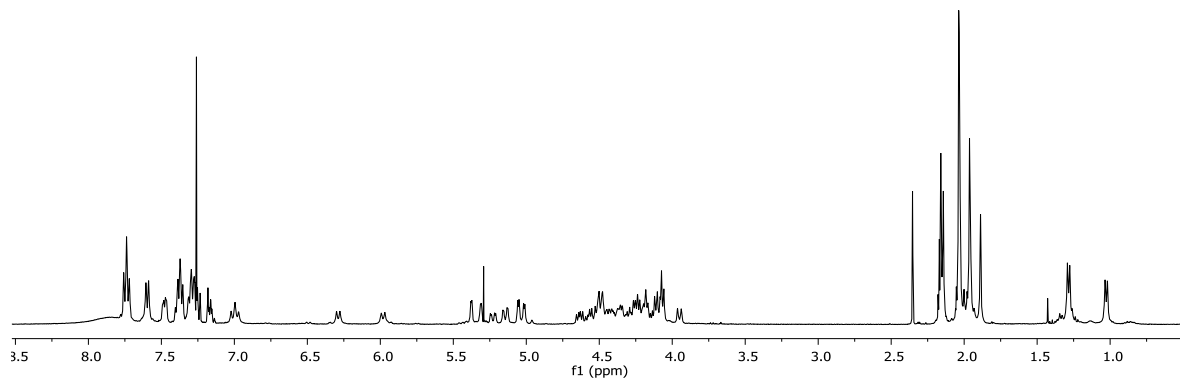
- [428] O. Seitz, *Eine neue allylische Ankergruppe fuer die Festphasensynthese von Peptiden*, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität (Mainz), **1995**.
- [429] P. E. Edem, S. Czorny, J. F. Valliant; *Synthesis and Evaluation of Radioiodinated Acyloxymethyl Ketones as Activity-Based Probes for Cathepsin B*; *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9564-9577.
- [430] I. Tavernaro, S. Hartmann, L. Sommer, H. Hausmann, C. Rohner, M. Ruehl, A. Hoffmann-Roeder, S. Schlecht; *Synthesis of tumor-associated MUC1-glycopeptides and their multivalent presentation by functionalized gold colloids*; *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 81-97.

ANHANG

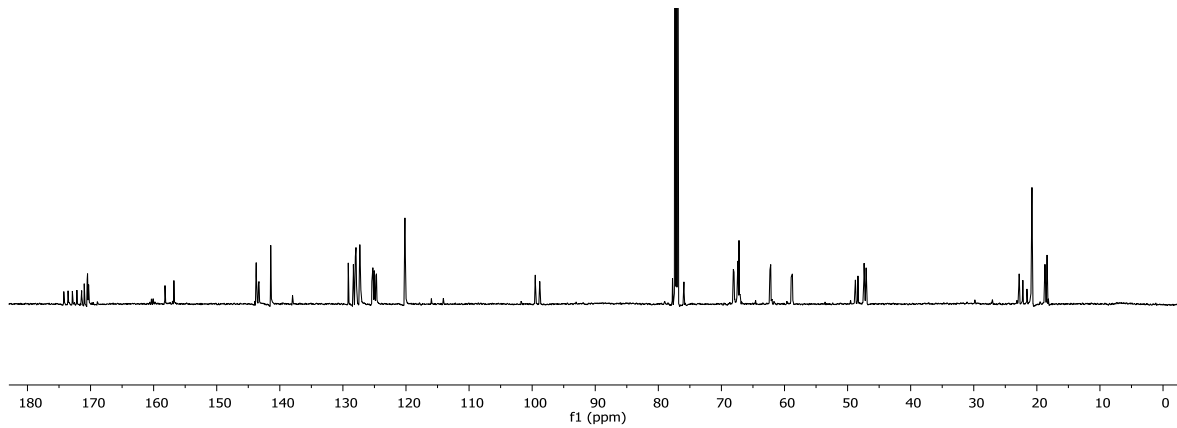
NMR SPEKTREN DER NEU DARGESTELLTEN VERBINDUNGEN

*Anhang NMR Festphasenbausteine****N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (1)**

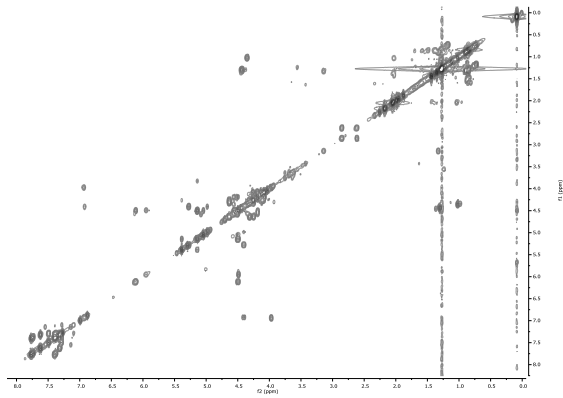
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):



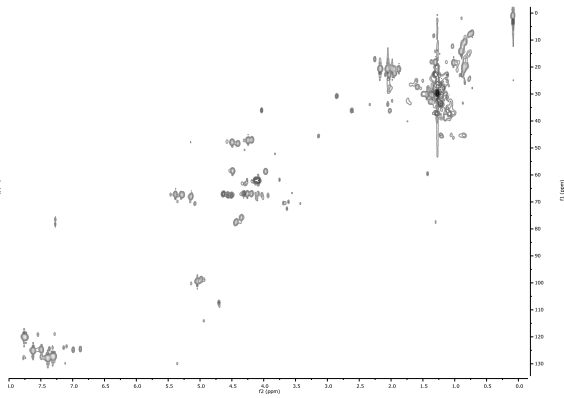
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):



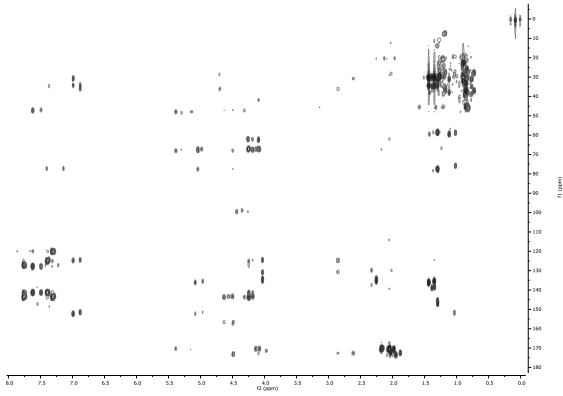
^1H - ^1H -COSY (800 MHz, CDCl_3):



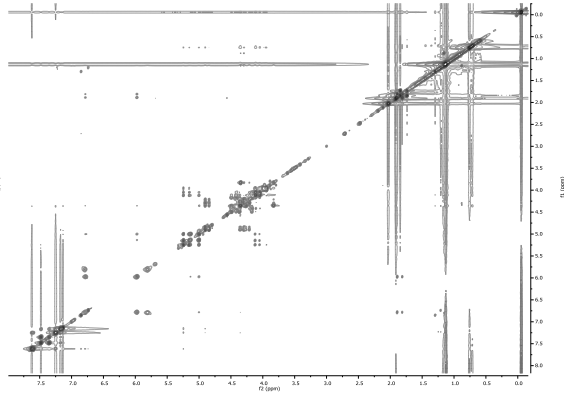
^1H - ^{13}C -HSQC (200 MHz, CDCl_3):



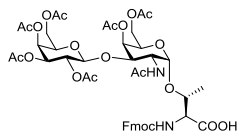
^1H - ^{13}C -HMBC (200 MHz, CDCl_3):



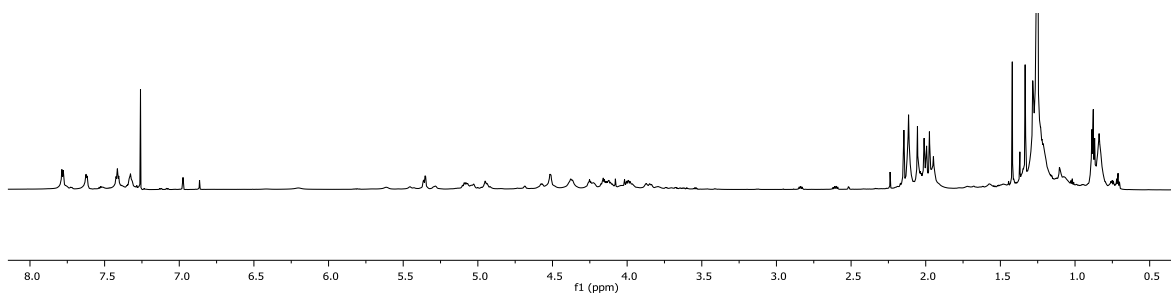
^1H - ^1H -NOESY (800 MHz, CDCl_3):



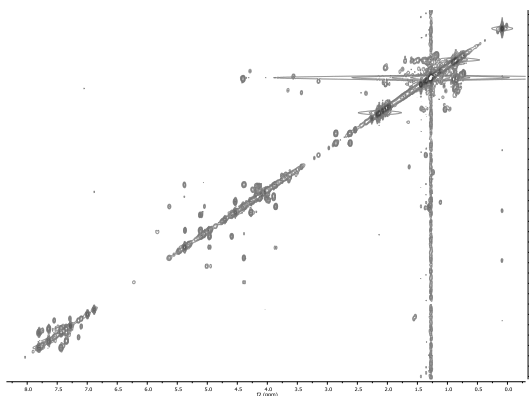
***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-4,6-di-*O*-acetyl-2-desoxy-3-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl]- α -D-galactopyranosyl)-L-threonin (2)**



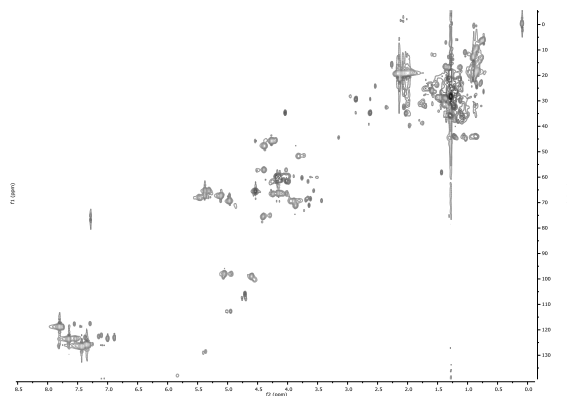
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):



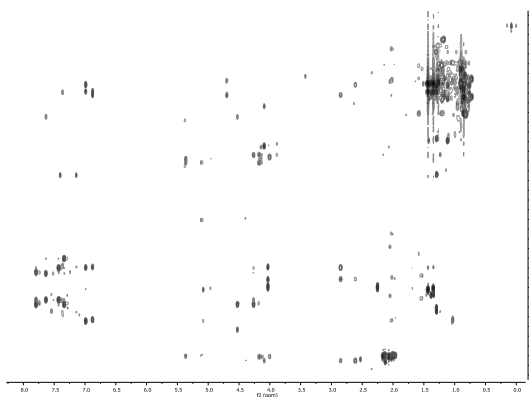
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, CDCl_3):



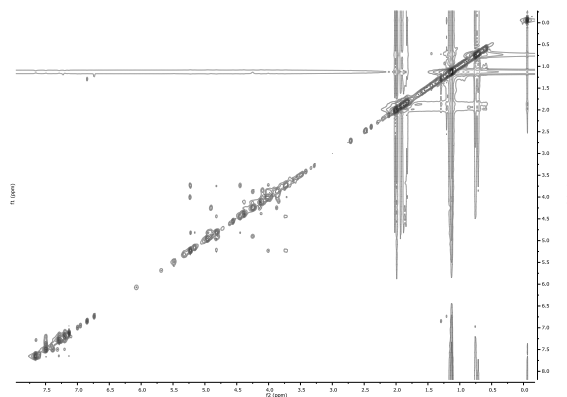
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, CDCl_3):



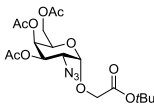
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, CDCl_3):



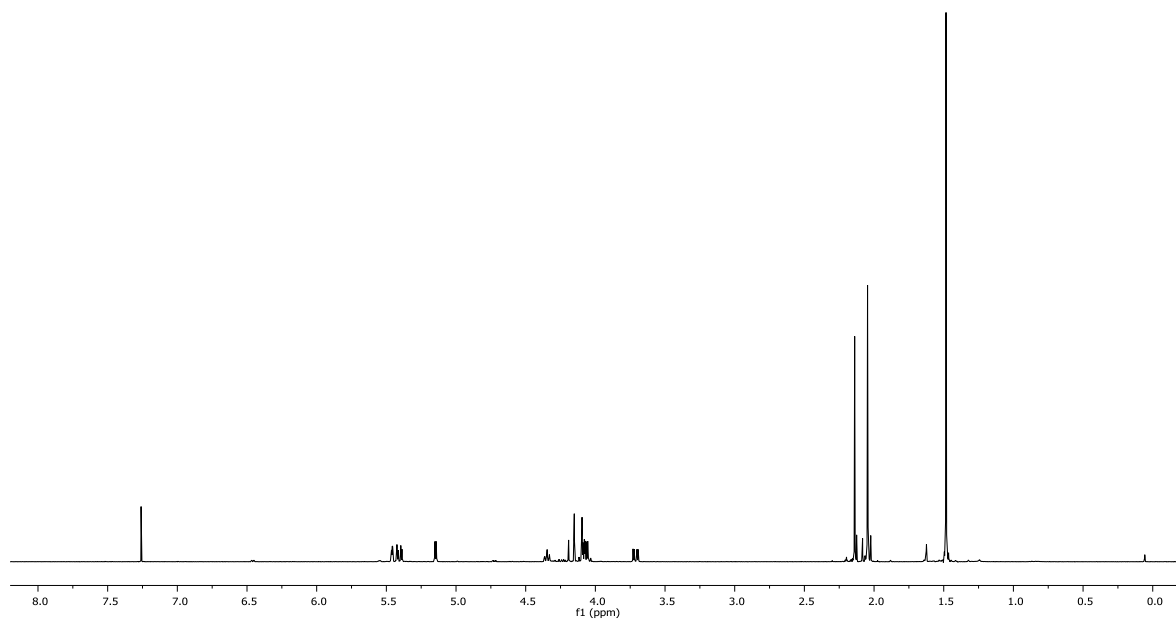
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, CDCl_3):



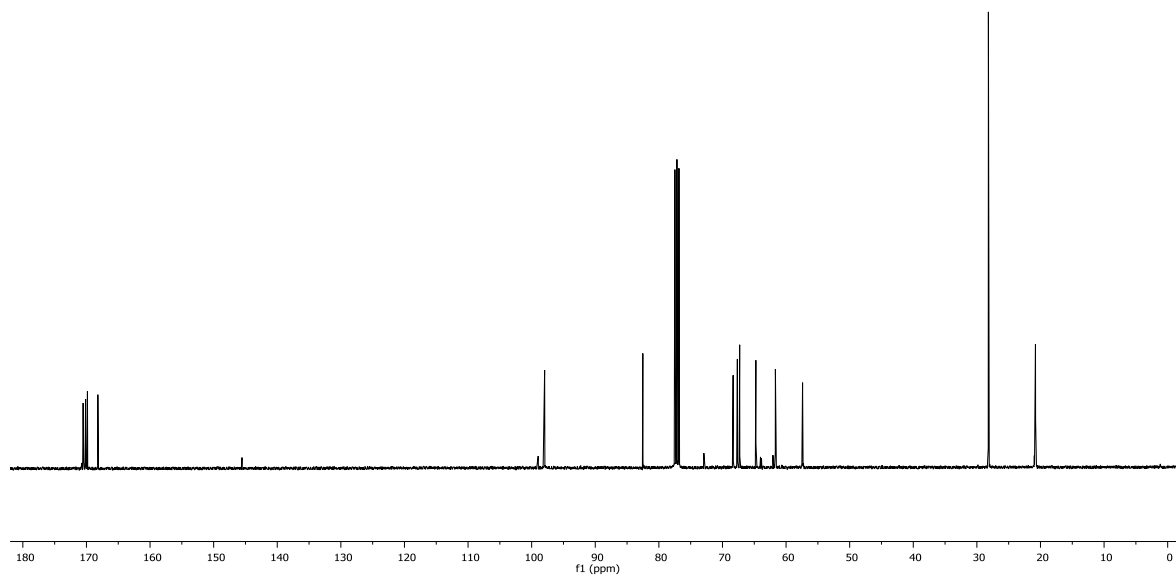
***O*-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-galactopyranosyl)-2-hydroxyessigsäure-*tert*-butylester (25)**



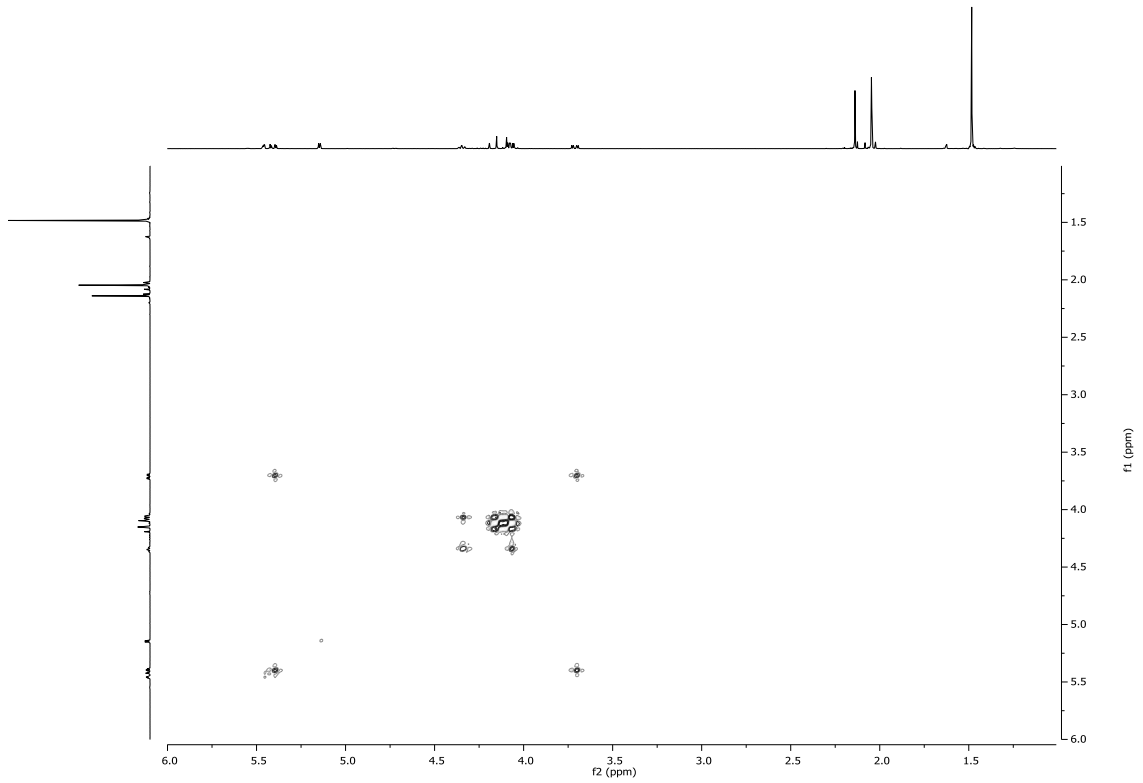
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):



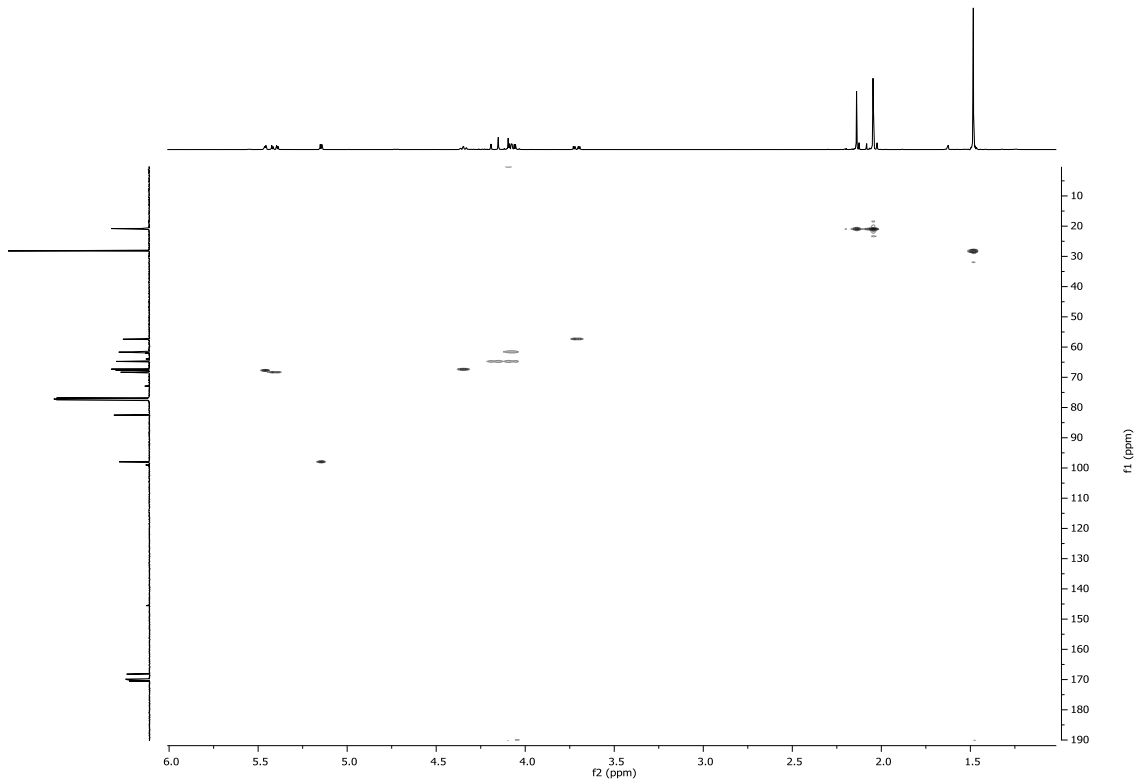
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):

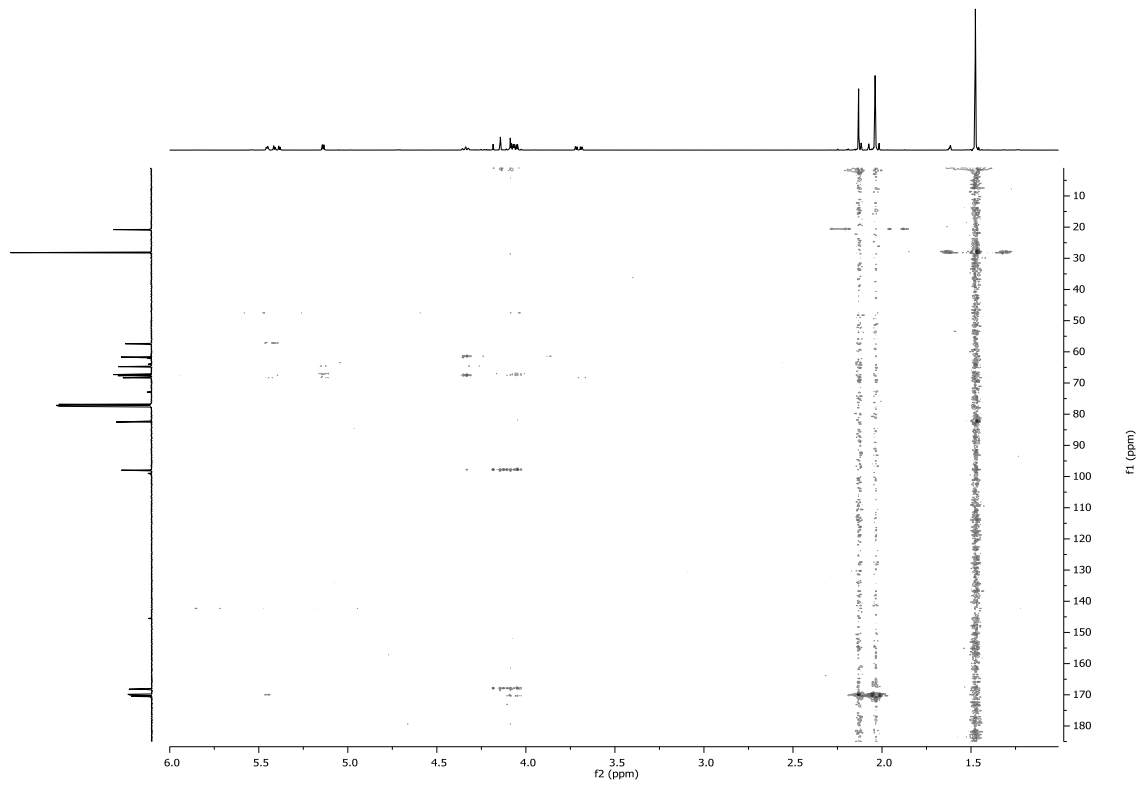


^1H - ^1H -COSY (800 MHz, CDCl_3):

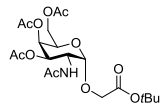


^1H - ^{13}C -HSQC (200 MHz, CDCl_3):

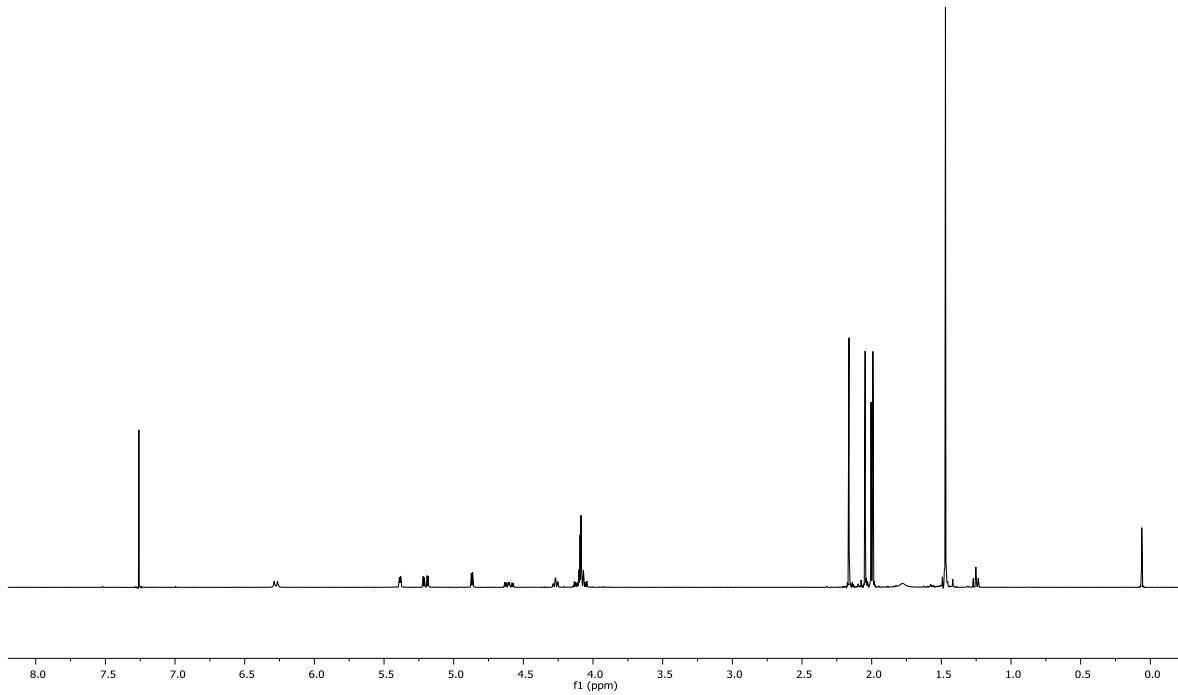


^1H - ^{13}C -HMBC (200 MHz, CDCl_3):

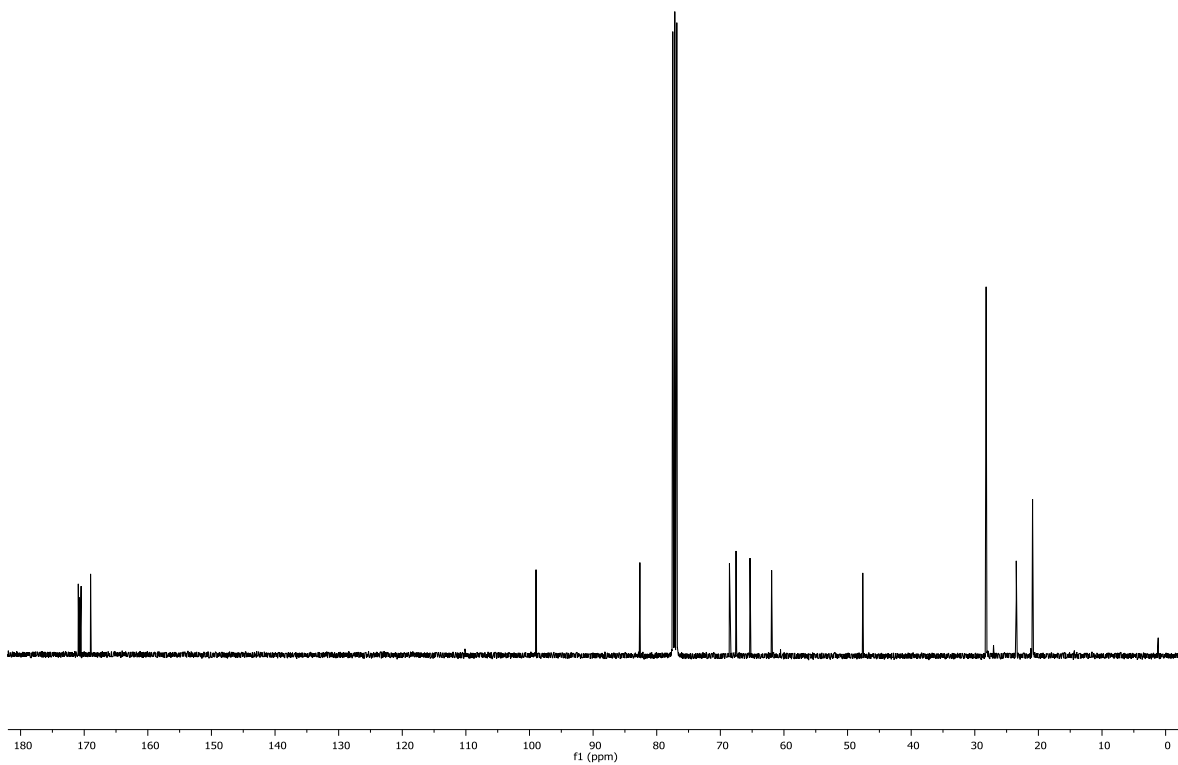
***O*-(2-Acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galactopyranosyl)2-hydroxyessigsäure-*tert.*-butylester (26)**

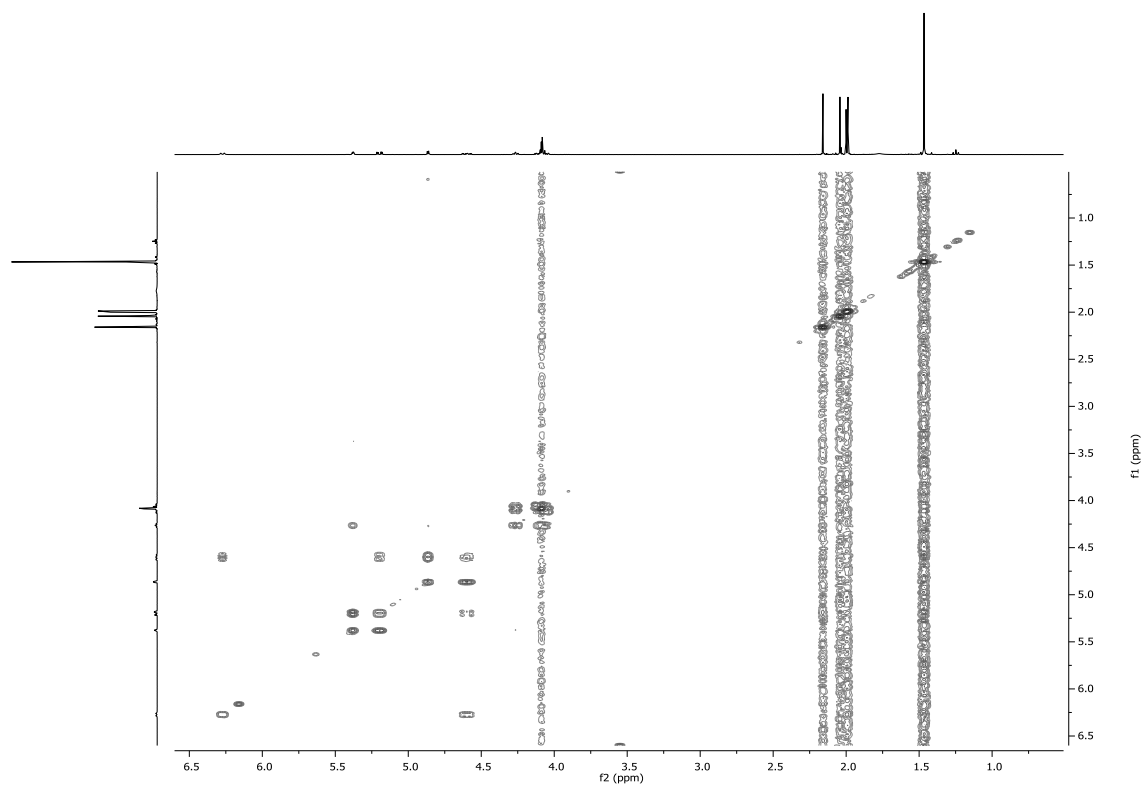
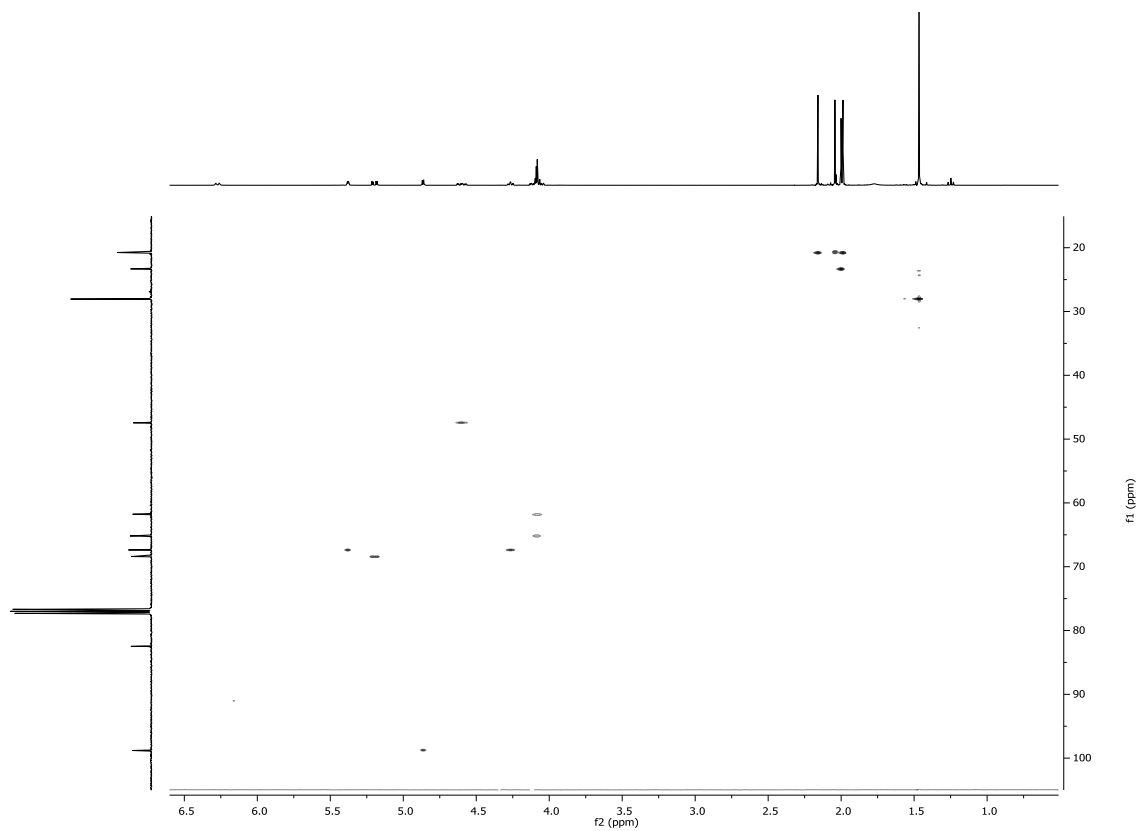


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):

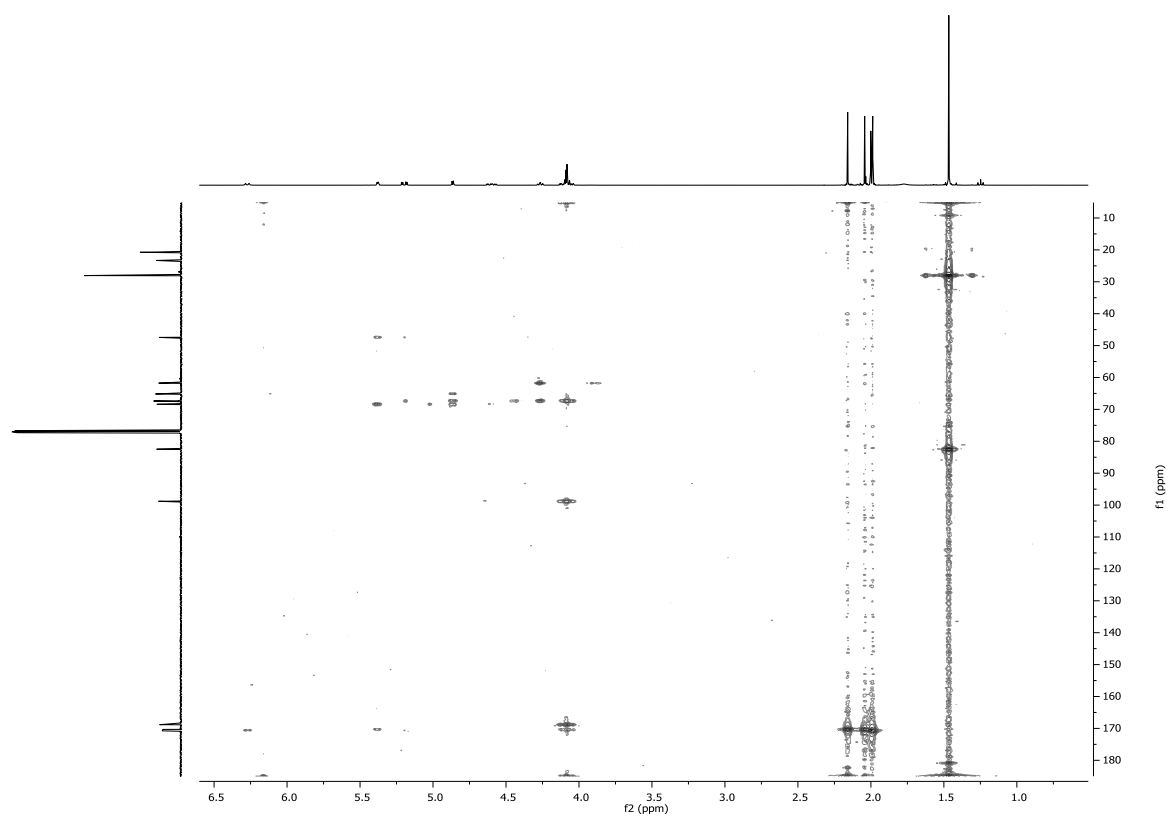


$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):

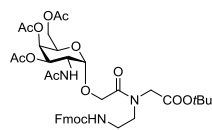


^1H - ^1H -COSY (800 MHz, CDCl_3): ^1H - ^{13}C -HSQC (200 MHz, CDCl_3):

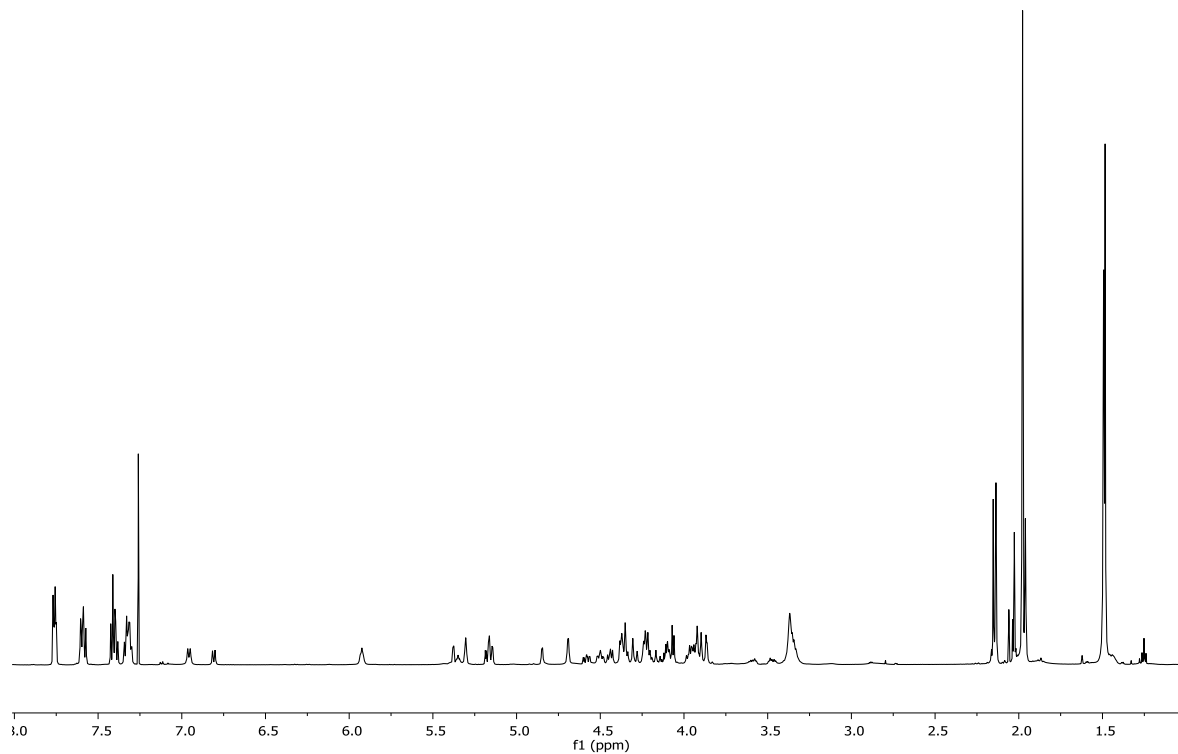
^1H - ^{13}C -HMBC (200 MHz, CDCl_3):



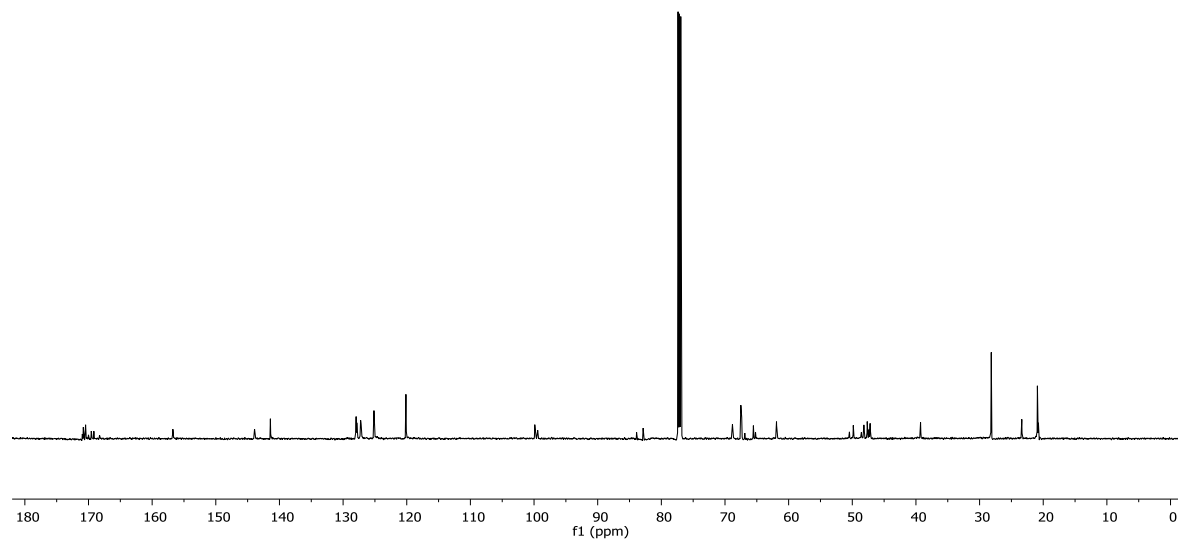
***N*-((*N'*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*-(*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galctopyranosyl)-2-hydroxyacetyl)glycin-*tert*-butylester (27)**



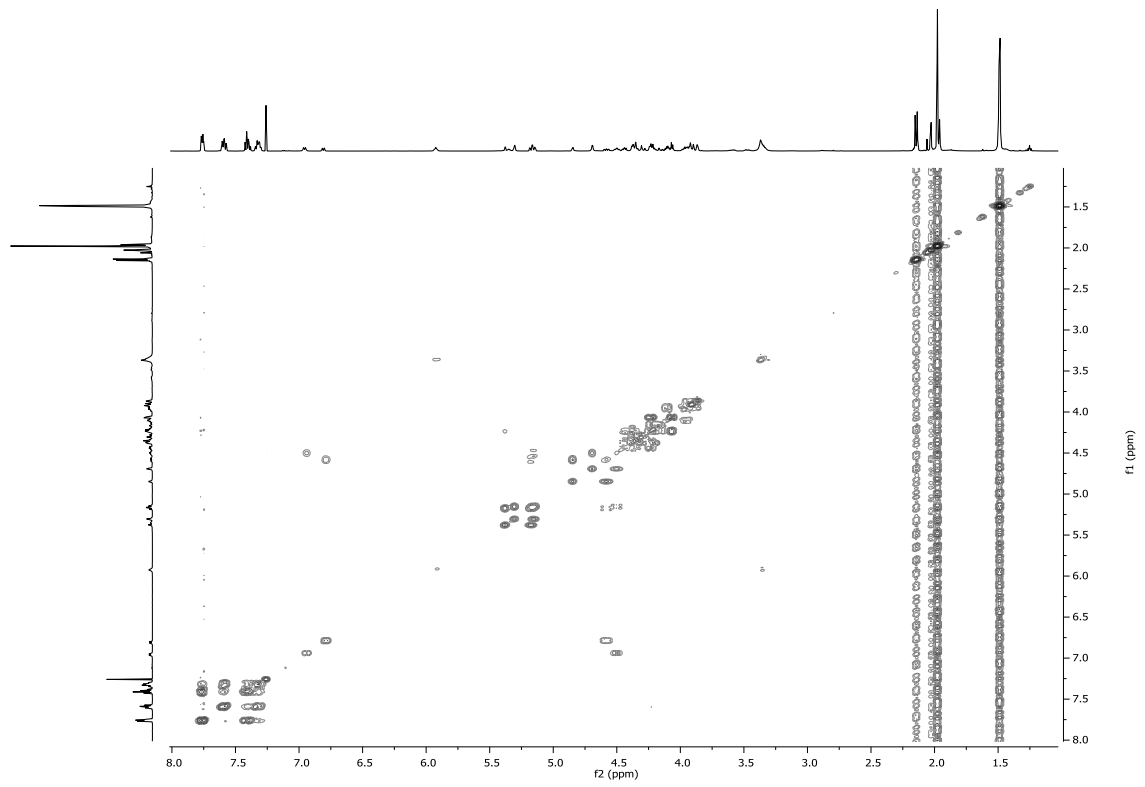
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):



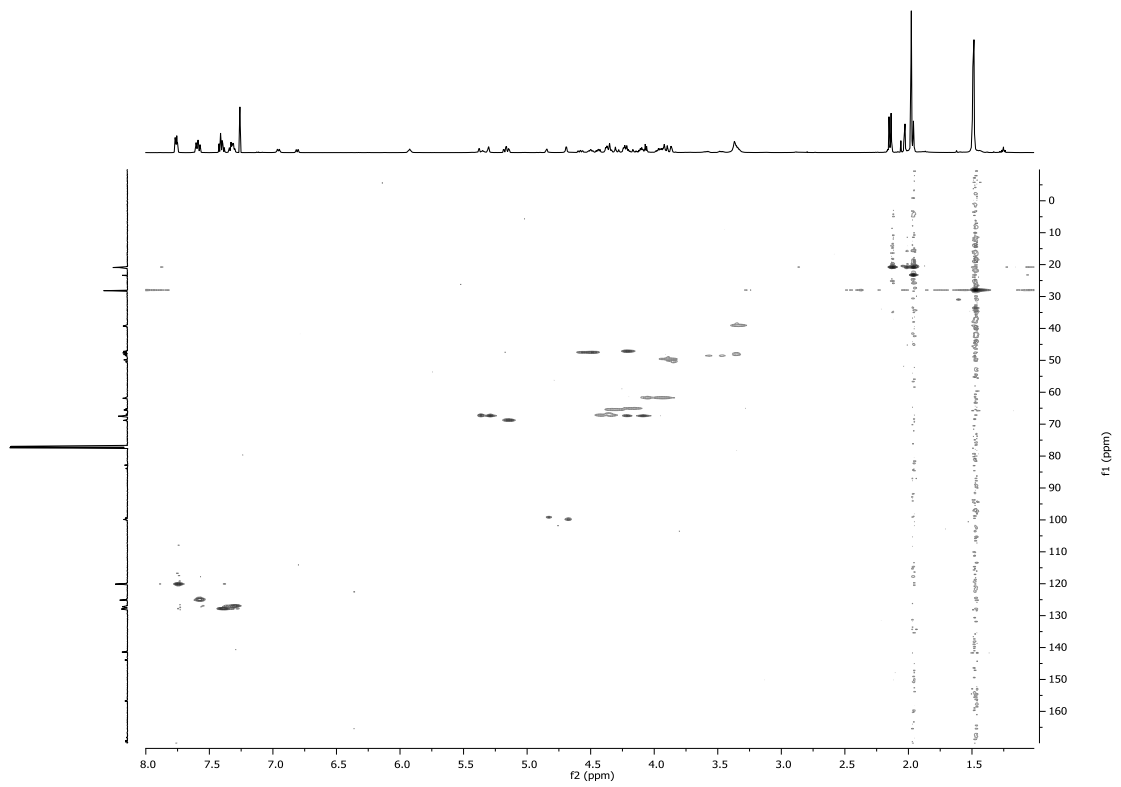
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):

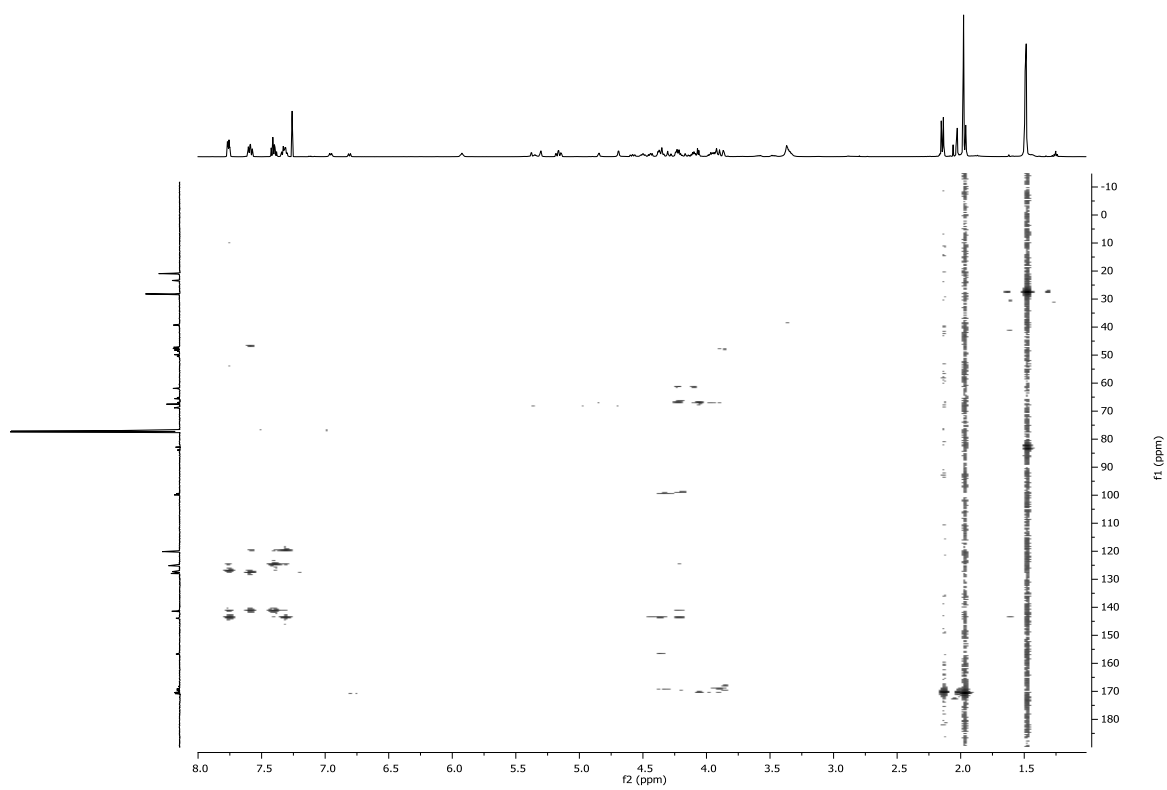


^1H - ^1H -COSY (800 MHz, CDCl_3):

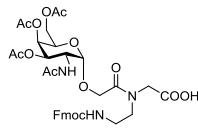


^1H - ^{13}C -HSQC (200 MHz, CDCl_3):

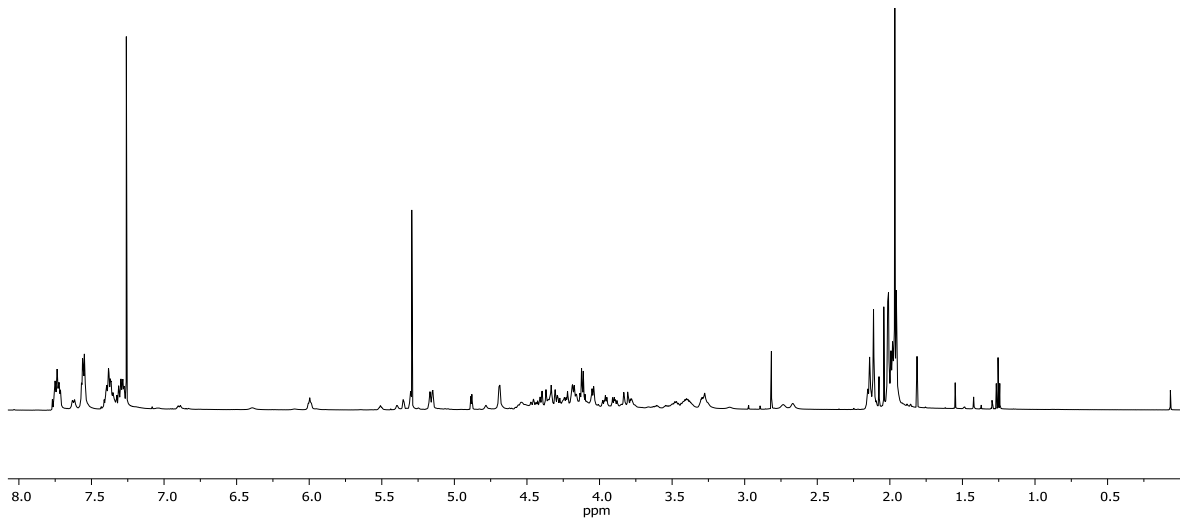


^1H - ^{13}C -HMBC (200 MHz, CDCl_3):

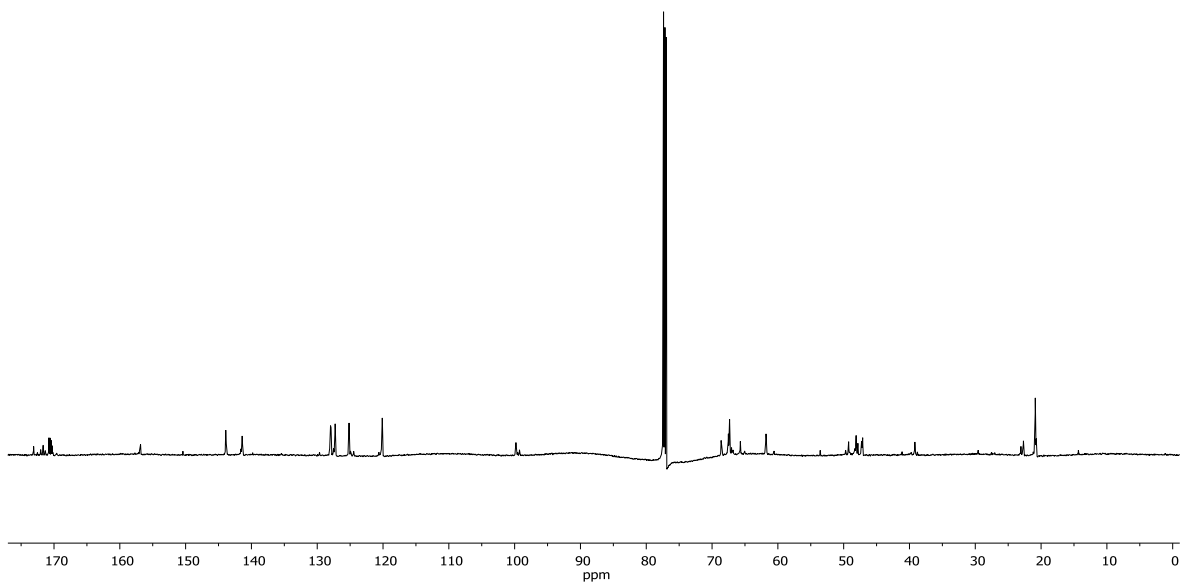
***N*-((*N*'-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl)-2-aminoethyl)-*N*'-(*O*-(2-acetamido-2-desoxy-3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-galctopyranosyl)-2-hydroxyacetyl)glycin (3)**

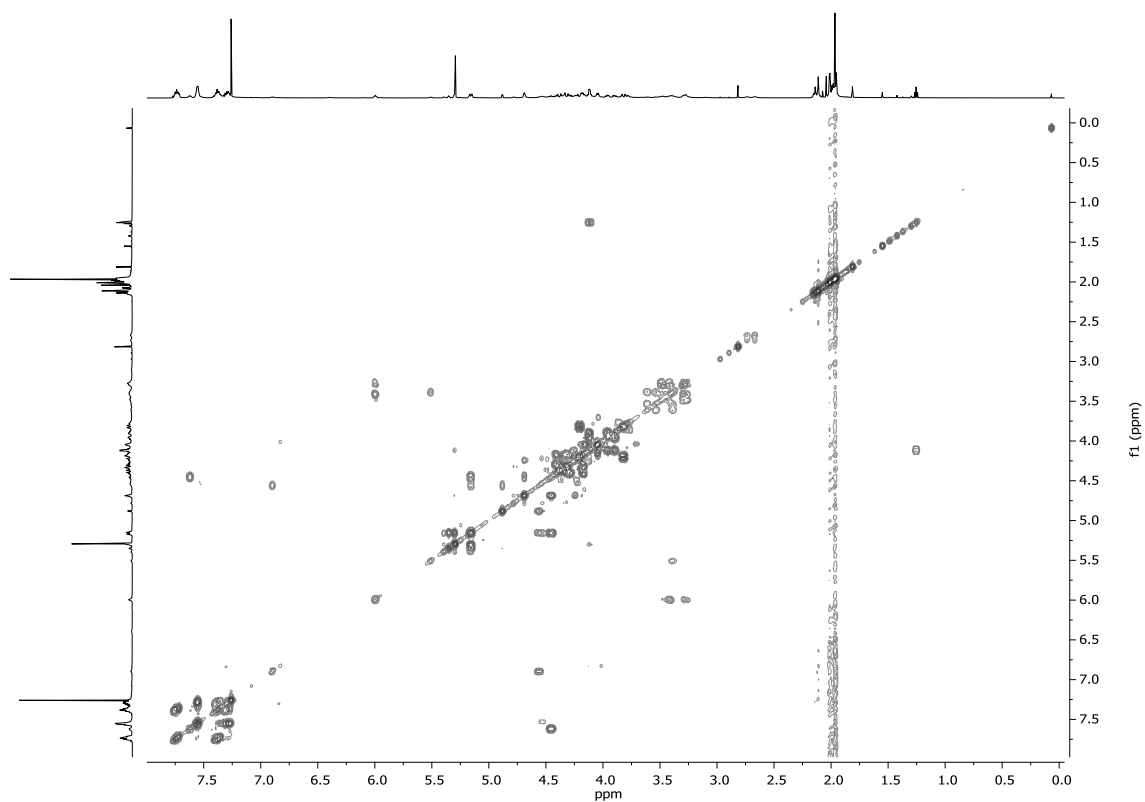
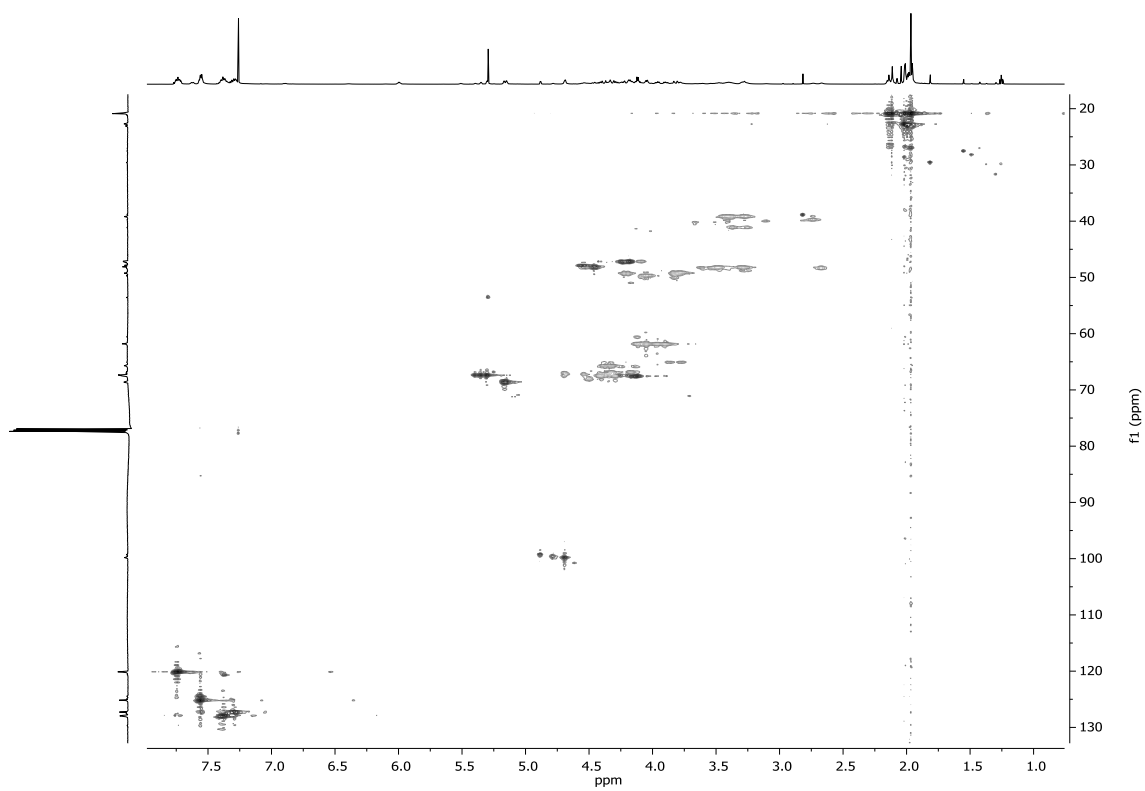


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):

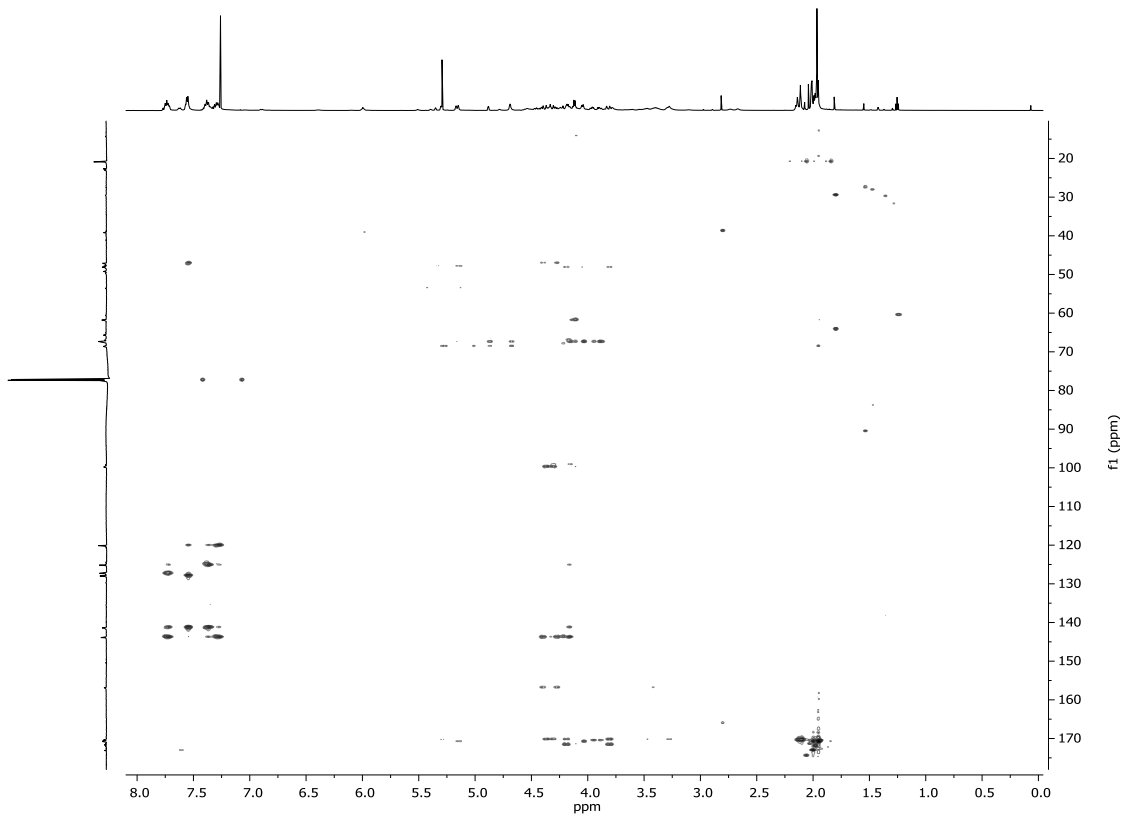


$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):

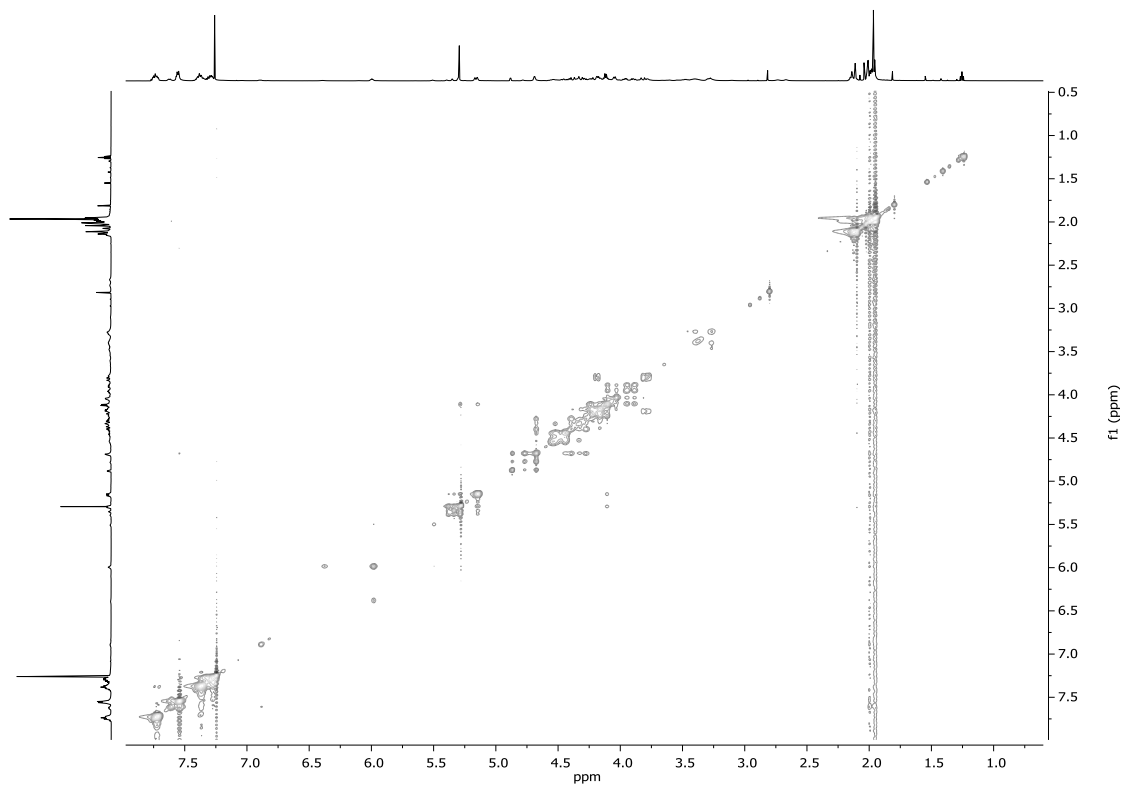


^1H - ^1H -COSY (800 MHz, CDCl_3): ^1H - ^{13}C -HSQC (200 MHz, CDCl_3):

^1H - ^{13}C -HMBC (200 MHz, CDCl_3):

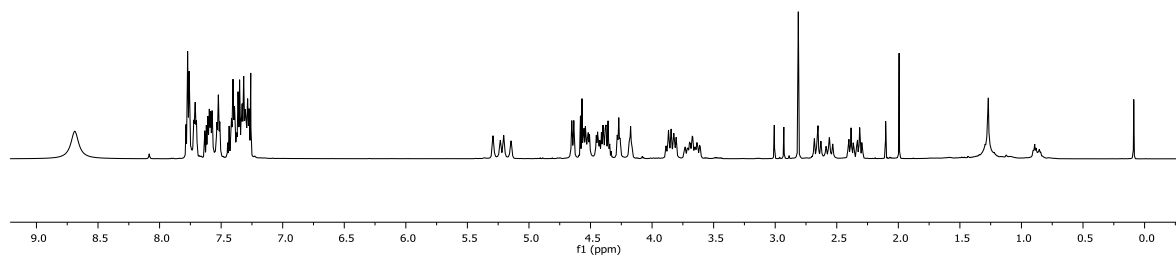


^1H - ^1H -NOESY (800 MHz, CDCl_3):

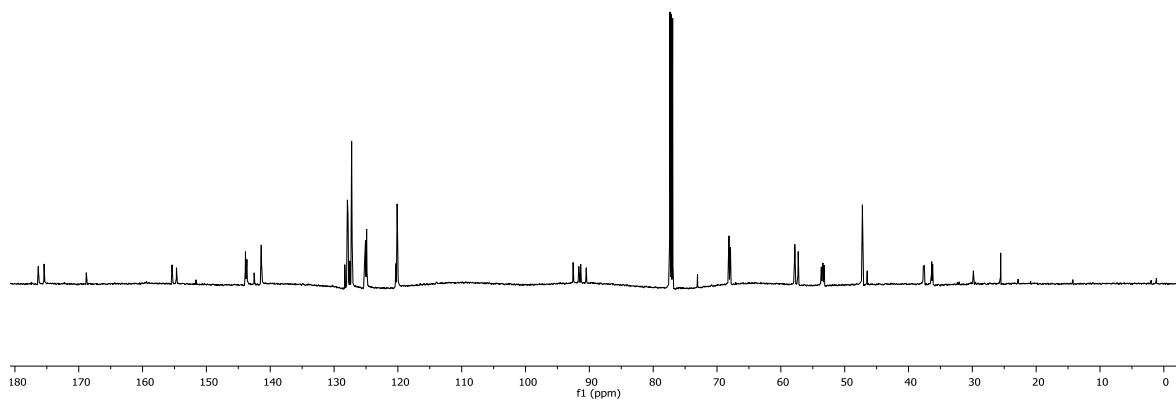


***N*-(9-*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*cis*-4-fluor-*L*-prolin (46)**

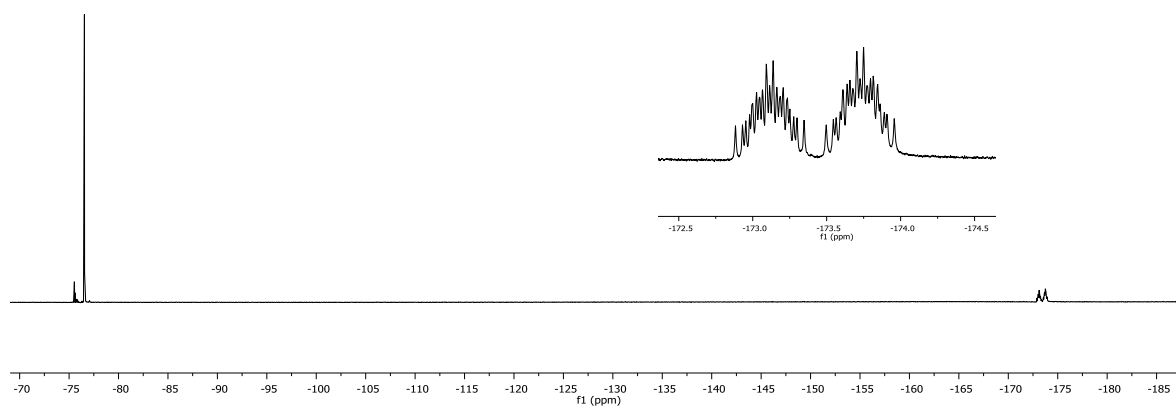
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃):

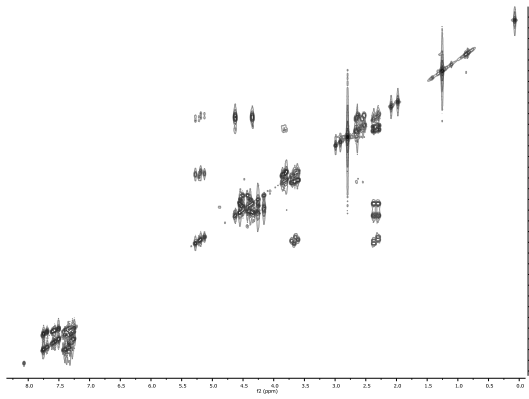
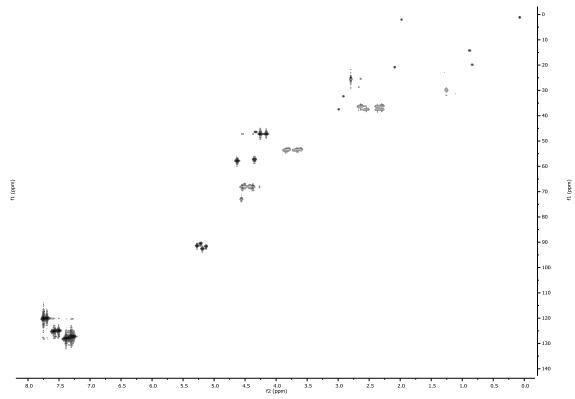
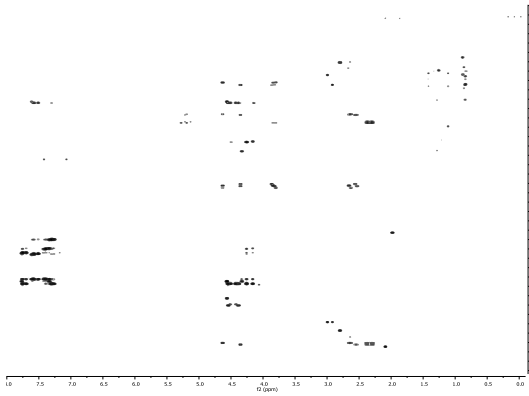
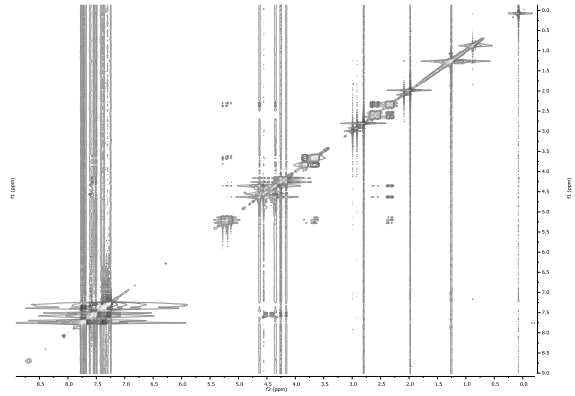


¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃):



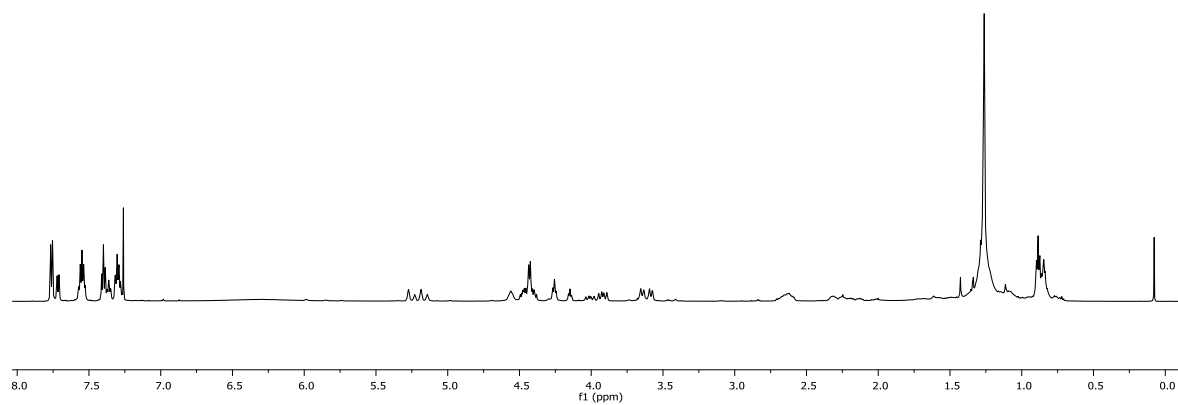
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



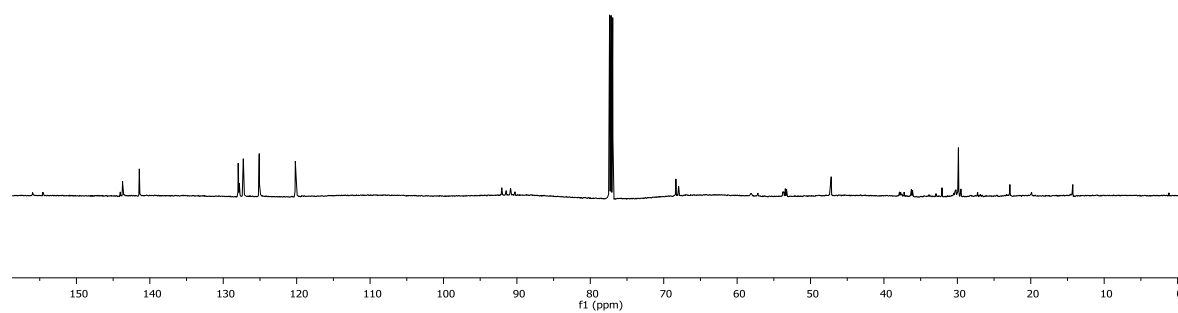
^1H - ^1H -COSY (600 MHz, CDCl_3): ^1H - ^{13}C -HSQC (150 MHz, CDCl_3): ^1H - ^{13}C -HMBC (150 MHz, CDCl_3): ^1H - ^1H -NOESY (600 MHz, CDCl_3):

***N*-(9-*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*trans*-4-fluor-*L*-prolin (47)**

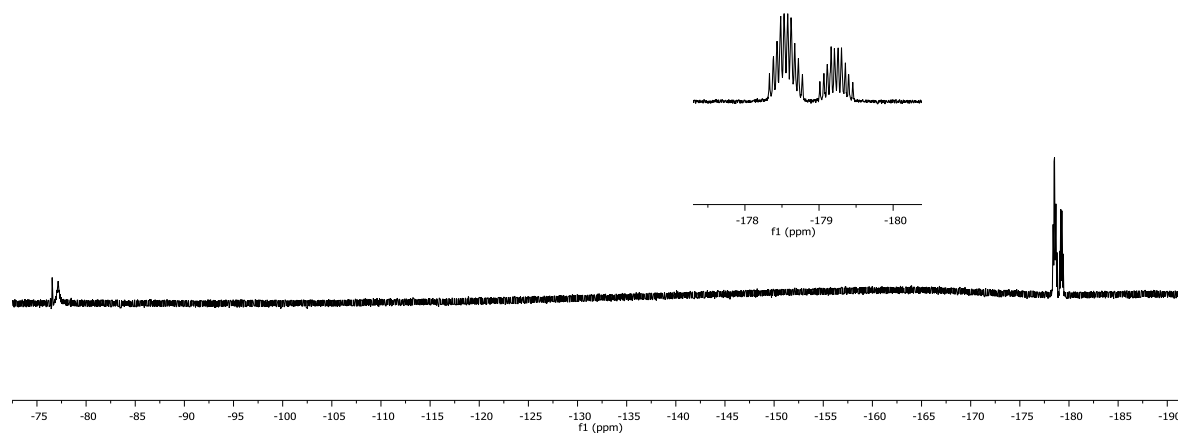
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3):

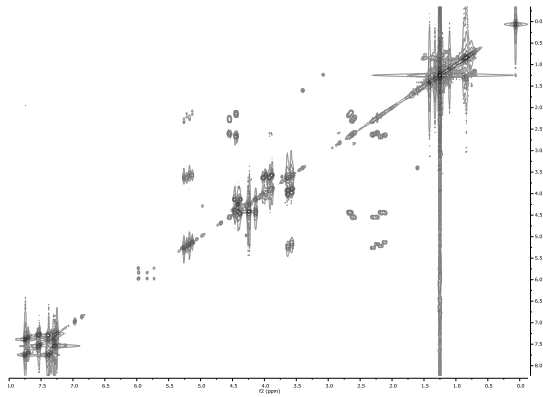
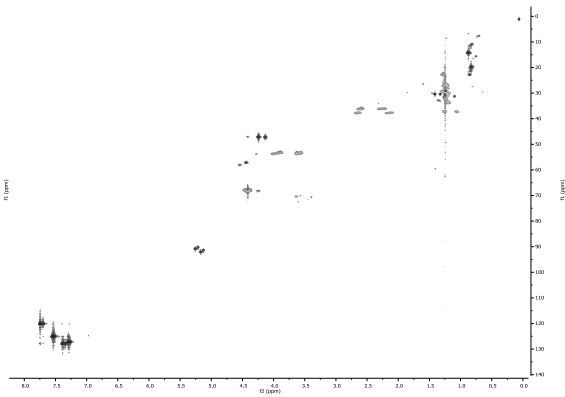
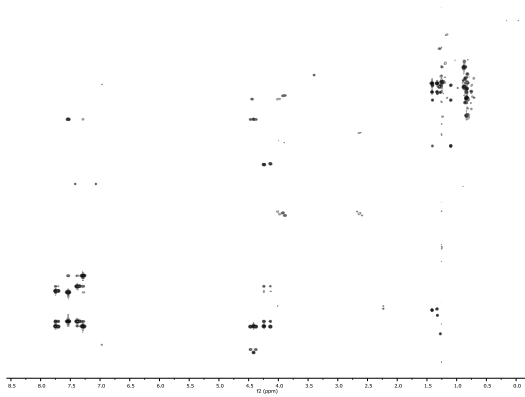
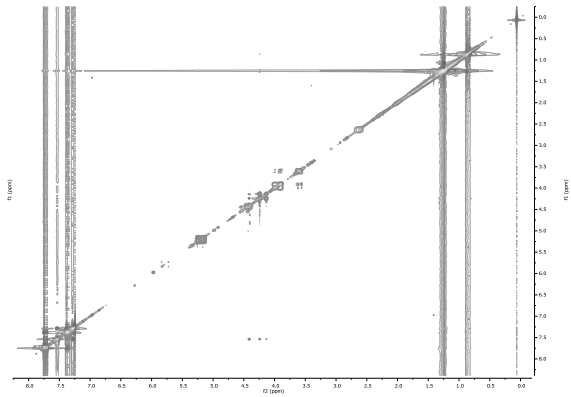


$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3):

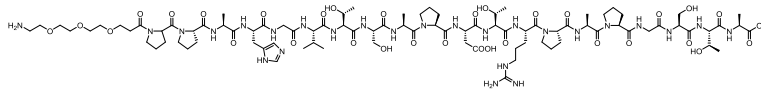


$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, CDCl_3):

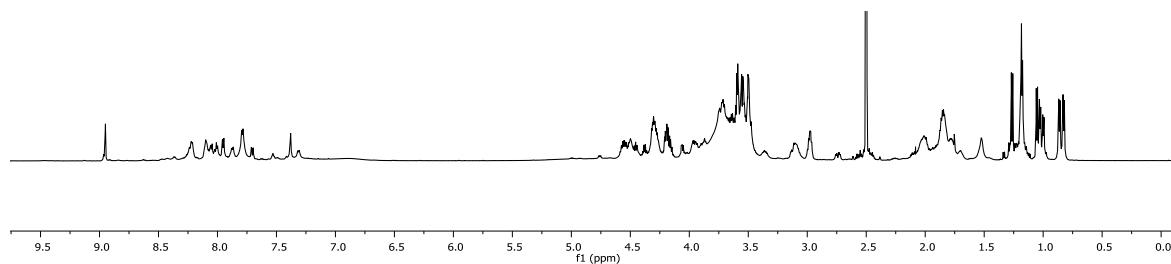


^1H - ^1H -COSY (600 MHz, CDCl_3): H - ^{13}C -HSQC (150 MHz, CDCl_3): ^1H - ^{13}C -HMBC (150 MHz, CDCl_3): ^1H - ^1H -NOESY (600 MHz, CDCl_3):

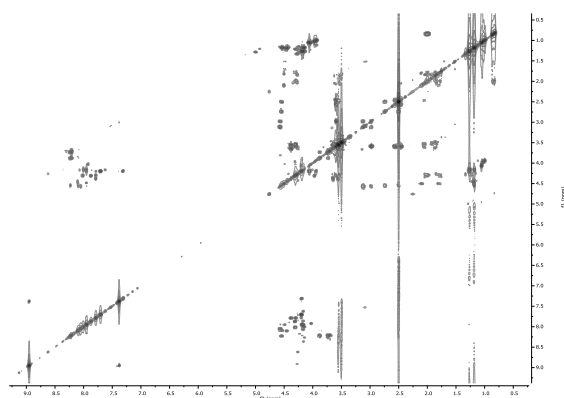
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (61)



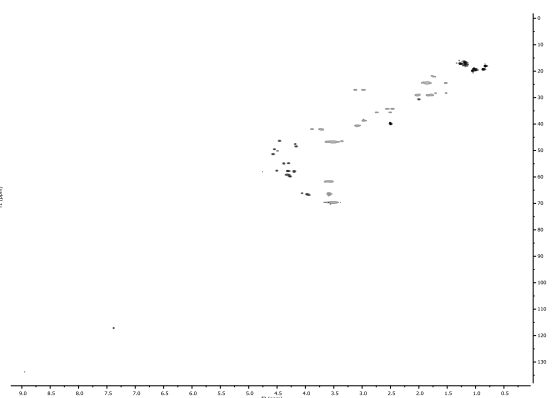
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



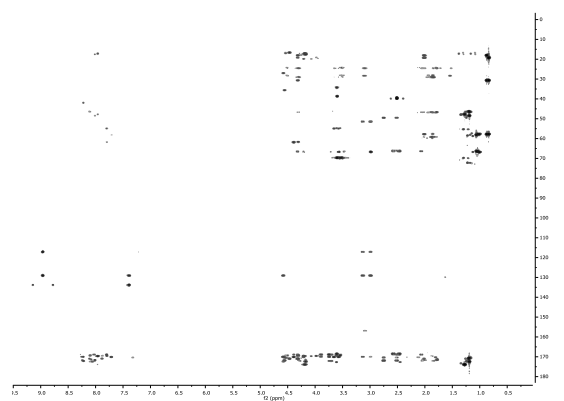
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



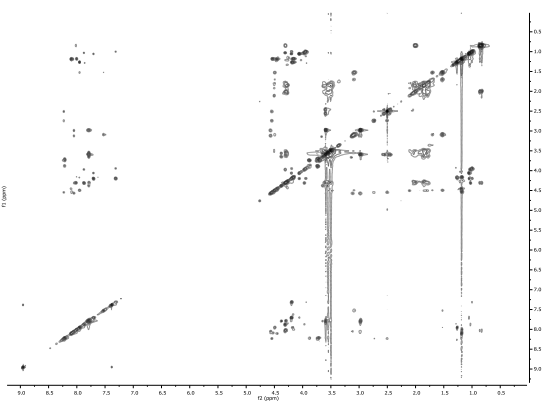
H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



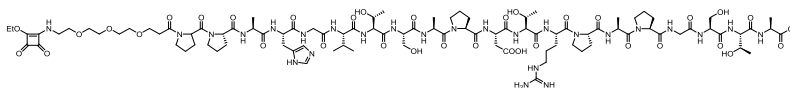
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



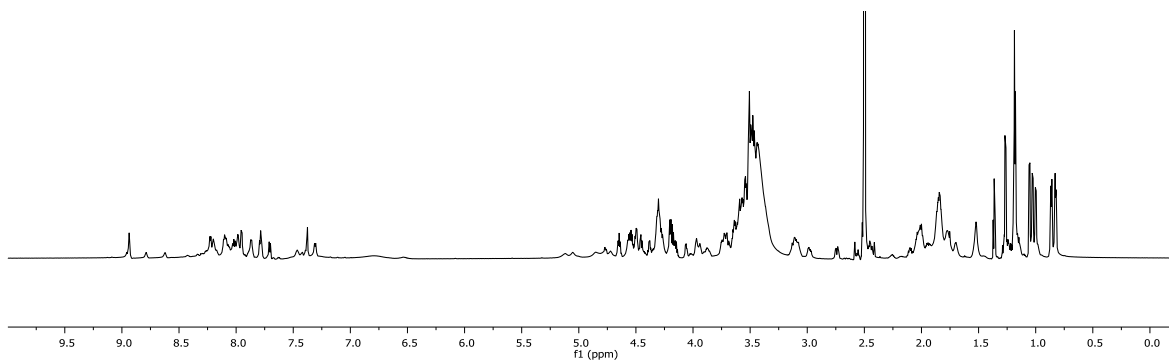
¹H-¹H-TOCSY (800 MHz, CDCl₃):



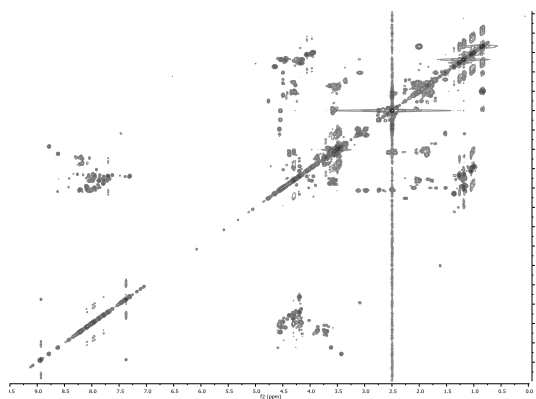
EtO-Squarat-HN(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (76)



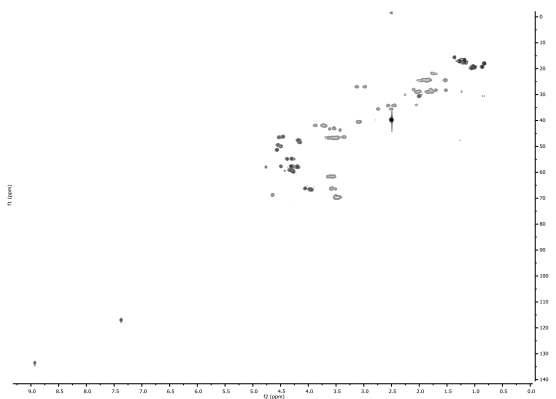
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



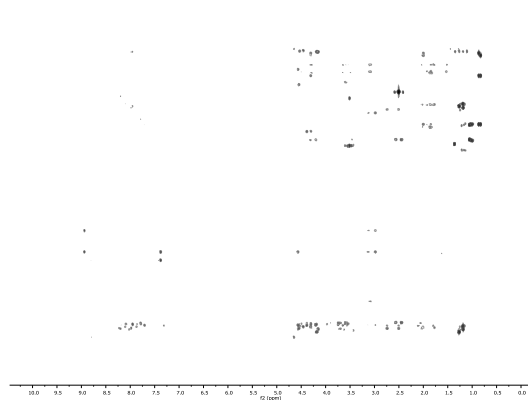
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



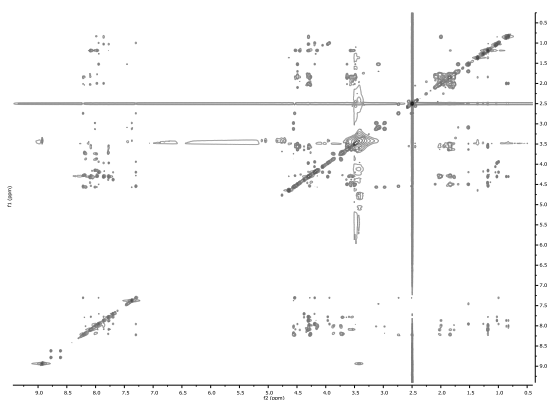
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



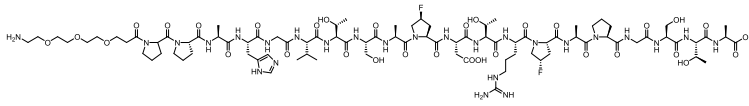
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



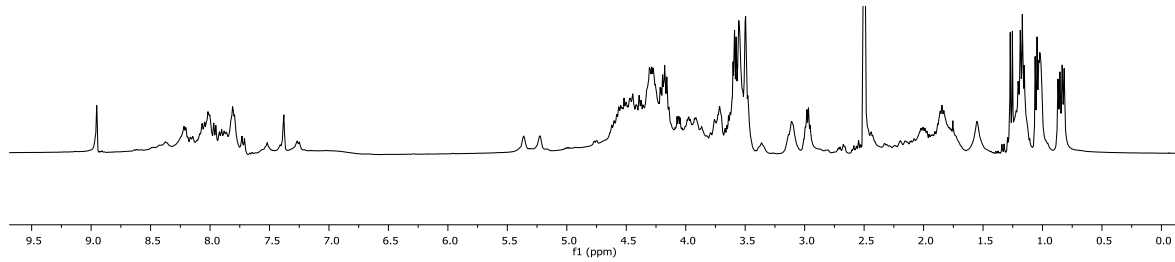
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-cis-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-cis-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH}$ (62)

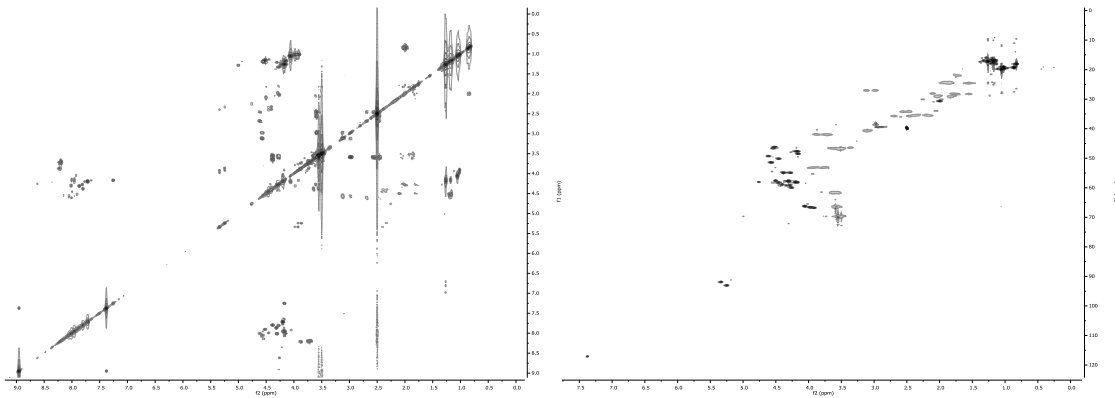


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):



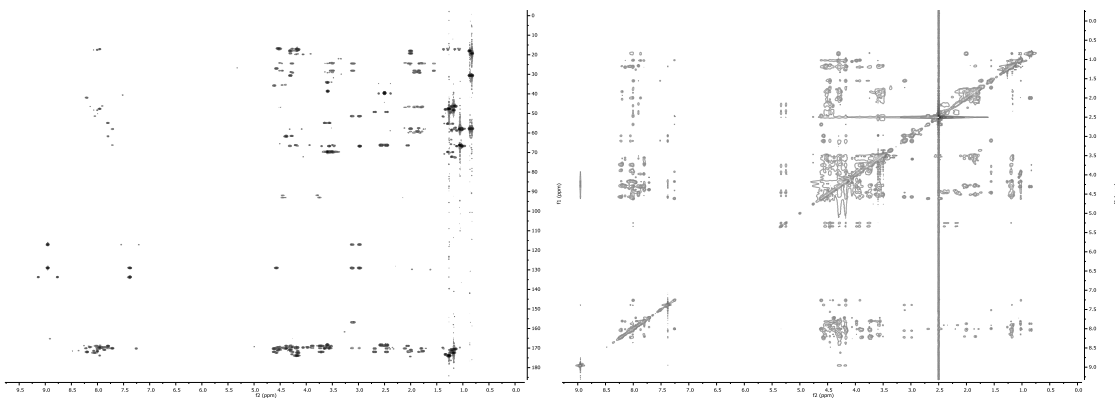
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, CDCl_3):

$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, CDCl_3):

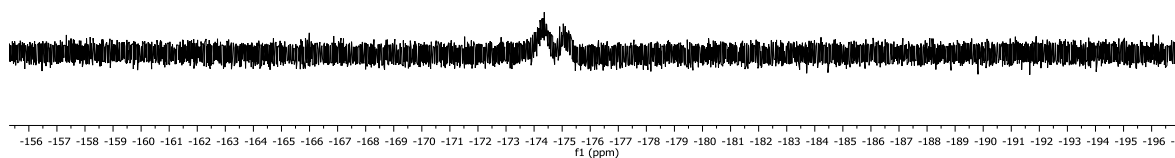


$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, CDCl_3):

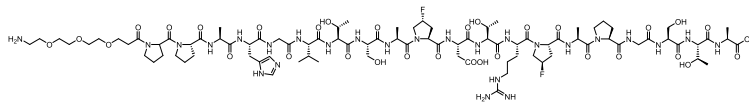
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, CDCl_3):



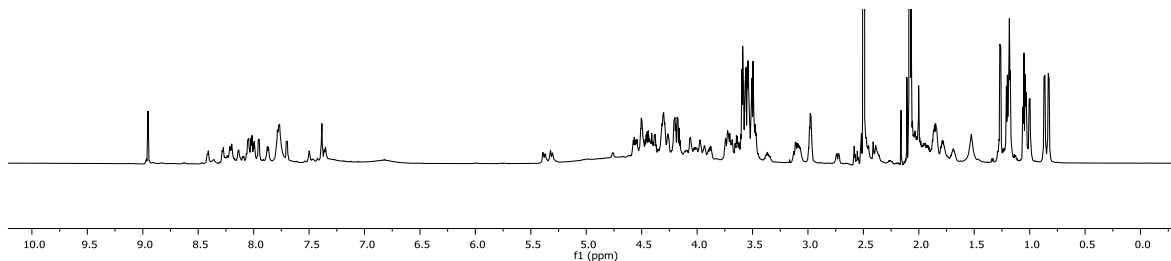
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, CDCl_3):



$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-trans-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-trans-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (63)$

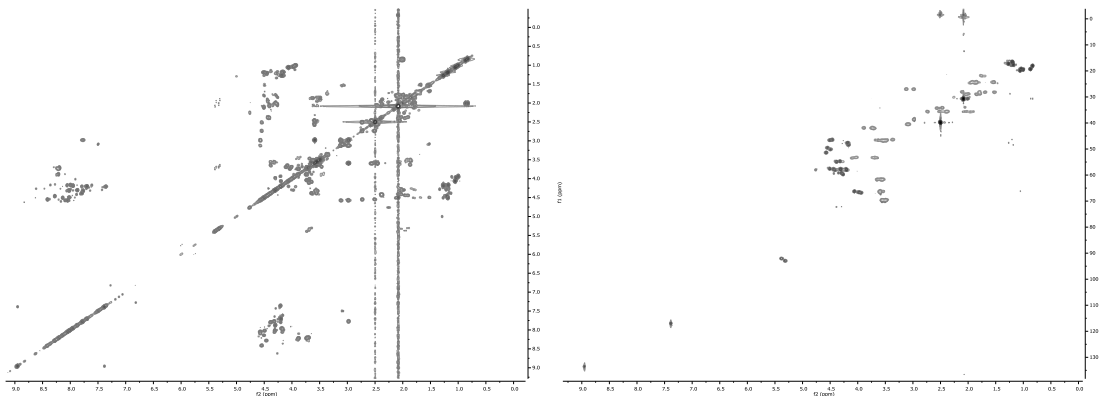


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):



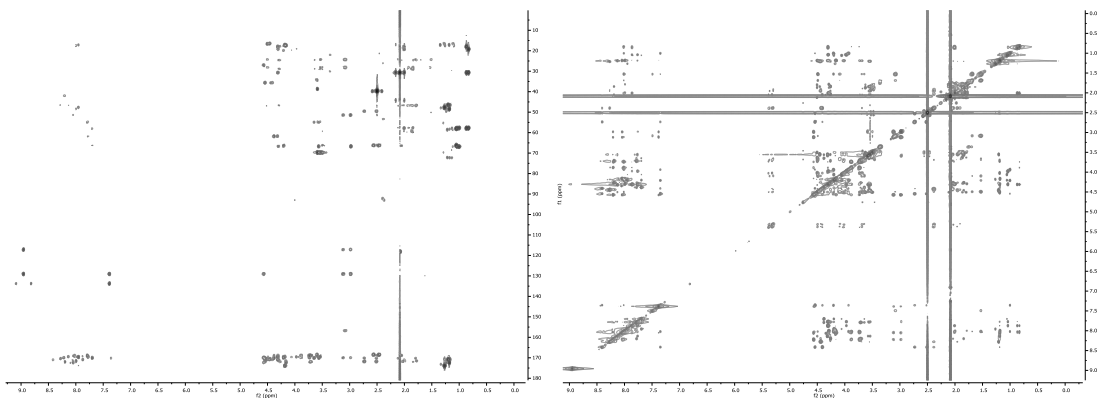
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, CDCl_3):

$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, CDCl_3):

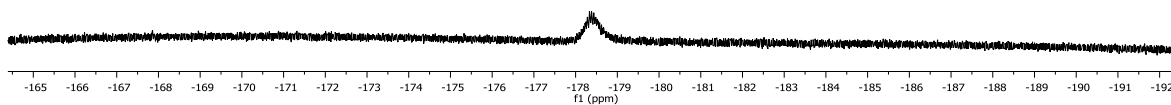


$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, CDCl_3):

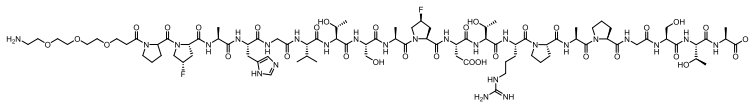
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, CDCl_3):



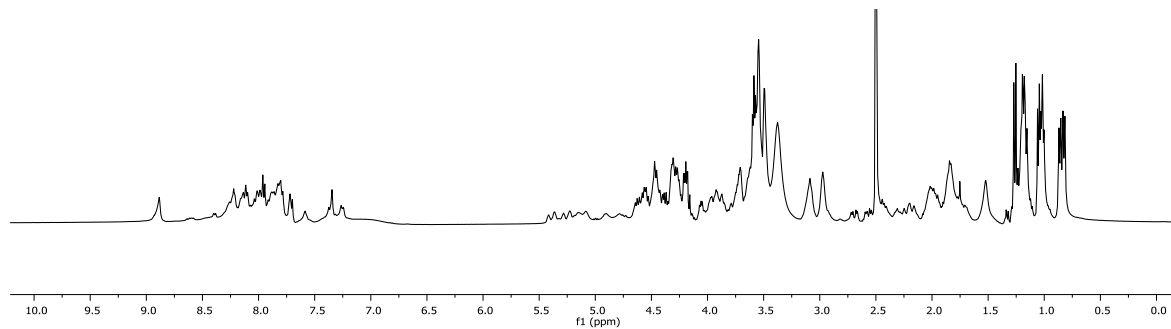
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, CDCl_3):



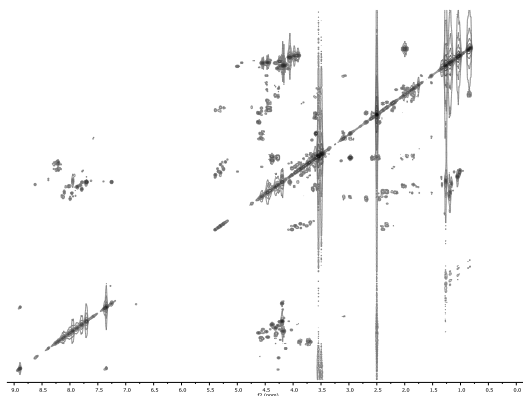
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (64)



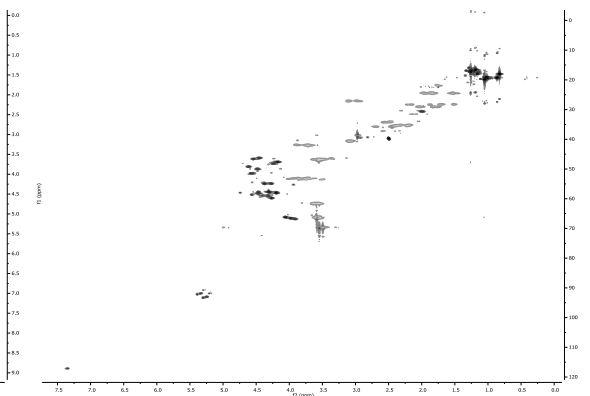
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



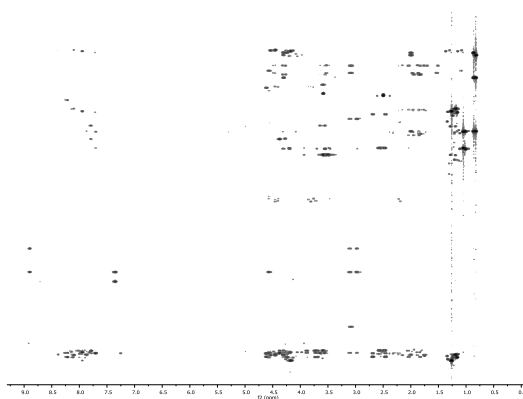
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



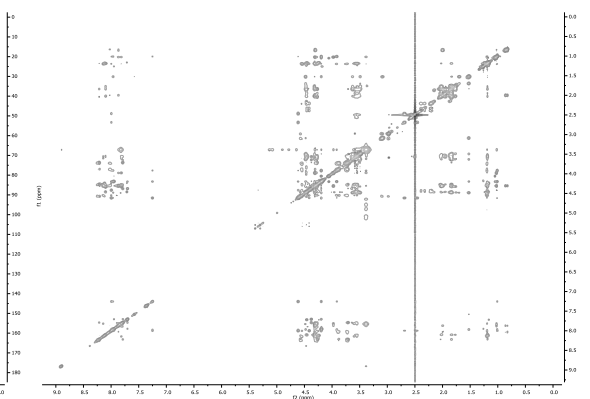
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



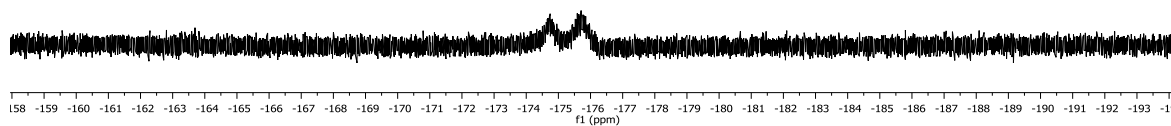
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



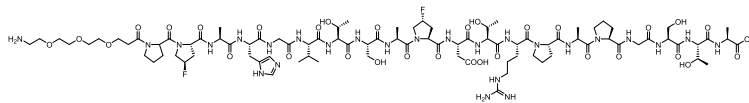
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



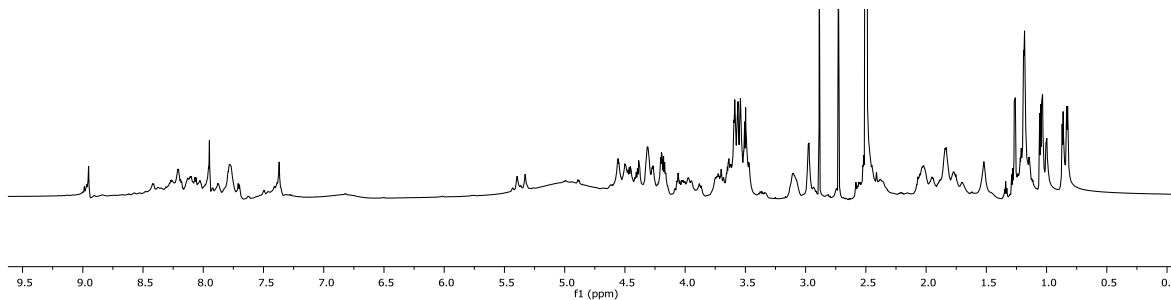
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Pro-trans-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-trans-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH}$ (65)

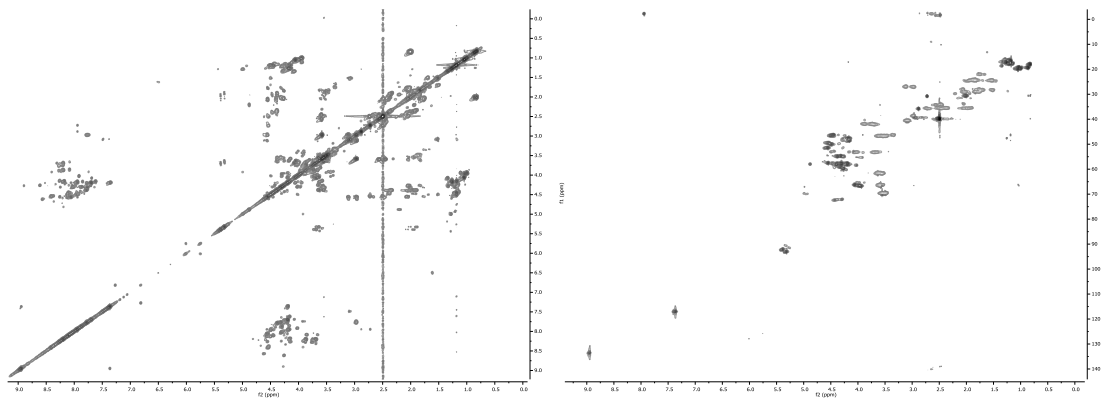


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3):



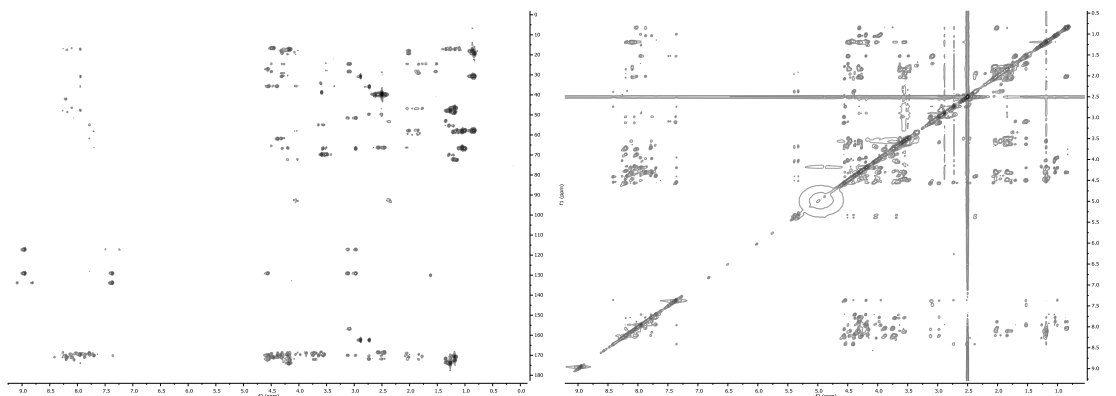
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, CDCl_3):

$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, CDCl_3):

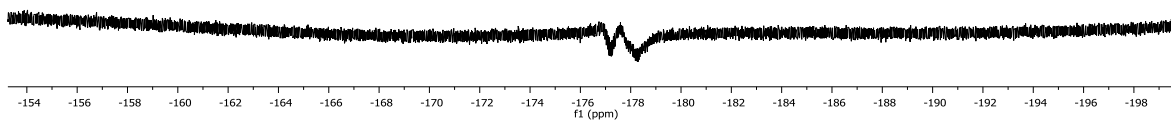


$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, CDCl_3):

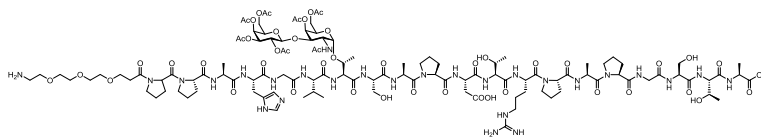
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, CDCl_3):



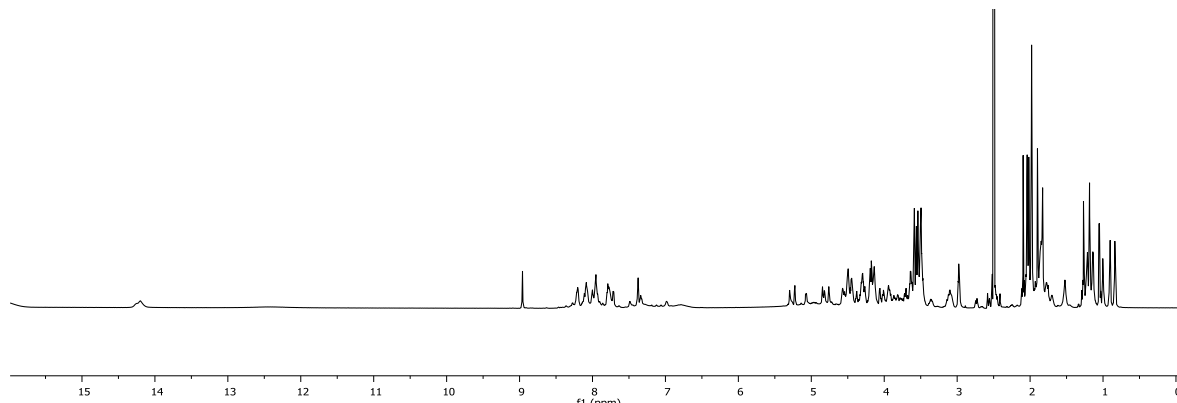
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, CDCl_3):



H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (66)

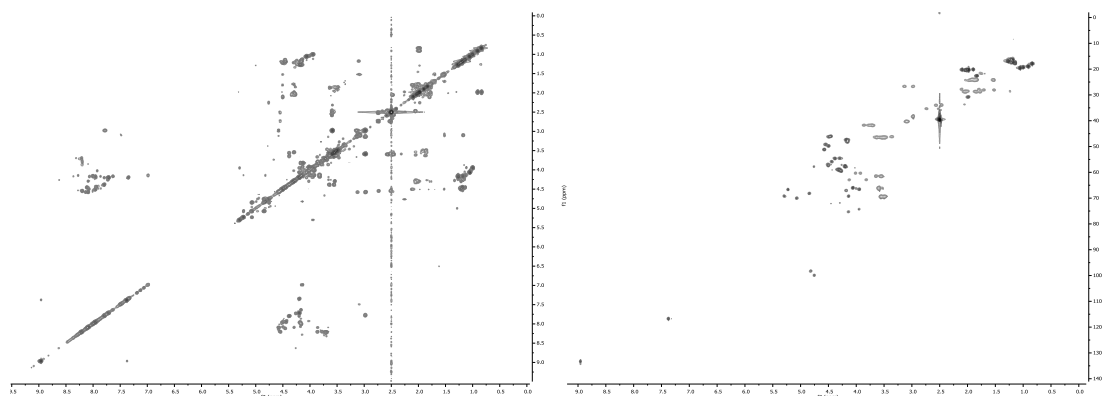


¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



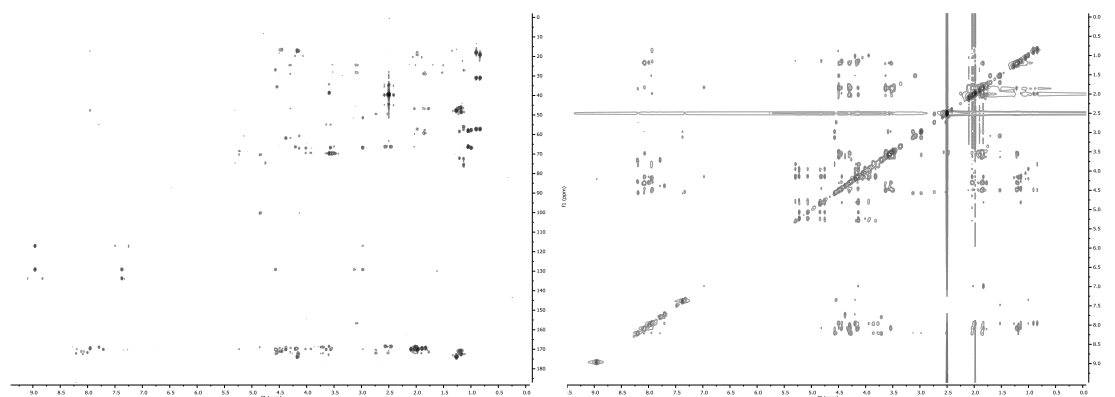
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):

¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):

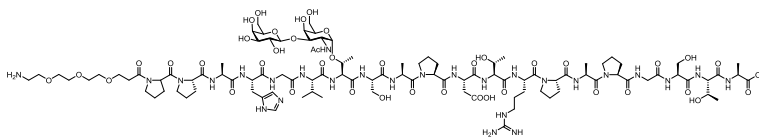


¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):

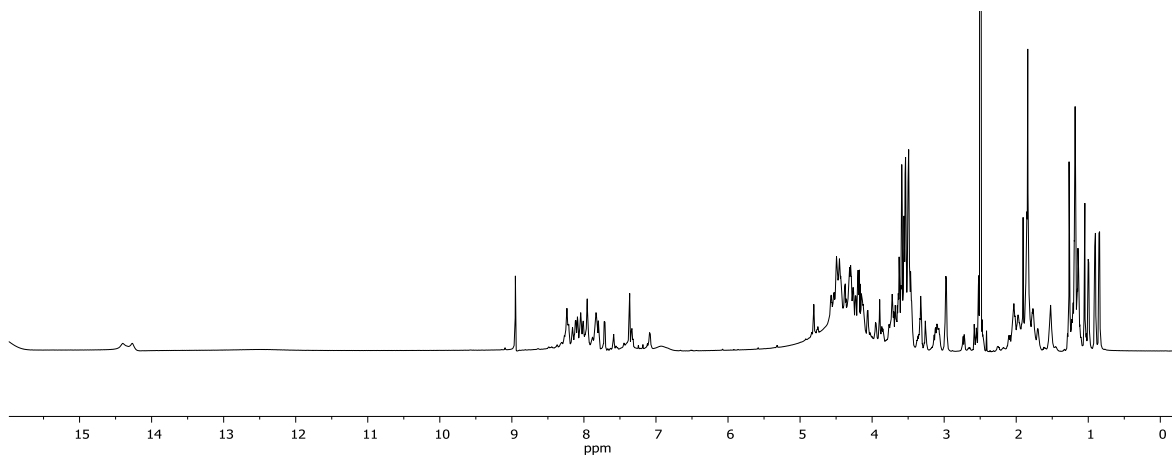
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



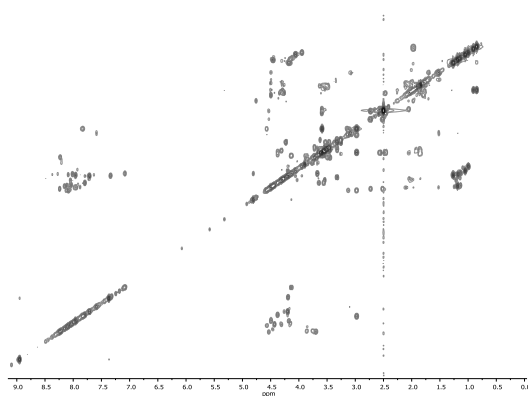
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (71)



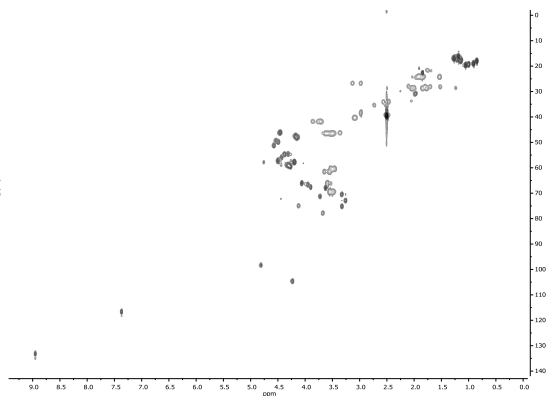
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



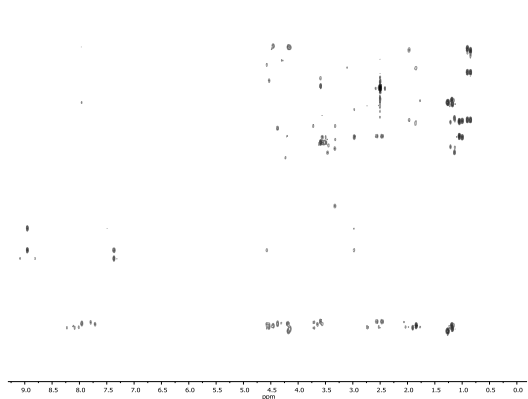
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



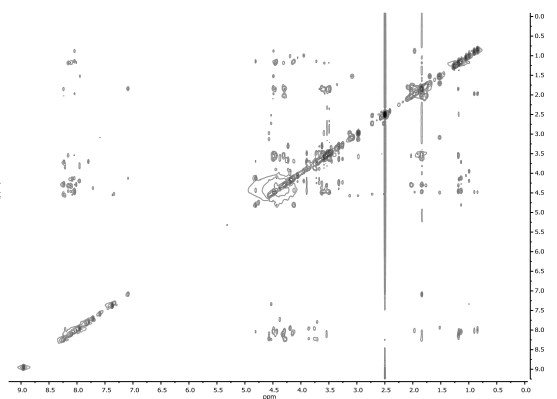
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



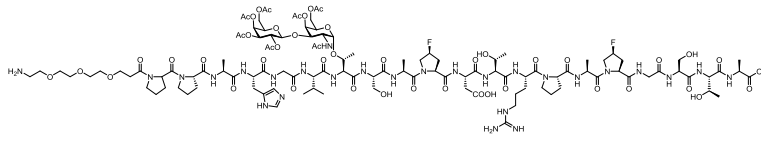
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



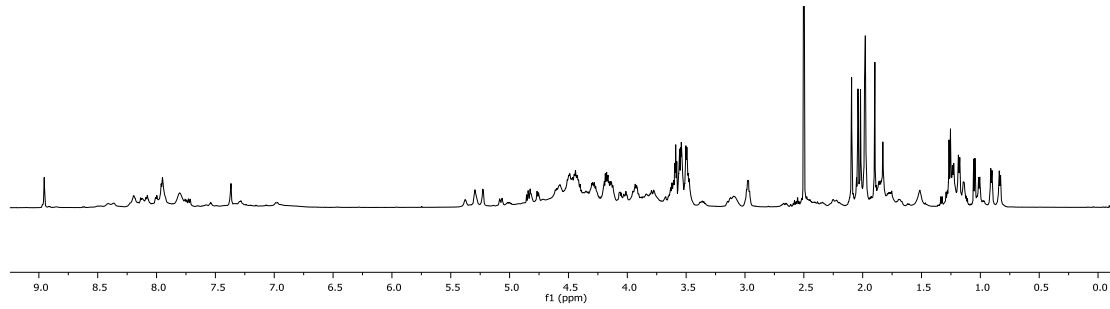
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



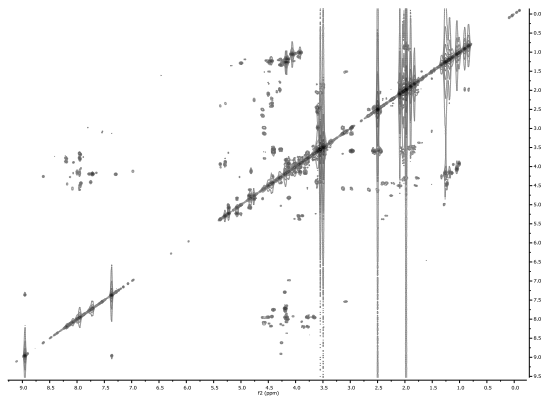
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-cis-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-cis-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH
(76)



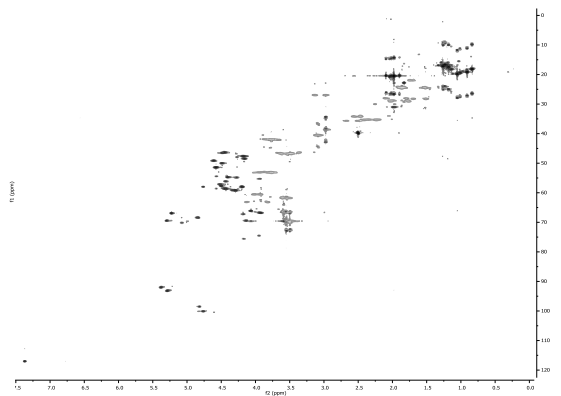
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



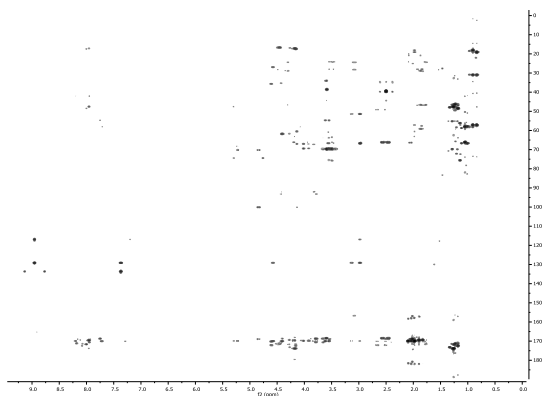
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



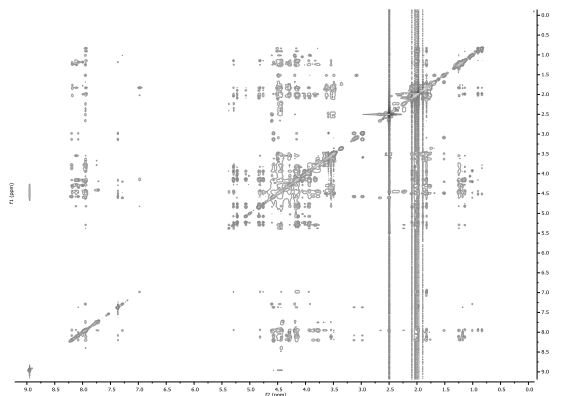
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



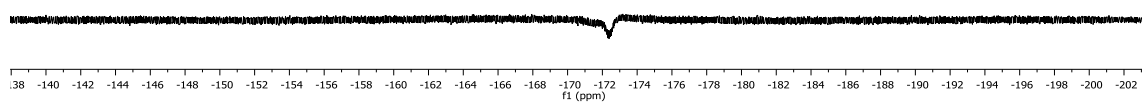
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



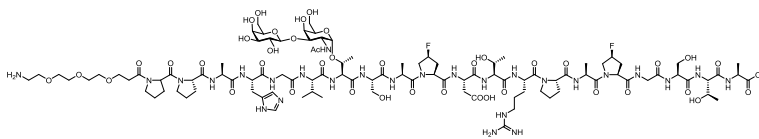
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



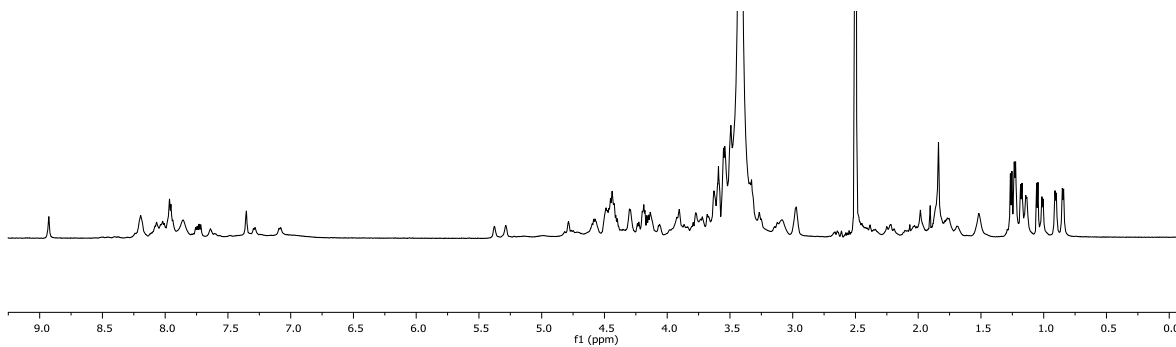
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



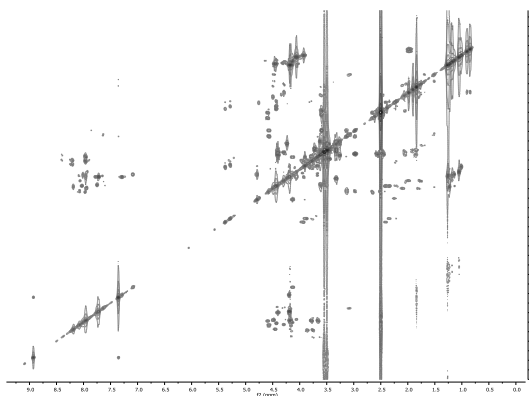
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-cis-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-cis-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (72)



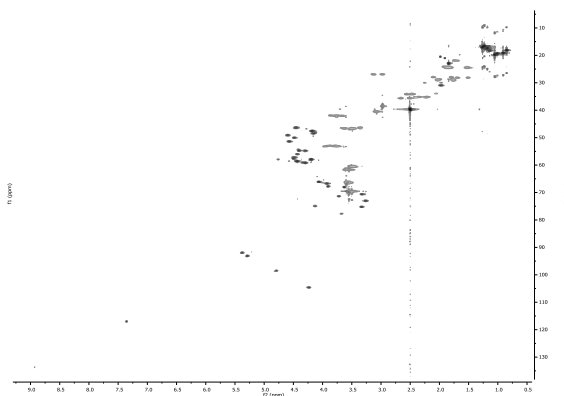
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



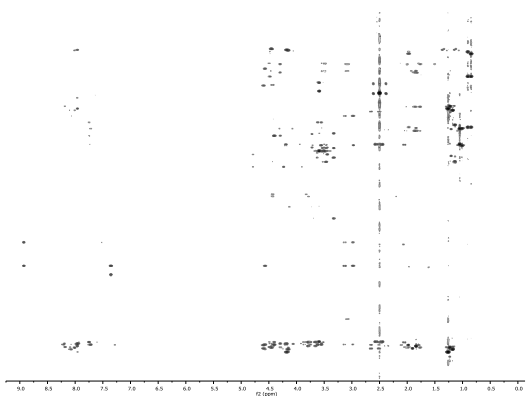
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



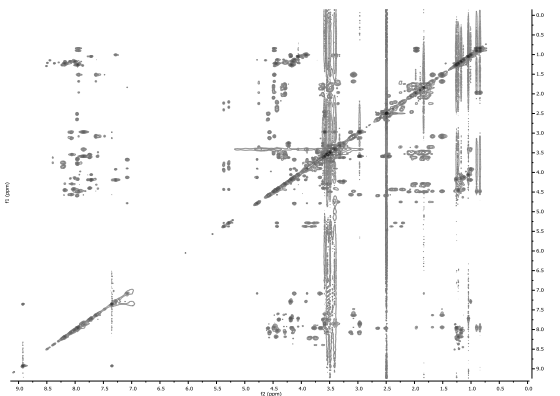
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



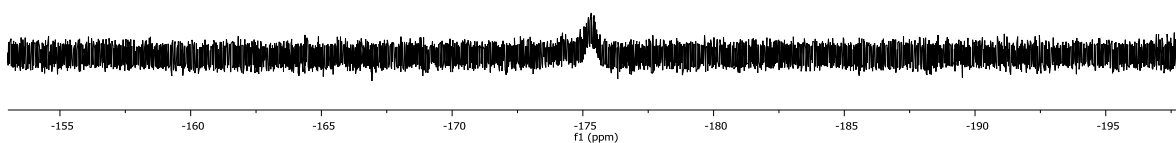
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



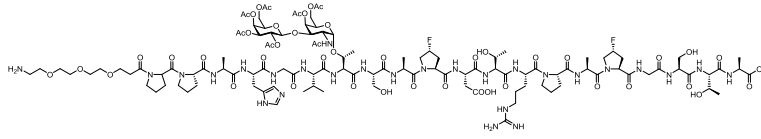
¹H-¹H-TOCSY (800 MHz, CDCl₃):



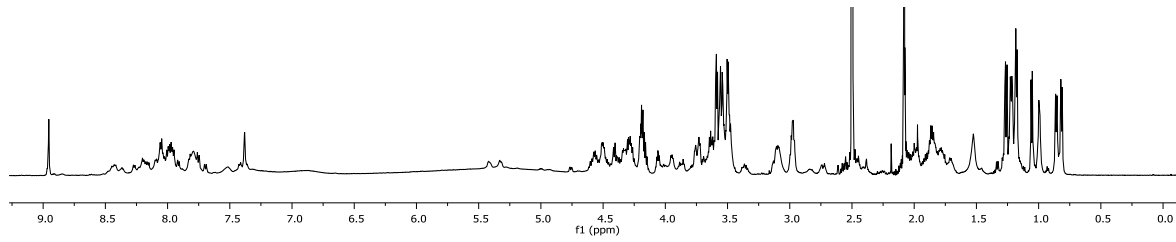
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*trans*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (68)

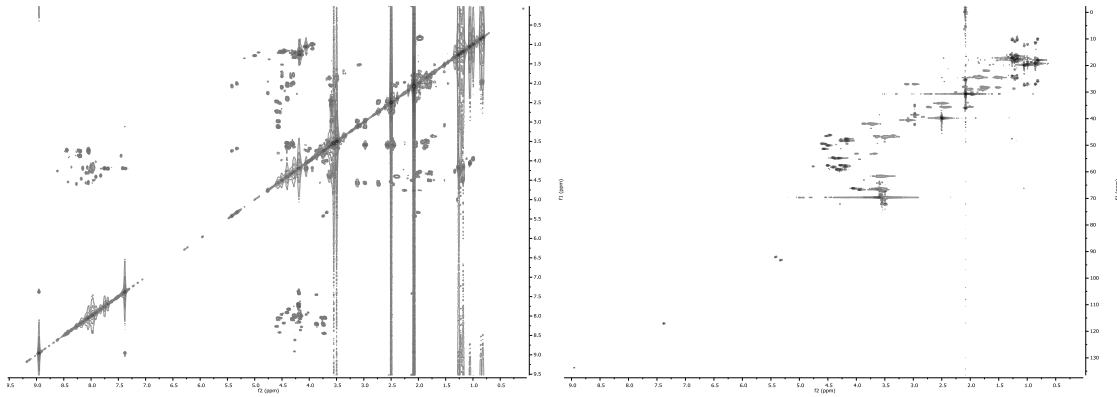


¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



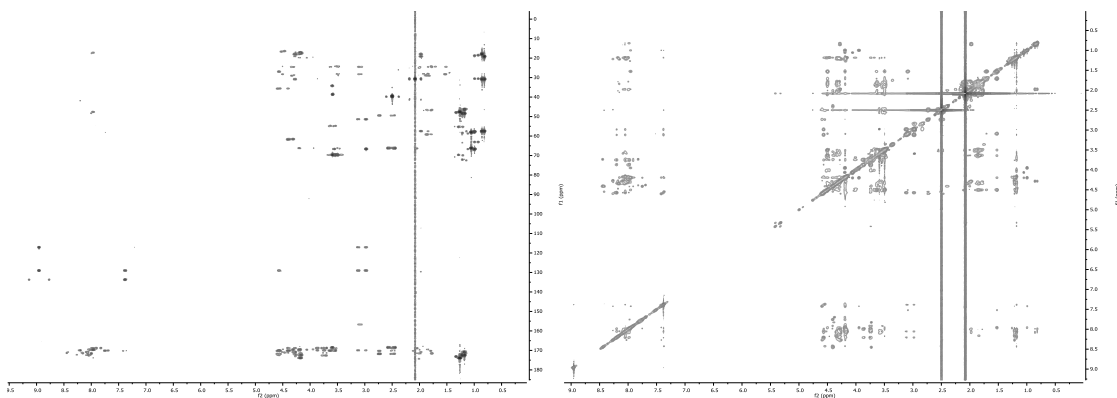
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):

¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):

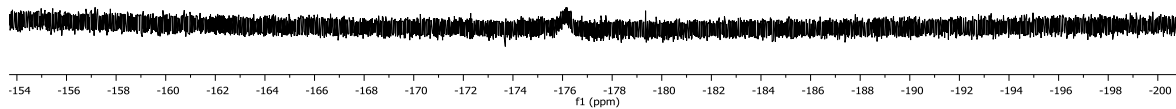


¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):

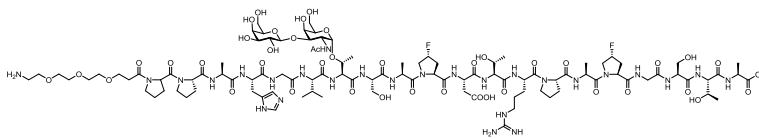
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



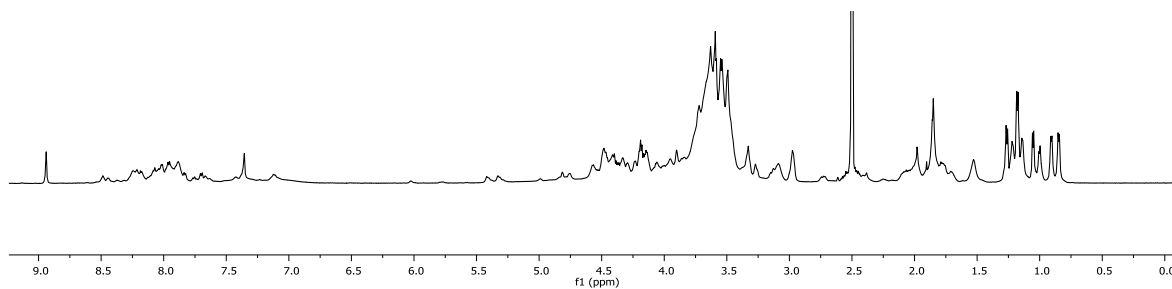
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



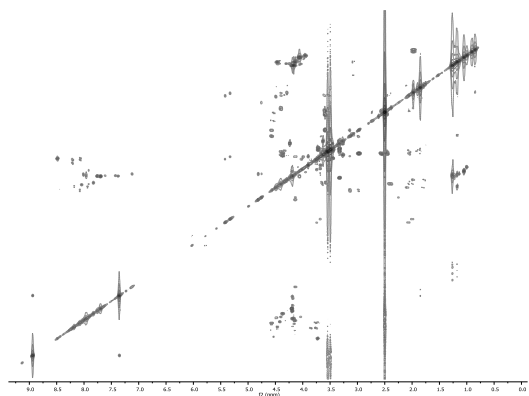
**H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-
Ser-Ala-trans-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-trans-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (73)**



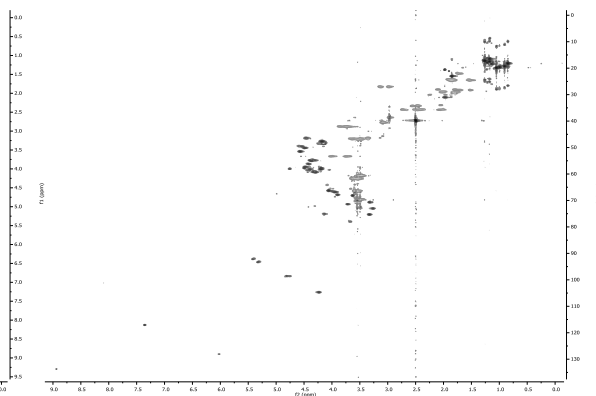
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



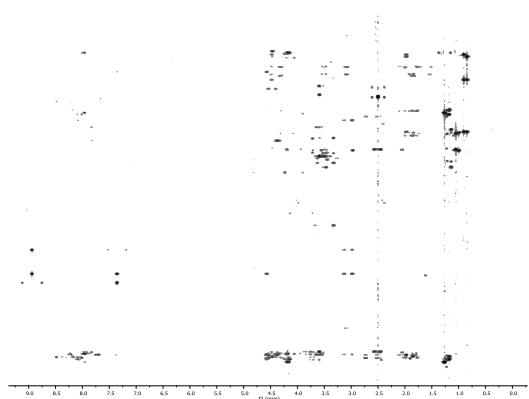
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



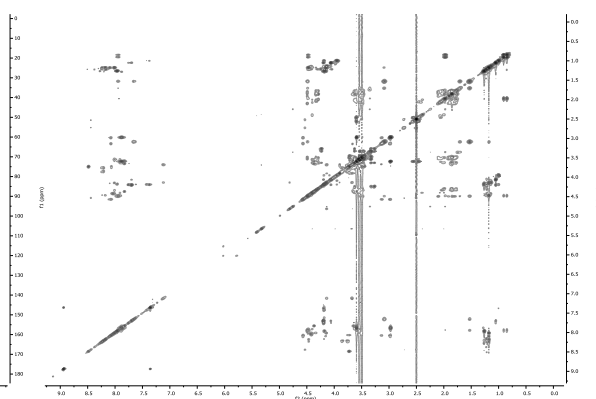
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



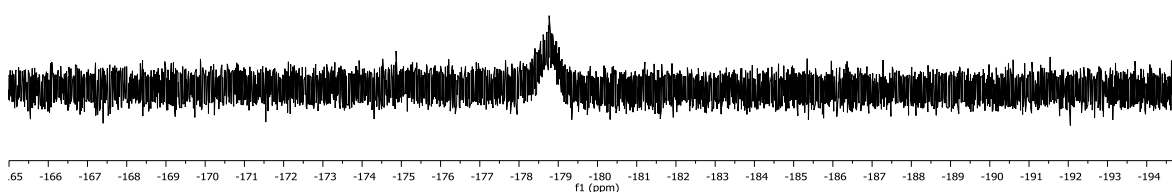
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



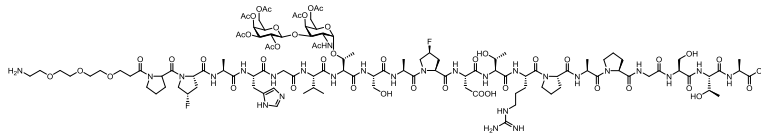
¹H-¹H-TOCSY (800 MHz, CDCl₃):



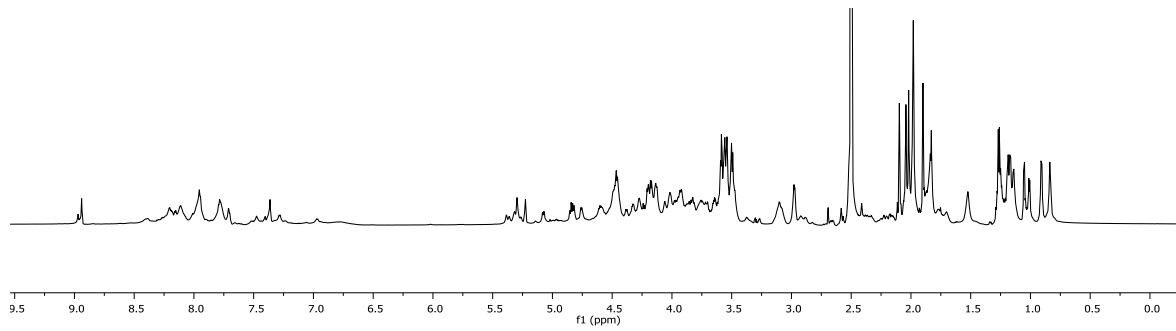
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



**H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Ac₄Gal-(1→3)-
α-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (69)**

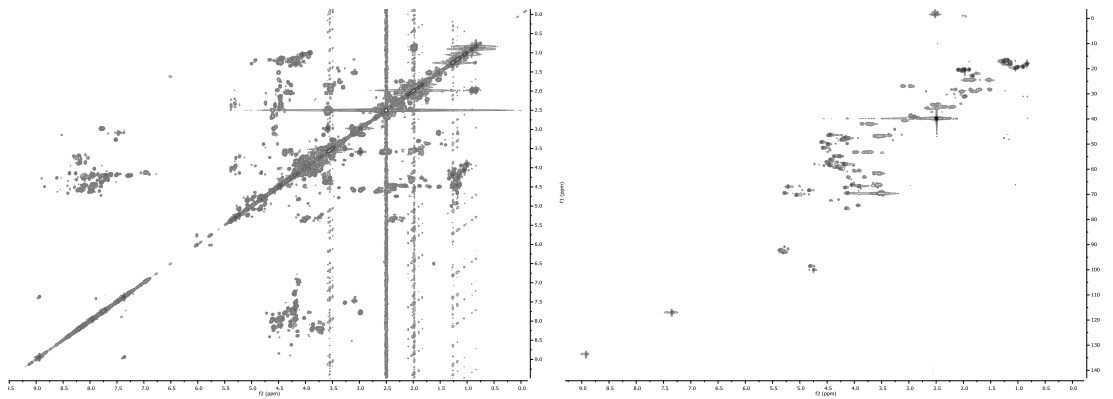


¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



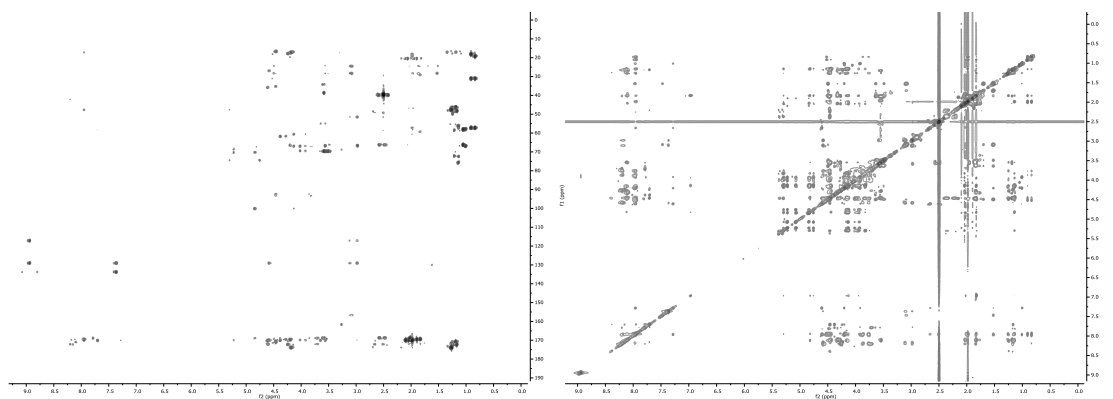
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):

^H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):

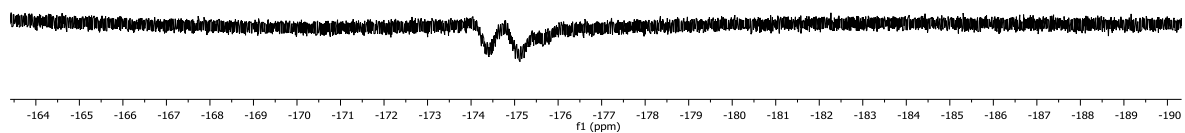


¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):

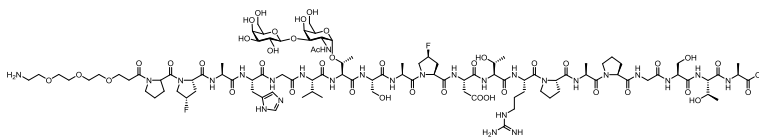
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



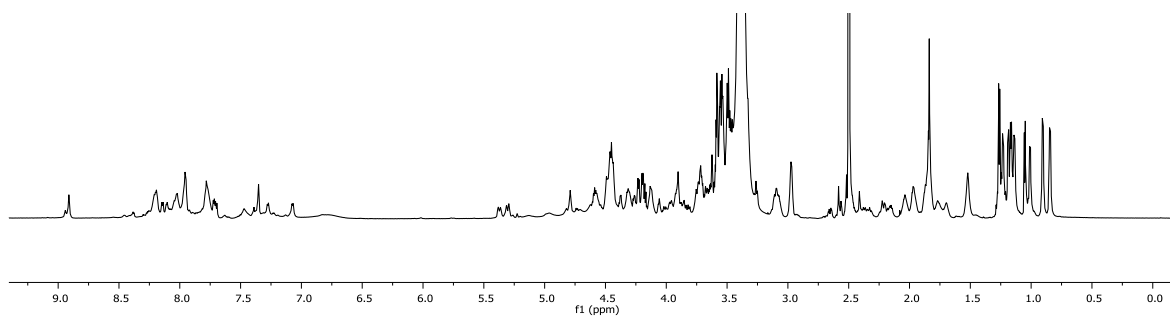
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (74)

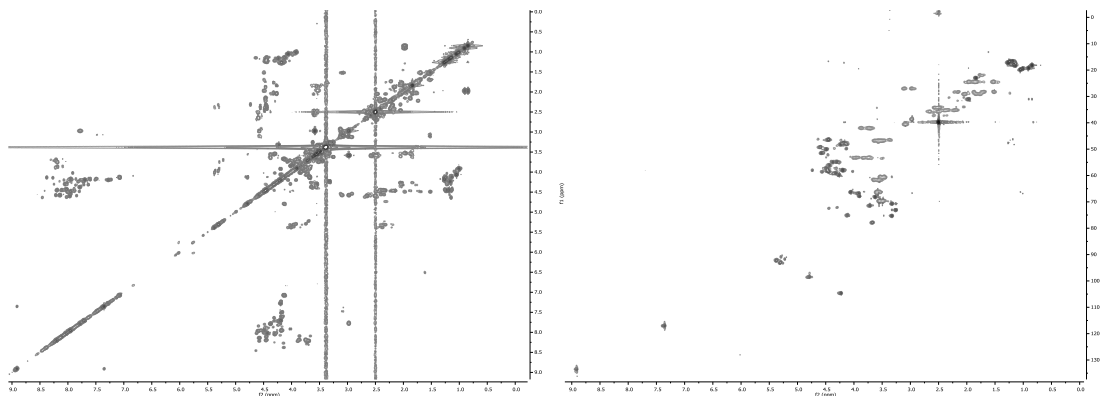


¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



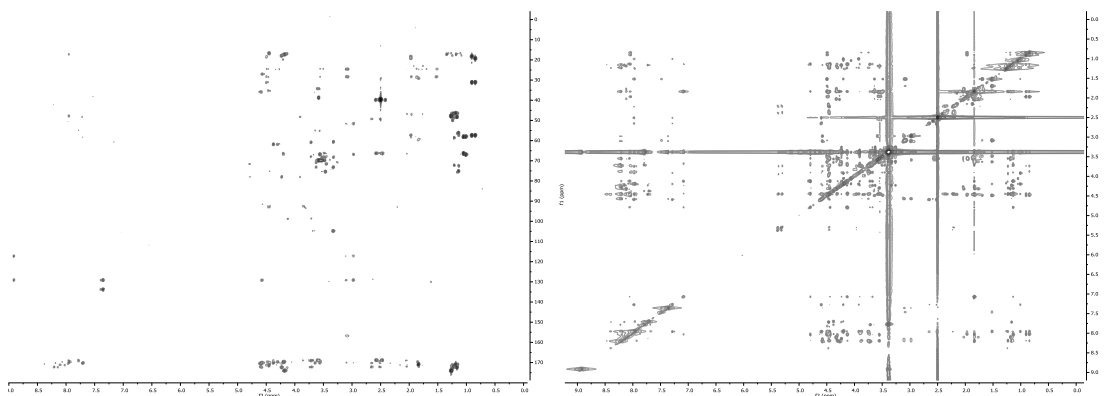
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):

¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):

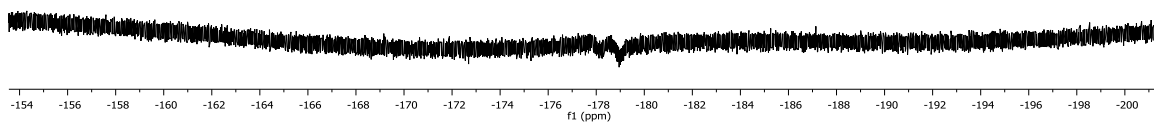


¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):

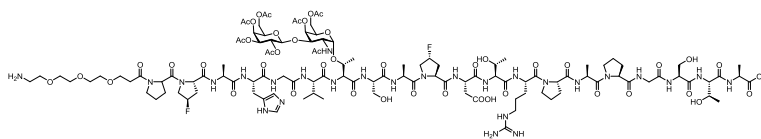
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



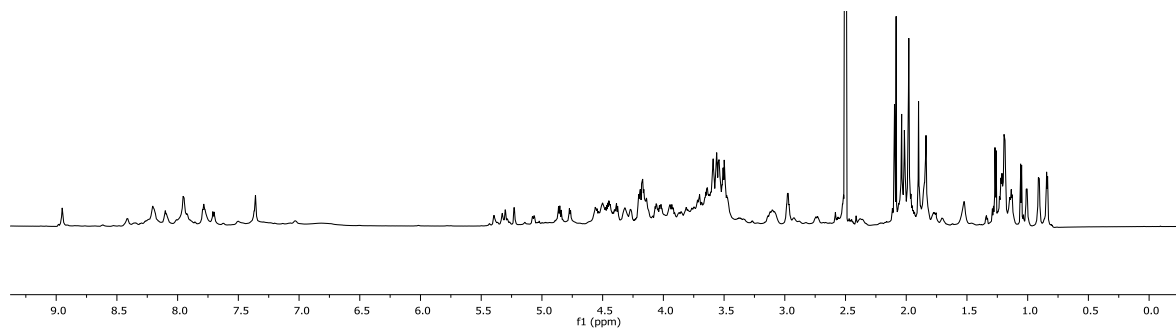
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



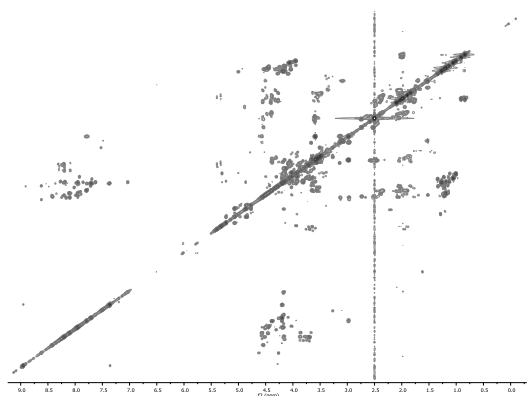
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*trans*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Ac₄Gal-(1→3)-α-Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH
(70)



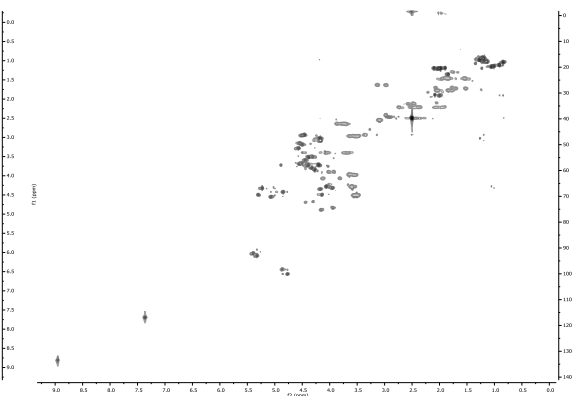
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



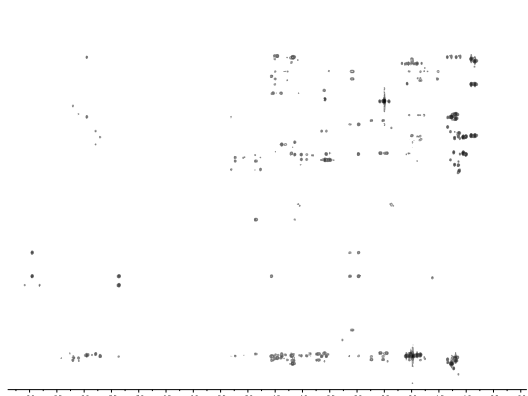
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



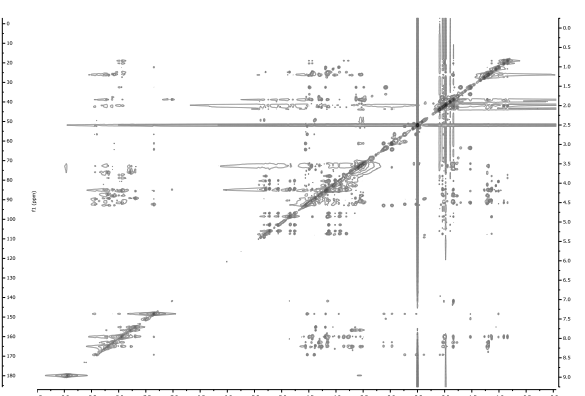
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



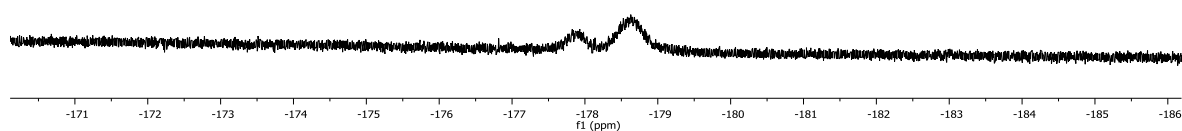
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



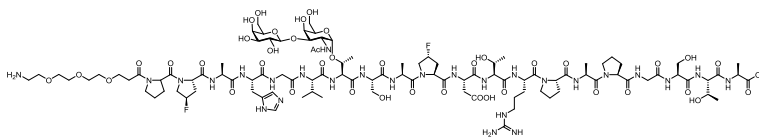
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



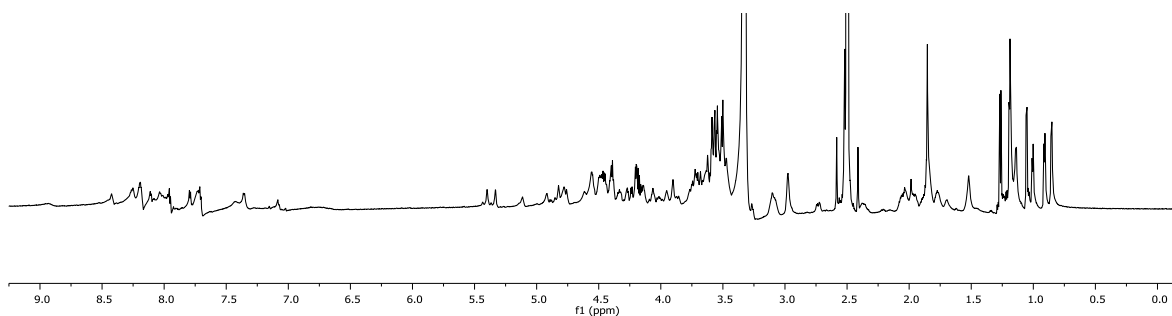
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



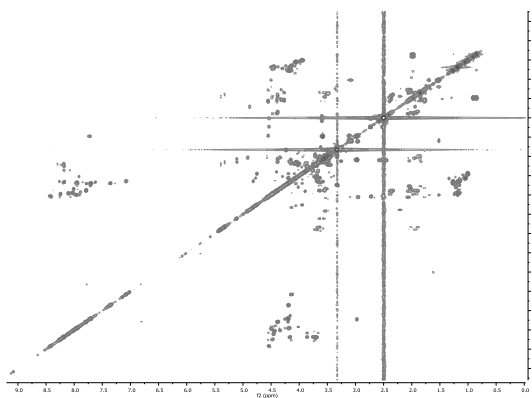
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-*trans*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β-Gal-(1→3)-α-GalNAc)-Ser-Ala-*trans*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (75)



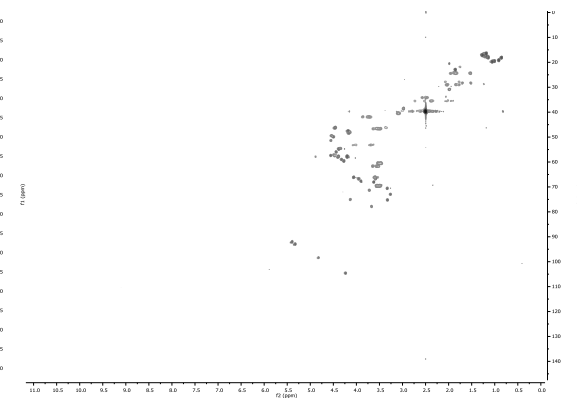
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃):



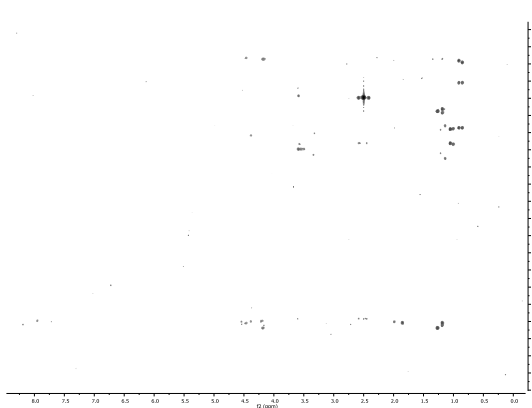
¹H-¹H-COSY (800 MHz, CDCl₃):



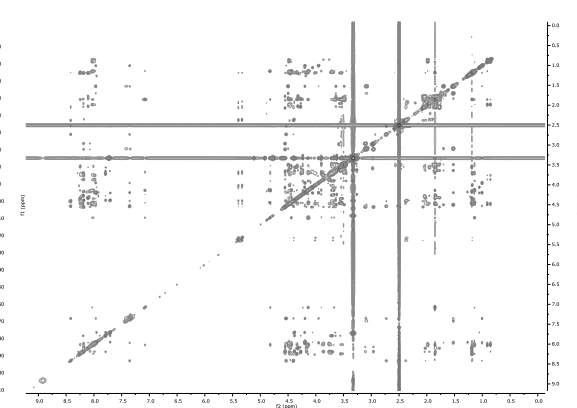
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, CDCl₃):



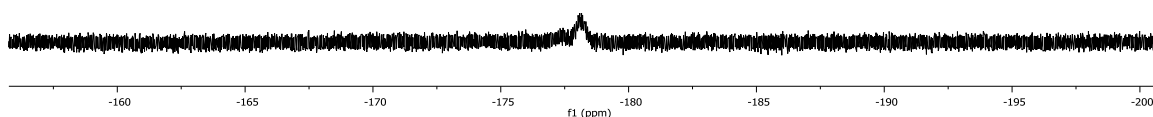
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, CDCl₃):



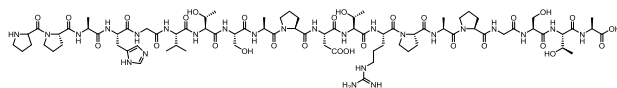
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, CDCl₃):



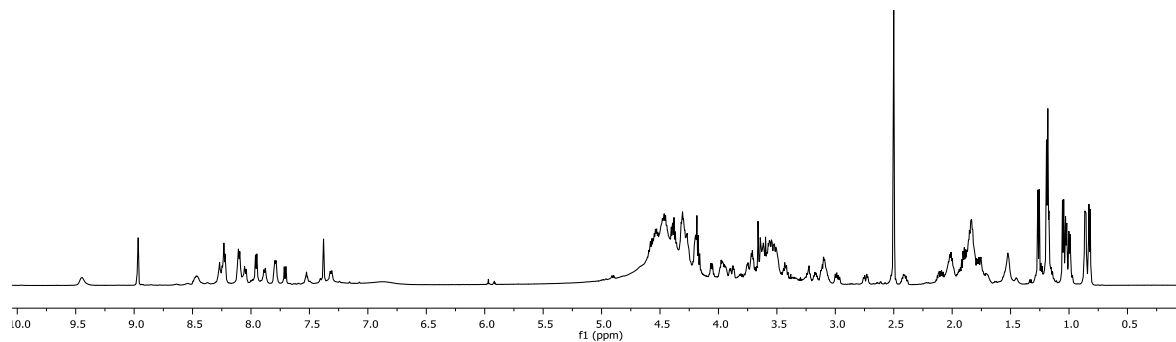
¹⁹F-NMR (280 MHz, CDCl₃):



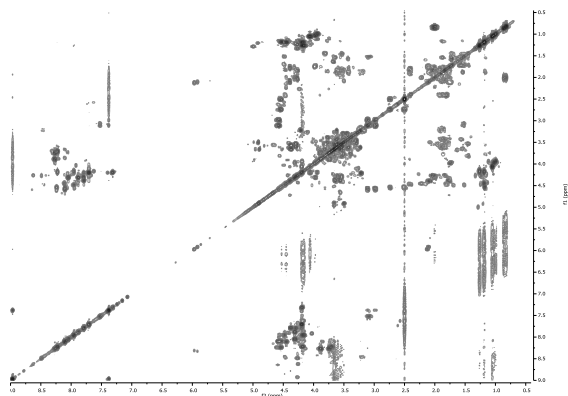
Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (78)



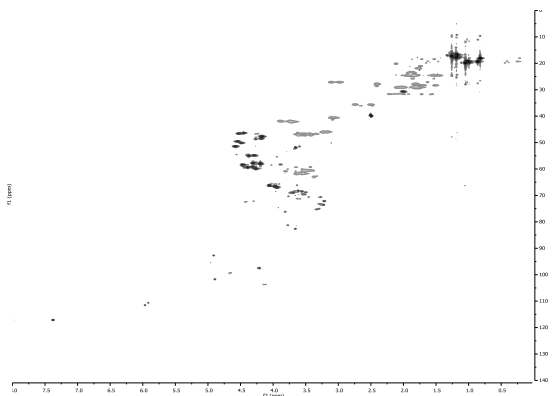
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



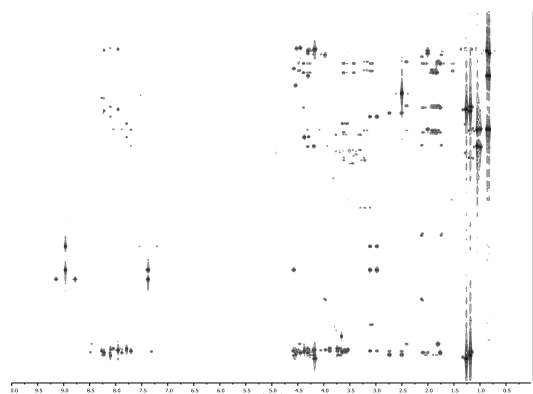
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



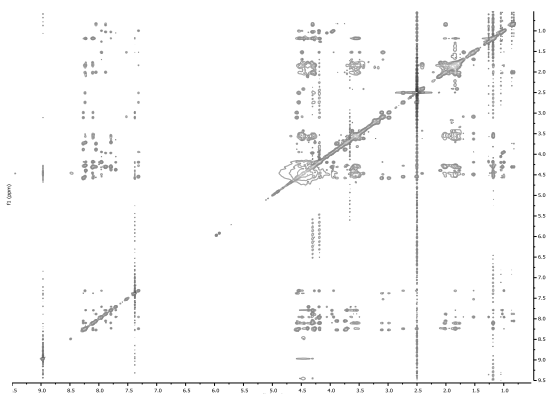
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (150 MHz, DMSO):



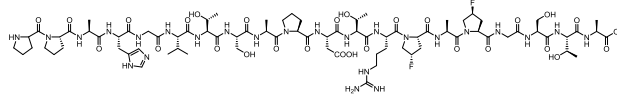
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (150 MHz, DMSO):



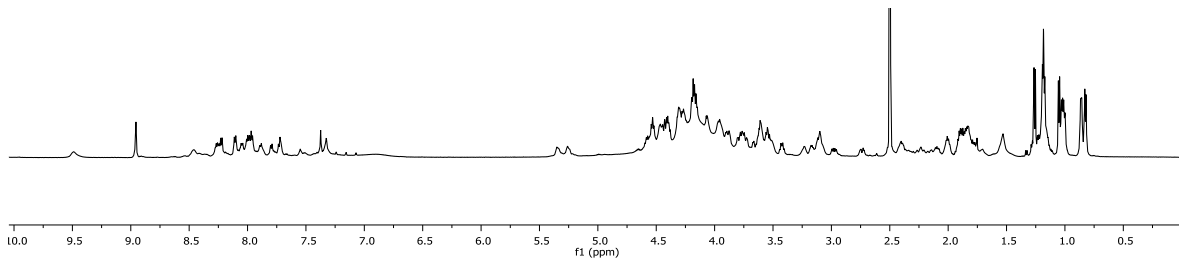
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-*cis*-4-F-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (79)

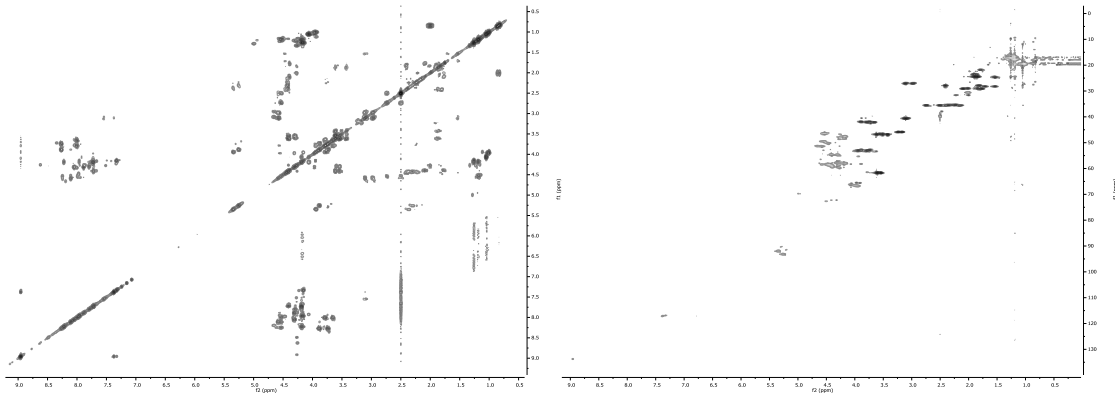


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



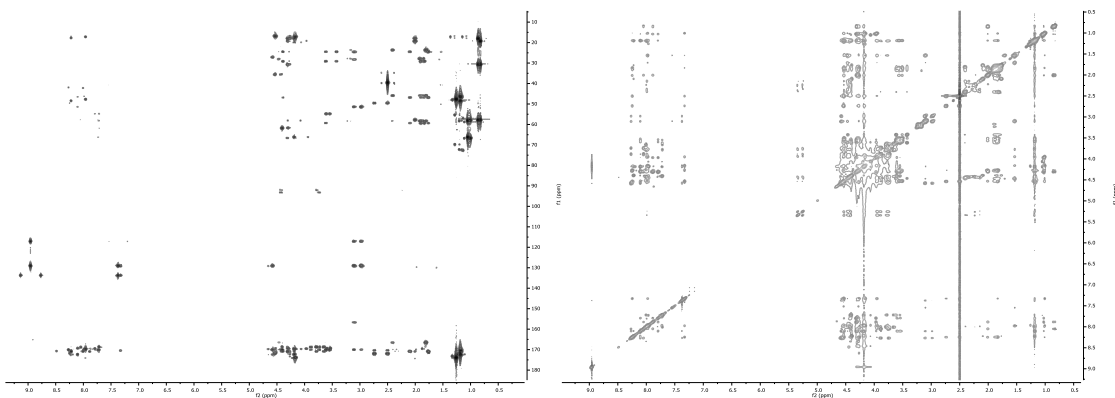
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):

$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (150 MHz, DMSO):

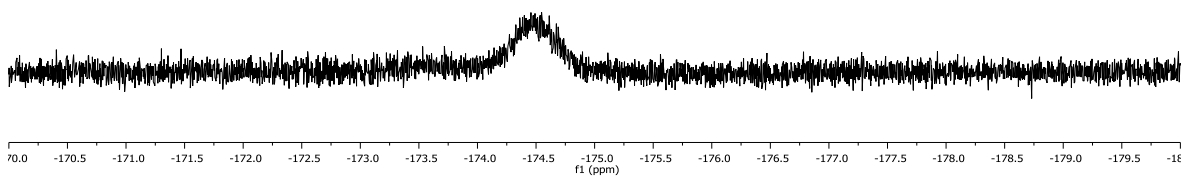


$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (150 MHz, DMSO):

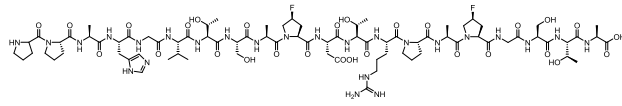
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



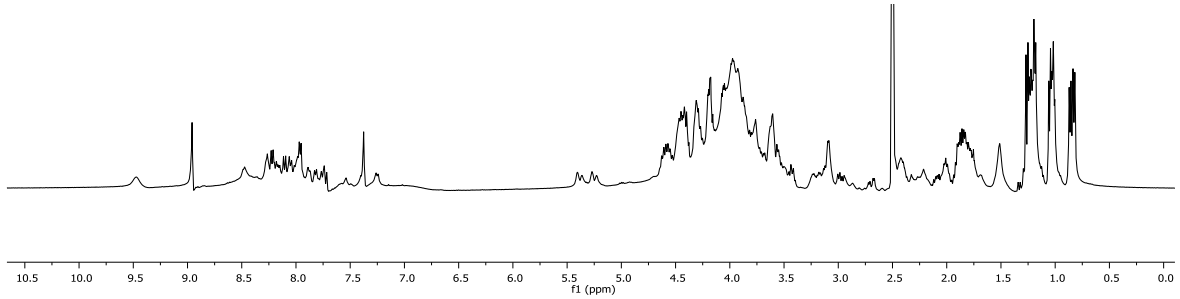
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-cis-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-cis-4-F-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (80)

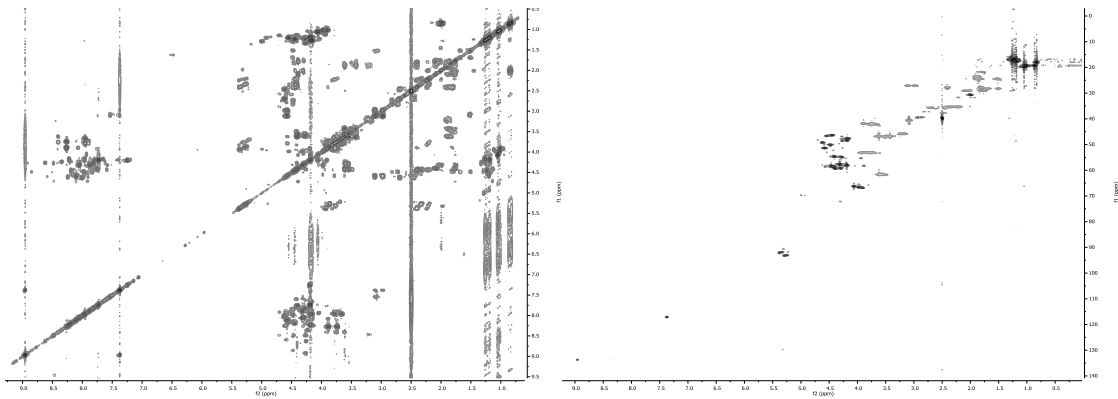


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- D_6):



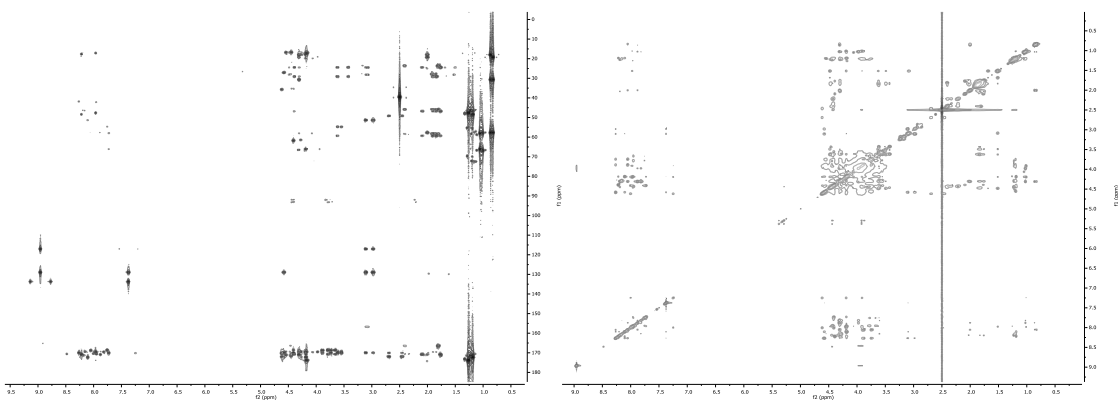
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (600 MHz, DMSO- D_6):

$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (150 MHz, DMSO):

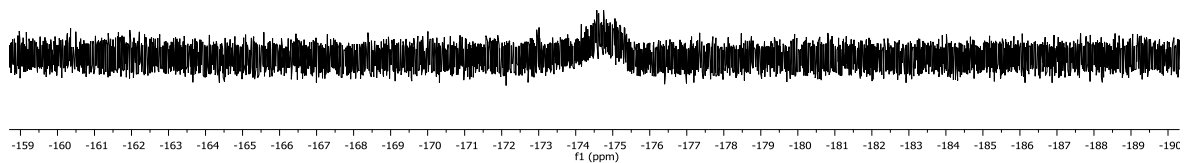


$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (150 MHz, DMSO):

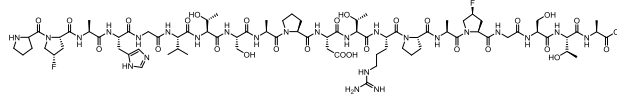
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz, DMSO- D_6):



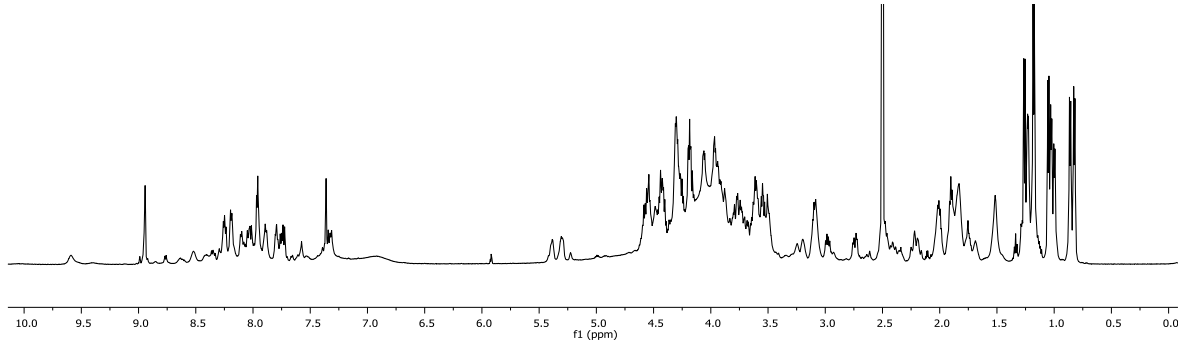
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



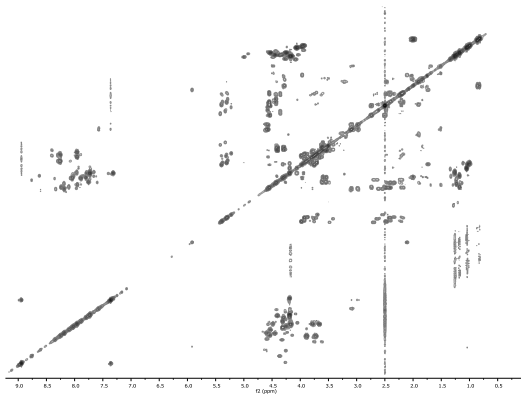
Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-*cis*-4-F-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (81)



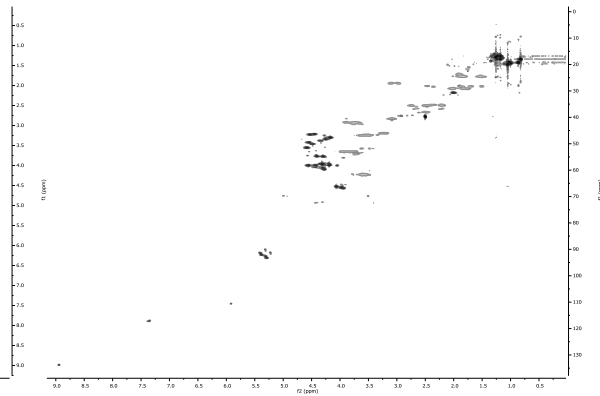
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



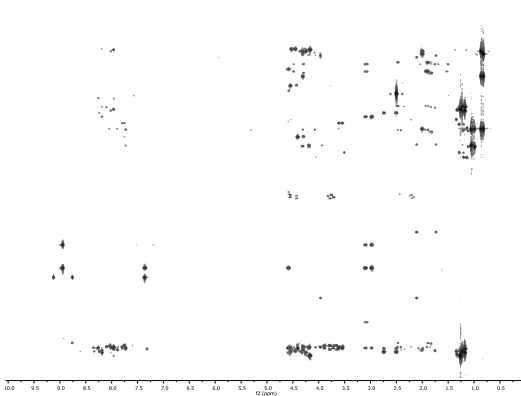
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



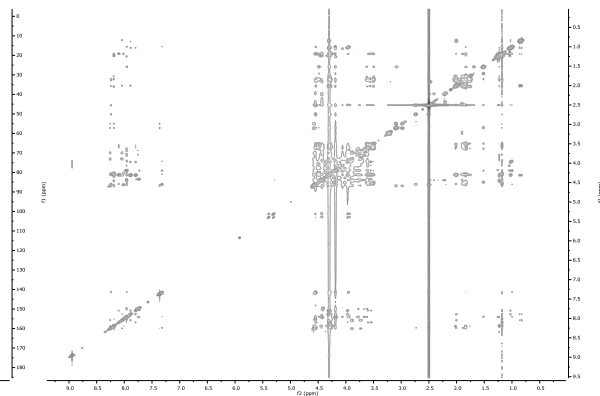
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (150 MHz, DMSO):



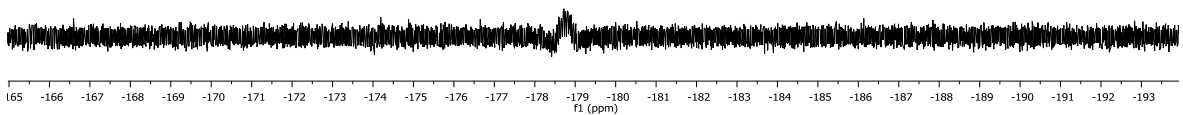
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (150 MHz, DMSO):



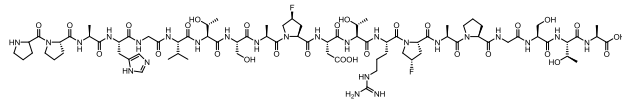
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



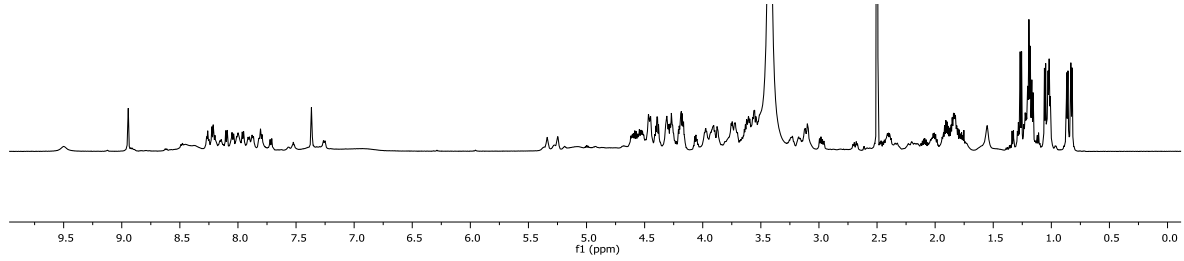
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



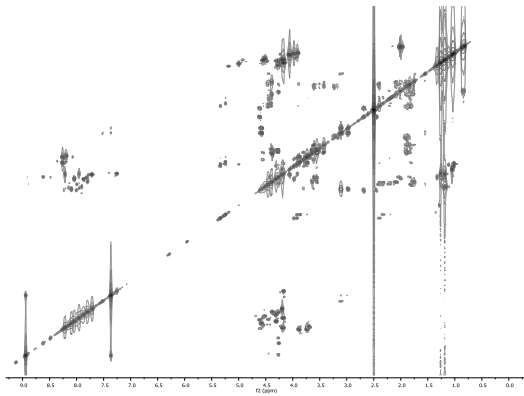
Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (82)



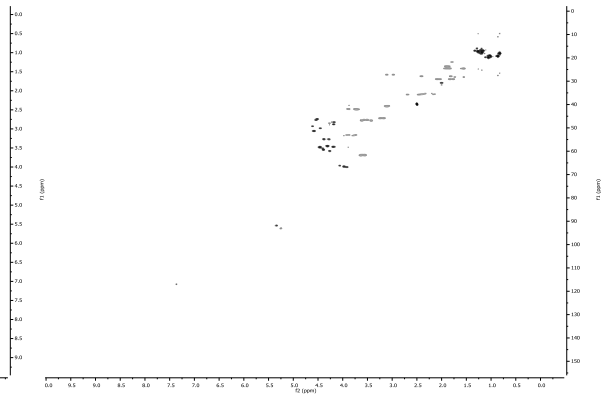
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



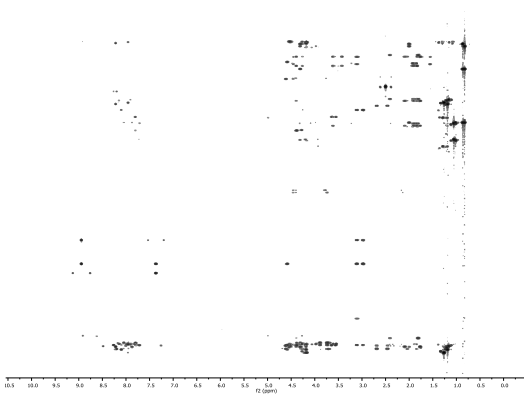
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



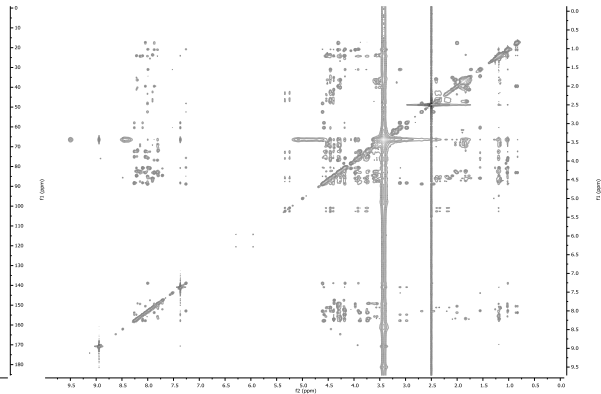
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (150 MHz, DMSO):



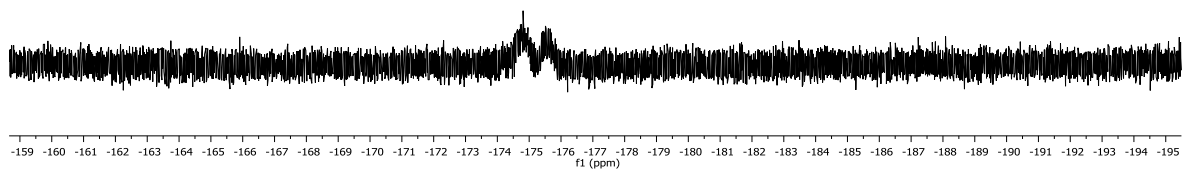
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (150 MHz, DMSO):



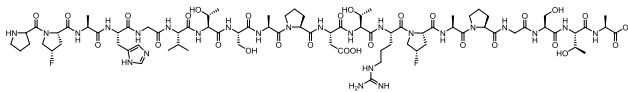
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



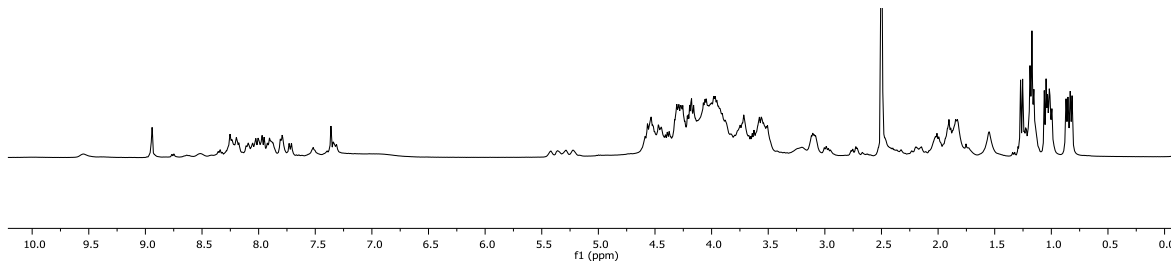
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



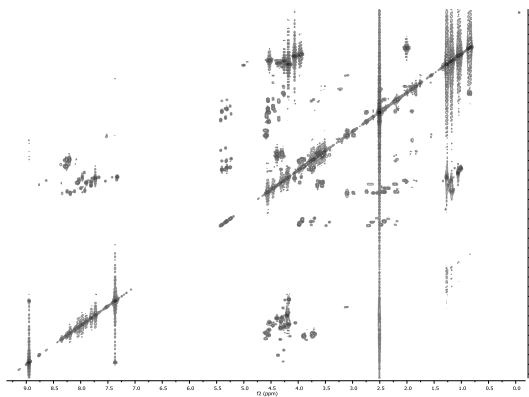
Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-*cis*-4-F-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (83)



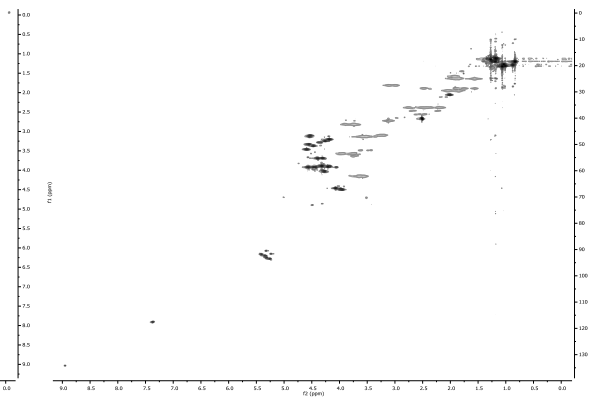
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



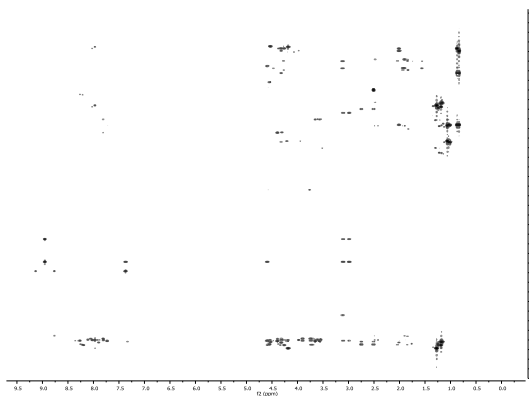
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



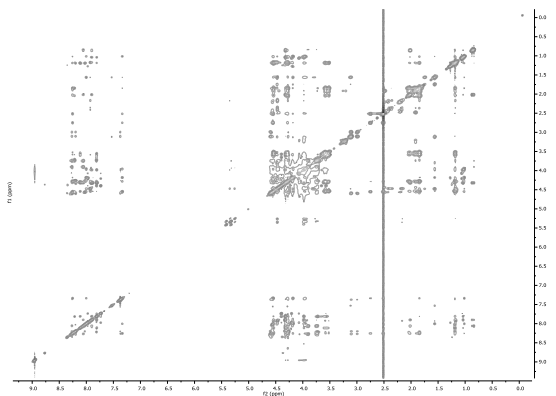
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (150 MHz, DMSO):



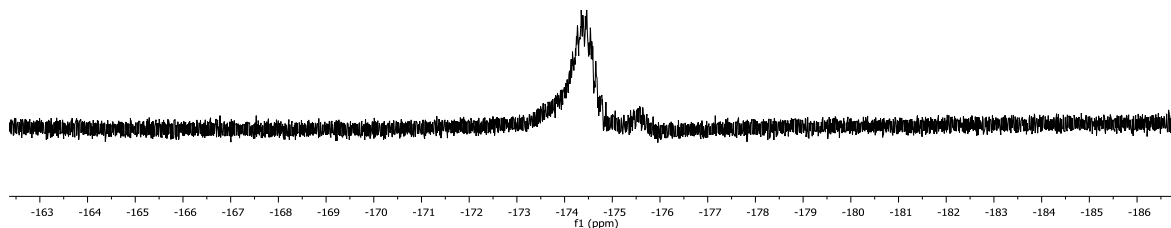
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (150 MHz, DMSO):



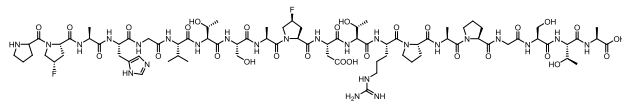
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



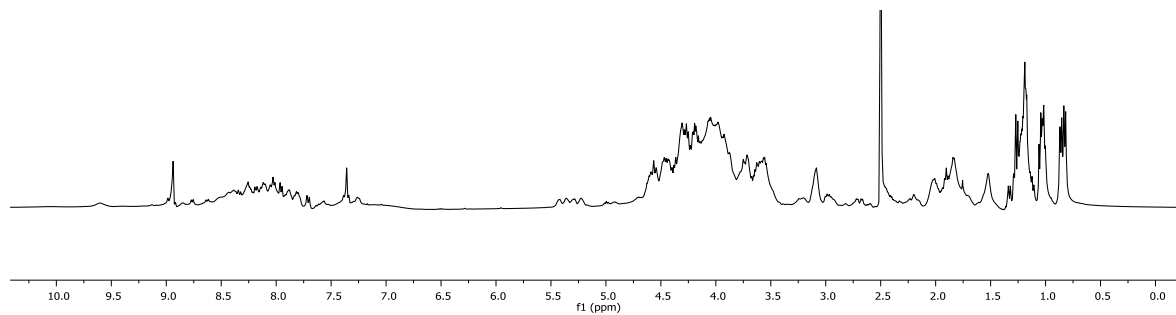
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



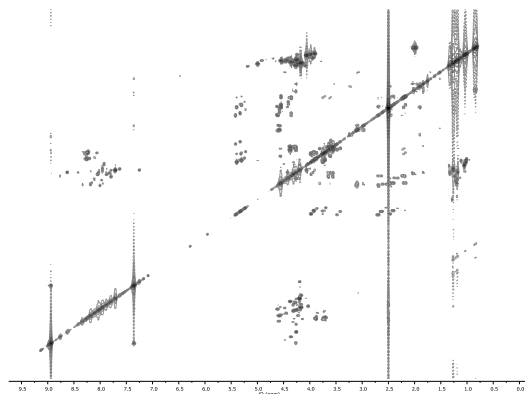
Pro-cis-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-cis-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (84)



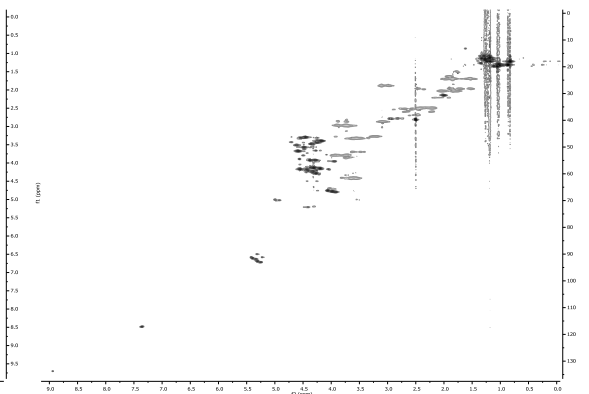
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



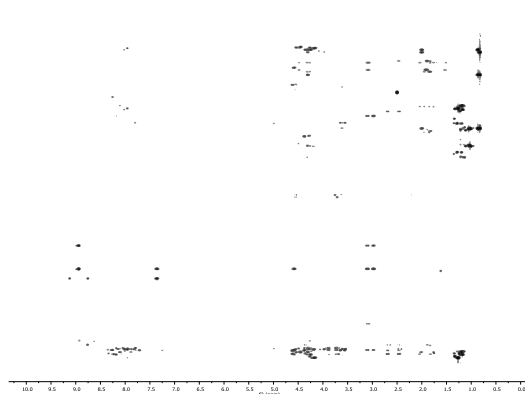
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



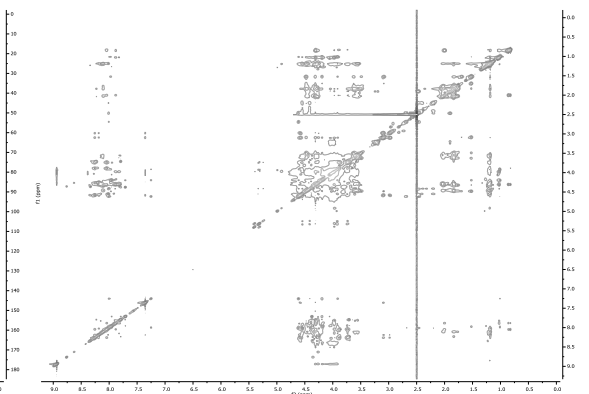
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (150 MHz, DMSO):



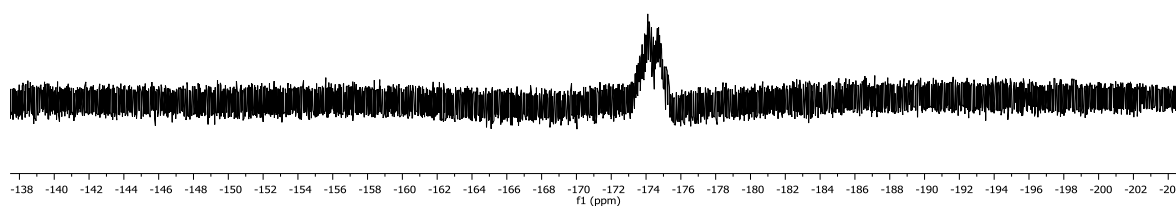
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (150 MHz, DMSO):



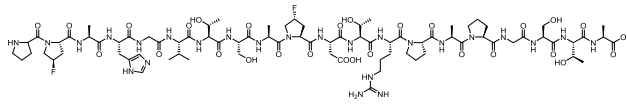
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz, DMSO-D_6):



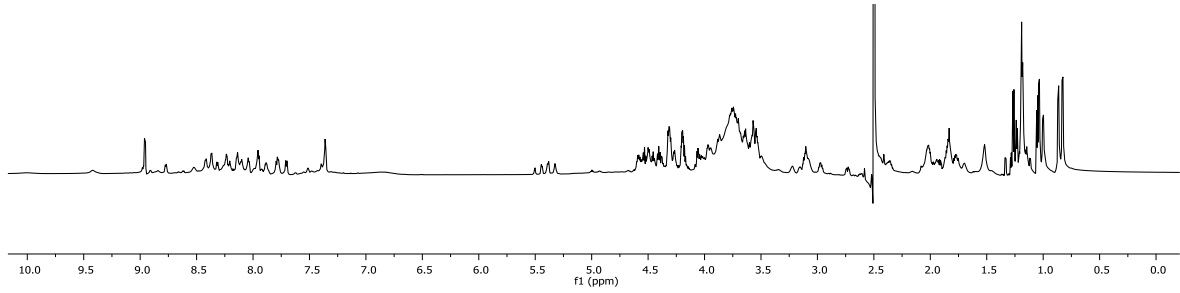
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



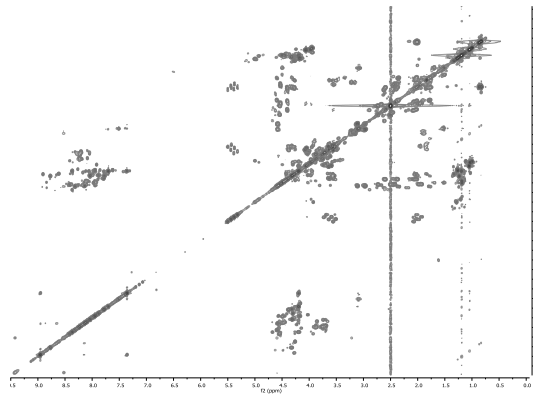
Pro-trans-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-trans-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (85)



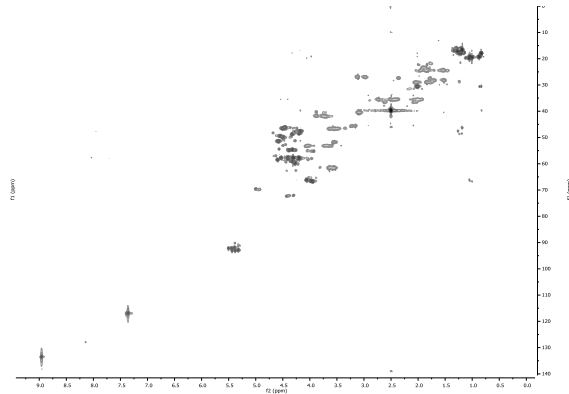
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



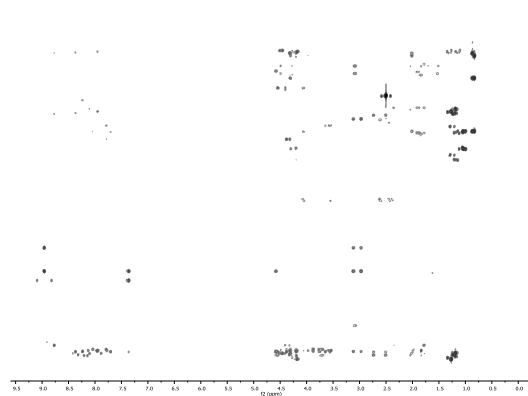
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



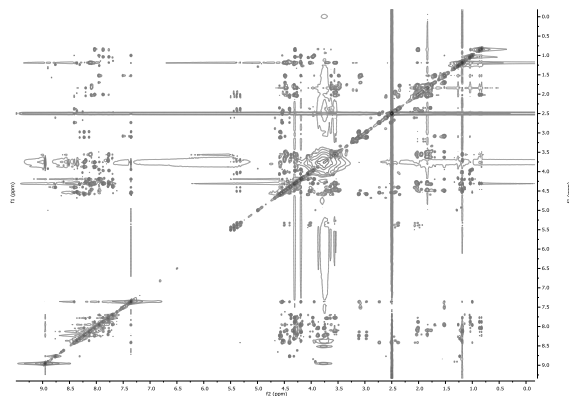
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):



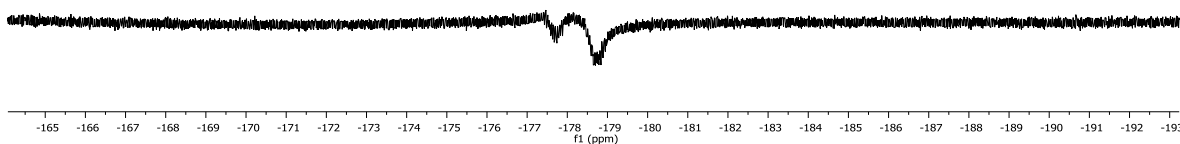
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):

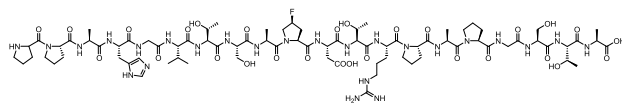


$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):

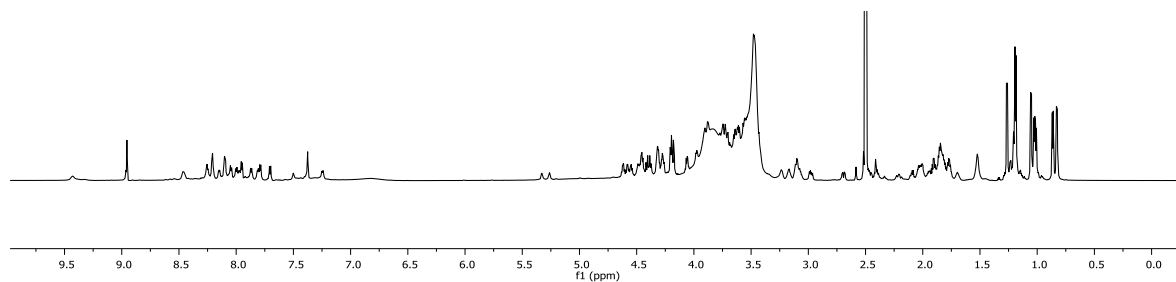


$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):

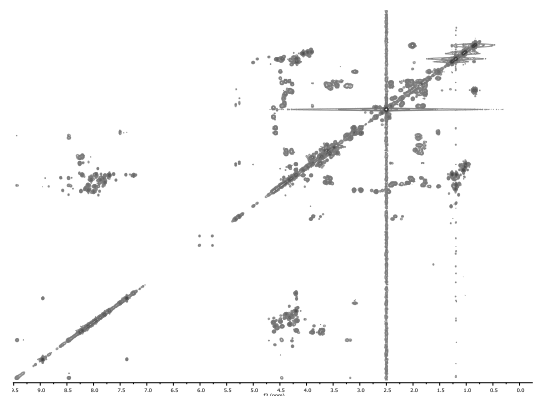


Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-cis-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (86)

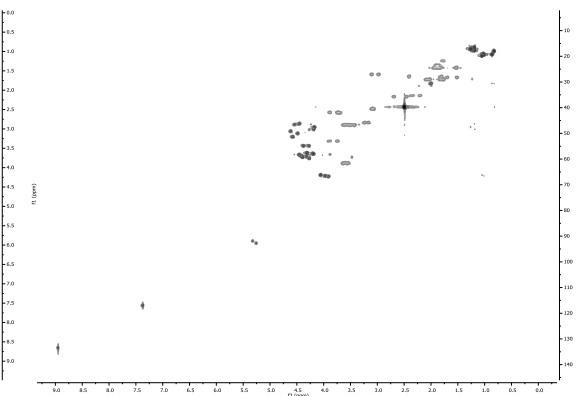
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



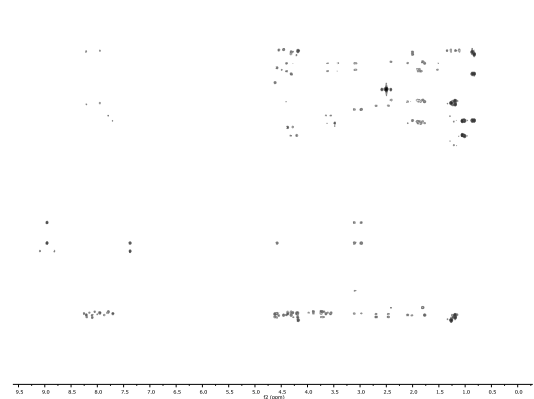
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



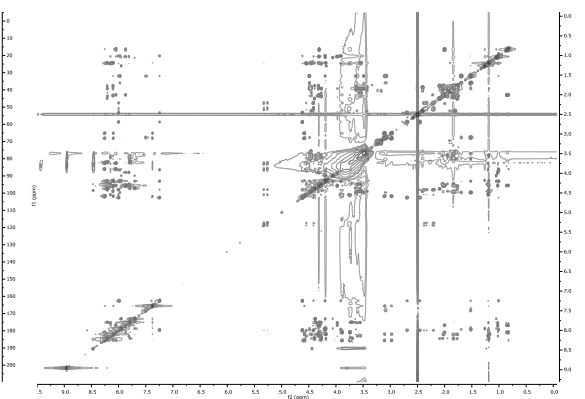
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):



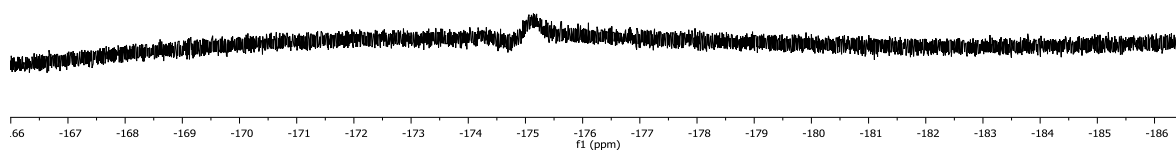
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):



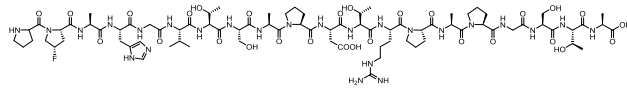
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



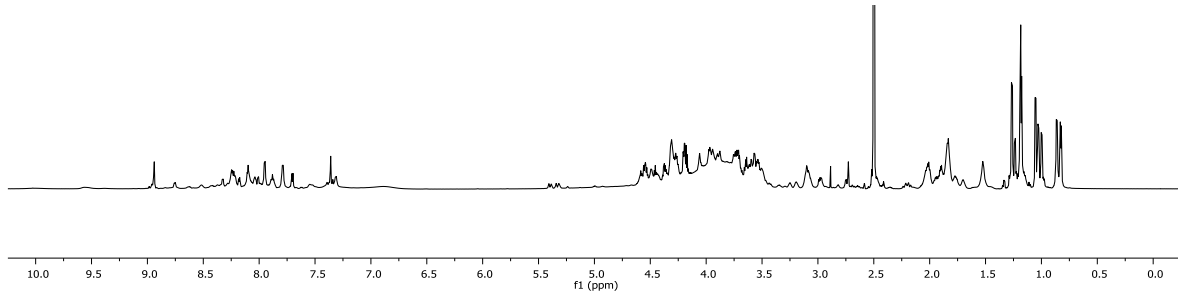
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (87)

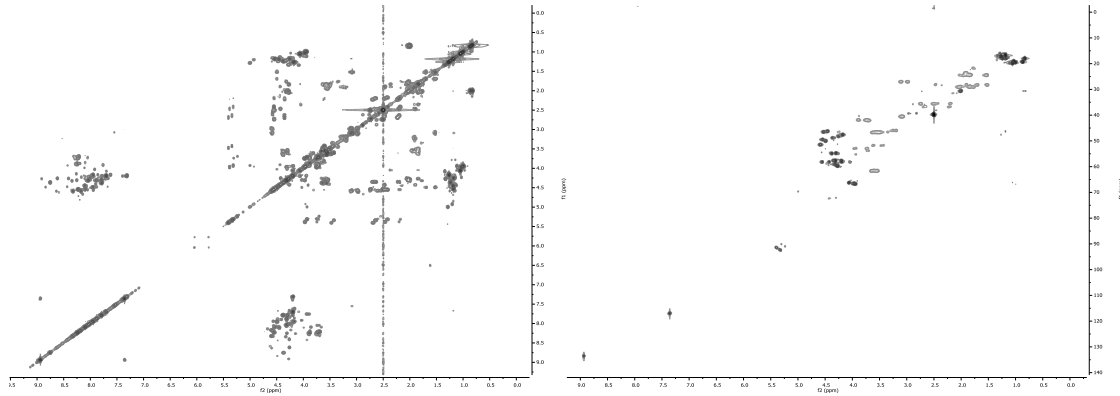


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



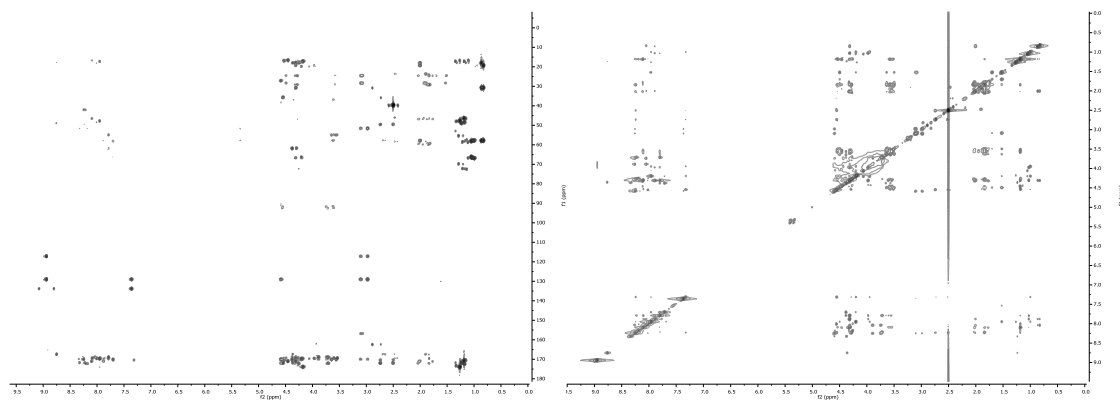
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):

$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):

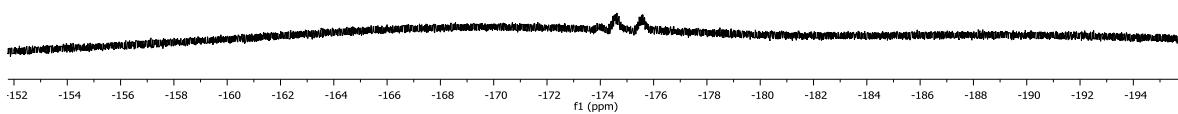


$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):

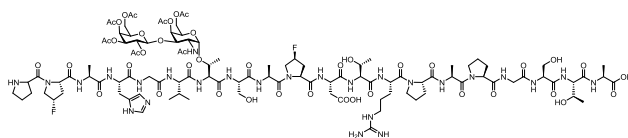
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



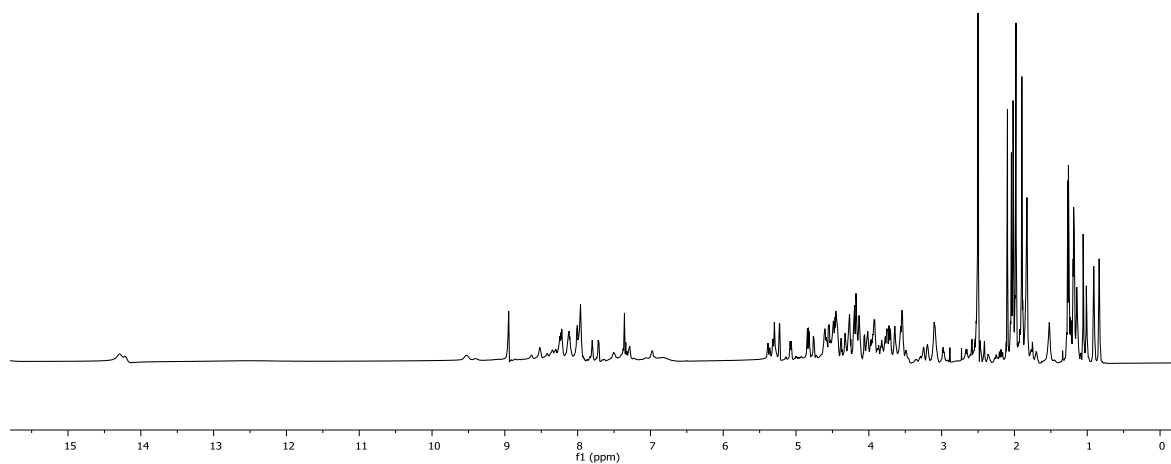
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



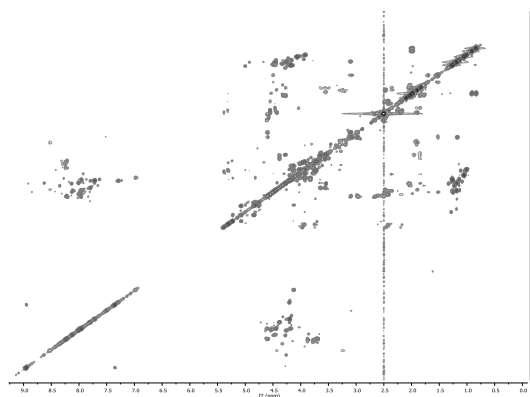
Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Ac₄Gal-(1 \rightarrow 3)- α -Ac₂GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (88)



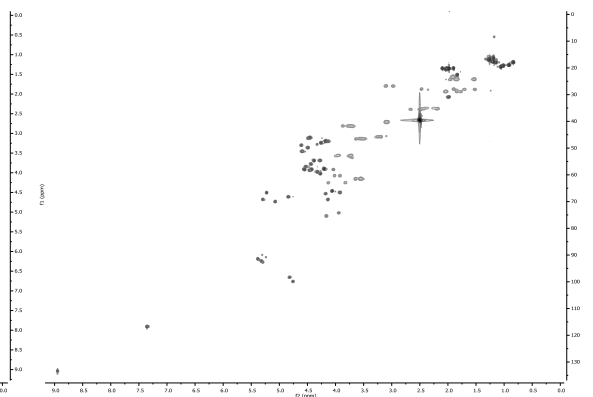
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆):



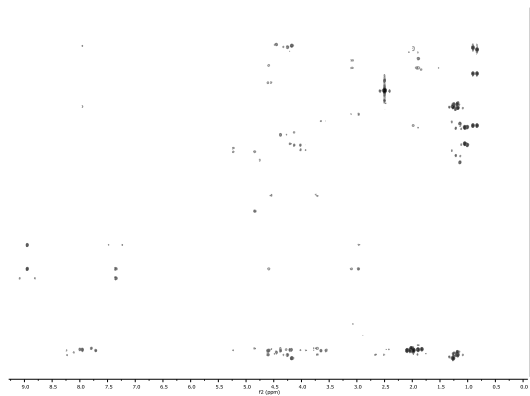
¹H-¹H-COSY (800 MHz, DMSO-D₆):



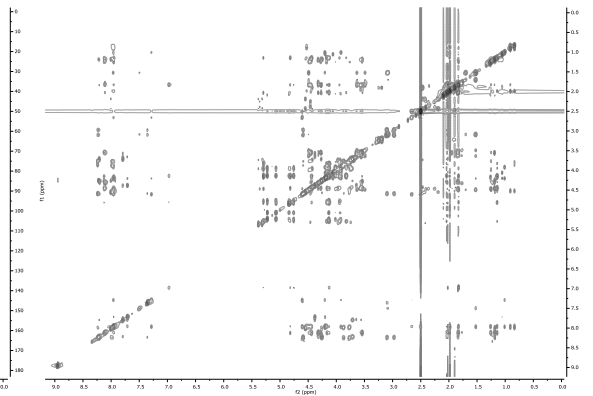
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, DMSO):



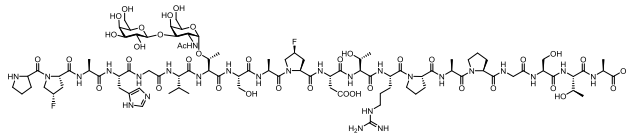
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, DMSO):



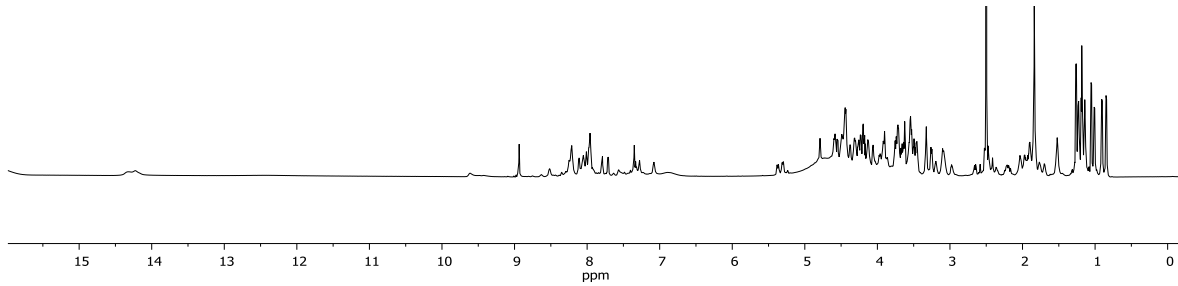
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, DMSO-D₆):



Pro-*cis*-4-F-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc)-Ser-Ala-*cis*-4-F-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (89)

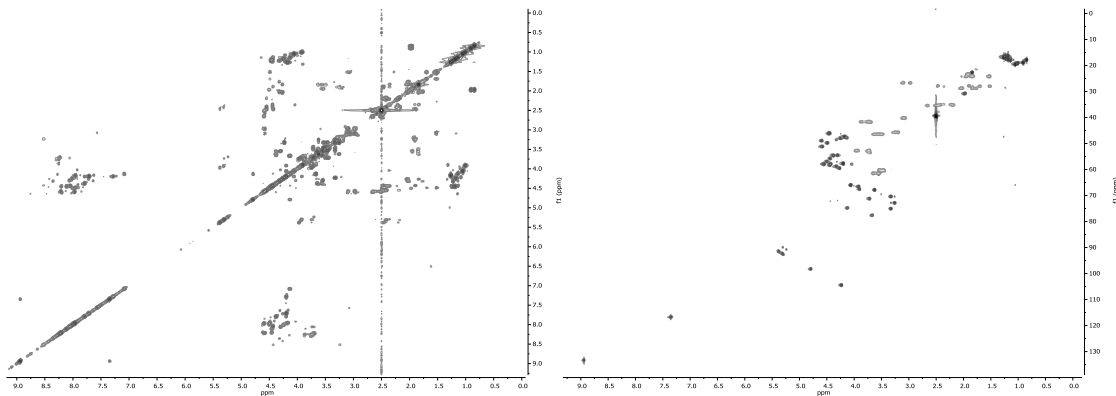


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



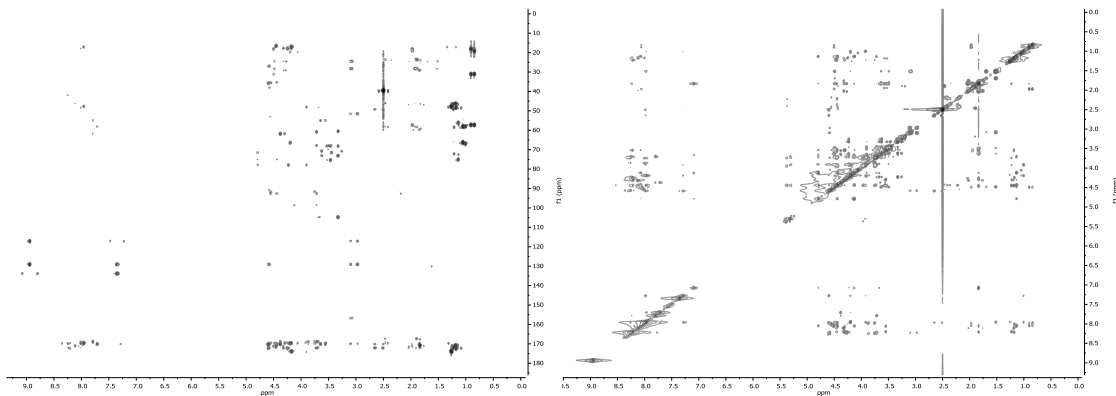
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):

$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):

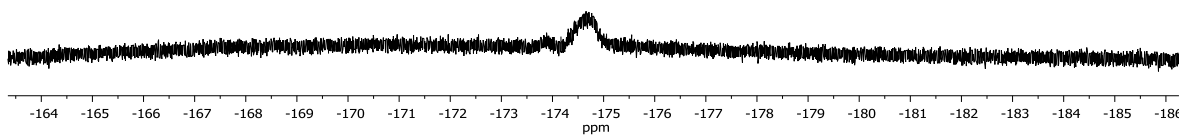


$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):

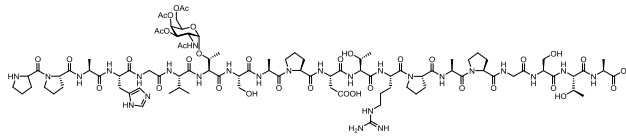
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



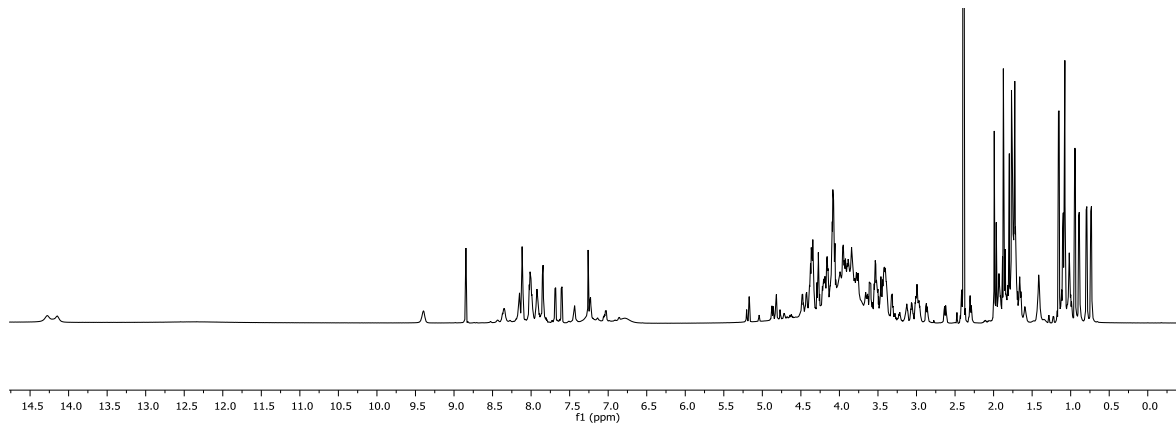
$^{19}\text{F-NMR}$ (280 MHz, DMSO):



Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (90)

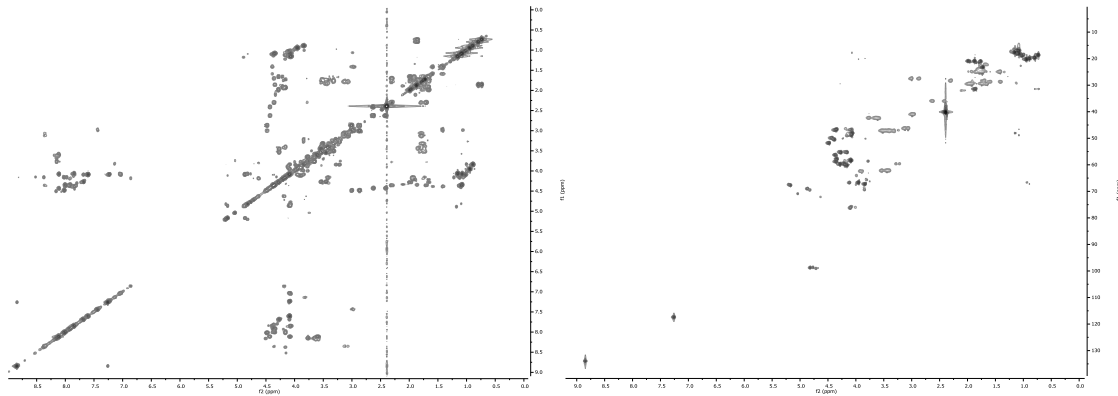


¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆):



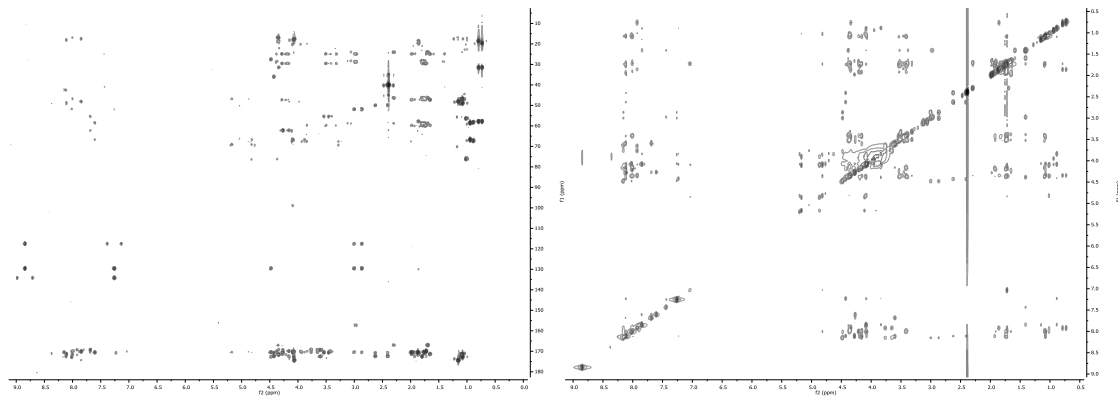
¹H-¹H-COSY (800 MHz, DMSO-D₆):

¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, DMSO):

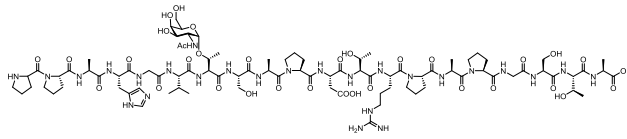


¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, DMSO):

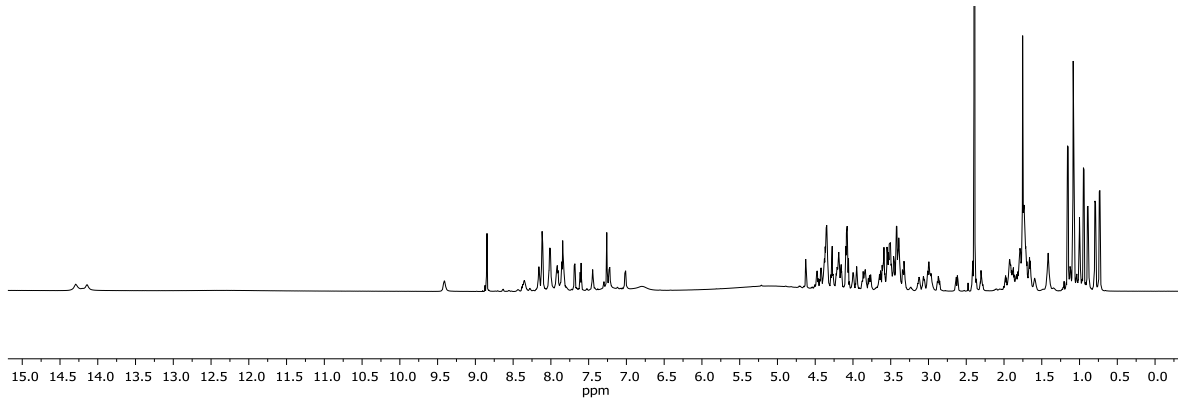
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, DMSO-D₆):



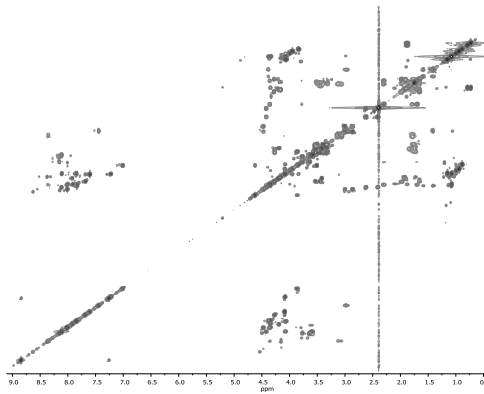
Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (94)



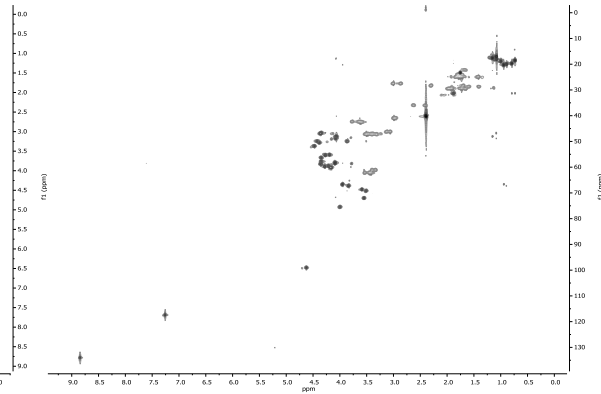
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



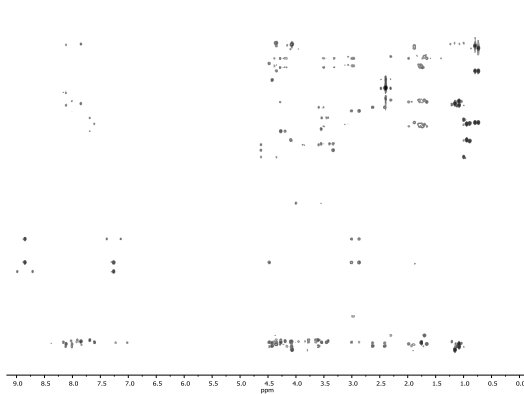
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



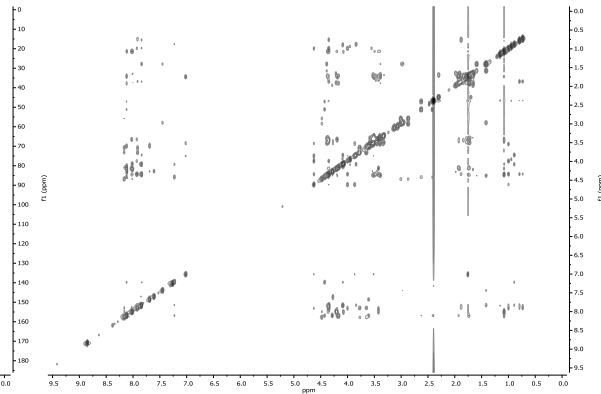
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):



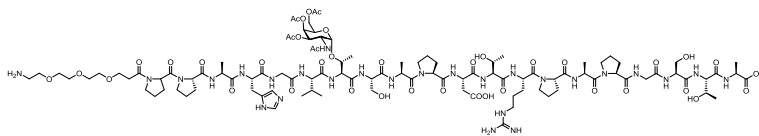
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):



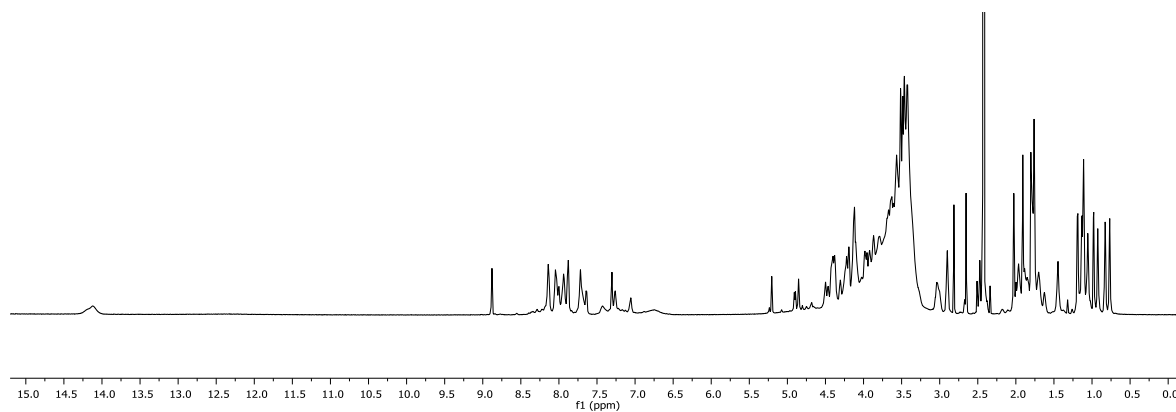
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



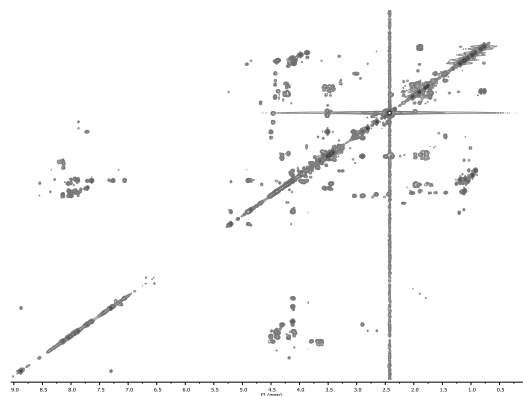
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -Ac₃GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (91)



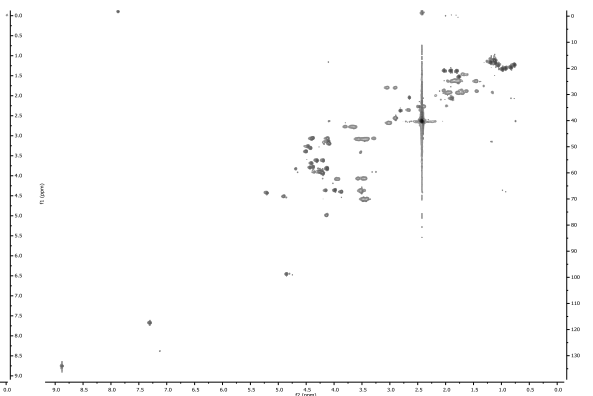
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆):



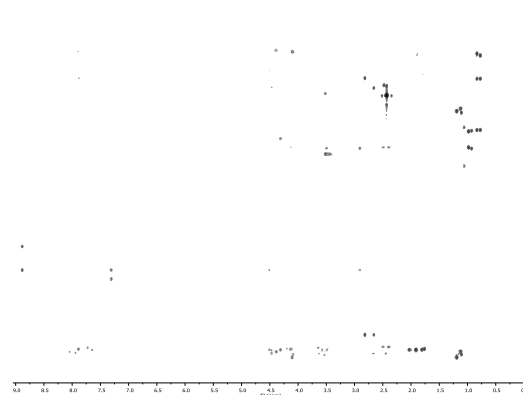
¹H-¹H-COSY (800 MHz, DMSO-D₆):



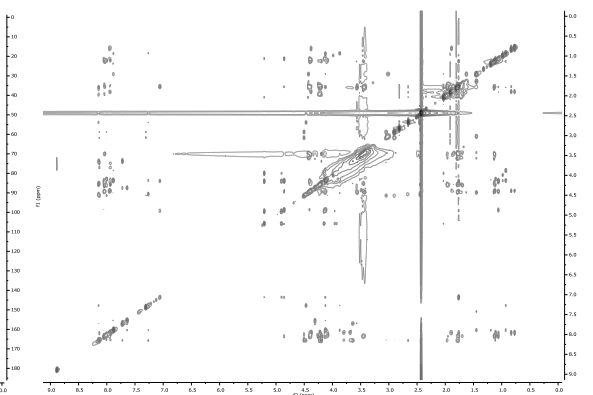
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, DMSO):



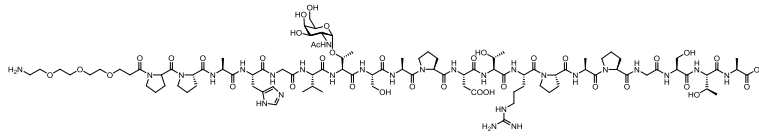
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, DMSO):



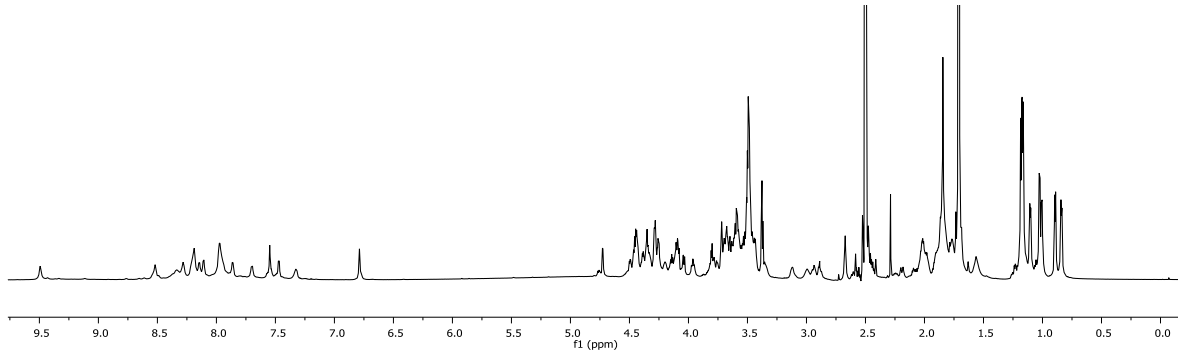
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, DMSO-D₆):



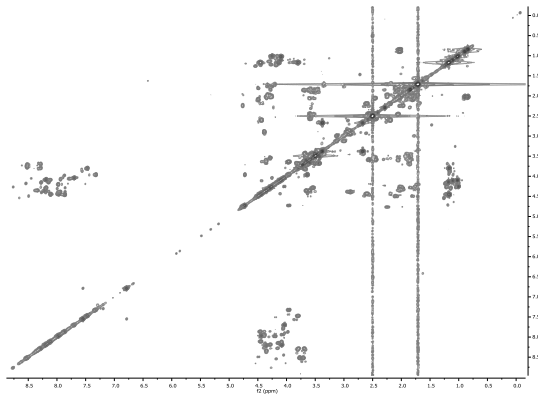
H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr(α -GalNAc)-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (95)



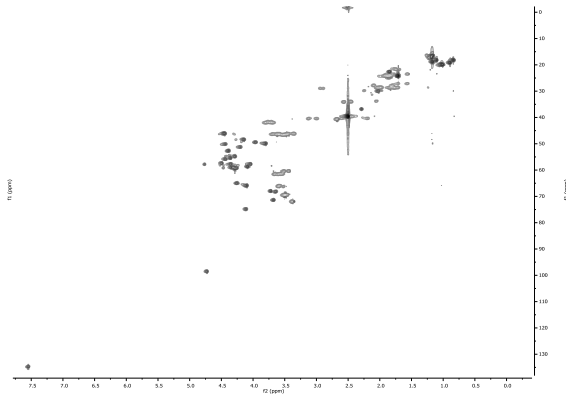
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆):



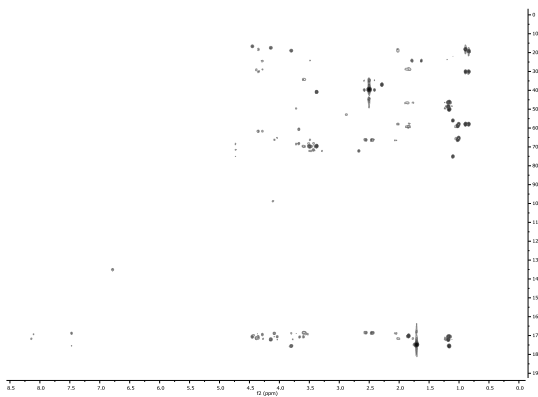
¹H-¹H-COSY (800 MHz, DMSO-D₆):



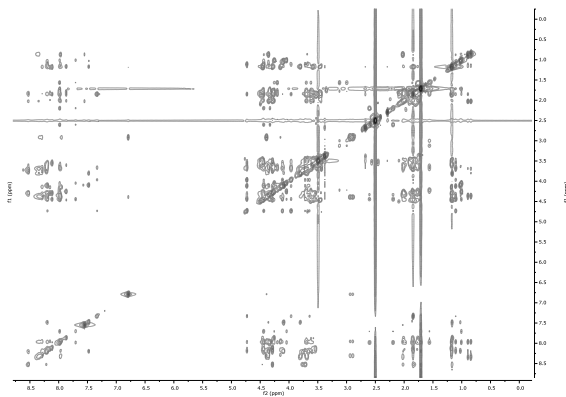
¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, DMSO):



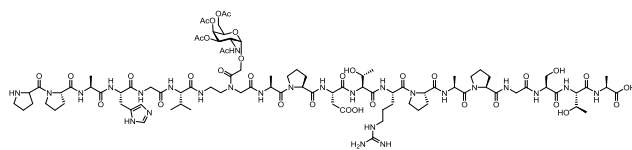
¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, DMSO):



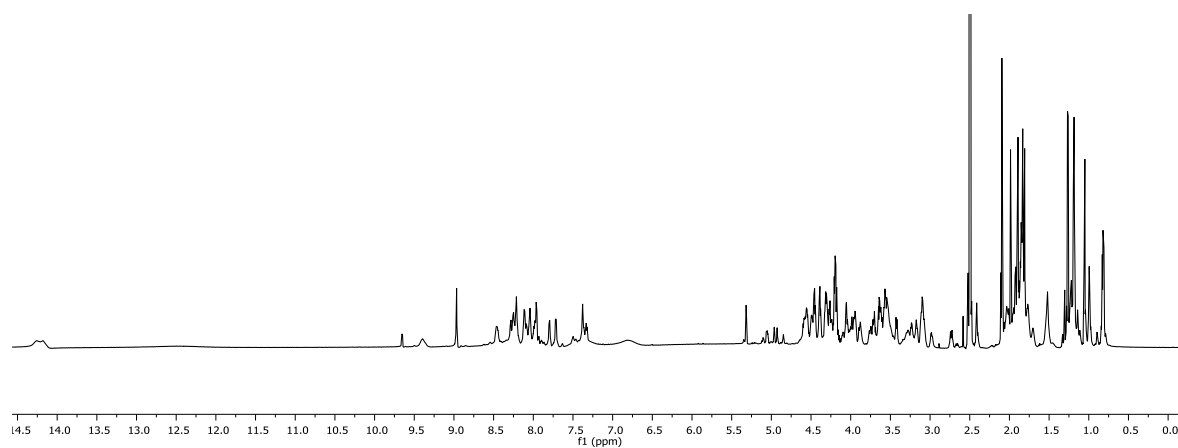
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, DMSO-D₆):



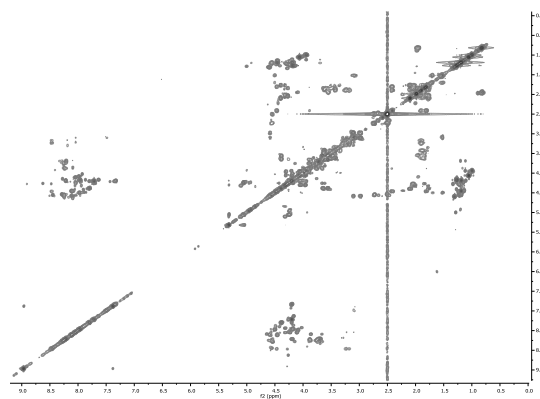
Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(α -AAT_NAc₃)Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (92)



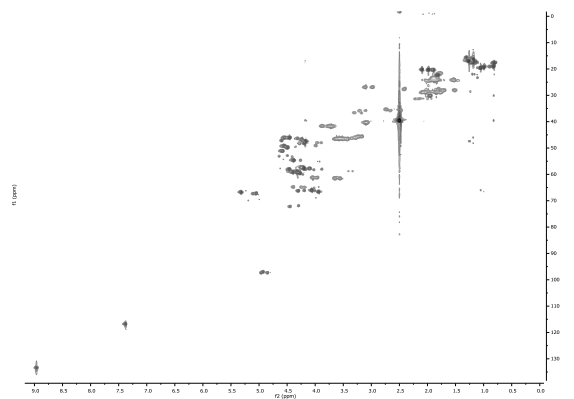
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO- D_6):



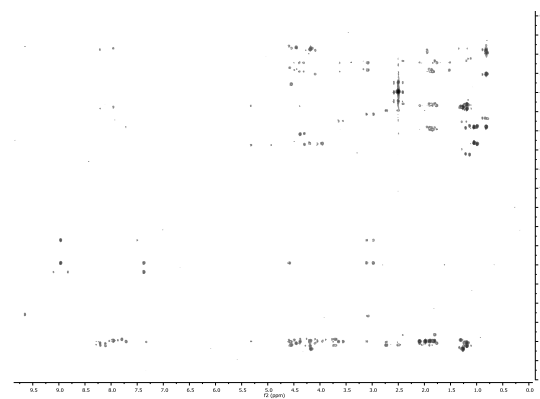
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO- D_6):



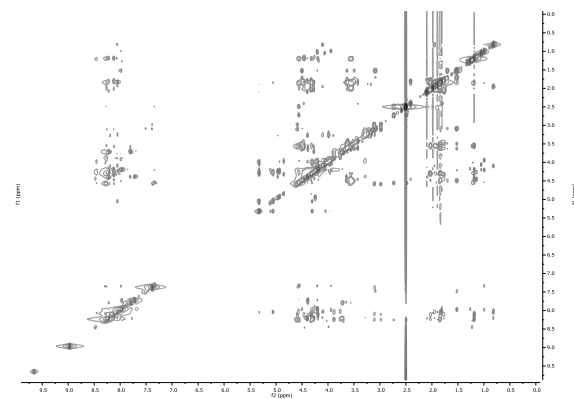
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):



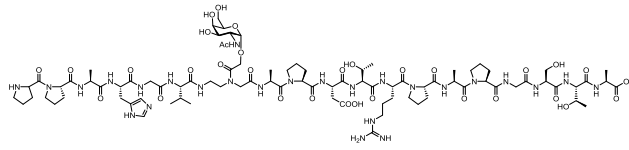
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):



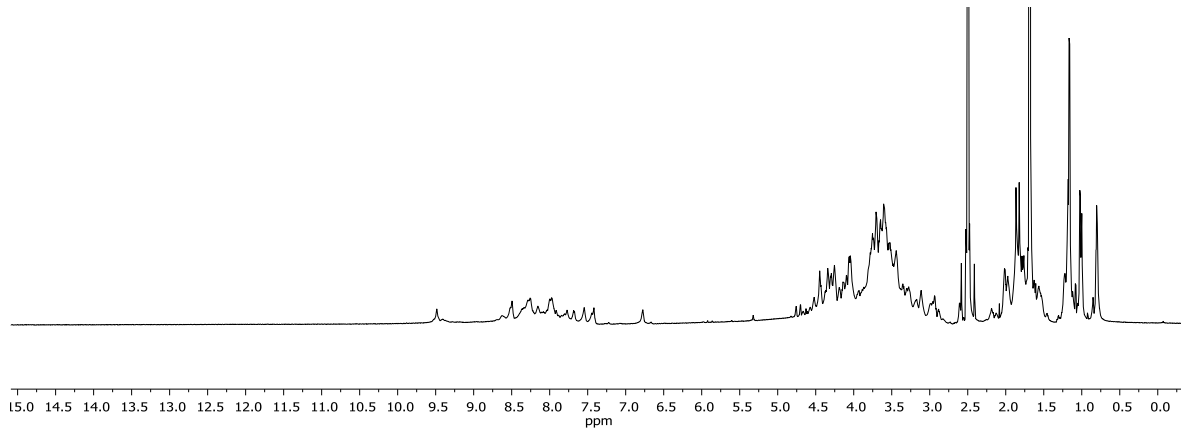
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO- D_6):



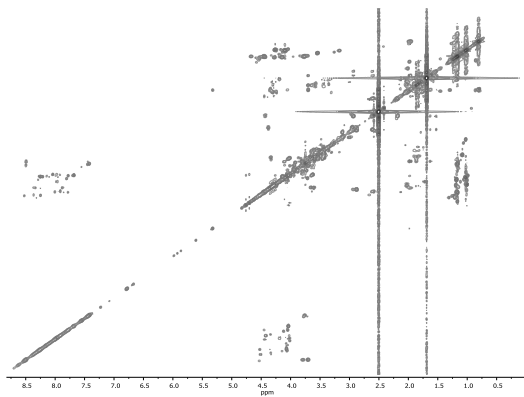
Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(α -AAT_N)Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (96)



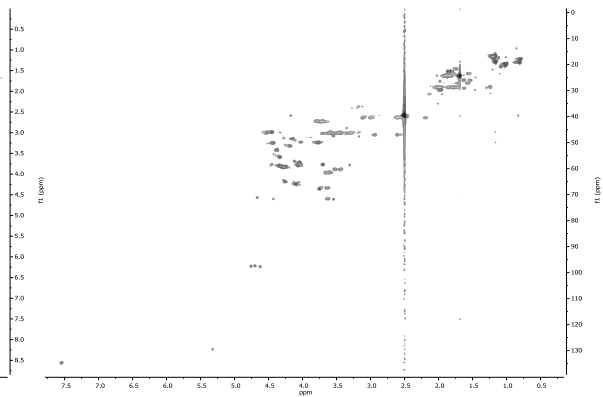
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO- D_6):



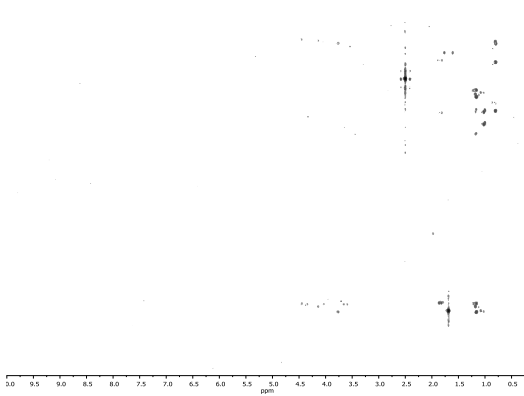
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO- D_6):



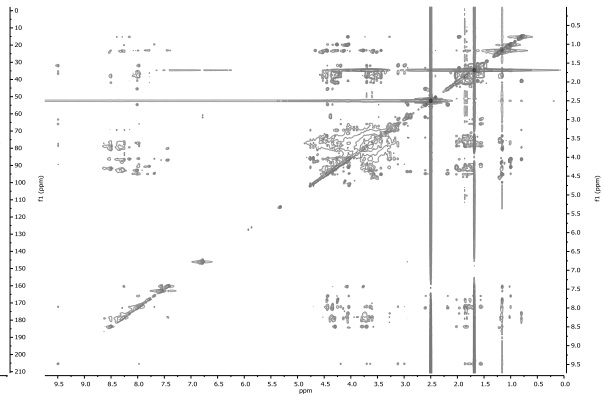
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):



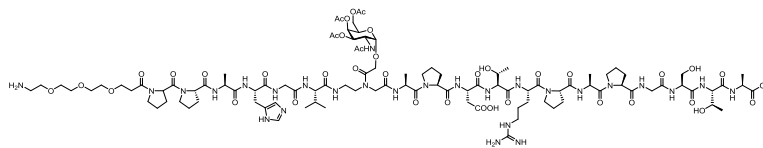
$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):



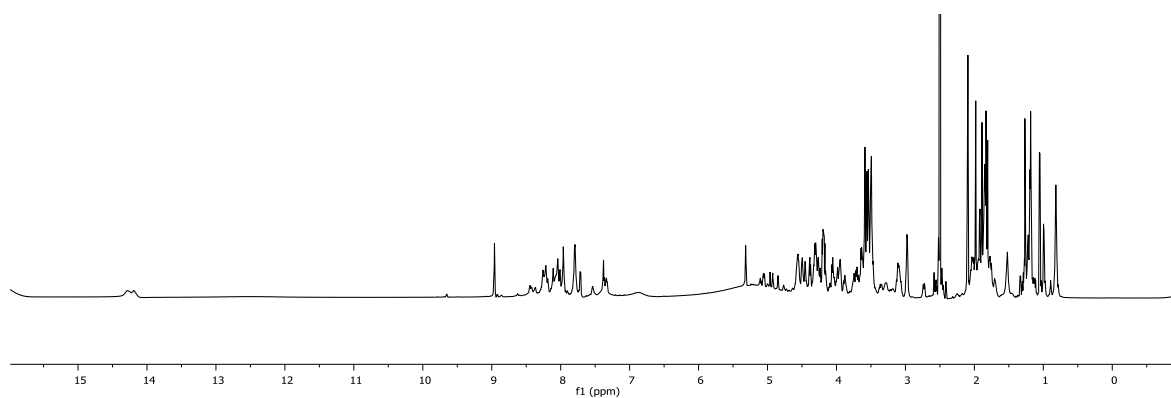
$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO- D_6):



H₂N(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-(α -AAT_NAc₃)Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (93)

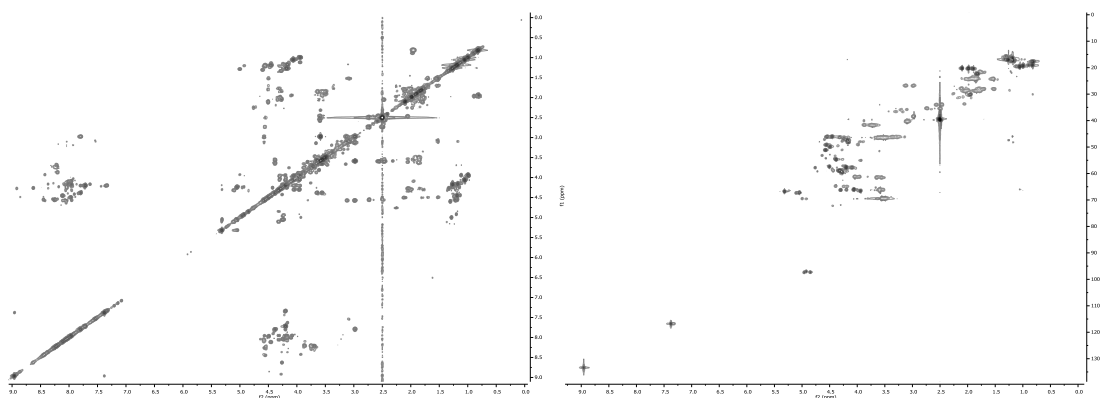


¹H-NMR (800 MHz, DMSO-D₆):



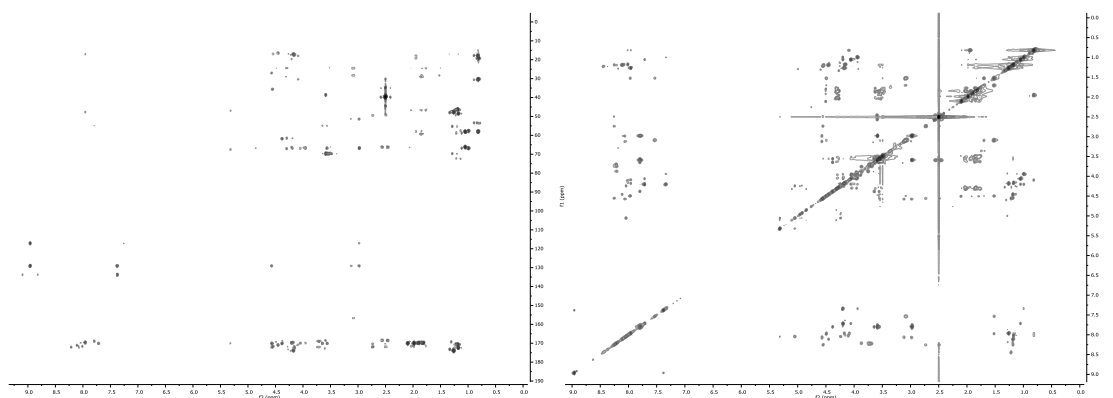
¹H-¹H-COSY (800 MHz, DMSO-D₆):

¹H-¹³C-HSQC (200 MHz, DMSO):

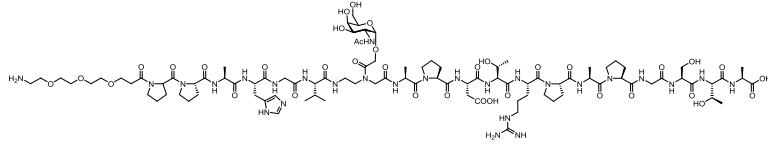


¹H-¹³C-HMBC (200 MHz, DMSO):

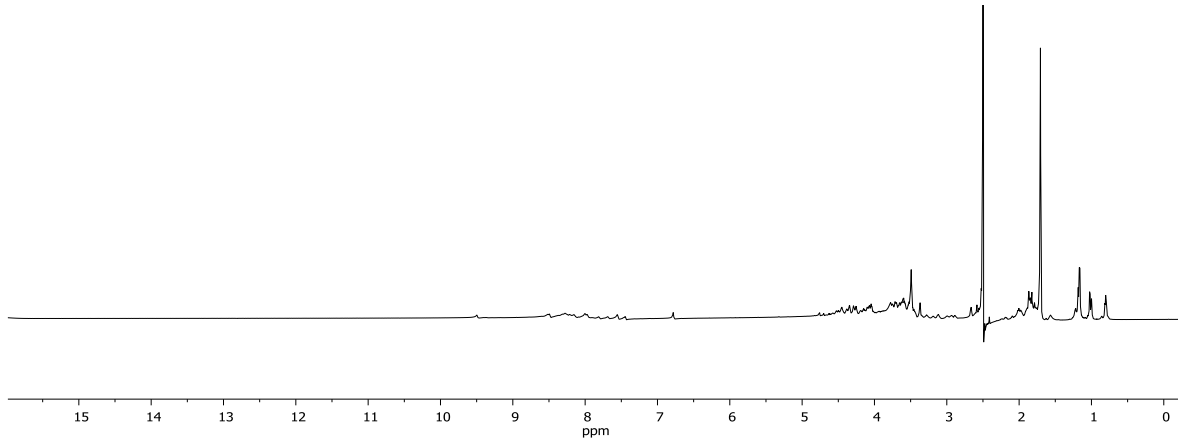
¹H-¹H-NOESY (800 MHz, DMSO-D₆):



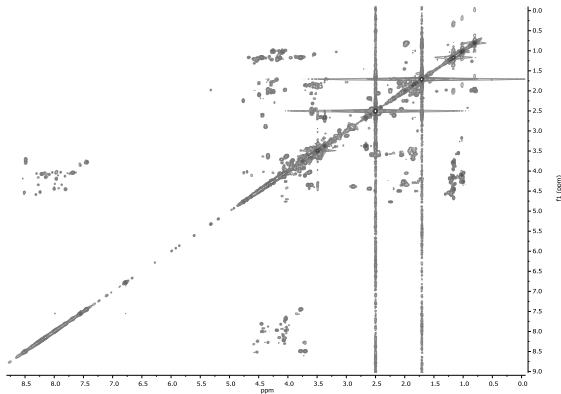
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-}(\alpha\text{-AAT}_N)\text{Gly-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-OH (97)}$



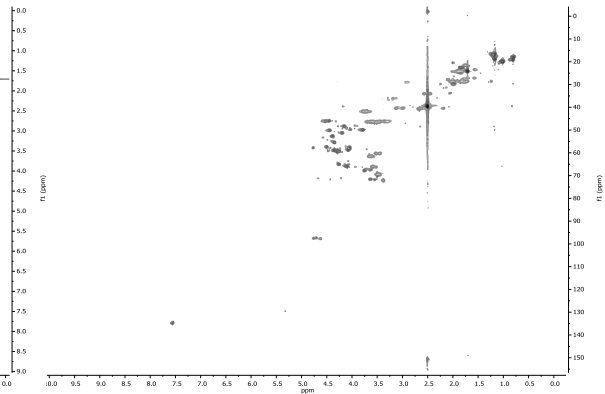
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



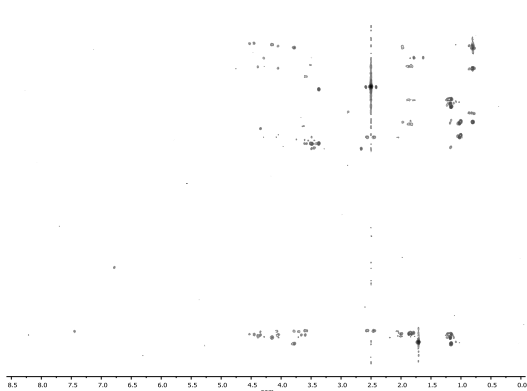
$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):



$^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ (200 MHz, DMSO):



$^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ (200 MHz, DMSO):



$^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ (800 MHz, DMSO-D_6):

